

Ispitivanje antibakterijskih svojstava etarskih ulja *Mentha longifolia* i *Mentha aquatica*

Antibakterijska svojstva etarskih ulja konjskog bosiljka (Mentha longifolia) i vodene nane (Mentha aquatica) ispitivana su na laboratorijskim sojevima bakterija Salmonella typhimurium, Escherichia coli K12, Escherichia coli SY252, Staphylococcus aureus i Listeria sp. Osetljivost sojeva na etarska ulja ispitivana su antibiogram testom i MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) testom. Antibiogram test je pokazao da etarsko ulje vodene nane ne ispoljava antibakterijska svojstva na testiranim sojevima. Sojevi koji su pokazali visok stepen osetljivosti na etarsko ulje konjskog bosiljka (Salmonella typhimurium, Escherichia coli K12 i Listeria sp.) podvrgnuti su MIK testu. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije etarskog ulja konjskog bosiljka bile su približno iste za sva tri soja i iznosile su 1.2 µL/mL za inhibitorne i 1.7 µL/mL za baktericidne koncentracije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se etarsko ulje konjskog bosiljka potencijalno može koristiti u terapiji infekcija, ali su potrebna dodatna istraživanja na ovom polju.

Uvod

Upotreba antibiotika pri lečenju bakterijskih infekcija često je povezana sa brojnim neželjenim posledicama, a jedna od njih je i pojava velikog broja mikroorganizama multirezistentnih na antibiotike. Zbog toga se moderna medicina sve više vraća upotrebi biljnih preparata u terapiji brojnih infekcija (Khan *et al.* 2009).

Rod *Mentha* obuhvata oko 25 kosmopolitski rasprostranjenih vrsta (Džamić *et al.* 2010). Lekovita svojstva biljaka iz ovog roda dobro su poznata i njihova zastupljenost u tradicionalnoj medicini brojnih naroda veoma je velika (Sujana *et al.* 2013). U narodnoj medicini korišćene su za terapiju bronhitisa, anoreksije, upala, čira, ali su takođe poznate po svojim analgetskim svojstvima (Džamić *et al.* 2010).

Neki patogeni (*Escherichia coli*, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*) koji se prenose putem hrane pokazali su osetljivost na etarsko ulje konjskog bosiljka. Zbog toga, osim u medicinske svrhe, etarsko ulje konjskog bosiljka (*Mentha longifolia*) se može koristiti kao prirodni konzervans (Gulluce *et al.* 2007).

Rađena su mnoga istraživanja čiji je cilj bio određivanje hemijskog sastava i antibakterijskih svojstava etarskih ulja vrsta iz roda *Mentha* i utvrđivanje mogućnosti primene tih ulja u komercijalne svrhe. Ova istraživanja su pokazala da etarsko ulje konjskog bosiljka ispoljava snažno antibakterijsko dejstvo na mnoge sojeve (Mendez-Vilas 2011).

Zbog potencijalnih toksičnih dejstava etarskih ulja na organizam pri upotrebi u visokim koncentracijama, potrebno je odrediti minimalnu inhibitornu (MIK) i minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK) ovih supstanci. Na taj način se može izbeći rizik od toksičnih efekata (EUCAST 2000).

Cilj ovog rada je ispitivanje antibakterijskih svojstava etarskih ulja vodene nane i konjskog bosiljka i stepena osetljivosti bakterijskih sojeva korišćenih u istraživanju (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* SY252, *Staphylococcus aureus* i *Listeria* sp.).

Jovan Raketić (1996), Čačak, Kulinovačko polje 121/4, učenik 2. razreda Gimnazije u Čačku

MENTORI:

Marjan Biočanin, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Boris Popović, student Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Materijal i metode

U ovom istraživanju su korišćene dve vrste iz roda *Mentha*, konjski bosiljak (*Mentha longifolia*) i vodena nana (*Mentha aquatica*). Biljni materijal je sakupljen u blizini Petničkog jezera početkom jula 2013. godine. Biljke su pažljivo očišćene od nečistoća i tragova drugih biljnih vrsta. Biljni materijal je sušen preko noći na temperaturi od 60°C (Kafaru 1994). Listovi osušanih biljaka su odvojeni od stabla, usitnjeni i sprášeni u porcelanskom avanu. Sprášeni listovi su stavljeni u balone od po 500 mL (po 150 g u svaki) i preliveni sa 250 mL vode. Ekstrakcija etarskog ulja vršena je aparaturom po Ungeru. Nakon sedmočasovne ekstrakcije dobijeno je 0.9 mL ulja konjskog bosiljka i 0.45 mL ulja vodene nane. Ulja su do upotrebe čuvana u staklenim bočicama na temperaturi od 4°C.

Priprema bakterijskog inokuluma. Prekonoćne kulture sojeva korišćenih u eksperimentima (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* SY252, *Staphylococcus aureus* i *Listeria* sp.) zasejane su u LB medijum (Knežević-Vukčević i Simić 1997). U sterilne epruvete odliveno je po 3 mL LB-a, a sojevi su presejani sa čvrste podloge. Pripremljeni inokulumi inkubirani su 8 sati na 37°C. Korišćeni su sojevi iz kolekcije Odeljenja za biologiju ISP, čuvani na NA podlozi.

Antibiogram test je postavljen na LA podlozi (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Na podlogu je zasejano 50 µL bakterijske suspenzije i postavljeni su sterilni diskovi filter papira (promera 6 mm) prethodno natopljeni sa po 10 µL rastvora etarskih ulja konjskog bosiljka i vodene nane u 30% alkoholu (koncentracija 3.33 µL/mL), jedan sa 10 µL rastvarača i jedan prazan disk kao kontrola sterilnosti. Osim diskova filter papira postavljeni su i diskovi sa antibiotikom (Vankomicin i Cephpodoksin) kao pozitivna kontrola. Petrijeve šolje su nakon toga inkubirane 24 h na 37°C pre očitavanja rezultata.

MIK test. Minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija su određene mikrodilucionom metodom. Minimalna inhibitorna koncentracija je najmanja koncentracija ispitivane supstance koja sprečava razvoj bakterija (MIK), dok je minimalna baktericidna koncentracija najmanja koncentracija ispitivane sup-

stance koja u potpunosti ubija bakterije (MBK). Rastvor etarskog ulja pripremljen je u 30% etanolu. Početna koncentracija rastvora etarskog ulja i antibiotika (gentamicin) je 33.3 µL/mL. U mikrotitar ploči sa 96 polja pripremljen je niz dvostrukih razblaženja etarskog ulja i antibiotika, tako da zapremina rastvora u svakom polju iznosi 100 µL. Nakon toga je dodato 80 µL LB podloge i 20 µL bakterijske suspenzije koncentracije 106 CFU/mL (CFU- colony forming units), čime je koncentracija etarskog ulja i antibiotika smanjena još dva puta. Opseg koncentracija etarskog ulja i antibiotika nakon postavljanja testa iznosio je od 0.05 µL/mL do 1.7 µL/mL. Isti postupak je ponovljen za svaki ispitivani soj. Osim testirane supstance i pozitivne kontrole postavljena je i negativna kontrola i blank kao kontrola sterilnosti. Mikrotitar ploča je inkubirana 24 h na 37°C. Posle inkubacije dodata je boja rezazurin kao indikator. Rezultati MIK testa su očitavani na osnovu promene boje indikatora. Koncentracija ispitivane supstance koja se nalazila u poslednjem polju u nizu u kom nije došlo do promene boje indikatora proglašavana je MBK-om. Ako u narednom polju indikator nije u potpunosti promenio boju ta koncentracija je proglašavana MIK-om.

Rezultati i diskusija

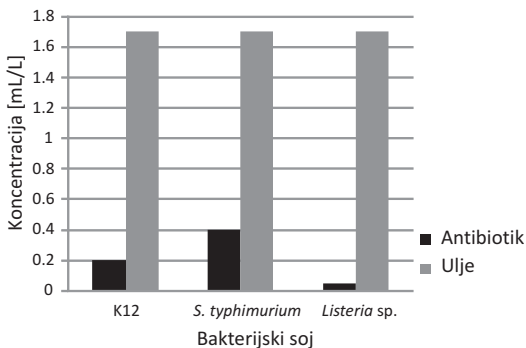
Rezultati antibiogram testa dobijeni su merenjem zone inhibicije oko diskova sa ispitivanom supstancom. Rezultati ukazuju na to da etarsko ulje vodene nane ne ispoljava antibakterijska svojstva na ispitivane sojeve. Zbog toga etarsko ulje ove biljke nije bilo podvrgnuto daljim ispitivanjima. Etarsko ulje konjskog bosiljka je za razliku od ulja vodene nane pokazalo izražena antibakterijska svojstva. U nekim slučajevima etarsko ulje konjskog bosiljka stvorilo je veću zonu inhibicije od antibiotika koji su korišćeni kao pozitivna kontrola (Vankomicin i Cephpodoksin) (tabela 1). Prema literaturi (Mendez-Vilas 2011), etarska ulja i ekstrakti biljaka ispoljavaju jača antibakterijska svojstva na Gram pozitivnim bakterijama nego na Gram negativnim. Međutim, rezultati našeg istraživanja pokazuju da etarsko ulje konjskog bosiljka ispoljava jaka antibakterijska svojstva i na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije. Kao i

Tabela 1. Prikaz prečnika zona inhibicije dobijenih očitavanjem rezultata antibiogram testa. Prečnik zone inhibicije prikazan u milimetrima.

Testirana supstanca	Prečnik zone inhibicije (mm)				
	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> SY252	<i>Listeria</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>M. aquatica</i>	-	-	-	-	-
<i>M. longifolia</i>	15.5	15	14	-	15
Cephpodoksin	18	14	-	16	16
Vankomicin	-	-	12	13	-
Negativna kontrola	-	-	-	-	-
Rastvarač	-	-	-	-	-

Nema inhibitorne koncentracije (-)

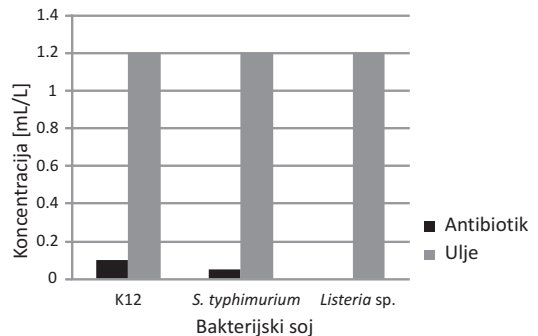
naše, i druga istraživanja (Mendez-Vilas 2011) pokazuju da ulje konjskog bosiljka stvara iste ili veće zone inhibicije od antibiotika korišćenih kao pozitivna kontrola, čak i pri veoma niskim koncentracijama. Izražena antibakterijska svojstva ovih ulja koja se ispoljavaju čak i pri niskim koncentracijama mogu se objasniti visokim procentom cis-piperiton epoksida, piperitenon oksida, pulegona i piperitenona u ovom ulju. Novija istraživanja su pokazala da postoji jaka povezanost između supstanci od kojih se sastoji ulje konjskog bosiljka i antibakterijskih svojstava (Mendez-Vilas 2011).



Slika 1. Minimalna baktericidna koncentracija antibiotika (hlorheksidin) i etarskog ulja konjskog bosiljka dobijena MIK testom izražena u µL/mL.

Figure 1. Minimal bactericidal concentration of antibiotic (black) and *Mentha longifolia* (gray), given in µL/mL

Rezultati MIK testa su očitavani na osnovu promene boje indikatora (rezazurin). Koncentracija ispitivane supstance koja se nalazila u poslednjem polju u nizu u kojem nije došlo do promene boje indikatora proglašavana je MBK-om (slika 2). Koncentracija koja je u potpunosti sprečila razvoj bakterija iznosila je 1.7 µL/mL za sva tri soja. Ako u narednom polju indikator nije u potpunosti promenio boju ta koncentracija je proglašavana MIK-om (slika 1). MIK za sva tri soja (*E. coli* K12, *Listeria* sp. i *S. typhimurium*) iznosi 1.2 µL/mL. Osim toga na slikama 1 i 2



Slika 2. Minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika (hlorheksidin) i etarskog ulja konjskog bosiljka dobijena MIK testom izražena u µL/mL.

Figure 2. Minimal inhibitory concentration of antibiotic (black) and *Mentha longifolia* (gray) given in (µL/mL)

može se videti da su MIK i MBK antibiotika (hlorheksidina) daleko manje od MIK i MBK etarskih ulja. Međutim MIK kod soja *S. typhimurium* je četiri puta manja od MBK, dok se MIK i MBK ulja kod istog soja razlikuju za približno jednu trećinu. Slični rezultati su dobijeni i sa drugim sojevima, ali su sabije izraženi.

Zaključak

Testirani bakterijski sojevi – *E. coli* K12, *S. typhimurium* i *Listeria* sp. su pokazali visok stepen osetljivosti na etarsko ulje konjskog bosiljka (*Mentha longifolia*). Ulje konjskog bosiljka je svoja antibakterijska svojstva ispoljilo i na gram pozitivnim i na gram negativnim sojevima, što je takođe vrlo dobar rezultat. Ovo ulje se potencijalno može koristiti u terapiji i prevenciji infekcija izazvanih ovim sojevima, ali su potrebna dalja istraživanja na ovom polju. Posebno interesantna bi mogla biti ona istraživanja koja bi uključila izolaciju aktivnih supstanci iz ulja (cis-piperiton epoksida, piperitenon oksida, pulegona, piperitenona, itd.) i ispitivanjem pojedinačnog i kombinovanog delovanja ovih supstanci na mikroorganizme. Nasuprot tome etarsko ulje vodene nane nije ispoljilo antibakterijska svojstva i samim tim nije određivana minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija.

Literatura

Džamić A. M., Soković M. D., Ristić M. S., Novaković M., Grujić-Jovanović S., Tešević V., Marin P. D. 2010. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Luminaceae) essential oil. *Botanica Serbica*, **34** (1): 57.

EUCAST 2000. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents; EUCAST DEFINITE DOCUMENT E.def 1.2, 2000.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. spp. *Longifolia. Food Chemistry*, **4**: 1449.

Kafaru E. 1994. Immense help formative workshop. U: *Essential pharmacology*. Lagos: Elizabeth Kafaru Publishers, str. 11-14.

Khan R., Islam B., Akram M., Shakil S., Ahmad A., Ali S., Siddiqui M., Khan A. 2009. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. *Molecules*, **14** (2): 586.

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Mendez-Vilas A. 2011. *Microbes in Applied Research*. Malaga: Formatex Research Center

Sujana P., Sridhar M. T., Josthna P., Naidu C. V. 2013. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint) – An Important Medicinal Plant. *American Journal of Plant Science*, **4**: 77-83

Jovan Rakezić

Antibacterial Properties of *Mentha longifolia* and *Mentha aquatica* Essential Oils

Antibacterial properties of *Mentha longifolia* and *Mentha aquatica* essential oils were tested against laboratory strains (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* SY252, *Staphylococcus aureus* and *Listeria* sp) from Petnica Science Center's biology department. The strains' susceptibilities to essential oils were determined by the disk diffusion and the microdilution method.

The results of the disk diffusion test showed that the *Mentha aquatica* essential oil does not

possess any antibacterial properties against strains used in this research. On the other hand, the same test showed that the *Mentha longifolia* essential oil expresses strong antibacterial properties against some strains (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12 and *Listeria* sp). These strains were then used in the microdilution test. The minimal inhibitory and the minimal bactericidal concentrations of the *Mentha longifolia* essential oil were approximately the same for all three strains (MIC \approx 1.2 μ L/mL and MBC \approx 1.7 μ L/mL). Based on these results it can be concluded that the *Mentha longifolia* essential oil can potentially be used in treatment of infections, but further research is definitely required. 