

ANTIMIKROBNA SVOJSTVA EKSTRAKTA PLODA I LISTA BOROVNICE, BRUSNICE I ARONIJE

*Aida Halilović¹, Snježana Hodžić², Amela Hercegovac², Sanida Osmanović²,
Darja Husejinagić², Emina Mešikić², Vildana Hadžić³*

Izvod: Obzirom na nepoželjne posljedice primjene sintetskih antibiotika, kao i porast bakterijske rezistencije prema njima svrha ovog rada je promocija antimikrobne učinkovitosti bobičastih vrsta sa ciljem racionalizacije upotrebe antibiotika. U ovom istraživanju smo ispitivali antimikrobni učinak ekstrakata iz plodova i listova borovnice, brusnice i aronije. Korišten je disk difuzijski metod po Kirby Baueru. Najizraženiji antimikrobni učinak od ispitivanih plodova posjeduje plod borovnice, a od listova list brusnice. Ekstrakti iz aronije iskazuju slabu antimikrobnu aktivnost. Bobičaste vrste su antimikrobno djelotvornije prema Gramm pozitivnim bakterijama u odnosu na Gramm negativne.

Ključne reči: borovnica, brusnica, aronija, antimikrobna aktivnost, rezistencija

Uvod

Bobičaste vrste su riznica nutrijenata i farmakološki aktivnih supstanci. U funkcionalnom pogledu su najvažnija fenolna jedinjenja: fenolne kiseline, lignani, stilbeni, flavonoidi i fenolni polimerni tanini. Dokazana su pozitivna dejstva bobičastih vrsta na imunološki sistem, kroz antioksidativni, radioprotektivni, helacijski, protuupalni, antimikrobni učinak, regulaciju metabolizma, kao i njihovo antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Đilas i sar., 2010.). Mehanizmi antimikrobnog djelovanja fenola iz bobičastog voća su: destabilizacija, dezintegracija i poremećaj permeabiliteta bakterijske opne, onemogućavanje bakterija da koriste hranjivo iz medija, inhibiranje bakterijskog metabolizma, rasta, te antiadhezivno djelovanje (Puupponen-Pimia i sar., 2005.). Učinkovitost sintetskih antibiotika je sve više ugrožena razvojem bakterijske rezistencije koja je rezultat njihove prekomjerne i neprimjerene primjene. Nepoželjne popratne pojave primjene antibiotika se odnose i na remećenje prirodnog imunog odgovora, narušavanje normalne mikroflore, otežavanje apsorpcije hranjivih tvari, te pojavu alergijskih i organskih komplikacija (Skupnjak i sar., 1975.). Dobre strane korištenja biljaka sa antimikrobnim učinkom se odnose na izostanak štetnih posljedica i činjenicu da njihova primjena ne dovodi do razvoja bakterijske rezistencije.

¹ Univerzitet u Bihaću, Pedagoški fakultet, Luke Marjanovića, 77 000 Bihać, Bosna i Hercegovina (aida.halilovic7@gmail.com)

² Univerzitet u Tuzli, Prirodno – matematički fakultat, Univerzitetska 4, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina (snjezana.hodzic@untz.ba)

³ Bolnica za respiratorne bolesti i TBC, Bašbunar 5, 72270 Travnik, Bosna i Hercegovina

Materijal i metode rada

Istraživanje je provedeno u Laboratoriji za mikrobiologiju i genetiku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Tuzli na plodovima i listovima borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), brusnice (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) i aronije (*Aronia melanocarpa* [Michx.](#) [Elliott](#)), prikupljenih tokom 2015. godine na području sjeverozapadne Bosne.

Antimikrobna aktivnost je ispitana na tri Gramm pozitivna: *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 i dva Gramm negativna bakterijska soja: *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, iz kolekcije Laboratorije za mikrobiologiju i genetiku, PMF-a, Univerziteta u Tuzli.

Prašasti biljni material (10 g) je otopljen u 50 ml metanola (99,8%). Dobijeni rastvor je podvrgnut djelovanju ultrazvuka (*UZV Bandelin RK 100H*), frekvencije od 35 kHz / 20 min. Nakon UZV je izvršeno filtriranje. Filtrat je ostavljen na zraku da isparava (72 h) pri čemu je uklonjen metanol, a zatim je dodano po 5 ml sterilne destilovane vode. Ekstrakti su čuvani u sterilnim staklenim bočicama u frižideru. Vrijednosti masenih udjela biljnih ekstrakata su sljedeće: borovnica list 11%, borovnica plod 38 %, aronija plod 37%, aronija list 22%, brusnica plod 53% i brusnica list 19%.

Za određivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva na dejstvo biljnih ekstrakata korišten je disk difuzijski test po *Kirby Bauera* (Bauer i sar, 1966). Gustina bakterija u inokulumu se usklađivala sa 0,5 *Mc Farlandovim* standardom da bi se dobio semikonfluentan porast bakterija na *Muller Hinton agru* (MHA). U Petrijevim posudama sa inokuliranim MHA su napravljeni bunarčići promjera 6 mm u koje se mikropipetom dodavalo po 50 µl testiranog biljnog ekstrakta te su inkubirane na 37°C / 24 h. Izostanak bakterijskog rasta oko bunarčića sa ekstraktom se naziva zona inhibicije, čiji se prečnik mjeri u mm pomoću lenijara. Kriteriji za ocjenjivanje antimikrobne vrijednosti biljnih ekstrakata predviđaju da zona inhibicije manja od 10 mm označava neosjetljivost bakterije na taj ekstrakt, od 10 do 15 mm slabu, od 16 do 20 mm umjerenu, te zona inhibicije veća od 20 mm označava izraženu antimikrobnu aktivnost datog ekstrakta (Pirvu i sar., 2014.).

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da obična borovnica ispoljava antimikrobnu aktivnost prema svim ispitivanim bakterijskim sojevima. Izraženiju antimikrobnu aktivnost posjeduje plod u odnosu na list ove biljke. Plod borovnice iskazuje veću antimikrobnu aktivnost prema Gramm pozitivnim bakterijama (vrijednosti zona inhibicije su: *Listeria monocytogenes* 25 mm, *Enterococcus faecalis* 22 mm, *Staphylococcus aureus* 20 mm) u odnosu na Gramm negativne (vrijednosti zona inhibicije su: *Escherichia coli* 13 mm, *Salmonella eneteritidis* 12 mm). Slične rezultate su dobili naučnici u Litvaniji ispitujući antimikrobnu aktivnost divlje borovnice i njenih sorti na Gramm pozitivne bakterije. Ovi autori su utvrdili da borovnica prema *Listeria monocytogenes* ostvaruje inhibicionu zonu do 20 mm, dok je osjetljivost *Staphylococcus aureus* prema borovnici iskazana kroz inhibicionu zonu do 18 mm (Burdulis i sar., 2009.).

Efikasnost protiv meticilin rezistentnog stafilokoka (*MRSA*) je potvrđena sa *MIK* (minimalna inhibitorna koncentracija) vrijednošću od 1,2 mg/ml (Wing-kwan i sar., 2011). Vučić i saradnici (2013.) su utvrdili da antimikrobna aktivnosti ploda borovnice prema *Enterococcus faecalis* iskazana kroz *MIK* vrijednost iznosi 5 mg/ml, dok *MBK* (minimalna baktericidna koncentracija) prema ovoj bakteriji iznosi 10 mg/ml. Prema ovim autorima list borovnice ima dvostruko slabiji učinak na ovu bakteriju od ploda. Rezultati našeg istraživanja kao i istraživanja većine drugih autora potvrđuju veću otpornost Gramm negativnih bakterija prema borovnici. Naši rezultati ukazuju da plod borovnice iskazuje slabu antimikrobnu aktivnost prema *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*, dok su ove bakterije rezistentne prema ekstraktima iz listova ove biljke. I drugi izvori potvrđuju slabiju učinkovitost borovnice prema *Escherichia coli* iskazanu kroz više vrijednosti za *MIK* i *MBK* (od 20 do 40 mg/ml) (Vučić i sar, 2013.).

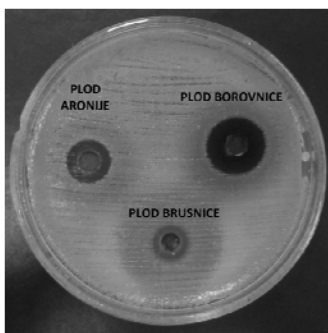
Rezultati našeg istraživanja ukazuju da brusnica posjeduje antimikrobna svojstva prema svim ispitivanim bakterijskim sojevima i to izraženiju aktivnost posjeduje list u odnosu na plod ove biljke. List brusnice iskazuje veću antimikrobnu aktivnost prema Gramm pozitivnim (vrijednosti zona inhibicije su: *Listeria monocytogenes* 22 mm, *Enterococcus faecalis* 21 mm, *Staphylococcus aureus* 29 mm) u odnosu na Gramm negativne bakterije (vrijednosti zona inhibicije su: *Escherichia coli* 16 mm, *Salmonella enteritidis* 17 mm). I istraživanja drugih autora potvrđuju antimikrobnu aktivnost prema Gramm pozitivnim bakterijama. Kanadski istraživači su utvrdili da polusatno izlaganje *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecium* (ERV) neutralnom soku od brusnice dovodi do potpunog inaktiviranja ispitivanih sojeva. Prethodno istraživanje potvrđuje i izražen uticaj na *Staphylococcus aureus* (Cote i sar., 2011). I Maseko sa saradnicima (2012.) potvrđuju učinkovitost prema zlatnom stafilokoku ističući jači uticaj brusnice na ovu bakteriju u odnosu na borovnicu, kupinu, jagodu i akai bobice. Naši rezultati ukazuju da list brusnice iskazuje umjerenu antimikrobnu aktivnost prema Gramm negativnim bakterijama (*Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*), dok su ove bakterije rezistentne prema ekstraktima iz plodova ove biljke. Većina drugih istraživanja nisu potvrdila baktericidni uticaj brusnice prema *Escherichia coli*, ali je njen poznati antiadhezivni uticaj intenzivno istraživan i potvrđen što doprinosi uspješnoj terapiji urinarnih infekcija. Reed i saradnici (2003.) su objasnili da je za taj učinak zaslužna specifična struktura proantocijanidina brusnice (ponavljajuća serija oligomera katehina sa jednom ili više A-veza). Konzumacija soka od brusnice dovodi do 80 % inhibicije adhezije *Escherichia coli* na urinarni epitel (Shaheen i sar, 2011). I istraživanja drugih autora o uticaju brusnice na rod *Salmonella typhimurium* otporna prema ekstraktima iz brusnice.

Naše istraživanje ukazuje da ekstrakti iz aronije iskazuju slabu antimikrobnu aktivnost prema Gramm pozitivnim bakterijama (vrijednosti zona inhibicije variraju od 10 do 15 mm), dok su Gramm negativne bakterije otporne prema ovim ekstraktima. Istraživači u Bugarskoj koji su analizirali uticaj ekstrakata aronije različitih koncentracija na dva soja *Listeria monocytogenes* su konstatovali izostanak antimikrobnog učinka u oba slučaja (Denev i sar., 2014.). Drugi autori potvrđuju određen uticaj aronije na zlatnog stafilokoka (vrijednosti zona inhibicije variraju od 8 do 15 mm) što je u skladu sa našim rezultatima (Liepina i sar., 2013). Denev i saradnici (2014.) su utvrdili da ekstrakti listova aronije ispoljavaju antimikrobni učinak prema

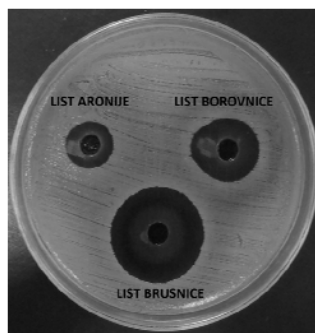
Staphylococcus aureus samo pri 100 % koncentraciji. Za razliku od prethodnih, istraživanje provedeno u Rumuniji ne potvrđuje antimikrobnu aktivnost ove biljke prema *Staphylococcus aureus* (Pirvu i sar., 2014.). Denev i saradnici (2014.) su objavili da ekstrakti aronije nisu rezultovali pojavom inhibicionih zona pri ispitivanju na *Escherichia coli* što je u skladu sa našim rezultatima. Naše istraživanje nije utvrdilo uticaj aronije na *Salmonella enteritidis*, što se slaže sa istraživanjima drugih autora koji potvrđuju indiferentnost roda *Salmonella* prema ovoj biljci (Denev i sar., 2014.). Rezultati našeg ispitivanja su prikazani u tabeli 1 i slikama 1 i 2.

1. Tabela Antimikrobna učinkovitost antibiotika i biljnih ekstrakata
 1. Table Antimicrobial activity of antibiotics and berries

Bakterijski soj Bacteria strain	Zone inhibicije bobičastog voća (u mm) Zones of inhibitions - berries (mm)					
	Plodovi Fruits			Listovi Leaves		
	Borovnica Blueberry	Brusnica Cranberry	Aronija Aronia	Borovnica Blueberry	Brusnica Cranberry	Aronija Aronia
<i>Listeria monocytogenes</i>	25	11	10	15	22	11
<i>Enterococcus faecalis</i>	22	14	12	15	21	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	12	14	20	29	15
<i>Escherichia coli</i>	13	9	0	0	16	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	12	0	0	0	17	0



Slika 1: Antimikrobna aktivnost ekstrakta plodova bobičastih vrsta na *Staphylococcus aureus*
 Figure 1: The antimicrobial activity of the berry fruits extracts on *Staphylococcus aureus*



Slika 2: Antimikrobna aktivnost ekstrakta listova bobičastih vrsta na *Staphylococcus aureus*
 Figure 2: The antimicrobial activity of the berry fruits extracts (leaves) on *Staphylococcus aureus*

Od ispitivanih plodova najizraženiji antimikrobni učinak uočen je kod borovnice, a od listova kod brusnice, dok su kod oba ekstrakta iz aronije uočena slaba antimikrobna svojstva. Svi analizirani ekstrakti ispoljavaju antimikrobnu aktivnost prema svim ispitivanim Gramm pozitivnim bakterijskim sojevima, dok su Gramm negativne bakterije slabije osjetljive ili otporne. Upravo zbog svojih antimikrobnih svojstava bobičaste vrste blagotvorno djeluju i na probavu tj. balansiraju crijevnu mikrofloru. Ove biljne vrste predstavljaju perspektivu i za industriju hrane gdje se mogu koristiti kao prirodni konzervansi. Prednost primjene prirodnih antimikrobnih tvari je svakako izostanak štetnih posljedica karakterističnih za sintetske lijekove kao i nemogućnost razvoja rezistencije svojstvene antibioticima.

Literatura

- Đilas S, Čanadanović BJ, Tumbas V, Četković G. (2010). Biološka aktivnost bobičastog voća. Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa RS; 4:1-11
- Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman Caldentey KM. (2005). Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens. Applied microbiology and biotechnology; 67: 8-18.
- Skupnjak B. i saradnici. (1975). Antibiotici i sulfonamidi u praksi lječnika opće medicine. Zagreb: Udruženje lječnika opće medicine
- Bauer, Kirby, Sherris, Turck. (1966). Am. J. Clin. Path, 45:493.
- Pirvu L, Hlevca C, Nicu I, Bubueanu C. (2014). Comparative Studies on analytical, antioxidant and antimicrobial activities of a series of vegetal extracts prepared from eight plant species growing in Romania, Journal of Planar Chromatography - Modern TLC
- Burdulis D, Šarkinas A, Jasutiene I, Stackeviciene E, Nikolajevs L, Janulis V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial i antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research; 66: 4: 399-408.
- Wing-kwan Chu, Sabrina C. M. Cheung, Roxanna A, W. Lau, Iris F. F. Benzie. (2011). Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. USA: CRC press Tayler & Francis group
- Vučić DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić LJR. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro, African Journal of Microbiology Research; 7(45):5130-5136.
- Côté J, Caillet S, [Doyon, G.J.](#), Dussault D, Sylvain, J.F and Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts, Food Control, 22(8): 1413-1418.
- Maseko T, Ken Ng. (2012). The antimicrobial effects of cranberry against *Staphylococcus aureus*. Food science and technology international; 1.22DOI: 10.1177/1082013211415159
- Reed J, Howell A, Cunningham D, Krueger C. (2003). Differences in structure and bacterial anti-adhesion activity of cranberry proanthocyanidins compared to proanthocyanidins from other foods. Proceedings of the 1st International conference on polyphenols and health; France

- Shaheen G, Ahmad I, Mehmood A, Akhter N, Usmanghani K, Shamim T, Ali Ahah SM, Sumreen L and Akram M. (2011). Monograph of *Vaccinium macrocarpon*, Journal of Medicinal Plants Research; 5(22): 5340-5346.
- Cote J, Caillet S, Doyon G, Sylvain J.F, and Lacroix M. (2010). Bioactive compounds in cranberries and their biological properties, Critical Reviews in Food Science and Nutrition; 50:666–679.
- Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, Nedelcheva P, Vojtek L, Hyrsil P. (2014). Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts, Acta Biochimica Polonica; 61/22: 359-367.
- Liepina I, Nikolajeva V, Jakobsone I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. Environmental and experimental biology, 11:195-199.

ANTIMICROBIAL PROPERTIES EXTRACTS FROM FRUITS AND LEAFS OF BLUEBERRY, CRANBERRY AND ARONIA

Aida Halilović¹, Snježana Hodžić², Amela Hercegovac², Sanida Osmanović², Darja Husejinagić², Emina Mešikić², Vildana Hadžić³

Abstract

The aim of this paper is to promote antimicrobial activity of berry fruits to rationalize the use of antibiotics considering unwanted consequences and increase of bacteria resistance towards them. In this research we have examined the antimicrobial effects of fruit and leaf extracts of blueberry, cranberry and aronia. During the research we used the Kirby Bauer disc diffusion method. The most prominent antimicrobial effects were achieved by the blueberry fruit extract and cranberry leaf extracts. The aronia extracts have shown the weakest antimicrobial activity. It has been proved that berries possess more antimicrobial effectiveness towards Gram positive bacteria than the Gram negative ones.

Key words: blueberry, cranberry, aronia, antimicrobial activity, resistance

¹ University of Bihać, Faculty of Education, Luke Marjanovića, 77 000 Bihać, Bosnia and Herzegovina (aida.halilovic7@gmail.com)

² University of Tuzla, Faculty of Science and Mathematics, Univerzitetska 4, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina (snjezana.hodzic@untz.ba)

³ Hospital for respiratory diseases and TBC, Bašbunar 5, 72270 Travnik, Bosnia and Herzegovina