

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maja JANKOVEC

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNEGA OLJA
ZLATE ROZGE (*Solidago* spp.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maja JANKOVEC

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNEGA OLJA ZLATE ROZGE
(*Solidago* spp.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF GOLDENROD (*Solidago* spp.)
ESSENTIAL OIL**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobril naslov magistrske naloge. Za mentorico magistrskega dela je bila imenovana doc. dr. Jasna Dolenc Koce, za somentorico asist. dr. Sabina Anžlovar, za recenzentko pa prof. dr. Kristina Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Mentorica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Somentorica: asist. dr. Sabina ANŽLOVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Recenzentka: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 21. 12. 2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Jankovec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 58:577(043.2)=163.6
KG	eterično olje/ <i>Solidago</i> /protibakterijska aktivnost/protiglivna aktivnost/fungicidna aktivnost/kalitev
AV	JANKOVEC, Maja, diplomirana biologinja (UN)
SA	DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)/ANŽLOVAR, Sabina (somentorica), SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNEGA OLJA ZLATE ROZGE (<i>Solidago</i> spp.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	X, 60 str., 4 pregl., 12 sl., 3 pril., 111 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V magistrskem delu smo določali biološko aktivnost eteričnih olj, pridobljenih iz listov in socvetij treh vrst zlate rozge (<i>Solidago virgaurea</i>, <i>S. canadensis</i>, <i>S. gigantea</i>). Protibakterijsko aktivnost smo ugotavljali s prilagojeno difuzijsko metodo na agarju proti po Gramu pozitivnim vrstam <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>. Protiglivno aktivnost smo določali z dilucijsko metodo na agarju proti vrstam <i>Alternaria alternata</i>, <i>Alternaria infectoria</i>, <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Epicoccum nigrum</i> in <i>Fusarium poae</i>. Vsa testirana eterična olja so uspešno zavrla rast vseh izbranih bakterijskih sevov. Rast glivnih micelijev je bila zavrla pri koncentracijah 0,1 % in 0,05 % ne glede na vrsto eteričnega olja. Ugotovili smo, da je protiglivno delovanje eteričnih olj koncentracijsko odvisno. Dodatno smo raziskali uporabnost eteričnih olj zlate rozge za zatiranje glivnih okužb in vpliv na kalitev pšeničnih zrn ter ugotovili, da so eterična olja zmanjšala pojav glivnih okužb na zrnih pšenice in njihovo kalitev. Vsa eterična olja, ki smo jih pridobili iz različnih vrst in organov zlatih rozg, so delovala podobno, zato sklepamo, da lahko za izdelavo eteričnega olja uporabimo celotne poganjke katerekoli vrste. Rezultati so pokazali, da imajo eterična olja zlatih rozg velik potencial za uporabo v medicini in živilski industriji pri zaviranju rasti škodljivih bakterij in gliv.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDK 58:577(043.2)=163.6

CX essential oil/*Solidago*/antibacterial activity/antifungal activity/fungicidal activity/germination rate

AU JANKOVEC, Maja

AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/ANŽLOVAR, Sabina (co-advisor), SEPČIĆ, Kristina (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Structural and Functional biology

PY 2016

TI BIOLOGICAL ACTIVITY OF GOLDENROD (*Solidago* spp.) ESSENTIAL OIL

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO X, 60 p., 4 tab., 12 fig., 3 ann., 111 ref.

LA sl

AL sl/en

AB We tested biological activity of essential oils extracted respectively from leaves and inflorescences from three different goldenrod species (*Solidago virgaurea*, *S. canadensis*, *S. gigantea*). Antibacterial activity was tested using adapted agar plate diffusion assay against *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus* sp., *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus*. Antifungal activity was tested using agar dilution method against species *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum* and *Fusarium poae*. Additionally, we tested fungicidal activity of essential oils and their influence on germination of wheat seeds. Antibacterial activity of all essential oils was confirmed against all tested bacterial strains. Essential oils also inhibited the growth of fungal mycelium of all selected species at 0,1 % and 0,05 % concentration. Results showed concentration dependency of antifungal activity. Essential oils effectively inhibited fungal infections of wheat seeds and also their germination. We noticed similar activity among essential oils of different goldenrod species. Essential oils extracted from leaves and blossoms of all three goldenrod species also have similar antimicrobial activity, therefore whole shoots could be collected for production of the essential oil. Results indicate a possible use of goldenrod essential oils for growth inhibition against multidrug-resistant bacteria as well as use against bacteria and fungi which may cause spoilage of food.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZLATA ROZGA (<i>Solidago</i> L.).....	3
2.1.1 Kanadska zlata rozga (<i>S. canadensis</i> L.).....	3
2.1.2 Orjaška zlata rozga (<i>S. gigantea</i> Aiton).....	4
2.1.3 Navadna zlata rozga (<i>S. virgaurea</i> L.)	6
2.2 BIOLOŠKA AKTIVNOST ZLATE ROZGE	8
2.3 ETERIČNA OLJA	10
2.3.1 Protimikrobno delovanje eteričnih olj	12
2.3.2 Uporaba eteričnih olj v medicini.....	13
2.3.3 Uporaba eteričnih olj v živilski industriji	15
2.3.4 Vpliv eteričnih olj na kalitev rastlin	16
2.4 KRATEK PREGLED UPORABLJENIH BAKTERIJSKIH IN GLIVNIH VRST.....	17
2.4.1 Bakterijske vrste.....	17
2.4.2 Glivne vrste	18
3 MATERIAL IN METODE.....	20

3.1	RASTLINSKI MATERIAL	20
3.2	EKSTRAKCIJA ETERIČNIH OLJ	21
3.3	DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ETERIČNIH OLJ	22
3.3.1	Določanje protibakterijske aktivnosti	22
3.3.2	Določanje protiglivne aktivnosti	23
3.3.3	Določanje vpliva eteričnih olj na razvoj glivnih okužb in kalitev zrn pšenice.....	24
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	26
4	REZULTATI	27
4.1	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE...	27
4.2	PROTIGLIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE	30
4.3	VPLIV ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE NA RAZVOJ GLIVNIH OKUŽB IN KALITEV ZRN PŠENICE	34
5	RAZPRAVA.....	37
5.1	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE...	37
5.2	PROTIGLIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE	40
5.3	VPLIV ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE NA RAZVOJ GLIVNIH OKUŽB IN KALITEV ZRN PŠENICE	43
6	SKLEPI	45
7	POVZETEK.....	46
8	VIRI	48

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Količina pridobljenih eteričnih olj iz posušenega rastlinskega materiala	21
Pregl. 2:	Uporabljeni bakterijski sevi v preliminarjih testih	22
Pregl. 3:	Protibakterijska aktivnost 100 % eteričnih olj (EO) vrst zlate rozge	28
Pregl. 4:	Protiglivna učinkovitost eteričnih olj (EO) vrst zlate rozge	31

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Kanadska zlata rozga (<i>Solidago canadensis</i> L.).....	4
Sl. 2:	Orjaška zlata rozga (<i>Solidago gigantea</i> Aiton)	5
Sl. 3:	Navadna zlata rozga (<i>Solidago virgaurea</i> L.)	6
Sl. 4:	Primer cikličnega monoterpena (limonen) in seskviterpena (murolen)	10
Sl. 5:	Splošna struktura fenilpropena	11
Sl. 6:	Uporabljena eterična olja zlate rozge	21
Sl. 7:	Inhibicijske cone rasti nekaterih bakterijskih vrst okoli diskov z različnimi eteričnimi olji	29
Sl. 8:	Protiglivno delovanje eteričnih olj (0,1 %) listov in cvetov vrst zlate rozge	32
Sl. 9:	Spremembe v obarvanosti in velikosti micelija glive <i>A. flavus</i> ob prisotnosti različnih koncentracij eteričnega olja iz cvetov <i>S. canadensis</i>	33
Sl. 10:	Delež okuženih zrn z glivami 1., 2. in 3. dan po tretiranju z 2 % eteričnimi olji.....	34
Sl. 11:	Delež kalitve pšeničnih zrn 1., 2. in 3. dan po tretiranju z 2 % eteričnimi olji.....	35
Sl. 12:	Ugotavljanje protiglivnega potenciala eteričnih olj zlatih rozg pri zrnih pšenice	36

KAZALO PRILOG

Pril. A: Kemijska sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. canadensis*

Pril. B: Kemijska sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. gigantea*

Pril. C: Kemijska sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. virgaurea*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DMSO	dimetil sulfoksid
EO	eterično olje
GC-MS	plinska kromatografija z masno spektrometrijo
LB	gojišče Luria-Bertani
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
PDA	krompirjevo gojišče (ang. Potato Dextrose Agar)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

1 UVOD

Eterična olja so zmesi sekundarnih metabolitov rastlin in služijo za zaščito in obrambo proti biotskemu in abiotskemu stresu (Anžlovar in Dolenc Koce, 2014). Prav zaradi te vloge se pogosto opaža tudi protimikrobno delovanje eteričnih olj (Hyldgaard in sod., 2012). Med njihovimi raznolikimi lastnostmi zagotovo izstopajo še protivnetno, protibolečinsko in antioksidativno delovanje (Pisseri in sod., 2008). Z omenjenimi lastnostmi eterična olja izkazujejo velik potencial za uporabo v medicini in živilski industriji (Lang in Buchbauer, 2011).

Naraščajoča protimikrobna odpornost ogroža tako uspešno preprečevanje kot tudi zdravljenje okužb, ki jih povzročajo različne bakterije, virusi, glive in paraziti. Čeprav se zdi, da je odpornost mikroorganizmov problem prihodnosti, je realnost drugačna – odpornosti so že prisotne in se stalno razvijajo. Želja po odkrivanju novih metod preprečevanja oz. zaviranja okužb s hrano zato postaja vse večja (WHO, 2014).

Nova zdravila iščemo tudi med naravnimi spojinami, ki se nahajajo v sestavi eteričnih olj. Potencial njihove uporabe v medicini se kaže v izdelkih za nego kože, za tretiranje oz. v izogib dermalnim infekcijam in kot terapija pri zdravljenju nalezljivih boleznih (Lang in Buchbauer, 2011).

Zanimanje za uporabo eteričnih olj pa narašča tudi v prehrambeni industriji (Hyldgaard in sod., 2012). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) ocenjuje, da letno zaradi zaužitja okužene hrane zbolijo kar 600 milijonov ljudi oz. skoraj vsaka deseta oseba na svetu. Za okoli 420.000 ljudi je okužba smrtna. Tovrstne okužbe so sicer najpogostejše v državah z nizkimi in srednjimi dohodki, vendar pa ne izostajajo niti v razvitejših državah (WHO, 2015).

Potrošniki vse pogosteje povprašujejo po hrani, ki ni obdelana s kemičnimi konzervansi. Ti so namreč pogosto nepopolno raziskani in zato potencialno nevarni za naše zdravje (Willis in Saidman, 2013). Dosedanje raziskave so pokazale, da so eterična olja enako ali pa celo bolj učinkovita pri preprečevanju kvarjenja hrane in zaviranju rasti patogenov kot trenutno uporabljeni kemični konzervansi (Hyldgaard in sod., 2012). Obenem eterična olja redkeje izkazujejo škodljive vplive na zdravje in okolje, so biološko razgradljiva in cenovno ugodna (Das in sod., 2012).

Višje rastline so kot vir novih protimikrobnih učinkovin v veliki meri še vedno precej neraziskane (Mahesh in Satish, 2008). V magistrskem delu smo raziskali biološko

aktivnost eteričnih olj zlate rozge (*Solidago* spp.), ki že stoletja velja za zdravilno rastlino. Farmakološke raziskave so pokazale, da njeni izvlečki delujejo protivnetno, diuretično, spazmolitično in antihipertenzivno (Lunder, 2013). V predhodnih raziskavah je že bila raziskana protibakterijska in protiglivna aktivnost organskih izvlečkov listov in korenin treh vrst rodu *Solidago*, ki uspevajo v Sloveniji (Anžlovar in Dolenc Koce, 2014). Običajno so eterična olja biološko bolj učinkovita kot organski izvlečki (Morel in sod., 2006), kar nas je spodbudilo k raziskovanju eteričnih olj tega rodu in njihove potencialne uporabe v medicini in živilski industriji.

Raziskovanje biološke aktivnosti zlate rozge je zanimivo tudi z vidika invazivnosti nekaterih vrst tega rodu. V Sloveniji sta kar dve izmed skupno treh vrst invazivni (Wraber, 2007). Ker popolna odstranitev njunih obsežnih sestojev praktično ni možna (Strgulc Krajšek, 2008a; Strgulc Krajšek, 2008b), bi lahko biomaso uporabili za pridelavo potencialno biološko aktivnih eteričnih olj in s tem invazivnost rastlin obrnili sebi v prid.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

V magistrskem delu smo določili protibakterijsko in protiglivno aktivnost eteričnih olj listov in cvetov treh vrst rodu *Solidago*; domorodne navadne zlate rozge (*Solidago virgaurea*) ter tujerodne invazivne kanadske (*S. canadensis*) in orjaške zlate rozge (*S. gigantea*). Pripravili smo različne koncentracije eteričnih olj in ugotavljali, kako zavirajo rast različnih vrst bakterij in gliv.

V nalogi smo želeli ugotoviti, katera vrsta zlate rozge vsebuje eterično olje, ki najučinkoviteje zavira rast izbranih bakterijskih in glivnih vrst. Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike v učinkovitosti eteričnih olj domorodne in tujerodnih vrst in ali obstajajo razlike v učinkovitosti med eteričnimi olji listov in eteričnimi olji cvetov.

Glede na pretekle raziskave smo predvidevali, da ima največjo biološko aktivnost eterično olje orjaške zlate rozge. Predvidevali smo, da bo imelo eterično olje obeh tujerodnih vrst večjo biološko aktivnost od domorodne vrste, saj je boljša obramba pred patogeni in herbivori lahko eden od razlogov za njihovo invazivnost. Predvidevali smo, da ima eterično olje cvetov večjo biološko aktivnost kot eterično olje listov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZLATA ROZGA (*Solidago* L.)

Zlata rozga (*Solidago* L.) je zelnata trajnica, ki jo uvrščamo v družino nebinovk (*Asteraceae*) (Wraber, 2007). Vrste omenjenega rodu izvirajo iz Severne Amerike in se zelo uspešno razširjajo po celem svetu. Tako je danes poznanih okoli 120 vrst, med katerimi so 3 izredno invazivne. Orjaška (*S. gigantea* Aiton), kanadska (*S. canadensis* L.) in visoka zlata rozga (*S. altissima* L.) so namreč uspešno naselile Evropo, velik del Azije, Avstralijo in Novo Zelandijo (Weber, 2003).

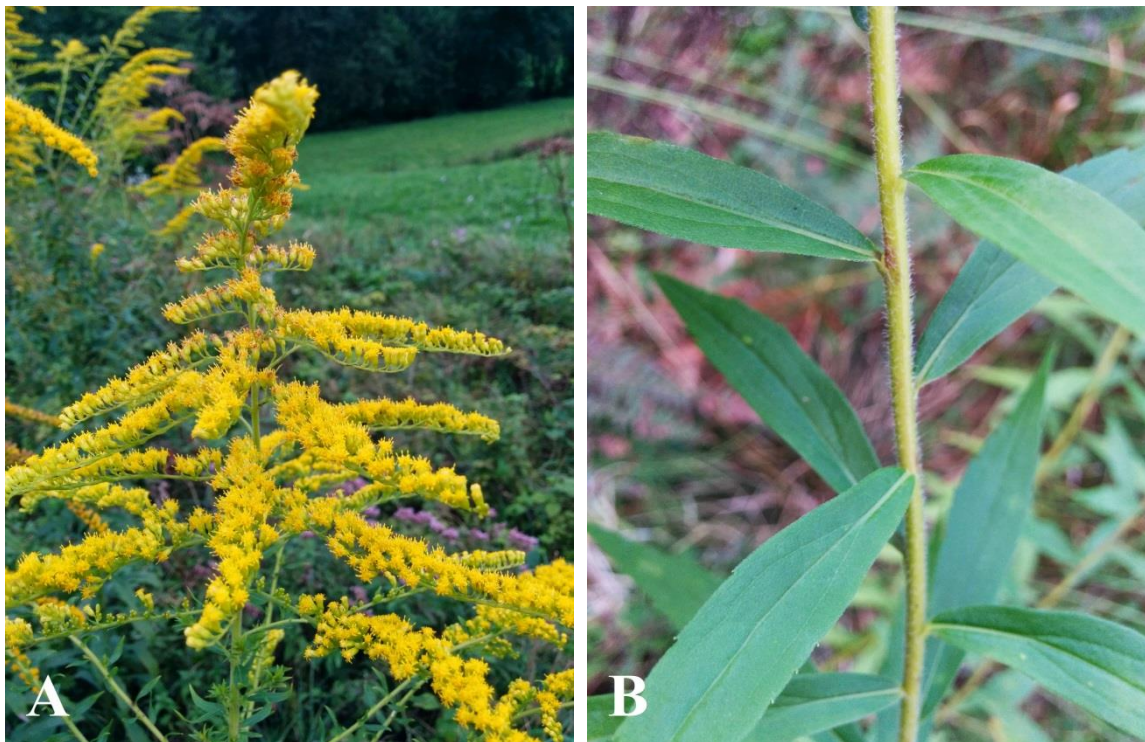
Vrste rodu *Solidago*, ki izvirajo iz Amerike, so v Evropi poznane kot rastline z visoko zmožnostjo osvajanja novih področij (Szymura in Szymura, 2013). Medtem ko se v osrednji Evropi pojavlja pet vrst rodu *Solidago*, na območju Slovenije uspevajo le tri (McNeil, 1976; Wraber, 2007). Domorodna je le navadna zlata rozga (*S. virgaurea*), kanadska (*S. canadensis*) in orjaška zlata rozga (*S. gigantea*) pa sodita med tujerodni invazivni vrsti. Vse tri vrste sodijo med hemikriptofite, torej trajnice, katerim nadzemni deli odmrejo, prezimijo pa organi na površini tal ali tik pod njo (Wraber, 2007).

Zlata rozga se kot zdravilna rastlina uporablja v tradicionalnem zdravilstvu. Kanadska, navadna in orjaška zlata rozga imajo podobne učinkovine, zato se uporabljajo v isti namen. Vse tri vrste so opisane v farmakopejah (Lunder, 2013). Njihovi pripravki delujejo blago protivnetno, diuretično, spazmolitično in antihipertenzivno (Lunder, 2013), nekateri organski izvlečki tudi protibakterijsko in protiglivno (Anžlovar in Dolenc Koce, 2014).

2.1.1 Kanadska zlata rozga (*S. canadensis* L.)

Kanadska zlata rozga (Slika 1) je okoli 70-210 cm visoka zelnata trajnica, ki izvira iz Severne Amerike (Strgulc Krajšek, 2008a). Rastlina največkrat raste podivjano v okolici naselij, ob železniških progah in cestah, opuščenih njivah, posekah, na gozdnih robovih in bregovih voda (Strgulc Krajšek, 2008a; Wraber, 2007). Steblo je v celoti spiralno olistano s suličastimi listi, ki so lahko sedeči ali pa zelo kratko pecljati. Spodja stran listov je odlačena, listni rob pa nazobčan. Steblo je v spodnjem delu golo, v zgornjem pa značilno dlakavo (Strgulc Krajšek, 2008a). Na vrhu poganjkov se od avgusta pa vse do oktobra pojavijo razvejana rumena socvetja s številnimi, 5-6 mm dolgimi koški, ki so razvrščeni večinoma enostransko, redkeje združeni v pakobul. Jezičasti cvetovi so komaj daljši od ovojka (Wraber, 2007). Plod je 0,9-1,2 mm dolga

rožka, ki ima do 2,5 mm dolg šop laskov, ki služijo za lažje razširjanje z vetrom (Strgulc Krajšek, 2008a).



Slika 1: Kanadska zlata rozga (*Solidago canadensis* L.). Oznake: A – socvetje, B - steblo z dlačicami.

Vrsta je v Evropo zašla v 17. stoletju. Kot okrasno rastlino so jo večinoma sadili v botanične vrtove, od koder se je zaradi nezahtevnih rastnih pogojev v naravo razširila v začetku 19. stoletja. V Sloveniji je kanadska zlata rozga prvič omenjena leta 1937. Danes je razširjena po nižinah celotne Slovenije in le redko jo opazimo kot gojeno rastlino (Strgulc Krajšek, 2008a; Wraber, 2007). Problem, ki se dotika omenjene vrste je invazivnost. Zaradi vegetativnega načina razmnoževanja tvori izredno goste sestoje, ki so trajni. Na mestih, kjer uspevajo sestoji kanadske rozge, je izrinjena vsa domorodna flora. Možnosti za njeno popolno odstranitev praktično ni. Širjenje manjših populacij lahko zaustavimo s košnjo ali odstranjevanjem rastlin še pred cvetenjem (Strgulc Krajšek, 2008a).

2.1.2 Orjaška zlata rozga (*S. gigantea* Aiton)

Orjaška zlata rozga (Slika 2) je zelo podobna kanadski zlati rozgi. Za razlikovanje med vrstama si je potrebno podrobno ogledati zgornje dele poganjkov in steblo v socvetju, ki je pri orjaški zlati rozgi golo. Vrsti se razlikujeta tudi v dolžini jezičastih cvetov, ki so pri orjaški zlati rozgi daljši od ovojka.

Orjaška rozga prav tako sodi med zelnate trajnice. V višino zraste od 30-280 cm. Steblo je golo in v celoti spiralasto olistano s podolgovatimi do suličastimi listi, ki so sedeči ali zelo kratko pecljati. Listi so večinoma goli, lahko pa tudi nekoliko dlakavi po spodnji strani. Listni rob je nazobčan. Steblo je ravno in se razveja le na vrhu poganjka, v predelu socvetja (Strgulc Krajšek, 2008b). Socvetja s številnimi rumenimi koški zacvetijo v poznem poletju med avgustom in oktobrom. Jezičasti cvetovi razločno presegajo dolžino ovojka (Wraber, 2007). Plod je 1-1,8 mm dolga rožka s šopom laskov (Strgulc Krajšek, 2008b).



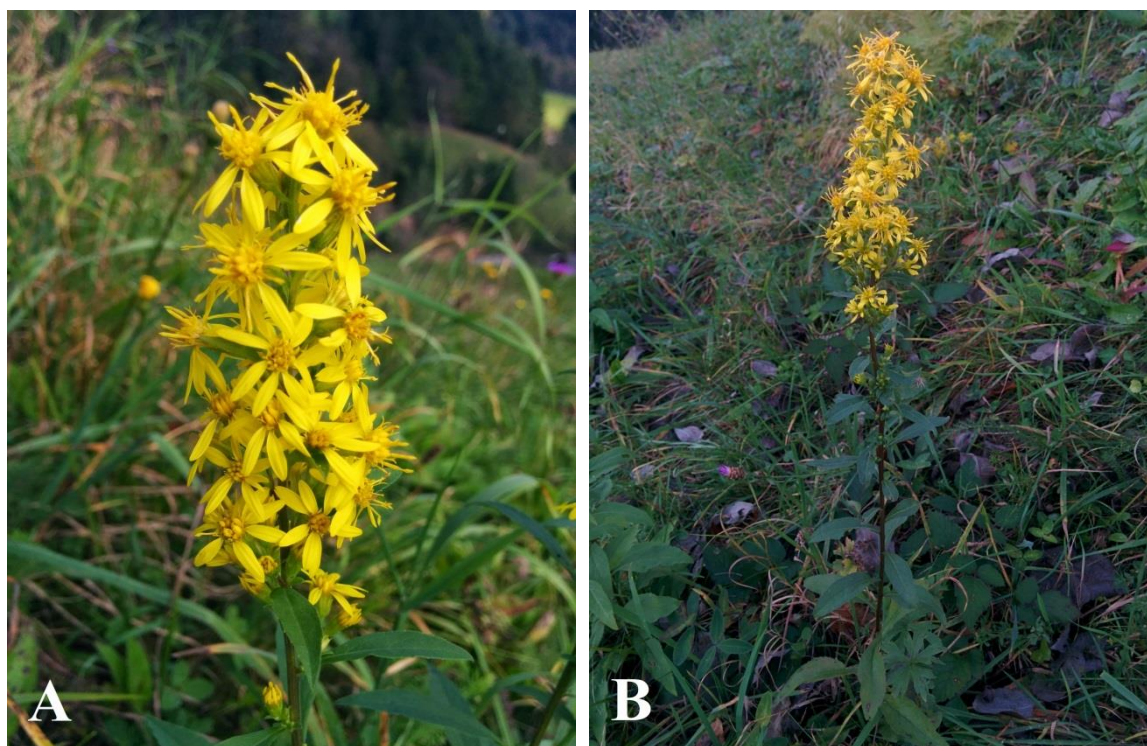
Slika 2: Orjaška zlata rozga (*Solidago gigantea* Aiton). Oznake: A – socvetje, B – golo steblo brez dlačic.

Orjaško zlato rozgo so kot okrasno rastlino v Evropo prinesli v 18. stoletju, a se je v naslednjih 100 letih razširila iz vrtov v naravo. V Sloveniji je vrsta prvič omenjena leta 1852 (Strgulc Krajšek, 2008b). Danes je le redko gojena vrsta. Največkrat se pojavlja podivjano v okolici naselij in vodah (Wraber, 2007). Glede rastišč je nezahtevna, saj ji ustrezajo različni tipi rastišč, ne glede na vlažnost prsti, teksturo tal, količino dušika v tleh in osvetljenost. Opazimo jo lahko na bregovih voda in gozdnih robovih kot tudi na sušnejših predelih ob cestah, železnicah in drugih ruderalnih mestih. Na bogatih tleh so rastline višje, sestoji pa gostejši in se hitro razširjajo. Tudi orjaška zlata rozga ima v Sloveniji status tujerodne invazivne vrste. Njene trpežne in dolge korenike služijo prezimitvi in vegetativnemu razmnoževanju. Rastlina tvori obsežne in goste sestoje, kjer lahko uspeva preko 150 poganjkov na kvadratni meter. Tudi sestoji orjaške zlate

rozge so trajni in z mest, kjer uspevajo, je izrinjena vsa domorodna flora. Pri nas v naravi njenih herbivorov ni oz. imajo na širjenje vrste zelo majhen vpliv. Možnosti za popolno odstranitev tudi pri tej vrsti praktično ni. Tako kot pri omejevanju kanadske zlate rozge, bi tudi pri tej vrsti manjše populacije lahko zatirali s košnjo ali odstranjevanjem rastlin še pred cvetenjem (Strgulc Krajšek, 2008b).

2.1.3 Navadna zlata rozga (*S. virgaurea* L.)

Navadna zlata rozga (Slika 3) je v Sloveniji edina avtohtona vrsta iz tega rodu. Vrsto lahko zlahka ločimo od kanadske in orjaške zlate rozge. Navadna zlata rozga doseže višino med 20-100 cm. Koški so dolgi med 7-18 mm in sestavljajo enostavne ali sestavljene grozde rumene barve, ki cvetijo od julija do oktobra (Wraber, 2007).



Slika 3: Navadna zlata rozga (*Solidago virgaurea* L.). Oznake: A – socvetje, B - nadzemni del rastline.

V Sloveniji uspevata dve podvrsti; *S. virgaurea* subsp. *virgaurea* L. - navadna zlata rozga in *S. virgaurea* subsp. *minuta* (L.) Arcangeli - planinska zlata rozga (Wraber, 2007).

Navadna zlata rozga ima manjše, med 10-15 mm široke koške, ki so združeni v sestavljene grozde. Ovojek je dolg med 5-7 mm. Steblo je nekoliko višje (30-100 cm) in

bolj razraslo. Uspeva v svetlih gozdovih, posekah, kamnitih in grmovnatih mestih od nižine do subalpinskega pasu celotne Slovenije (Wraber, 2007).

Planinska zlata rozga ima nekoliko večje, 15-20 mm široke koške, ki so pogostejše v enostavnih grozdih. Steblo je nižje (do 20 cm) in večinoma nerazraslo. Najdemo jo na travnikih in pašnikih, med rušjem in grmovjem ter svetlih gozdovih v montanskem in subalpinskem pasu alpskega in dinarskega območja (Wraber, 2007).

2.2 BIOLOŠKA AKTIVNOST ZLATE ROZGE

Biološko aktivnost rastlin lahko v veliki meri pripišemo sekundarnim metabolitom (Wink, 2003). Z njihovo pomočjo si rastline povečujejo možnost preživetja in razmnoževanja (Fraenkel, 1959 cit. po Thaler in Bajc, 2013). Te organske spojine sicer niso neposredno vpletene v normalno rast, razvoj in razmnoževanje organizma, vendar pa skrbijo za obrambo pred rastlinojedi, mikrobi in drugimi rastlinami ali opravljajo vlogo signalnih molekul v procesih privabljanja opraševalcev in raznašalcev semen. Ljudje rastlinske sekundarne metabolite s pridom izkoriščamo kot zdravila, arome, začimbe in prehranske dodatke (Thaler in Bajc, 2013).

Zlata rozga se kot zdravilna rastlina že stoletja uporablja v tradicionalnem zdravilstvu. Za pridobivanje rastlinske droge uporabljamo vse tri vrste, *S. canadensis*, *S. gigantea* in *S. virgaurea*, saj je njihovo učinkovanje izredno podobno. Rastlinsko drogo *Solidaginis virgaureae* herba pridobivamo iz zeli navadne zlate rozge, medtem ko sta ameriški vrsti vir rastlinske droge *Solidaginis herba*. Pripravke uporabljamo pri vnetnih boleznih sečil ter preventivnem zdravljenju ponavljajočih se bakterijskih okužb sečil. Zaradi diuretičnega učinka pomaga pri izpiranju sečnih poti in preprečuje nastajanje peska ter kamnov v ledvicah, mehurju in sečnih izvodilih. S spazmolitičnim delovanjem pomaga pri spontanem izločanju ter pospešitvi izločanja peska in kamnov po zdravniškem posegu (Lunder, 2013).

Najpomembnejše učinkovine zlate rozge predstavljajo številni sekundarni metaboliti; flavonoidi kot so astragalin, hiperozid, izokvercetin, nikotiflorin, kvercitrin in rutin, triterpenski saponini oleananskega tipa, bisdezmozidne fenolni glikozidi, leiokarpozidi in virgavreozid A, diterpenoidni laktoni *cis*-klerodanskega tipa, fenolne kisline med katerimi sta najpogostejši kavna in klorogenska kislina, tanini ter manjše količine eteričnega olja (Lunder, 2013).

Raziskovalci so dokazali raznoliko biološko aktivnost vrst rodu *Solidago*, ki nakazujejo na možno uporabo rastlin v medicini in živilstvu.

Protibakterijsko delovanje

V raziskavah so bili večinoma uporabljeni metanolni, etanolni ali heksanski izvlečki. Anžlovar in Dolenc Koce (2014) navajata, da različni organski izvlečki vrst *S. canadensis* in *S. gigantea* delujejo protibakterijsko proti vrstam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Deng in sod. (2015) poročajo še o izvlečkih *S. canadensis*, ki zavirajo rast bakterije *Listeria monocytogenes*. Organski izvlečki *S. virgaurea* delujejo proti vrstam *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*,

Enterobacter faecalis, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* (Demir in sod., 2009; Starks in sod., 2010; Thiem in Gošličska, 2002). Kołodziej in sod. (2011) poročajo o protibakterijskem delovanju organskih izvlečkov *S. canadensis*, *S. gigantea* in *S. virgaurea* proti vrstam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus faecalis*.

Opravljenih je bilo tudi nekaj raziskav o protibakterijskem delovanju eteričnih olj različnih vrst rodu *Solidago*. Eterično olje *S. microglossa* deluje proti bakterijam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella setubal*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* (Morel in sod., 2006). Eterično olje, pridobljeno iz listov *S. canadensis*, deluje proti vrstam *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* in *Streptococcus faecalis* (Mishra in sod., 2011), medtem ko eterično olje korenin deluje širšemu spektru bakterij; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus faecalis* (Mishra in sod., 2010).

Protiglivno delovanje

Prav tako organski izvlečki listov in korenin *S. canadensis*, *S. gigantea* ter *S. virgaurea* delujejo šibko protiglivno proti vrstama *Armillaria mellea* in *Fusarium* sp. (Anžlovar in Dolenc Koce, 2014). Thiem in Gošličska (2002) sta pokazala, da organski izvlečki *S. virgaurea* delujejo proti glivi *Aspergillus niger*. Laurençon in sod. (2013) ter Chavalier in sod. (2012) opisujejo delovanje *S. virgaurea* proti glivi *Candida albicans*.

Ostale oblike delovanja

Eterično olje, pridobljeno iz listov *S. canadensis*, deluje kot analgetik (Mishra in sod., 2011). Tamura in sod. (2009) poročajo o sistemskem in lokalnem protivnetnem delovanju izvlečkov *S. chilensis*. Polifenolno-polisaharidno-proteinski kompleks *S. canadensis* se je izkazal kot dober antitusik. Pridobljeni izvleček namreč zavira refleks kašljanja in reaktivnost gladkih mišic dihalnih poti (Šutovská in sod., 2013). Izvlečki vrst *S. virgaurea* in *S. canadensis* izkazujejo antioksidativno aktivnost (Deng in sod., 2015; Demir in sod., 2009; Apáti in sod., 2003). Prav tako so Sabir in sod. (2012) pokazali antioksidativen potencial vrste *S. microglossa*. Organski izvlečki *S. canadensis*, *S. gigantea* in *S. virgaurea* delujejo tudi antimutageno (Kołodziej in sod., 2011). Izvlečki vrste *S. canadensis* inhibirajo kalitev semen (Butcko in Jensen, 2002; Abhilasha in sod., 2008).

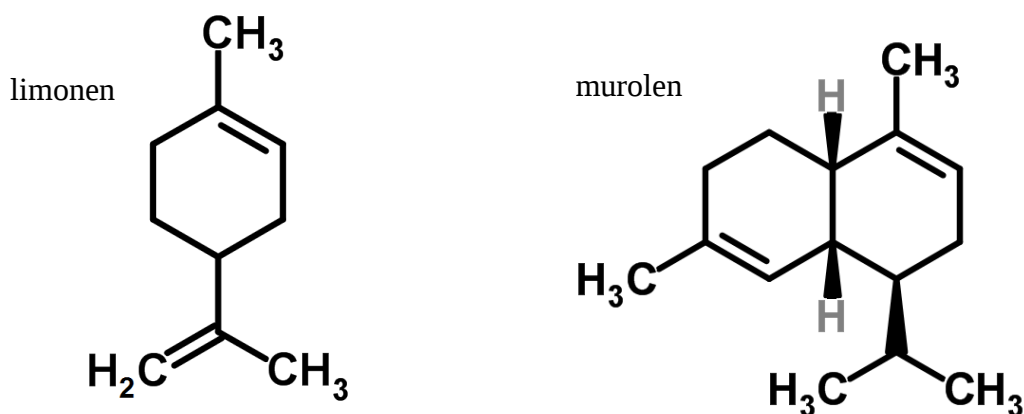
2.3 ETERIČNA OLJA

Eterična olja so aromatične in hlapne oljate tekočine, ki jih sestavljajo različni sekundarni metaboliti. Za izdelavo eteričnih olj lahko uporabimo celotno rastlino ali le posamezne rastlinske dele, kot so npr. cvetovi, listi, korenine, semena, ovojji, plodovi, les in lubje (Hyldgaard s sod., 2012). Eterična olja se tvorijo v citoplazmi celic, v rastlinskih tkivih pa jih najdemo v obliki majhnih kapljic med samimi celicami. Ob destilaciji so večinoma brezbarvni do rahlo rumenkaste barve (Sonwa, 2000).

Eterična olja vsebujejo številne biološko aktivne spojine, vendar je njihova kombinacija v posameznem eteričnem olju izredno raznolika (Espina in sod., 2011). Zgradba posameznega eteričnega olja je odvisna od letnega časa žetve rastline in metode ekstrakcije (Demuner in sod., 2011; Paibon in sod., 2011). Aktivne skupine spojin v eteričnih oljih lahko glede na njihovo kemijsko sestavo razdelimo na štiri glavne skupine: terpeni, terpenoidi, fenilpropani in ostali sekundarni metaboliti (Hyldgaard in sod., 2012).

Terpeni

Terpeni so skupina sekundarnih metabolitov, katerih osnovni gradnik je izoprenska enota (C_5H_8). Sintetizirajo se v citoplazmi rastlinskih celic preko poti mevalonske kisline iz izhodiščne spojine acetil-CoA. Najpogostejši so monoterpeni ($C_{10}H_{16}$) in seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$). *In vitro* testi so pokazali, da terpeni kot samostojno testirane spojine ne izkazujejo močne protimikrobne aktivnosti (Dorman in Deans, 2000; Koutsoudaki in sod., 2005).



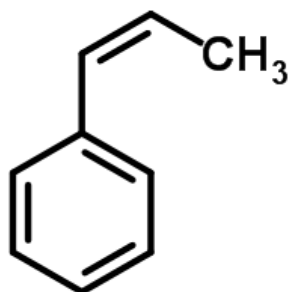
Slika 4: Primer cikličnega monoterpena (limonen) in seskviterpena (murolen) (ChemSpider, 2016).

Terpenoidi

Terpenoidi so obsežna skupina biokemijsko modificiranih terpenov z atomi kisika in dodanimi oz. prerazporejenimi metilnimi skupinami (Caballero in sod., 2003). Razdelimo jih lahko v več podskupin kot so npr. alkoholi, estri, aldehidi, ketoni, etri, fenoli in epoksidi. Protimikrobna aktivnost večine terpenoidov je odvisna od njihove funkcionalne skupine, saj ta vpliva na hidrofobnost in s tem na interakcijo molekule s celično membrano mikrobov (Veldhuizen in sod., 2006). Širok nabor terpenoidov v eteričnih oljih ima dobro protimikrobno aktivnost proti širokemu spektru mikroorganizmov. Najpogostejše je protimikrobna aktivnost eteričnih olj v korelaciji z vsebnostjo fenolnih skupin (Aligiannis in sod., 2001; Kalemba in Kunicka, 2003; Rhayour in sod., 2003).

Fenilpropeni

Fenilpropene uvrščamo med fenilpropanoide, ki se v rastlinah sintetizirajo iz fenilalanina. V eteričnih oljih predstavljajo relativno majhen delež spojin. Protimikrobna aktivnost fenilpropenov je odvisna od vrste in števila funkcionalnih skupin na aromatskem obroču, izbranih mikrobov in testnih parametrov kot so vrsta gojišča, temperatura itd. (Pauli in Kubeczka, 2010).



Slika 5: Splošna struktura fenilpropena (ChemSpider, 2016).

Ostali sekundarni metaboliti

Eterična olja vsebujejo še številne druge sekundarne metabolite, ki jih predstavljajo različni razpadni produkti nenasičenih maščobnih kislin, laktonov, terpenov, glikozidov in spojine, ki vsebujejo dušik ali žveplo (Caballero in sod., 2003).

2.3.1 Protimikrobno delovanje eteričnih olj

Eterična olja delujejo protimikrobno na širok spekter mikroorganizmov vendar pa točni mehanizmi delovanja še vedno niso povsem jasni (Calo in sod., 2015). Posamezno eterično olje sestavljajo številne spojine, zato njihove protimikrobne aktivnosti ne moremo pripisati poznavanju delovanja posamezne komponente (Bajpai in sod., 2012). V večini primerov je protimikrobno delovanje rezultat aditivnih, sinergističnih ali antagonističnih vplivov posameznih spojin (Lang in Buchbauer, 2011).

Številni raziskovalci menijo, da je protimikrobno delovanje eteričnih olj odraz njihove hidrofobne narave, ki jim omogoča prodor skozi celične membrane kot tudi membrane organelov (Bajpai in sod., 2012; Fisher in Phillips, 2009; Guinoiseau in sod., 2010). Neposredne poškodbe membran običajno privedejo do iztekanja metabolitov in ionov, izčrpanja protonske gonilne sile in celo do koagulacije citoplazme (Burt, 2004).

Protimikrobno delovanje eteričnih olj je bilo večinoma raziskano pri bakterijah. Predvidevanja o občutljivosti posamezne vrste in razlaga, zakaj so posamezni sevi različno dovzetni, so izredno težavna prav zaradi pestre sestave eteričnih olj in različnih tarčnih mest delovanja posameznih spojin (Hyldgaard s sod., 2012). Eterična olja povzročajo razpad bakterijske celične stene ter poškodbe plazemske membrane in membranskih proteinov. Raziskave kažejo, da eterična olja učinkoviteje zavirajo rast po Gramu pozitivnih kot po Gramu negativnih bakterijskih vrst (Lang in Buchbauer, 2011; Mishra in sod., 2010; Morel in sod., 2006). Razlog za manjšo občutljivost po Gramu negativnih vrst je v prisotnosti zunanje membrane, ki jo v veliki meri gradijo hidrofilni lipopolisaharidi. Ti ovirajo stik s hidrofobnimi molekulami, prisotnimi v eteričnih oljih (Saei-Dehkordi, 2010). Odsotnost zunanje membrane pri po Gramu pozitivnih bakterijah eteričnim oljem omogoča neposredne poškodbe plazemske membrane in s tem večjo protibakterijsko aktivnost eteričnih olj (Sandri in sod., 2007).

Mehanizmi delovanja eteričnih olj so slabše raziskani pri glivnih vrstah. Pretekle raziskave so pokazale, da eterična olja povzročajo poškodbe celičnih sten obstoječih micelijev ter zavirajo razvoj novih micelijev (Gandomi in sod., 2009; Sharma in Tripathi, 2008; Tolouee in sod., 2010). Eterična olja lahko povzročajo tudi morfološke spremembe hif, kar kaže na možen vpliv na sintezo celičnih sten (Romagnoli in sod., 2005). Prav tako naj bi eterična olja zavirala nastanek spor (Sant'anna in sod., 2009 citirano po Lang in Buchbauer, 2011) in nekaterih mikotoksinov kot sta aflatoksin (*Aspergillus*) in deoksinivalenol (*Fusarium*) in njegovi derivati (Nogueira in sod., 2010; Kumar in sod., 2010; Gandomi in sod., 2009; Yoshinari in sod., 2008).

2.3.2 Uporaba eteričnih olj v medicini

Zanimanje za uporabo zdravil rastlinskega izvora v javnosti narašča iz leta v leto (Apáti, 2003). Eterična olja se v medicini uporabljajo predvsem kot nadomestek sintetičnih zdravil, ki postajajo neučinkovita zaradi naraščajoče odpornosti mikroorganizmov, v proizvodih, ki služijo za zdravljenje dermalnih okužb in seveda v tradicionalni medicini (Lang in Buchbauer, 2011). Večina raziskav eteričnih olj je usmerjena v določanje protimikrobne aktivnosti. Širok spekter njihovega delovanja, ki je podkrepjen s številnimi *in vitro* raziskavami, kaže veliko možnost njihove uporabe v medicini. Žal se raziskave najpogosteje zaustavijo na klinični ravni, ki zahteva močno finančno podporo (Schmidt, 2010).

Protibakterijsko delovanje

Večina raziskav protibakterijskega delovanja je usmerjena k iskanju novih zdravil, ki bi delovala na vrste, ki so razvile odpornost proti obstoječim antibiotikom. Eterična olja so v uporabi tudi za zaščito pred bakterijami v ustni votlini ter za zmanjševanje neprijetnega vonja in zdravljenje nekrotičnih tkiv (Buchbauer, 2010).

Tretiranje kože s kremami in geli z dodanimi eteričnimi olji bazilike (*Ocimum gratissimum*) in čajevca (*Melaleuca alternifolia*) so se izkazali za zelo učinkovite proti bakteriji *Propionibacterium acnes*, ki povzroča akne. Številne *in vitro* raziskave so potrdile tudi antibiotično delovanje različnih eteričnih olj proti na meticilin odporni bakteriji *Staphylococcus aureus* (Buchbauer, 2010).

Ustne vode in zobne paste z dodanimi eteričnimi olji so zaradi enostavnejših postopkov potrjevanja izdelkov in učinkovitosti prišle tudi na prodajne police. S povpraševanjem po tovrstnih izdelkih seveda naraščajo tudi raziskave. Kot učinkovita eterična olja proti ustnim patogenim bakterijam so se izkazala eterična olja manuke, čajevca, evkaliptusa, sivke in rožmarina (Buchbauer, 2010).

Uporaba eteričnih olj postaja vse pogostejša tudi v paliativni oskrbi pacientov z odprtimi ranami. Eterična olja evkaliptusa, čajevca, sivke, materine dušice, grenivke in limonske trave odlično delujejo pri zmanjševanju neprijetnega vonja ran, kot tudi zmanjšanja vnetja in velikosti nekrotičnega tkiva zaradi protibakterijskega učinka (Buchbauer, 2010).

Protiglivno delovanje

Eterično olje grenke pomaranče (*Citrus aurantium* var. *amara*) učinkovito zavira glivične okužbe telesa, stopal in dimelj. Prav tako glivične okužbe zavira eterično olje evkaliptusa (*Eucalyptus pauciflora*) in čajevca, ki uspešno zavira glivične okužbe stopal in nohtov. Po številnih *in vitro* raziskavah vpliva eteričnih olj na okužbe z glivo *Candida albicans*, se je v klinični raziskavi kot učinkovito sredstvo proti kandidozi nožnice izkazalo tudi eterično olje vrste *Zataria multiflora* (Buchbauer, 2010).

Ostale oblike delovanja

In vitro raziskave nakazujejo širok spekter eteričnih olj, ki delujejo protivirusno proti virusom *Herpes simplex* ter virusu hepatitisa B in C. Številna eterična olja prav tako učinkovito zavirajo živalske okužbe s pršicami (Buchbauer, 2010).

Za razgradnjo žolčnih in ledvičnih kamnov na tržišču že nekaj let najdemo kapsule, katerih glavne učinkovine (triterpeni) izvirajo iz eteričnih olj. Študije so pokazale, da tovrstna zdravila zmanjšujejo že obstoječe žolčne in ledvične kamne oz. pripomorejo k njihovi spontani izločitvi. Za preprečevanje dispepsije, občasne ali stalne bolečine v predelu zgornjega dela trebuha in spodnjega dela prsnega koša, učinkovito delujejo kapsule z eteričnim oljem poprove mete in kumine. Eterično olje poprove mete se uporablja tudi za lajšanje sindroma razdraženega črevesja in zmanjšanje spazmolitičnega delovanja zgornjih in spodnjih delov prebavil ob medicinskih pregledih. S terpenom *d*-limonenom, ki je sestavina eteričnih olj citrusov, lahko učinkovito preprečujemo gastroezofagealni refluks. Eterična olja poprove in zelene mete, sivke, ingverja, kardamoma, pehtrana in kamilice lahko uporabljamo za preprečevanje slabosti (Buchbauer, 2010).

Eterična olja učinkovito lajšajo tudi bolečine na različnih delih telesa. S pomočjo eteričnih olj, ki delujejo antispazmolitično, lahko omilimo boleče menstruacije in kolike pri dojenčkih. Proti bolečim in otrdelim sklepom lahko uporabljamo gele z dodanimi eteričnimi olji. Z nanosom eteričnega olja poprove mete na predelu čela in temena si olajšamo neprijetno bolečino glavobola. Zaradi visoke hlapnosti se eterična olja pogosto uporabljajo tudi v inhalacijski terapiji in kot spreji za lajšanje težav pri boleznih dihal. S pomočjo aromaterapije lahko z eteričnimi olji blažimo tudi postoperativne bolečine, lajšamo požiranje in zmanjšamo smrčanje (Buchbauer, 2010).

2.3.3 Uporaba eteričnih olj v živilski industriji

Vsako leto se številne nove rastlinske spojine izkažejo kot varna in učinkovita sredstva konzerviranja živil, ki delujejo protibakterijsko, protiglivično in antioksidativno (Bhat in sod. 2011). Nekatere izmed njih naj bi tudi izboljšale prehransko vrednost živil, ki jih konzervirajo. Predvsem eterična olja številnih zeli, začimbnic, sadja in zelenjave lahko hkrati uporabljamo kot konzervans, prehranski dodatek in sredstvo za izboljšanje okusa živil (Abay in sod., 2011; Tajkarimi in Ibrahim, 2012). Prvo uradno poročilo o uporabi eteričnih olj kot konzervansov sega v leto 1880 in vse do danes se raziskave nadaljujejo v upanju, da bodo nekoč uporabljena v večjem obsegu (Tajkarimi in Ibrahim, 2012).

Eden spornejših delov obdelave živil v zadnjih letih predstavlja prav njihovo konzerviranje. Proizvajalci živil običajno stremijo k čim nižjim stroškom in visokemu zaslužku, ob tem pa pozabljajo na želje in zdravje potrošnikov. Številni umetni konzervansi so namreč slabo raziskani in zato potencialno nevarni za naše zdravje. Čeprav se mnogi naravni konzervansi izkazujejo za primerljivo in neškodljivo alternativo umetnim, pa njihova uporaba zaenkrat še ni prešla v industrijsko proizvodnjo živil (Willis in Saidman, 2013).

Eterična olja so se v številnih raziskavah izkazala za dober naravni konzervans. Aromatične spojine, ki sestavljajo eterična olja, ustvarjajo neugodne življenjske pogoje za rast bakterij in gliv. Mehanizmi protibakterijskega in protiglivičnega delovanja eteričnih olj so zelo kompleksni. Obstajajo različne teorije o principih delovanja eteričnih olj kot konzervansov, vendar pa zaenkrat še ni oblikovan jasen odgovor. Prevladujoča teorija pravi, da eterična olja reagirajo z maščobnimi kislinami celičnih membran škodljivih mikroorganizmov in s tem destabilizirajo oz. celo povzročijo razpad njihovih membran (Bhat in sod., 2011).

Številni terpeni, ki so prisotni v eteričnih oljih, naj bi uspešno zavirali rast bakterij in gliv. Kljub temu, da so mnogi že v uporabi kot sredstvo za izboljšanje okusa in prehranski dodatki, pa se v vlogi konzervansov še niso pojavili. V eteričnih oljih se pogosto pojavljajo tudi različni fenoli, ki s svojimi antioksidantnimi lastnostmi lahko ohranjajo živilo in povečajo prehransko vrednost (Bhat in sod., 2011).

Številne raziskave nakazujejo, da so eterična olja v primerjavi s sintetično pridelanimi konzervansi enako ali pa celo bolj učinkovita pri zaviranju kvarjenja živil in rasti patogenov, ne kažejo škodljivih vplivov na zdravje in okolje, so biološko razgradljiva in cenovno ugodna (Das in sod., 2012). Velik vpliv pri promoviranju zdrave prehrane imajo gotovo mediji, saj ti pogosto kritizirajo kemične dodatke v prehrani in

obravnavajo vpliv različnih kemikalij na kvaliteto hrane in splošno zdravje ljudi po svetu. Pretirano poudarjene zgodbe o kvaliteti in načinu pridelave hrane med ljudmi povzročajo strah in burne razprave. Kot rezultat temu se potrošniki pogosteje odločajo za nakup živil z oznako "sveže", "naravno", "organsko" ipd.. Kupci torej iščejo hrano, ki ne vsebuje umetnih konzervansov oz. ni pretirano predelana (Willis in Saidman, 2013).

S strani potrošnikov je uporaba eteričnih olj kot naravnih konzervansov dobra rešitev za njihove zahteve po kvalitetni hrani. Gre za naravno sredstvo, katerega pridelava je obem poceni in okolju prijazna (Willis in Saidman, 2013).

V zadnjih letih interes za uporabo eteričnih olj kot naravnih konzervansov narašča. Poleg naraščanja negativnega dojemanja umetnih konzervansov med potrošniki, so v svetu vse večji problem tudi okužbe s hrano, kar kaže na potrebo po bolj učinkovitih konzervansih (Hyldgaard s sod., 2012).

2.3.4 Vpliv eteričnih olj na kalitev rastlin

Interakcije, v katerih aromatične rastline preko hlapnih kemičnih snovi vplivajo na druge organizme, so v naravi precej pogoste. Z izrazom alelopatija označujemo vsako neposredno ali posredno, praviloma zaviralno delovanje rastline na drugo s pomočjo spojin, ki jih izloča v okolje (Rice, 1984 cit. po Dudai in sod., 2004).

Asplund (1968) poroča o alelopatskih učinkih eteričnih olj, ki zavirajo kalitev in rast rastlin. Na ta način naj bi nekatera eterična olja povečevala možnost za preživetje rastline, ki jih proizvaja (Schmidt, 2010). Dudai in sod. (1999) so pokazali, da monoterpeni, ki so prisotni v številnih eteričnih oljih aromatičnih rastlin, zavirajo kalitev pšenice. Mehanizmi delovanja eteričnih olj zaenkrat še niso popolnoma raziskani (Dudai in sod., 2000). V nadaljevanju (Dudai in sod., 2004) poročajo, da je stopnja inhibicije kalitve pšenice odvisna od sposobnosti razgradnje posameznih monoterpenov, kar nakazuje na pomen monoterpenov kot inhibitorjev kalitve semen.

Številna eterična olja zmanjšujejo kalivost semen rastlin (Dudai in sod., 1993; Dudai in sod., 1999; Verdeguer in sod., 2009). Uporaba eteričnih olj za zaviranje mikrobnih okužb bi bila tako primernejša za tretiranje semen, ki so namenjena zaužitju in ne vzgoji novih rastlin.

2.4 KRATEK PREGLED UPORABLJENIH BAKTERIJSKIH IN GLIVNIH VRST

2.4.1 Bakterijske vrste

Bacillus subtilis

B. subtilis je nepatogena aerobna vrsta bakterije s paličasto obliko (bacil), ki jo lahko najdemo v zemlji, vodi in vegetaciji (Harwood, 1992). Vrsta je ena od najbolj raziskanih po Gramu pozitivnih bakterij, zato je pogosto uporabljena kot modelni organizem (Kunst in sod., 1997). *B. subtilis* je pomembna predvsem za proizvodnjo industrijskih encimov kot so amilaze in proteaze (Harwood, 1992).

Listeria monocytogenes

Fakultativno anaerobna in po Gramu pozitivna *L. monocytogenes* je patogena bakterija, ki je v naravi precej pogosta. Najdemo jo lahko v zemlji, vodi in propadajoči vegetaciji. Vrsta je problematična predvsem zaradi pojavljanja v različnih mlečnih in mesnih izdelkih, kar vodi v okužbe s hrano. *L. monocytogenes* povzroča listeriozo, ki se lahko kaže kot driska, bruhanje in bolečine v trebuhu, obolenje podobno gripi, v hujših primerih pa se lahko pojavi tudi meningitis, vnetje centralnega živčnega sistema, endokarditis in septikemija (Rossmanith in sod., 2006).

Paenibacillus sp.

Paenibacillus je rod aerobnih ali fakultativno anaerobnih po Gramu pozitivnih bakterijskih vrst paličaste oblike. Vrste *Paenibacillus* lahko najdemo v raznolikih okoljih; zemlji, vodi, rizosferi, hrani, vegetaciji, larvah insektov in tudi v bolnišnicah (Lorentz in sod., 2006). Vrste so dolgo veljale za nepatogene, vendar se vse pogostejše pojavljajo tudi okužbe pri ljudeh (Ouyang in sod., 2008; Roux in sod., 2008).

Staphylococcus pseudintermedius

S. pseudintermedius je po Gramu pozitivna okrogla bakterija, katerih celice se združujejo v grozdaste skupke, od koder tudi izvira ime rodu. Bakterija je oportunistični patogen psov in mačk, ki jo lahko pri zdravih osebkih najdemo v nosni in ustni sluznici ter na koži v predelu čela, dimelj in anusa. Pri okužbah kože in ušes pri psih je najpogostejši vzrok prav okužba z *S. pseudintermedius* (Devriese in sod., 2005). V preteklem desetletju vrsta postaja vse večji problem veterinarske medicine, saj se je pri nekaterih sevih razvila odpornost proti meticilinu. Odporni sevi se občasno pojavljajo tudi pri okuženih ljudeh, saj se bakterije z živali lahko na ljudi prenesejo neposredno in posredno (Duijkeren in sod., 2011).

Staphylococcus aureus

S. aureus je ena težavnejših patogenih bakterij, saj lahko pri ljudeh povzroča številna življenjsko ogrožujoča obolenja (Miljković-Selimović in sod., 2015). Nahaja se v zelo raznolikih okoljih; v zraku, prahu, vodi, ljudeh in živalih (Hennekinne in sod., 2011). V 20 do 40 % *S. aureus* predstavlja del normalne mikrobiote kože in sluznice odraslih ljudi, vendar lahko pod določenimi pogoji povzroča sprva blage okužbe, ki lahko vodijo v sistemska in življenjsko ogrožujoča stanja (Miljković-Selimović in sod., 2015).

S. aureus je vrsta, ki je ena od najpogostejših povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo preko okužene hrane. Zaradi naraščanja števila sevov, odpornih proti antibiotikom, vrsta predstavlja vse večji problem. Hrana tako postaja pomemben dejavnik pri prenosu tovrstne odpornosti na človeško mikrobioto, kar pomeni veliko grožnjo našemu zdravju (Hennekinne in sod., 2011).

2.4.2 Glivne vrste

Alternaria alternata in *Alternaria infectoria*

Vrste rodu *Alternaria* so splošno razširjene glive, ki se najpogosteje pojavljajo kot rastlinski patogeni ali saprofiti na sadju, zelenjavi in žitih (Brzonkalik in sod., 2011). Okužbe z glivami rodu *Alternaria* ne vplivajo le na količino pridelka in s tem dobička, temveč tudi na kvaliteto in vsebnost mikotoksinov v končnem izdelku (Kahl in sod., 2015). Mikotoksini, ki jih vrsti *A. alternata* in *A. infectoria* izločata v živila na katerih uspevata, predstavljajo tveganje za naše zdravje (Brzonkalik in sod., 2011). Po zaužitju takšnih živil mikotoksini preidejo v človeški ali živalski organizem, kjer lahko povzročijo akutna in kronična obolenja, lahko tudi smrt (Kahl in sod., 2015). Ker so vrste zelo odporne na različne okoljske vplive lahko do okužbe živil prihaja tudi med samim transportom in skladiščenjem (Ozcelik in sod., 1990). Ljudem težave povzročajo tudi spore *A. alternata*, ki veljajo za alergene (Gabriel in sod., 2016).

Aspergillus flavus

A. flavus je vrsta, ki se oportunistično pojavlja kot patogena gliva žit in živali. Vrsta je nevarna zaradi aflatoksina. To je rakotvoren mikotoksin, katerega vsebnost v živilih je v večini držav strogo regulirana. Pri ustreznih rastnih razmerah se lahko gliva razrašča in proizvaja aflatoksin v praktično vseh zrnih žit pred in po žetvi. Gliva je znan alergen in oportunistični patogen predvsem pri imunsko oslabilih ljudeh (Klich, 2007).

Epicoccum nigrum

E. nigrum je splošno razširjena saprofitna gliva, ki jo lahko najdemo v zemlji in rastlinah. Vrsta je le redko šibko patogena, vse pogosteje pa se uporablja za biološko kontrolo nekaterih glivnih rastlinskih patogenov. Obenem je *E. nigrum* tudi vir različnih sekundarnih metabolitov s pomembnimi biološkimi aktivnostmi, ki jih lahko uporabljamo v biotehnologiji (Lima Fávare in sod., 2011).

Fusarium poae

Vrste rodu *Fusarium* zaradi okužb raznolikih vrst žit igrajo ključno vlogo pri izpadu dohodka v poljedelstvu, obenem pa zaradi sproščanja številnih mikotoksinov v žita vplivajo tudi na zdravje ljudi in živali (Guo in sod., 2014).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za potrebe eksperimentalnega dela smo v avgustu leta 2013 nabrali popolnoma razvite nadzemne dele vseh treh vrst zlate rozge, ki uspevajo v Sloveniji: *S. canadensis* L., *S. gigantea* Aiton in *S. virgaurea* L.. Nabiranje rastlinskega materiala so dne 22.8.2013 opravili na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vrsto določanje je opravila dr. Simona Strgulc Krajšek.

Rastlinski material je bil nabran na različnih lokacijah po Sloveniji. Vrsta *S. canadensis* je bila nabrana v osrednji Sloveniji (S 46° 4' 19,86", J 14° 25' 52,25") na nadmorski višini 350 m.n.v.. Prav tako je bila v osrednji Sloveniji nabrana vrsta *S. gigantea* (S 46° 3' 29,44", J 14° 27' 50,30" in S 46° 3' 17,61", J 14° 27' 11,34") na nadmorski višini 300 m.n.v. Vrsta *S. virgaurea* je bila nabrana na različnih lokacijah v Zasavju (S 46° 7' 12,80", J 15° 6' 20,50" , S 46° 6' 28,00", J 15° 7' 15,96" , S 46° 9' 1,08", J 14° 56' 41,82" in S 46° 8' 58,13", J 14° 55' 40,39") na nadmorski višini med 200 in 420 m.n.v. ter v Polhograjskem hribovju na nadmorski višini med 350 in 500 m.n.v. ter 600 in 700 m.n.v..

Rastlinski material smo posušili, ločili liste in cvetove, ter ga do ekstrakcije eteričnih olj shranili v papirnatih vrečkah v suhem in temnem prostoru pri sobni temperaturi.

V preliminarjih testih smo zaradi izredno majhne količine ekstrahiranih eteričnih olj uporabili tudi komercialno dostopni olji *S. canadensis* (Essence Pure, Kanada) in *S. puberula* (Essence Pure, Kanada). Z njima smo metode optimizirali.

3.2 EKSTRAKCIJA ETERIČNIH OLJ

Eterična olja so iz suhega rastlinskega materiala pridobili na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Preko vodne destilacije z aparatur po Clevenger-ju (Ph.Eur. 6.0) so ločeno ekstrahirali eterična olja listov in cvetov posamezne vrste (Preglednica 1). Po ekstrakciji je sledila analiza sestave (PRILOGA A, PRILOGA B in PRILOGA C) posameznih eteričnih olj s plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS) na aparatu GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japonska) (Radonić, 2014). Eterična olja smo do nadaljnjih testov hranili v hladilniku v stekleničkah iz temnega stekla (Slika 6).



Slika 6: Uporabljena eterična olja zlate rozge.

Preglednica 1: Količina pridobljenih eteričnih olj iz posušenega rastlinskega materiala (200 g cvetov in 300 g listov). (Radonić, 2014: 27).

Vrsta	cvetovi (mL)	listi (mL)
<i>S. canadensis</i>	1,65	1,65
<i>S. gigantea</i>	0,40	0,35
<i>S. virgaurea</i>	0,35	0,28

3.3 DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ETERIČNIH OLJ

3.3.1 Določanje protibakterijske aktivnosti

Protibakterijsko aktivnost eteričnih olj smo testirali s prilagojeno difuzijsko metodo na agarju. V testih smo uporabili po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterijske vrste iz zbirke Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

V preliminarnih testih smo določali protibakterijsko aktivnost eteričnih olj *S. canadensis* proti različnim po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijskim vrstam in sevom. V nadaljnjih testih smo zaradi izredno majhnih količin eteričnih olj teste nadaljevali le na po Gram pozitivnih bakterijskih sevih *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Paenibacillus* sp., *S. aureus* (H - MRSA in Ž - MRSA) in *S. pseudintermedius*, ki se izkazali kot najbolj občutljivi.

Preglednica 2: Uporabljeni bakterijski sevi v preliminarnih testih.

<i>B. subtilis</i> L519	<i>E. coli</i> DH5
<i>L. monocytogenes</i> L606	<i>E. coli</i> 3273
<i>Paenibacillus</i> sp. L564	<i>E. coli</i> Ž39
<i>S. aureus</i> H - MRSA 2135	<i>K. pneumoniae</i> RPC1705
<i>S. pseudintermedius</i> MRSP 1342	<i>S. enterica</i> TL747

Priprava tekočega gojišča LB in gojenje bakterijskih kultur preko noči

Za pripravo tekočega hranljivega gojišča Luria-Bertani (LB) (Sigma, ZDA) smo v erlenmajerico zatehtali 2,5 g LB-gojišča in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. S pipeto smo v 150 mL erlenmajerice prenesli po 10 mL dobro premešanega gojišča, jih pokrili z aluminijasto folijo in avtoklavirali. Ko se je gojišče ohladilo, smo iz zbirke predhodno nacepljenih bakterijskih sevov na hranilnem gojišču posamezen sev sterilno prenesli v 10 mL tekočega hranilnega gojišča. Erlenmajerice smo nato prekrili z aluminijasto folijo in jih preko noči (24 h) stresali pri 250 obratih/min pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan so bile bakterijske kulture pripravljene za določanje vpliva eteričnih olj na njihovo rast.

Priprava trdega gojišča LB

V erlenmajerico smo zatehtali 12,5 g LB-gojišča in 7,5 g agarja in ju raztopili v 500 mL destilirane vode. Raztopino smo avtoklavirali, ohladili do temperature približno 42 °C in jo razlili v sterilne Petrijeve plošče, v vsako približno 20 mL. Plošče smo za nekaj minut položili na ravno podlago, nato pa jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Določanje protibakterijske aktivnosti eteričnih olj

Po 50 µL posamezne prekonočne tekoče bakterijske kulture smo prenesli na Petrijevo ploščo s trdim LB-gojiščem. Bakterije smo s pomočjo sterilnih steklenih kroglic enakomerno razmazali po celotni površini plošče. Na površino gojišča smo nato položili sterilne papirnate diske premera 6 mm, na katere smo s pipeto nanесли posamezno eterično olje. Volumen nanesenega eteričnega olja v preliminarnih poskusih je znašal med 6 in 8 µL. Opazili smo, da diski slabo vpijajo eterično olje, zato se je pogosto razlivalo. Tekom testiranja smo ugotovili, da diski izredno hitro vežejo vodo iz gojišča in posledično ne morejo vpiti hidrofobnega olja. V izogib tej situaciji smo eterična olja nanесли na diske takoj po tem, ko smo jih položili na gojišče. Na ta način so diski vpili po 10 µL eteričnega olja. Kot negativno kontrolo smo uporabili diske z 96 % etanolom. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 50 % eterično olje timijana (*Thymus vulgaris*) in 50 % eterično olje cimeta (*Cinnamomum* sp.), za katera je znano močno protibakterijsko delovanje (Anžlovar in sod., 2014a; Choi in sod., 2016). Eterični olji smo do omenjene koncentracije redčili s 96 % etanolom.

Po pripravi plošč je sledila 24-urna inkubacija v topli sobi pri 37 °C. V tem času eterična olja počasi hlapijo v okolico in difundirajo iz diskov v agar. Občutljivost bakterijskega seva na določeno eterično olje se kaže kot zavrti rast bakterij v okolici diska. Za določitev občutljivosti posameznega bakterijskega seva na določeno eterično olje zlate rozge smo izmerili premer (2r) inhibicijske cone. Zaradi izredno majhnih količin eteričnih olj smo poskus opravili le enkrat.

3.3.2 Določanje protiglivne aktivnosti

Protiglivno aktivnost eteričnih olj smo določali s pomočjo dilucijske metode na agarju. Za poskus smo uporabili tri koncentracije eteričnih olj: 0,1 %, 0,05 % in 0,01 %. Uporabili smo glivne vrste, ki smo jih predhodno izolirali s površine 3 dni kalečih zrn pšenice in taksonomsko določili z molekularnimi metodami (Anžlovar in sod., v tisku); *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum* in *Fusarium poae*. Vse našete vrste gliv se nahajajo v zbirki Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Priprava trdega gojišča PDA

Poskus smo izvajali v Petrijevih ploščah (2r = 90 mm) z 1 % gojiščem iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) (Biolife, Italija), ki smo mu dodali ustrezno količino eteričnega olja, tako da smo dobili končne koncentracije 0,1 %, 0,05 % in 0,01 %. Za posamezni poskus smo pripravili sedem 500 mL steklenic, v katere smo zatehtali po 1,25 g PDA in ga raztopili 125 mL destilirane vode. Steklenice z raztopino smo avtoklavirali in pustili, da se je gojišče ohladilo do temperature približno 42 °C. Nato smo v gojišče dodali ustrezen volumen posameznega eteričnega olja in ga s pomočjo magnetnega mešala homogeno vmešali. Kot kontrolne plošče smo uporabili plošče brez dodanega eteričnega olja. Sledilo je razlivanje v sterilne Petrijeve plošče, v vsako približno 20 mL. Plošče smo do strditve gojišča pustili pri sobni temperaturi, nato smo nacepili glive.

Nacepljanje gliv

Iz izvornih glivnih kultur smo s pomočjo spatule izrezali robni del micelija v obliki kvadrata 5 mm x 5 mm in ga sterilno prenesli na sredino predhodno pripravljenih Petrijevih plošč z gojiščem PDA in ustrezno koncentracijo eteričnega olja. Plošče smo oblepili s parafilmom, zavili v aluminijasto folijo in inkubirali 7 dni v temi pri sobni temperaturi.

Določanje protiglivne aktivnosti eteričnih olj

Po inkubaciji smo izmerili premer micelija posamezne glive na treh različnih točkah. Tako smo kot premer micelija prikazali povprečje treh meritev. Za določitev občutljivosti glive na določeno eterično olje zlate rozge smo izračunali inhibicijo rasti glive preko spodnje enačbe, kjer je PK premer micelija kontrole in PT premer micelija, tretiranega z eteričnim oljem.

$$\text{Inhibicija rasti glive (\%)} = \frac{PK - PT}{PK} \times 100 \quad \dots (1)$$

Zaradi izredno majhnih količin eteričnih olj smo poskus opravili le enkrat.

3.3.3 Določanje vpliva eteričnih olj na razvoj glivnih okužb in kalitev zrn pšenice

Tretiranje zrn pšenice

V poskusu smo nesterilizirana zrna pšenice (Vila Natura) tretirali z 2 % eteričnimi olji vrst zlate rozge. Za posamezni tretma smo pripravili dve seriji po 50 zrn, ki smo jih sterilno prenesli v Petrijeve plošče (2r = 55 mm). V čaši smo pripravili 10 % raztopino

DMSO (Sigma, ZDA) iz 5 mL DMSO in 45 mL destilirane vode. Po 4 mL pripravljene raztopine 10 % DMSO smo odpipetirali v ploščo z zrnji in na koncu dodali še 80 μ L eteričnega olja. Kontrolno skupino so predstavljala zrna pšenice, tretirana le z 10 % raztopino DMSO. Vse petrijevke smo zaprli s parafilmom in jih za 24 h položili na stresalnik (Gerhardt Laboshake RO5) na 50 obratov na minuto. V tem času so zrna imbibirala, poleg tega pa je njihova površina postala svetleča zaradi oprijema eteričnega olja.

Priprava trdega gojišča PDA

Za nadaljevanje poskusa smo potrebovali Petrijeve plošče z 2 % gojiščem PDA. Za določanje vpliva posameznega eteričnega olja smo pripravili dve 500 mL steklenici, v kateri smo zatehtali po 5 g PDA in ga raztopili v 250 mL destilirane vode. Steklenice z raztopino smo avtoklavirali in pustili, da se je gojišče ohladilo do temperature približno 42 °C. Nato smo gojišče razlili v sterilne Petrijeve plošče (2r = 90 mm), v vsako približno 20 mL. Plošče smo do strditve gojišča pustili pri sobni temperaturi, nato pa jih do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

Prenos zrn pšenice na gojišče PDA

Zrna pšenice smo po 24 h namakanju v raztopini eteričnega olja s pinceto prenesli na sterilno gazo in jih osušili. Po 10 zrn smo s pinceto sterilno prenesli in razporedili na ploščo z gojiščem PDA, tako da smo imeli za vsak tretma 10 plošč. Plošče smo ovili s parafilmom in aluminijasto folijo ter jih inkubirali 3 dni v temi pri sobni temperaturi.

Določanje protiglivnega delovanja eteričnih olj in vpliva na kalitev zrn pšenice

Za določitev protiglivnega delovanja in vpliva eteričnih olj na kalitev smo dnevno spremljali število okuženih pšeničnih zrn z glivami in njihovo kalitev. Zrno smo označili kot okuženo v kolikor smo na njem s prostim očesom zaznali rast glivnega micelija. Kot uspešno vzkaleno zrno smo označili tisto, pri katerem smo opazili prodor korenčice iz osemenja. Po treh dneh smo poskus zaključili, saj so glivni miceliji zaradi svoje velikosti že dosegli sosednja zrna, obenem pa v treh dneh vzkalijo tudi vsa viabilna zrna pšenice.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Pridobljene podatke smo analizirali s pomočjo računalniških programov Microsoft Excel in GraphPad Prism. Inhibicijo rasti glivnega micelija smo izračunali po enačbi 1, pri čemer smo kot premer micelija kontrole in tretiranih plošč uporabili povprečje treh meritev. Rezultate testa protiglivne aktivnosti eteričnih olj na zrnih pšenice smo analizirali z enosmernim testom ANOVA in Tukey's post-hoc testom. Kot statistično značilne razlike štejemo tiste rezultate, za katere je vrednost $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE

Protibakterijsko aktivnost posameznega eteričnega olja zlate rozge smo določili preko vpliva na zaviranje rasti bakterijskih kultur. V ta namen smo izmerili premere inhibicijskih con. Velikost inhibicijske cone okoli diska z eteričnim oljem je sorazmerna z občutljivostjo bakterijske kulture na testirano eterično olje. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 50 % eterično olje vrste *Thymus vulgaris*, pri kateri smo izmerili velikost cone inhibicije od 2,4 cm do 4,0 cm ter 50 % eterično olje vrste *Cinnamomum* sp., pri kateri so cone inhibicije merile od 1,8 cm do 2,8 cm. Omenjeni eterični olji smo redčili s 96 % etanolom. Kot negativno kontrolo smo tako uporabili disk s 96 % etanolom, ki pa ni deloval protibakterijsko.

V preliminarnih testih smo ugotovili, da eterična olja zlate rozge ne delujejo na po Gramu negativne bakterije, zato smo v nadaljevanju uporabili le občutljivejše po Gramu pozitivne seve.

Preglednica 3 prikazuje rezultate testa protibakterijske aktivnosti 100 % eteričnih olj različnih vrst zlate rozge. Vseh šest testiranih eteričnih olj je v primerjavi z delovanjem komercialno dostopnih eteričnih olj vrst *S. canadensis* in *S. puberula* delovalo močnejše. Eterična olja, ki smo jih pridobili iz rastlin, nabranih v Sloveniji, so uspešno zavrla rast vseh izbranih bakterijskih vrst in sevov. Glede na občutljivost sevov si od najbolj občutljivega proti najmanj občutljivemu sevu sledijo *B. subtilis*, *Paenibacillus* sp., *S. aureus* (Ž - MRSA), *S. pseudintermedius*, *L. monocytogenes* in *S. aureus* (H - MRSA). Med komercialno pridobljenimi olji smo nekoliko večjo protibakterijsko učinkovitost izmerili pri vrsti *S. puberula*, ki je delovalo proti vsem testiranim bakterijskim sevom. Komercialno eterično olje vrste *S. canadensis* je delovalo le proti vrstam *B. subtilis*, *Paenibacillus* sp. in *S. aureus* (Ž - MRSA).

Vidnejših razlik v protibakterijskem delovanju med posameznimi vrstami eteričnih olj zlatih rozg nismo opazili (Slika 7). Prav tako nismo opazili večjih razlik v delovanju eteričnih olj listov in eteričnih olj cvetov. Test smo zaradi izredno majhnih količin eteričnih olj opravili le enkrat, zato statistična primerjava ni bila mogoča.

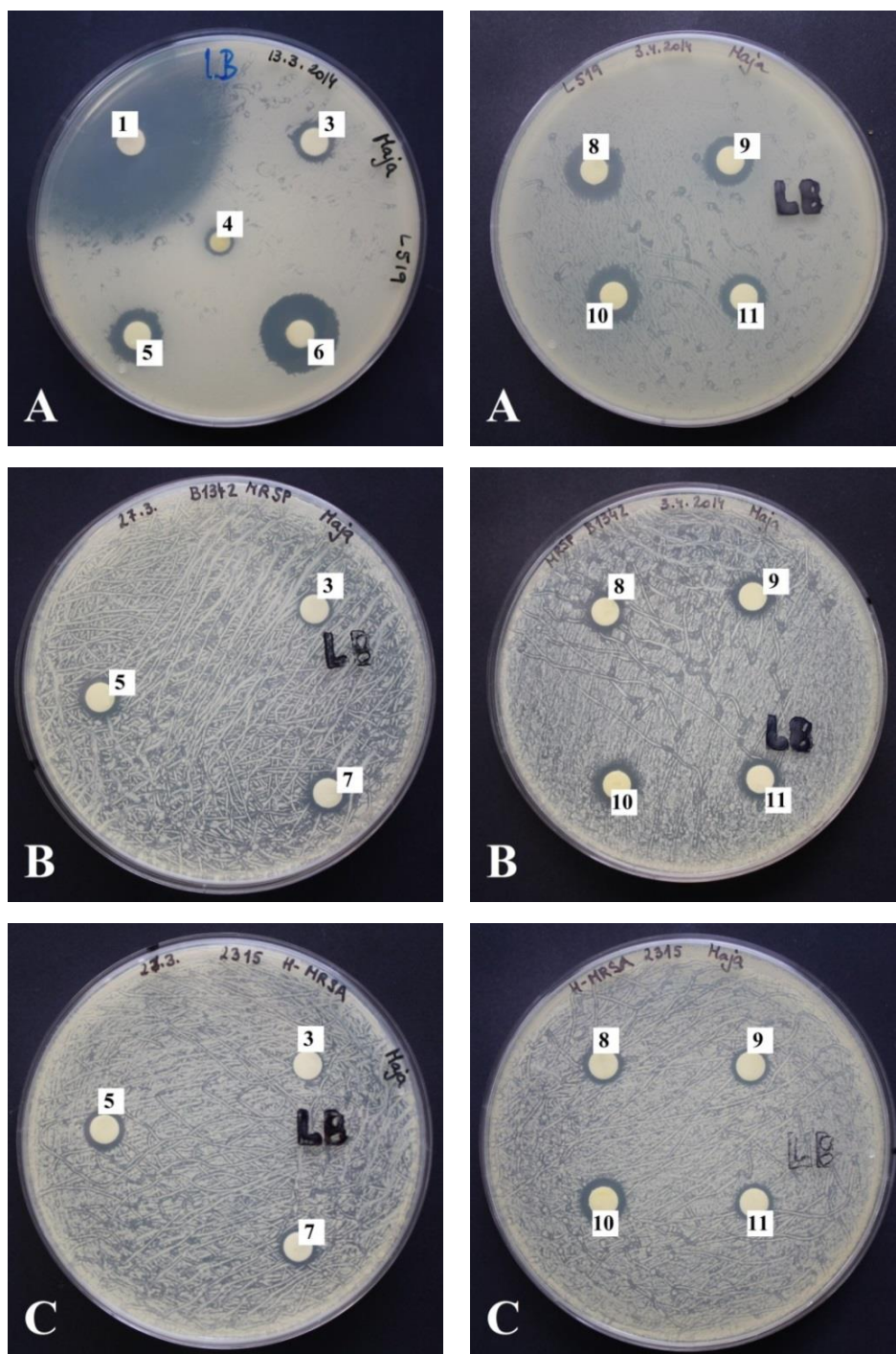
Preglednica 3: Protibakterijska aktivnost 100 % eteričnih olj (EO) vrst zlate rozge proti izbranim bakterijskim vrstam.

	Premer inhibicijske cone (cm)**							
Bakterija	EO <i>S. canadensis</i>		EO <i>S. gigantea</i>		EO <i>S. virgaurea</i>		EO <i>S. canadensis</i> *	EO <i>S. puberula</i> *
	<i>listi</i>	<i>cvetovi</i>	<i>listi</i>	<i>cvetovi</i>	<i>listi</i>	<i>cvetovi</i>		
<i>B. subtilis</i>	1,4	1,2	1,4	1,1	1,2	1,0	0,7	0,9
<i>L. monocytogenes</i>	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	/	0,8
<i>Paenibacillus</i> sp.	1,2	1,1	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7
<i>S. pseudintermedius</i>	0,9	0,9	0,8	0,9	1,0	0,9	/	0,9
<i>S. aureus</i> (H - MRSA)	0,8	0,8	0,8	0,8	1,0	0,8	/	0,8
<i>S. aureus</i> (Ž - MRSA)	0,9	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,7	0,7

Oznake: * - komercialno dostopni eterični olji, pridobljeni iz celotnih poganjkov

** - premer diska = 0,6 cm

/ - ni aktivnosti



Slika 7: Inhibicijske cone rasti nekaterih bakterijskih vrst okoli diskov z različnimi eteričnimi olji (EO). Oznake: A - *B. subtilis*, B - *S. pseudintermedius*, C - *S. aureus* (H - MRSA), 1 – EO *T. vulgaris*, 3 – EO *S. puberula* (komercialen), 4 – EO *S. canadensis* (komercialen), 5 – EO *S. canadensis* (listi), 6 – EO *Cinnamomum* sp., 7 – EO *S. canadensis* (cvetovi), 8 – EO *S. gigantea* (listi), 9 – EO *S. gigantea* (cvetovi), 10 – EO *S. virgaurea* (listi), 11 – EO *S. virgaurea* (cvetovi).

4.2 PROTIGLIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE

Protiglivno aktivnost posameznega eteričnega olja vrst *Solidago* smo določili preko njihovega vpliva na rast glivnega micelija. Velikost glivne kulture je obratnosorazmerna z njeno občutljivostjo na testirano eterično olje. Test smo opravili pri treh različnih koncentracijah eteričnih olj; 0,1 %, 0,05 % in 0,01 %. Kot negativno kontrolo smo uporabili glive, ki so uspevale na agarju brez dodanega eteričnega olja. Učinkovitost eteričnih olj smo določili preko inhibicije rasti tretirane glive v primerjavi s kontrolo.

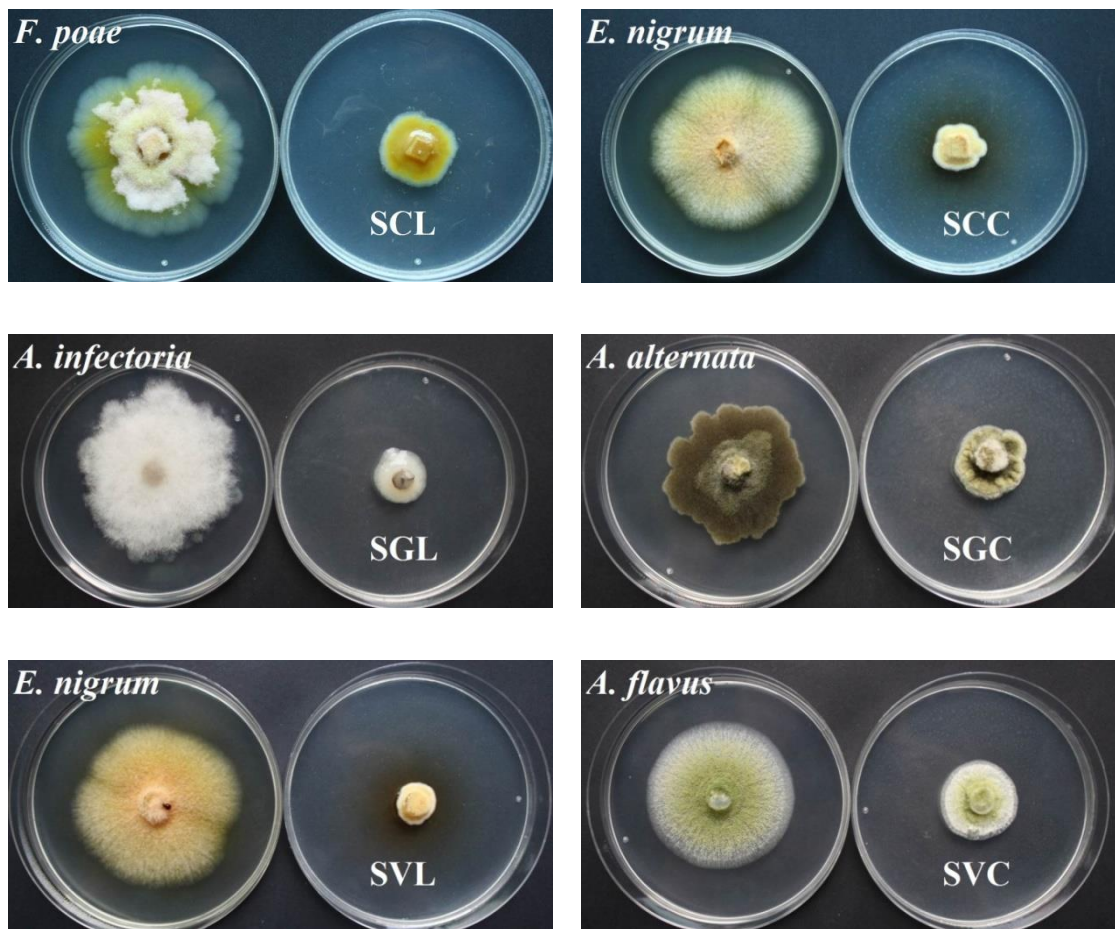
Preglednica 4 prikazuje rezultate protiglivnega delovanja eteričnih olj različnih vrst zlate rozge. Vsa testirana eterična olja so zavirala rast glivnega micelija pri vseh koncentracijah z izjemo glive *A. alternata* pri najnižji koncentraciji eteričnega olja cvetov *S. canadensis* in *S. virgaurea*. Največjo občutljivost na delovanje eteričnih olj smo opazili pri vrstah *F. poae* in *E. nigrum*, najmanjšo pa pri *A. alternata* in *A. flavus*. Ob višanju koncentracije eteričnih olj v agarju smo zaznali trend upadanja rasti glive zato sklepamo, da je delovanje eteričnih olj koncentracijsko odvisno.

Opaznejših razlik v protiglivnem delovanju eteričnih olj med posameznimi vrstami zlatih rozg nismo opazili. Najvišjo stopnjo zaviranja rasti gliv so pokazala eterična olja vrst *S. gigantea* in *S. virgaurea*. Prav tako nismo zaznali očitnejših razlik v protiglivnem delovanju eteričnih olj iz listov in cvetov (Slika 8).

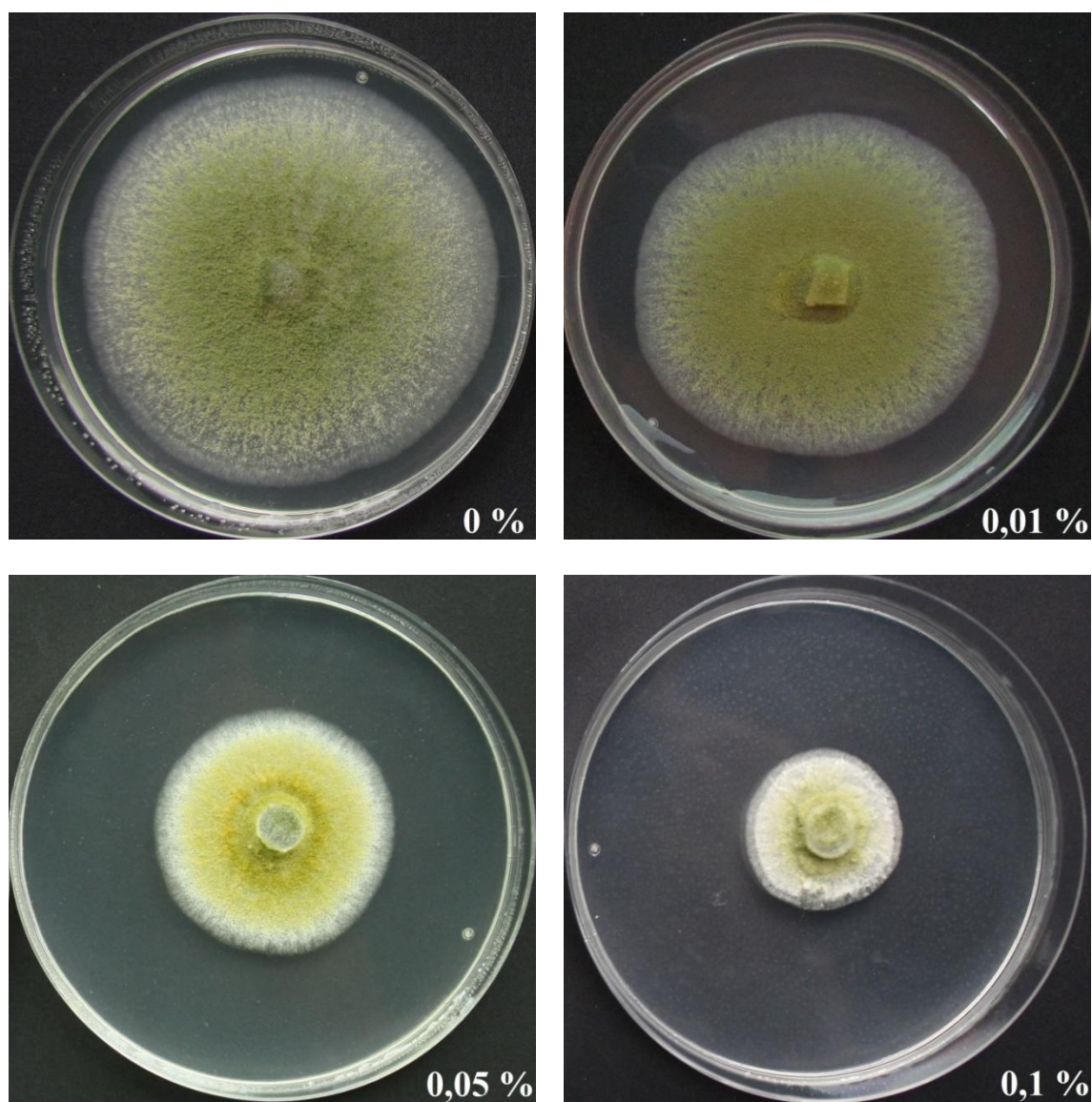
Tekom testiranja protiglivne aktivnosti smo opazili spremembe v obarvanosti micelija glive *A. flavus*. Te so se pojavile ne glede na vrsto eteričnega olja in prav tako pri vseh koncentracijah. Višje koncentracije eteričnih olj so na barvo micelija vplivale izraziteje (Slika 9).

Preglednica 4: Protiglivna učinkovitost eteričnih olj (EO) vrst zlate rozge proti izbranim glivnim vrstam.

Gliva	Inhibicija rasti glivnega micelija (%)						
	Konc. EO	EO <i>S. canadensis</i>		EO <i>S. gigantea</i>		EO <i>S. virgaurea</i>	
		listi	cvetovi	listi	cvetovi	listi	cvetovi
<i>A. alternata</i>	0,1 %	39,1	39,1	48,6	50,0	55,8	38,4
	0,05 %	31,1	28,9	42,2	40,0	40,0	28,9
	0,01 %	13,0	-33,0	20,0	20,0	18,0	0,0
<i>A. infectoria</i>	0,1 %	39,8	66,1	69,9	77,4	78,5	53,8
	0,05 %	52,2	34,3	64,2	64,2	59,7	63,4
	0,01 %	23,0	23,0	34,0	24,0	22,0	18,0
<i>A. flavus</i>	0,1 %	45,3	35,5	49,2	47,2	59,6	47,9
	0,05 %	21,6	19,6	41,2	43,1	49,0	28,9
	0,01 %	8,0	3,0	8,0	3,0	5,0	10,0
<i>E. nigrum</i>	0,1 %	68,3	66,6	74,2	67,7	76,0	68,3
	0,05 %	59,6	43,9	64,9	68,4	63,2	52,6
	0,01 %	17,0	3,0	63,0	56,0	49,0	14,0
<i>F. poae</i>	0,1 %	56,7	57,9	64,6	58,4	74,2	55,6
	0,05 %	54,4	50,9	59,6	59,6	68,4	49,1
	0,01 %	48,0	40,0	44,0	41,0	51,0	49,0



Slika 8: Protiglivno delovanje eteričnih olj (0,1 %) listov in cvetov vrst zlate rozge proti izbranim glivnim vrstam. Leva plošča na posamezni sliki predstavlja kontrolo, desna plošča pa glive, tretirane z različnimi eteričnimi olji (EO). Oznake: SCL – EO *S. canadensis* (listi), SCC – EO *S. canadensis* (cvetovi), SGL – EO *S. gigantea* (listi), SGC – EO *S. gigantea* (cvetovi), SVC – EO *S. virgaurea* (listi), SVC – EO *S. virgaurea* (cvetovi).

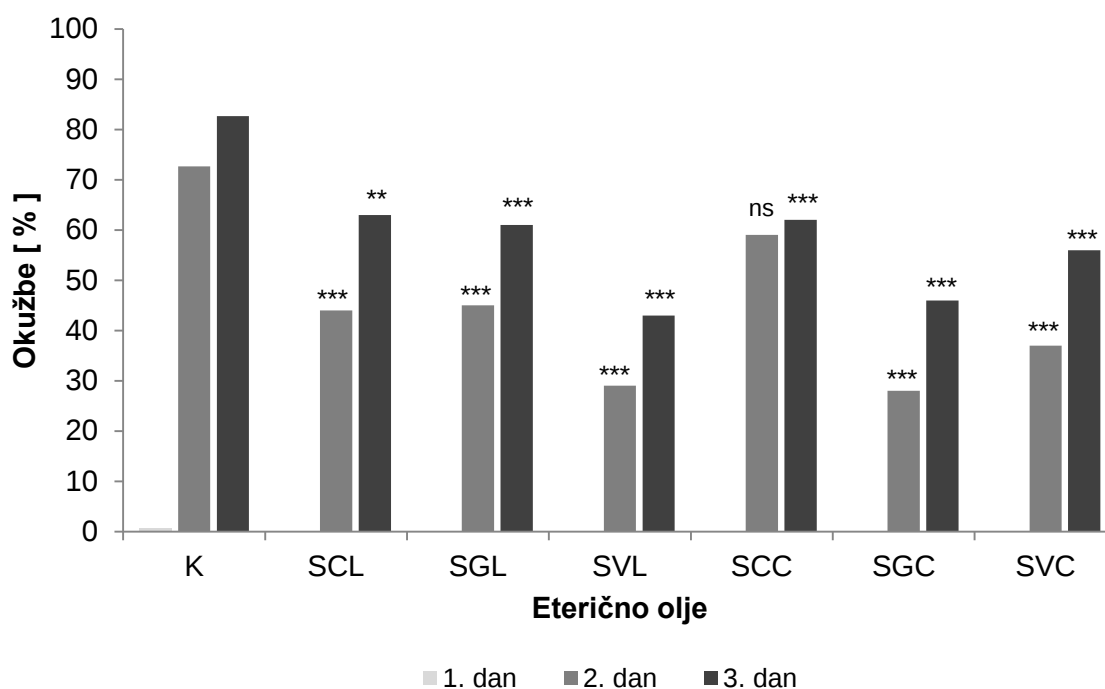


Slika 9: Spremembe v obarvanosti in velikosti micelija glive *A. flavus* ob prisotnosti različnih koncentracij eteričnega olja iz cvetov *S. canadensis*.

4.3 VPLIV ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE NA RAZVOJ GLIVNIH OKUŽB IN KALITEV ZRN PŠENICE

Protiglivno delovanje eteričnih olj smo določali tudi preko spremljanja protiglivne aktivnosti eteričnih olj vrst *Solidago* na nesteriliziranih zrnih pšenice. Zrna smo tretirali z 2 % eteričnimi olji, redčenimi v 10% DMSO in beležili število zrn, okuženih z glivami ter število vzkaljenih zrn (Slika 12). Kot negativno kontrolo smo uporabili netretirana zrna, ki so bila v času imbibicije namočena v 10 % razstopini DMSO.

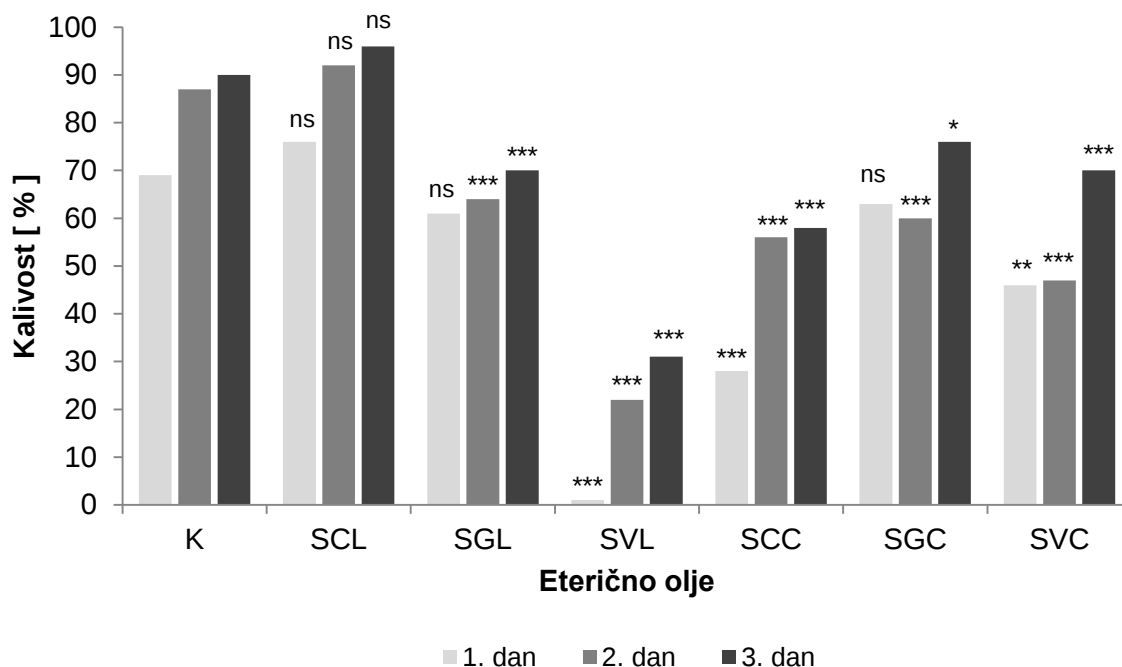
Slika 10 prikazuje delež zrn, na katerih smo zaznali eno ali več glivnih okužb. Njihovo pojavljanje smo spremljali dnevno. Meritve smo zaključili tretji dan, saj so se glivni miceliji razrasli do sosednjih zrn. Prve okužbe smo s prostim očesom zaznali drugi dan po tretiranju z eteričnimi olji. Tretji dan meritev je bil delež tretiranih zrn z glivnimi okužbami statistično značilno manjši od kontrole pri vseh eteričnih oljih.



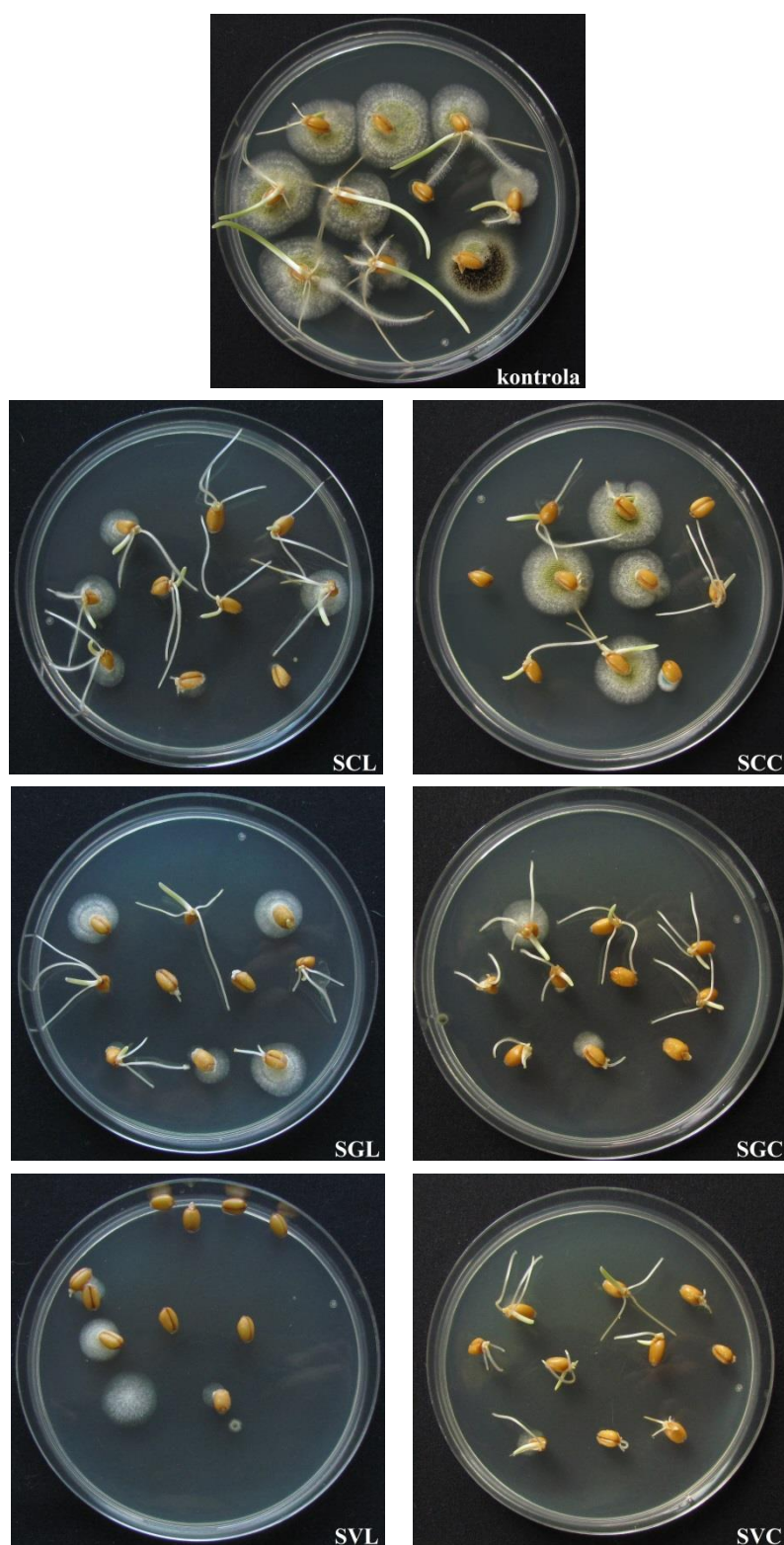
Slika 10: Delež okuženih zrn z glivami 1., 2. in 3. dan po tretiranju z 2 % eteričnimi olji (EO). Oznake: K – kontrola, SCL – EO *S. canadensis* (listi), SGL – EO *S. gigantea* (listi), SVL – EO *S. virgaurea* (listi), SCC – EO *S. canadensis* (cvetovi), SGC – EO *S. gigantea* (cvetovi), SVC – EO *S. virgaurea* (cvetovi). Oznake: zvezdice ponazarjajo statistično značilne razlike na podlagi Tukey-jevega testa primerjave med kontrolo in posameznim tretmajem eteričnega olja 2. in 3. dan tretiranja (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$). ns, razlika ni statistično značilna ($p>0,05$).

Statistično značilne razlike 3. dan po tretiranju smo zabeležili le med eteričnim oljem listov *S. virgaurea* in tremi različnimi eteričnimi olji - listov *S. gigantea* in obema eteričnema oljema vrste *S. canadensis*. Primerjava delovanja med preostalimi eteričnimi olji ni pokazala razlik.

Slika 11 prikazuje delež vzkalenih pšeničnih zrn, ki so bila tretirana z različnimi eteričnimi olji. Večina zrn je vzkalila prvi dan po tretiranju. Testirana eterična olja so se izkazala kot učinkoviti zaviralci kalitve. Statistično značilne razlike na 2. in 3. dan po tretiranju so v primerjavi s kontrolno skupino opazne pri vseh oljih z izjemo eteričnega olja iz listov *S. canadensis*.



Slika 11: Delež kalitve pšeničnih zrn 1., 2. in 3. dan po tretiranju z 2 % eteričnimi olji. Oznake: K – kontrola, SCL – EO *S. canadensis* (listi), SGL – EO *S. gigantea* (listi), SVL – EO *S. virgaurea* (listi), SCC – EO *S. canadensis* (cvetovi), SGC – EO *S. gigantea* (cvetovi), SVC – EO *S. virgaurea* (cvetovi). Oznake: zvezdice ponazarjajo statistično značilne razlike na podlagi Tukey-jevega testa primerjave med kontrolo in posameznim tretmajem eteričnega olja 2. in 3. dan tretiranja (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). ns, razlika ni statistično značilna ($p > 0,05$).



Slika 12: Ugotavljanje protiglivnega potenciala eteričnih olj zlatih rozg pri zrnih pšenice. Po treh dneh inkubacije lahko s prostim očesom zaznamo glivne okužbe in razvoj kalic. Oznake: SCL – EO *S. canadensis* (listi), SCC – EO *S. canadensis* (cvetovi), SGL – EO *S. gigantea* (listi), SGC – EO *S. gigantea* (cvetovi), SVL – EO *S. virgaurea* (listi), SVC – EO *S. virgaurea* (cvetovi).

5 RAZPRAVA

Raziskovanje biološke aktivnosti eteričnih olj je izredno težavno, saj je sestava in s tem povezano delovanje odvisno od številnih dejavnikov kot so rastni pogoji rastline, čas žetve, način ekstrakcije in individualni kemotip eteričnega olja (Lang in Buchbauer, 2011; Fathi in Sefidkon, 2012).

Za pomoč pri razumevanju delovanja posameznega preučevanega eteričnega olja so sodelavci identificirali med 49 in 70 različnih sestavin, ki predstavljajo med 68,0 - 92,1 % vseh prisotnih spojin. V eteričnih oljih listov in cvetov iste vrste zlate rozge je nabor identificiranih spojin večinoma enak, razlike je moč opaziti le v deležu spojin (Radonić, 2014).

5.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE

Okvirno oceno biološke aktivnosti preučevanih eteričnih olj rodu *Solidago* smo v preliminarnih testih opravili s komercialno pridobljenima eteričnema oljema vrste *S. canadensis* in *S. puberula* na po Gramu negativnih bakterijskih vrstah *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae*. V splošnem velja, da močnejša eterična olja, ki zavrejo rast po Gramu negativnih bakterijskih vrst, praviloma zavrejo tudi rast po Gramu pozitivnih bakterij. Trditev so z raziskavami eteričnih olj vrst rodu *Solidago* podprli Mishra in sod. (2010) ter Morel in sod. (2006).

V naši raziskavi omenjeni eterični olji nista delovali na po Gramu negativne bakterije, zato smo v nadaljnih preliminarnih testih uporabili le po Gramu pozitivne bakterijske vrste. O podobnem delovanju eteričnega olja listov *S. canadensis* le na po Gramu pozitivne bakterije poročajo tudi Mishra in sod. (2011). Eterična olja so učinkovitejša proti po Gramu pozitivnim bakterijskim vrstam, saj odsotnost zunanje membrane oljem omogoča neposredne poškodbe plazemske membrane in s tem večjo protibakterijsko aktivnost (Sandri in sod., 2007; Lang in Buchbauer, 2011). Zaradi majhnega volumna nekomercialnih eteričnih olj iz divje rastočih zlatih rozg smo za teste izbrali le šest najbolj občutljivih vrst: *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Paenibacillus* sp., *S. pseudintermedius* in dva različna seva vrste *S. aureus*.

Eterična olja listov in cvetov vseh treh vrst zlate rozge, *S. canadensis*, *S. gigantea* in *S. virgaurea*, so pokazala protibakterijsko aktivnost proti vsem izbranim po Gramu pozitivnim bakterijskim vrstam (Preglednica 3). V povprečju so bile največje inhibicijske cone opažene pri vrsti *B. subtilis*, najmanjše pa pri obeh sevih vrste *S. aureus* (Slika 7, A in C). Podoben vzorec občutljivosti obeh bakterijskih vrst na eterično

olje vrste *S. canadensis* in *Zornia diphylla* so v svojih raziskavah opisali tudi Arunkumar in sod. (2014) ter Mishra in sod. (2010).

Največjo biološko aktivnost smo glede na raziskavo, ki sta jo opravili Anžlovar in Dolenc Koce (2014), pričakovali pri vrsti *S. gigantea*. Naša sklepanja so se izkazala za napačna, saj rezultati niso pokazali izrazitejših razlik v protibakterijskem delovanju eteričnih olj različnih vrst zlatih rozg (Preglednica 3). Prav tako smo predvidevali, da bodo večjo protibakterijsko aktivnost imela predvsem eterična olja cvetov. Opazili smo ravno nasprotno, saj je bila rast bakterij nekoliko močnejše zavrtja pri delovanju eteričnih olj listov. Zaradi majhnega števila meritev o dejanskih razlikah v učinkovitosti eteričnih olj listov in cvetov ne moremo sklepati z gotovostjo.

Protibakterijska aktivnost komercialno dostopnega eteričnega olja *S. canadensis* je bila v primerjavi z našima eteričnima oljema vrste *S. canadensis* šibkejša (Preglednica 3). Komercialno eterično olje *S. canadensis* je rast bakterijskih kultur zavrlo le pri polovici testiranih sevov, tj. *B. subtilis*, *Paenibacillus* sp. in *S. aureus* (Ž - MRSA). Prav tako smo opazili, da so bile inhibicijske cone vidno manjše kot pri delovanju nekomercialnih eteričnih olj. Komercialno eterično olje vrste *S. puberula* je zavrlo rast vseh bakterijskih sevov, velikosti inhibicijskih con pa so bile nekoliko večje kot pri komercialnem olju vrste *S. canadensis*.

Možnih razlogov za slabše delovanje komercialno dostopnih eteričnih olj je zagotovo več. Na protibakterijsko delovanje posameznega eteričnega olja vpliva predvsem sestava eteričnega olja, ki pa se spreminja z rastiščem, rastnimi razmerami in časom žetve (Lang in Buchbauer, 2011). V pomoč pri razlagi različnega delovanja bi lahko bila že primerjava kemijske sestave komercialnih eteričnih olj s sestavo pri nas pridobljenih eteričnih olj.

V *in vitro* poskusih so se testirana eterična olja zlate rozge izkazala kot učinkovito protibakterijsko sredstvo. Uporabljene bakterijske vrste *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Paenibacillus* sp., *S. pseudintermedius* in *S. aureus* se pojavljajo v zelo raznolikih okoljih in lahko povzročijo okužbe tudi pri ljudeh. McMahon in sod. (2008) opozarjajo, da se bakterijske odpornosti razvijajo tudi proti eteričnim oljem, ko so ta uporabljena v prenizkih koncentracijah. Ključnega pomena bi tako bila določitev minimalnih inhibitornih koncentracij. Zaradi izredno majhnih količin pridobljenih eteričnih olj zlatih rozg, minimalne inhibitorne koncentracije posameznega olja nismo določili.

Iz rezultatov lahko domnevamo, da vrstno specifično ločevanje rastlinskega materiala in ločevanje na posamezne rastlinske dele za izdelavo eteričnih olj zlate rozge ni smiselno.

Takšno delo je časovno potratno, obenem pa zahteva dobro razlikovanje med vrstami. V našem primeru bi za izdelavo eteričnega olja lahko uporabili kar celotne poganjke vseh treh vrst, saj imajo podobno tako sestavo (Radonić, 2014) kot protibakterijsko aktivnost, kar je še posebej uporabno za vrsti *S. canadensis* in *S. gigantea*, ki rasteta v velikih in gostih sestojih. Protibakterijsko delovanje eteričnih olj zlate rozge bi lahko izkoristili samostojno ali pa v kombinaciji z drugimi eteričnimi olji oziroma sintetično pridobljenimi aktivnimi snovmi, kot predlagata Lang in Buchbauer (2011). Različne učinkovine lahko delujejo sinergistično, zato lahko z različnimi kombinacijami dobimo močnejši protibakterijski učinek in širši spekter delovanja (Mahboubi in Bidgoli, 2010; Roller in sod., 2009). Glede na spekter pojavljanja testiranih bakterijskih vrst bi lahko eterična olja zlate rozge potencialno uporabljali tako v medicini kot tudi živilski industriji.

V medicini bi eterična olja zlate rozge lahko predstavljala potencialno naravno sredstvo za dezinfekcijo vode in zraka, preprečevanje nastanka biofilmov na medicinskih napravah, kot dodatek kremam, gelom in milom za nego obolenih predelov kože vendar pa so v ta namen potrebne še temeljite raziskave (Buchbauer 2010; Lang in Buchbauer, 2011). Za boljše protibakterijsko delovanje Lang in Buchbauer (2011) predlagata predvsem kombinacijo eteričnih olj s sintetičnimi antibiotiki. Sinergistično delovanje zdravila in eteričnega olja lahko zniža koncentracijo sintetičnih snovi in s tem omili stranske učinke zdravila.

Potencial izkoriščanja eteričnih olj zlate rozge v namen konzerviranja živil je gotovo možen, vendar bi bile zato potrebne dodatne raziskave. Za doseganje enakega protibakterijskega delovanja na živilih kot v *in vitro* testih so običajno potrebne precej višje koncentracije eteričnega olja (Burt, 2004). Eterična olja so lahko odlično nadomestilo umetnim sintetičnim konzervansom, ki se dodajajo živilom ob skladiščenju, predvsem sadju, zelenjavi in mesu (Solgi in Ghorbanpour, 2014). Lang in Buchbauer (2011) priporočata kombinacijo različnih metod konzerviranja, saj s tem lahko omilimo spremembe v okusu zaradi dodatka eteričnih olj, obenem pa zmanjšamo količnino sintetičnih konzervansov. Eterična olja poskrbijo za upočasnitev oziroma zavrtje rasti škodljivih mikroorganizmov, zmanjšajo dehidracijo in s tem poskrbijo tudi za večjo sočnost živil (Solgi in Ghorbanpour, 2014). V splošnem je protibakterijsko delovanje eteričnih olj učinkovitejše pri nižjih temperaturah, nižjemu pH, manjši vsebnosti maščob in večji slanosti (Calo in sod., 2015).

5.2 PROTIGLIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE

Protiglivno aktivnost eteričnih olj smo testirali na glivnih vrstah, ki so bile predhodno izolirane iz kalečih zrn pšenice in so prepoznane kot potencialne povzročiteljice njihovega kvarjenja (Anžlovar in sod., v tisku). Vrste zasedajo različne ekološke niše, saj se pojavljajo kot endofiti, saprofiti ali kot patogene glive v/na pšeničnih zrnih. V poskusih smo uporabili vrste *Alternaria alternata* (endofit/saprofit), *Alternaria infectoria* (endofit/saprofit), *Epicoccum nigrum* (saprofit), *Aspergillus flavus* (saprofit/patogen) in *Fusarium poae* (patogen).

Vsa eterična olja so pri vseh testiranih koncentracijah zavirala rast glivnih micelijev z izjemo glive *A. alternata* pri najnižji koncentraciji 0,01 % eteričnega olja cvetov *S. canadensis* in *S. virgaurea* (Preglednica 4). Opazili smo, da je tekom testiranja kontrola vrste *A. alternata* iz tedna v teden slabše uspevala. Možen razlog za slabšo rast glive je lahko gojišče s premalo hranil. Za gotovo potrditev neučinkovitosti eteričnega olja cvetov *S. canadensis* proti glivi *A. alternata* bi morali teste ponoviti.

Eterična olja so tudi povzročila spremembe v obarvanosti micelija glive *A. flavus* (Slika 9). Micelij kontrole, ki je uspeval na 2 % gojišču PDA brez dodanih eteričnih olj, je bil obarvan zeleno. Glive, ki smo jih tretirali z eteričnimi olji so barvo spremenile v različno močne odtenke rumenozelene, pri najvišji koncentraciji do skoraj bele barve. Glede na raziskavo, ki so jo opravili Yigit in sod. (2000) predvidevamo, da izguba pigmentacije glivnega micelija lahko kaže na upad virulentnosti patogena. O samih morfoloških spremembah glivnih hif vrste *Botrytis cinerea* so v raziskavi z eteričnim oljem rjavkaste žametnice (*Tagetes patula*) poročali že Romagnoli in sod. (2005). Kasneje so o razbarvanju konidijev gliv poročali tudi Yahyazadeh in sod. (2008), ki so zaznali morfološke spremembe hif pri glivi *Penicillium digitatum* po tretiranju z eteričnima oljema materine dušice (*Thymus vulgaris*) in dišečega klinčevca (*Eugenia caryophyllata*). Spremembe na hifah glive *Aspergillus niger* po tretiranju z eteričnem oljem prave kamilice (*Matricaria chamomilla*) so opisali tudi Tolouee in sod. (2010).

O koncentracijsko odvisni protiglivni učinkovitosti eteričnih olj poročajo številni avtorji (Anžlovar in sod., 2014a; Gandomi in sod., 2009; Kocevski in sod., 2013; Romagnoli in sod., 2005; Vitoratos in sod., 2013). Enak učinek smo opazili tudi pri delovanju eteričnih olj zlate rozge, saj se je z višanjem koncentracije kazal trend upadanja rasti glive. Tako je odstotek zavrte rasti praviloma večji pri višji koncentraciji eteričnih olj (Preglednica 4).

V raziskavi nismo zaznali izrazite protiglivne učinkovitosti eteričnega olja ene od vrst zlate rozge (Preglednica 4). Najvišjo stopnjo zaviranja rasti smo glede na rezultate predhodne raziskave, ki sta jo opravili Anžlovar in Dolenc Koce (2014) pričakovali pri invazivnih vrstah *S. canadensis* in *S. gigantea*, vendar sta rast gliv najmočnejše zavrli eterični olji vrst *S. gigantea* in *S. virgaurea*. Pri najvišji koncentraciji 0,1 % je proti vsem testiranim glivnim vrstam najučinkoviteje delovalo eterično olje listov *S. virgaurea*. Ta trend se pri ostalih dveh koncentracijah ni izrazil, saj so največje inhibicije rasti porazdeljene med eteričnimi olji listov in cvetov vrst *S. gigantea* in *S. virgaurea*. Podobno protiglivno delovanje preučevanih eteričnih olj se tudi tokrat ujema z njihovo podobno kemijsko sestavo (Radonić, 2014).

V primerjavi protiglivnega delovanja eteričnih olj listov in cvetov očitnejših razlik nismo zaznali (Preglednica 4). Pri koncentraciji 0,1 % opazimo, da eterična olja listov in cvetov vrst *S. canadensis* in *S. gigantea* na rast posamezne glive vplivajo različno učinkovito. O raznolikem vplivu organskih izvlečkov oziroma eteričnih olj zlate rozge na različne vrste gliv poročajo tudi Anžlovar in Dolenc Koce (2014), Mishra in sod. (2010) in Mishra in sod. (2011). Pri vrsti *S. virgaurea* je rast vseh vrst gliv najbolj učinkovito zavrlo eterično olje iz listov. V testu z 0,05 % eteričnimi olji opazimo, da je eterično olje listov vrste *S. canadensis* uspešneje zaviralo rast gliv kot eterično olje cvetov iste vrste. Učinkovitost eteričnih olj listov in cvetov *S. gigantea* in *S. virgaurea* je različna glede na vrsto glive. Mishra in sod. (2010) so pri raziskovanju protiglivnega delovanja 0,1 % eteričnega olja korenin *S. canadensis* opazili protiglivno delovanje proti vrstam *Aspergillus niger* in *Candida albicans*. Medtem pri preučevanju 0,1 % eteričnega olja listov *S. canadensis* niso zaznali protiglivnega delovanja proti omenjenima glivama (Mishra in sod., 2011).

Eterična olja zlate rozge so se v *in vitro* testih izkazala kot učinkovito sredstvo s protiglivnim delovanjem. Z vse večjim neodobravanjem sintetičnih konzervansov zaradi nezaželenih učinkov na živali in ljudi, narašča povpraševanje predvsem po naravnih sredstvih, ki bi preprečila kvarjenje in potencialne težave z mikotoksini v živilih (Kedia in sod., 2014). Uspešno zaviranje rasti glivnih vrst s strani eteričnih olj zlate rozge, kaže na velik potencial uporabe tovrstnih olj kot naravnih konzervansov predvsem pri skladiščenju sadja, zelenjave in žit, kot so predlagali že Willis in Saidman (2013), Kedia in sod. (2014), Solgi in Ghorbanpour (2014) ter Calo in sod. (2015). Okužbe s testiranimi vrstami predstavljajo veliko težavo predvsem pri skladiščenju žitaric in stročnic, saj te povzročajo ogromne ekonomske izgube pridelovalcem na račun propadanja in zmanjšanja kalivosti obenem pa zaradi izločanja glivnih mikotoksinov v zrna ogrožajo tudi življenje ljudi in živali (Kedia in sod., 2014). Eterična olja zlate rozge bi v namen protiglivnega delovanja na živilih lahko izkoristili samostojno ali v

kombinaciji z drugimi eteričnimi olji ali sintetično pridobljenimi aktivnimi snovmi, kot tudi predlagata tudi Lang in Buchbauer (2011), saj se s tem učinkovitost lahko poveča. Težave s spremembami okusa zaradi dodatka eteričnih olj bi tudi v primeru protiglivne zaščite živil lahko zmanjšali predvsem s kombinacijo eteričnega olja in sintetičnih konzervansov. Seveda je za uporabo eteričnih olj v prehranski industriji potrebno opraviti še nadaljne raziskave. Gotovo bi bilo priporočljivo določiti tudi minimalno inhibitorno koncentracijo posameznega eteričnega olja, vendar zaradi omejenih količin olj tega nismo mogli izvesti.

5.3 VPLIV ETERIČNIH OLJ ZLATE ROZGE NA RAZVOJ GLIVNIH OKUŽB IN KALITEV ZRN PŠENICE

Pozitivni rezultati protiglivne aktivnosti eteričnih olj *Solidago* v testih, opravljenimi z glivnimi kulturami, so nas spodbudili k raziskovanju možnosti uporabe eteričnih olj kot fungicida oz. konzervansa za shranjevanje zrn po žetvi. Prisotnost in rast gliv na zrnih žit povzroča velike izgube tako v kakovosti kot tudi količini pridelka, prav tako nekatere glive z izločanjem mikotoksinov lahko predstavljajo nevarnost za potrošnike (Nogueira in sod., 2010; Kumar in sod., 2010). V ta namen smo določili, kako posamezno eterično olje zavira rast gliv v/na zrnih pšenice. Poleg spremljanja glivnih okužb smo opazovali tudi vpliv eteričnih olj na kalitev nesteriliziranih pšeničnih zrn.

Glivne okužbe so se na zrnih pojavile drugi dan po tretiranju (Slika 10). Zrna so kljub glivnim okužbam uspešno kalila, večinoma že prvi dan opazovanja (Slika 11). Po treh dneh nismo več opazili novo skalenih zrn, poleg tega pa so miceliji gliv iz sosednjih zrn že dosegli drug drugega, zato smo poskus zaključili. Delež glivnih okužb zrn, tretiranih z eteričnimi olji, je bil zadnji dan poskusa statistično značilno manjši od kontrolne skupine (Slika 10), zato lahko potrdimo, da vsa testirana eterična olja vrst *Solidago* delujejo fungicidno na glive, prisotne v/na zrnih pšenice.

Protiglivna aktivnost eteričnih olj zlatih rozg je bila večinoma podobna, od ostalih je odstopalo le eterično olje iz listov *S. virgaurea*. Podobno protiglivno delovanje eteričnih olj se ujema s podobno kemijsko sestavo eteričnih olj (Radonić, 2014).

Kot so že predhodno poročali Dudai in sod. (1993), Dudai in sod. (1999), Dudai in sod., (2000), Dudai in sod. (2004), Scrivanti in sod. (2003) ter Verdeguer in sod. (2009), se eterična olja pogosto izkažejo kot fitotoksična, saj učinkovito zavirajo kalitev rastlin. O zaviranju kalitve izvlečkov vrste *S. canadensis* so poročali tudi Butcko in Jensen (2002) ter Abhilasha in sod. (2008). V naši raziskavi so eterična olja zlate rozge v veliki meri pokazala zaviralni vpliv na kalitev pšenice (Slika 11). Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino so tretji dan meritev vidne pri vseh oljih z izjemo eteričnega olja listov *S. canadensis*.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je eterično olje listov vrste *S. canadensis* primerno za tretiranje zrn pšenice, ki bi se kasneje uporabljala za sejanje. Predlagano eterično olje bi tako zaščitilo pšenična zrna z zmanjšanjem glivnih okužb (Slika 10), obenem pa ne bi vplivalo na zmanjšanje kalitve (Slika 11). Uporaba eteričnega olja listov kanadske zlate rozge bi lahko zmanjšala uporabo sintetično pridelanih fungicidov pri pridelavi pšenice. Podobno v raziskavah učinkovitosti eteričnega olja kumine (*Cuminum*

cyminum) predlagajo tudi Kedia in sod. (2015). Z vidika varovanja narave pa to ni edini pozitiven vidik, saj bi obsežno biomaso invazivne tujerodne vrste *S. canadensis* lahko uporabili za izdelavo eteričnih olj. Z redno košnjo bi tako omejevali vrsto in s tem pripomogli k ohranjanju biotske pestrosti vrst (Strgulc Krajšek, 2008a).

Znana so že poročanja o zaviranju kalitve in rasti gliv zaradi delovanja eteričnih olj v/na zrnih pšenice (Anžlovar in sod., 2014b) in čičerike (Kedia in sod., 2014; Prakash in sod., 2015). Eterična olja listov *S. canadensis* ter listov in cvetov vrst *S. gigantea* in *S. virgaurea* s svojim zaviralnim delovanjem na kalitev pšeničnih zrn in razvoj gliv prav tako kažejo potencial za uporabo. Omenjena eterična olja bi lahko uporabili za preprečevanje kvarjenja zrn pšenice, ki bi služila kot živilo, saj sposobnost kalitve zrn za prehrano ni potrebna oz. zaželeno. Tekom skladiščenja živil se pod ugodnimi pogoji (visoka vlažnost in pH) razvijejo glivne okužbe, zato v tem času naraste potreba po uporabi fungicidov (Kedia in sod., 2014). Pri nižjih koncentracijah bi eterična olja šibkeje zavirala kalitev, zato bi bila lahko primerna tudi kot naravni konzervansi za shranjevanje zrn za sejanje. Ker bi se z nižjo koncentracijo uporabljenih eteričnih olj zmanjšala tudi učinkovitost zaviranja glivnih okužb, bi jih bilo smiselno kombinirati z drugimi (npr. sintetičnimi) konzervansi. Na ta način bi lahko koristno uporabili vsa eterična olja zlate rozge in s tem zmanjšali količino sintetičnih konzervansov, ki obremenjujejo okolje in so manj zaželeni pri potrošnikih.

6 SKLEPI

- V *in vitro* testih so vsa testirana eterična olja zlate rozge učinkovito delovala proti izbranim bakterijskim in glivnim vrstam.
- Učinkovitost eteričnih olj, pripravljenih iz listov in cvetov, je podobna.
- V namen protibakterijskega delovanja bi lahko pripravili enotno eterično olje iz celotnih pogankov vseh treh vrst.
- Protiglivo delovanje eteričnih olj zlate rozge je koncentracijsko odvisno.
- Eterična olja zlate rozge izkazujejo dober potencial za uporabo v medicini, saj preprečujejo rast nekaterih odpornih bakterijskih vrst.
- Eterična olja zlate rozge imajo potencial za uporabo v živilski industriji, saj preprečujejo rast bakterij in gliv, ki se pojavljajo na živilih.
- Vsa testirana eterična olja bi lahko uporabljali kot naravni konzervansi pri skladiščenju pšeničnih zrn, ki služijo za prehrano.
- Za skladiščenje pšeničnih zrn za setev bi bilo najprimernejše olje iz listov *S. canadensis*.

7 POVZETEK

V magistrskem delu smo raziskali biološko aktivnost eteričnih olj, pridobljenih iz listov in socvetij vseh treh vrst zlate rozge, ki uspevajo v Sloveniji; domorodne navadne zlate rozge (*S. virgaurea*) ter invazivne tujerodne kanadske (*S. canadensis*) in orjaške zlate rozge (*S. gigantea*) (Wraber, 2007).

Raziskovanje uporabnosti rastlinskih vrst je vse pogostejše, saj so rastline kot pomemben vir biološko aktivnih učinkovin še vedno dokaj neraziskane (Mahesh in Satish, 2008). Ob dejstvu, da sta kar dve od skupno treh pri nas rastočih vrst zlatih rozg invazivni, je ideja po izkoriščanju njihove obsežne biomase vsekakor dobrodošla. Pretekle raziskave o biološki aktivnosti izvlečkov zlate rozge in dejstvo, da rastlina že stoletja velja za zdravilno, so nas spodbudili k raziskovanju biološke aktivnosti njihovih eteričnih olj. V delu smo se osredotočili na določanje protibakterijske in protiglivne aktivnosti eteričnih olj zlatih rozg, ki smo jih pridobili iz različnih rastlinskih organov.

Protibakterijsko aktivnost 100 % eteričnih olj smo določili s prilagojeno difuzijsko metodo na agarju pri po Gramu pozitivnih vrstah *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus* sp., *Staphylococcus pseudintermedius* in *Staphylococcus aureus*. Vsa testirana eterična olja so uspešno zavrla rast vseh izbranih bakterijskih sevov. Glede na občutljivost sevov si od najbolj občutljivega proti najmanj občutljivemu sevu sledijo *B. subtilis*, *Paenibacillus* sp., *S. aureus* (Ž - MRSA), *S. pseudintermedius*, *L. monocytogenes* in *S. aureus* (H - MRSA). Izrazitejših razlik v protibakterijskem delovanju eteričnih olj različnih vrst rodu *Solidago* nismo opazili. Prav tako nismo zaznali razlik v delovanju eteričnih olj listov in cvetov. V preliminarni raziskavi smo testirali tudi po Gramu negativne bakterijske vrste *E. coli*, *K. pneumoniae* in *S. enterica*, vendar eterična olja na njihovo rast niso vplivala.

Protiglivno aktivnost eteričnih olj zlatih rozg smo določili z dilucijsko metodo na agarju pri vrstah *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum* in *Fusarium poae*. Rast glivnih micelijev vseh testiranih gliv je bila zavrla pri koncentracijah 0,1 % in 0,05 % neodvisno od vrste eteričnega olja. Protiglivno delovanje eteričnih olj se je izkazalo za koncentracijsko odvisno. Pomembnih razlik v delovanju eteričnih olj posamezne vrste zlate rozge tudi tokrat nismo opazili. Prav tako ni bilo razlik v delovanju eteričnih olj, ki so bila pripravljena iz listov in cvetov.

Fungicidno delovanje eteričnih olj in njihov vpliv na kalitev zrn pšenice smo določili pri nesteriliziranih zrnih, ki smo jih tretirali z 2 % eteričnimi olji zlatih rozg. Tretirana zrna smo položili na Petrijeve plošče z 2 % gojiščem PDA in 3 dni spremljali razvoj glivnih

okužb in kalitev. Ugotovili smo, da je število okužb na tretiranih zrnih statistično značilno manjše glede na netretirana zrna, kar potrjuje protiglivno delovanje vseh eteričnih olj zlatih rozg. Omenjena eterična olja delujejo podobno, razlike med posameznimi olji smo zabeležili le med eteričnim oljem listov *S. virgaurea* in oljem listov *S. gigantea* ter obema eteričnema oljema vrste *S. canadensis*. V delovanju preostalih eteričnih olj ni bilo zaznati statistično značilnih razlik. Vsa eterična olja, z izjemo olja iz listov vrste *S. canadensis*, so zavrla tudi kalitev pšeničnih zrn, zato sklepamo, da bi bilo eterično olje listov vrste *S. canadensis* primerno za tretiranje tistih zrn pšenice, ki bi se kasneje uporabljala za sejanje, saj olje zaščiti zrna pred glivnimi okužbami, obenem pa ne vpliva na njihovo kalivost. Prav vsa eterična olja pa bi lahko uporabili za preprečevanje kvarjenja zrn pšenice, ki bi služila kot živilo (npr. predelava v moko), saj sposobnost kalitve zanje ni potrebna.

Rezultati nakazujejo na možnost uporabe eteričnih olj zlate rozge pri zaviranju rasti proti antibiotikom odpornih bakterij, kot tudi proti bakterijam in glivam, ki se pojavljajo na živilih med shranjevanjem. Za zanesljivejše rezultate bi morali poskuse izvesti v več neodvisnih ponovitvah in določiti minimalne inhibitorne koncentracije, kar pa ni bilo mogoče zaradi majhnih količin eteričnih olj. Kljub temu eterična olja zlatih rozg izkazujejo potencial kot sredstvo v boju proti bakterijskim in glivnim okužbam, ki povzročajo težave na področju medicine in živilske industrije. Uporaba eteričnih olj bi lahko pripomogla k preprečevanju bakterijskih okužb ljudi ter zmanjšala uporabo sintetično pridelanih fungicidov pri pridelavi pšenice in s tem pripomogla k manjšemu obremenjevanju okolja. Obsežno biomaso invazivnih vrst *S. canadensis* in *S. gigantea* bi lahko uporabili za izdelavo eteričnih olj in tako pripomogli k počasnejši razrasti obsežnih sestojev. Zlata rozga tako predstavlja obetajoče sredstvo tako v medicini kot tudi živilski industriji, saj bi s svojim širokim spektrom delovanja omogočila zmanjšanje uporabe sintetičnih zdravil in konzervansov.

8 VIRI

- Abay S., Aydin F., Irkin R. 2011. Inhibitory effects of some plant essential oils against *Arcobacter butzleri* and potential for rosemary oil as a natural food preservative. *Journal of Medicinal Food*, 14, 3: 291-296
- Abhilasha D., Quintana N., Vivanco J., Joshi J. 2008. Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? *Journal of Ecology*, 96: 993-1001
- Aliagiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I. B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4168-4170
- Anžlovar S., Dolenc Koce J. 2014. Antibacterial and antifungal activity of aqueous and organic extracts from indigenous and invasive species of Goldenrod (*Solidago* spp.) grown in Slovenia. *Phyton*, 54, 1: 135-147
- Anžlovar S., Baričevič D., Ambrožič Avguštin J., Dolenc Koce J. 2014a. Essential oil of common thyme as a natural antimicrobial food additive. *Food Technology and Biotechnology*, 52, 2: 263-268
- Anžlovar S., Pršin T., Likar M., Dolenc Koce J. 2014b. Potential of thyme essential oil as antifungal preservative for storage of wheat seeds. V: 6. slovenski simpozij o rastlinski biologiji, Hoče, 11.-12. september 2014. Dolenc Koce J., Grebenc T., Urbanek Krajnc A. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za biologijo rastlin: 69-70
- Anžlovar S., Likar M., Dolenc Koce J. Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. *Acta botanica croatica*, v tisku
- Apáti P., Szentmihályi K., Kristó T.S., Papp I., Vinkler P., Szoke E., Kéry A. 2003. Herbal remedies of *Solidago*-correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32: 1045-1053
- Arunkumar R., Nair S. A., Rameshkumar K. B., Subramoniam A. 2014. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil. *Records of Natural Products*, 8: 385-393

- Asplund R. O. 1968. Monoterpenes: Relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry*, 7: 1995-1997
- Bajpai V. K., Baek H.-K., Kang S. C. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45: 722-734
- Bhat R., Alias A. K., Paliyath G. 2011. Essential oils and other plant extracts as food preservatives. V: *Progress in Food Preservation*. New Jersey, John Wiley & Sons: 539-580
- Brzonkalik K., Herrling T., Sylatk C., Neumann A. 2011. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 120-126
- Buchbauer G. 2010. Biological activities of essential oils. V: *Handbook of essential oils. Science, technology and applications*. Baser K. H. C., Buchbauer G. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 235-273
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253
- Butcko V. M., Jensen R. J. 2002. Evidence of tissue-specific allelopathic activity in *Euthamia graminifolia* and *Solidago canadensis* (Asteraceae). *The American Midland Naturalist*, 148: 253-262
- Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Amsterdam, Academic Press: 6000 str.
- Calo J. R., Crandall P. G., O'Bryan C. A., Ricke S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54: 111-119
- ChemSpider. 2016. Search and share chemistry.
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.20939.html?rid=8d329434-e112-44f7-8120-6bf681de34e6> (15. nov. 2016)
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10209840.html?rid=bd44c055-dfe2-472e-818d-da5a92340919> (15. nov. 2016)
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.221081.html?rid=804995db-c70e-46b3-8a15-17207e1f9e64> (15. nov. 2016)

- Chevalier M., Medioni E., Prêcheur I. 2012. Inhibition of *Candida albicans* yeast–hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1016-1022
- Choi O., Cho S. K., Kim J., Park C. G., Kim J. 2016. In vitro antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 4: 308-314
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). V: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (ur.). Rockville, American Society of Plant Physiologist: 1250-1318
- Das M., Rath C. C., Mohapatra U. B. 2012. Bacteriology of a most popular street food (*Panipuri*) and inhibitory effect of essential oils on bacterial growth. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 5: 564
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550854/> (5. dec. 2016)
- Demir H., Açık L., Bali E. B., Koç L. Y., Kaynak G. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2: 274-279
- Demuner A. J., Barbosa L. C. A., Magalhaes C. G., Da Silva C. J., Maltha C. R. A., Pinheiro A. L. 2011. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brasil. *Molecules*, 16: 1181-1191
- Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G. 2015. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L.. *Industrial Crops and Products*, 74: 803-809
- Devriese L. A., Vancanneyt M., Baele M., Vanechoutte M., De Graef E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawyndt P., Swings J., Decostere A., Haesebrouck F. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 4: 1569-1573
- Dinolfo M. I., Stenglein S. A. 2014. *Fusarium poae* and mycotoxins: potential risk for consumers. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49, 1: 5-20

- Dorman H. J. D., Deans S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316
- Dudai N., Ben-Ami M., Chaimovich R., Chaimovitsh D. 2004. Essential oils as allelopathic agents: Bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. *Acta Horticulturae*, 629: 505-508
- Dudai N., Larkov O., Putievsky E., Lerner H. R., Ravid U., Lewinsohn E., Mayer A. M. 2000. Biotransformation of constituents of essential oils germinating wheat seeds. *Phytochemistry*, 55: 375-382
- Dudai N., Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., Putievsky E., Lerner H. R. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25, 5: 1079-1089
- Dudai N., Poljakoff-Mayber A., Lerner H. R., Putievsky E., Ravid U., Katzir E. 1993. Inhibition of germination and growth by volatile substances from *Micromeria fruticosa*. *Acta Horticulturae*, 344: 123-131
- Duijkeren V. E., Kamphuis M., Mije I. C., Laarhoven L. M., Duim B., Wagenaar J. A., Houwers D. J. 2011. Transmission of methicillinresistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary Microbiology*, 16: 1-6
- Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D., Pagán R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food control*, 22: 896-902
- Fathi E., Sefidkon F. 2012. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Eucalyptus sargentii*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14: 1035-1042
- Fisher K., Phillips C. 2009. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19: 156-164
- Gabriel M. F., Postigo I., Tomaz C. T., Martínez J. 2016. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environment International*, 89-90: 71-80

- Gandomi H., Misaghi A., Basti A. A., Bokaei S., Khosravi A., Abbasifar A., Javan A. J. 2009. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. Food and Chemical Toxicology, 47: 2397-2400
- Guinoiseau E., Luciani A., Rossi P. G., Quilichini Y., Ternengo S., Bradesi P., Berti L. 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 29: 873-879
- Guo Z., Döll K., Dastjerdi R., Karlovsky P., Dehne H.-W., Altincicek B. 2014. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). PLOS ONE 9, 6: 1-9
- Harwood C. R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. Trends in Biotechnology, 10: 247-256
- Hennekinne J.-A., De Buyser M.-L., Dragacci S. 2011. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiology Reviews, 36: 815-836
- 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, 12: 1-24
- Kahl S. M., Ulrich A., Kirichenko A. A., Müller M. E. H. 2015. Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. Journal of Applied Microbiology, 119: 1637-1650
- Kalembe D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medical Chemistry, 10: 813-829
- Kedia A., Prakash B., Mishra K. P., Dubey N. K. 2014. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. International Journal of Food Microbiology, 168-169: 1-7

- Klich M. A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Molecular plant pathology, 8: 713-722
- Kocevski D., Du M., Kan J., Jing C., Lačanin I., Pavlović H. 2013. Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. Journal of Food Science, 78, 5: 731-737
- Kołodziej B., Kowalski R., Kędzia B. 2011. Antibacterial and antimutagenic activity of extracts aboveground parts of three *Solidago* species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago canadensis* L. and *Solidago gigantea* Ait. Journal of Medicinal Plants Research, 5, 31: 6770-6779
- Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentosus* Var. chia.. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 7681-7685
- Kumar A., Shukla R., Singh P., Dubey N. K. 2010. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. Food and Chemical Toxicology, 48: 539-543
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessi res P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S.-K., Codani J.-J., Connerton I. F., Cummings N. J., Daniel R. A., Denizot F., Devine K. M., D sterh ft A., Ehrlich S. D., Emmerson P. T., Entian K. D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S.-Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E. J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B. J., Haga K., Haiech J., Harwood C. R., H naut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.-F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.-M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mau  C., M digue C., Medina N., Mellado R. P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.-H., Parro V., Pohl T. M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A. M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S. J., Serror P., Shin B.-S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H.,

- Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H.-F., Zumstein E., Yoshikawa H., Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249-256
- Lang G., Buchbauer G. 2011. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 13-39
- Laurençon L., Sarrazin E., Chevalier M., Prêcheur I., Herbette G., Fernandez X. 2013. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea alpestris* with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. *Phytochemistry*, 86: 103-111
- Lima Fávaro L. C., Melo F. L., Aguilar-Vildoso C. I., Araújo W. L. 2011. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLOS ONE* 6, 8: 1-18
- Lorentz R. H., Ártico S., Silveira A. B., Einsfeld A., Corção G. 2006. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology*, 43: 541-547
- Lunder M. 2013. Zlata rozga. V: *Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. Kreft S., Glavač Kočever N. (ur.). 2. izdaja. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 398-402
- Mahboubi M., Bidgoli F. G. 2010. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*, 17: 548-550
- Mahesh B., Satish S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4: 839-843
- McMahon M. A. S., Tunney M. M., Moore J. E., Blair I. S., Gilpin D. F., McDowell D. A. 2008. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Letters in Applied Microbiology*, 47: 263-268

- McNeil J. 1976. *Solidago* L. V: Flora Europaea. Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 110-111
- Miljković-Selimović B., Dinić M., Orlović J., Babić T. 2015. *Staphylococcus aureus*: Immunopathogenesis and Human Immunity. Acta facultatis medicae Naissensis, 32, 4: 243-257
- Mishra D., Joshi S., Bisht G., Pilkhwai S., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* Linn. root essential oil. Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 1, 3: 187-190
- Mishra D., Joshi S., Pilkhwai S., Bisht G. 2011. Chemical composition, analgesic and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* essential oil from India. Journal of Pharmacy Research, 4, 1: 63-66
- Morel A. F., Dias G. O., Porto C., Simionatto E., Stuker C. Z., Dalcol I. I. 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. Fitoterapia, 77: 453-455
- Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Research, 17: 215-234
- Nogueira J. H. C., González E., Galletti R. S., Facanali R., Marques M. O. M., Felício J. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin supressor of *Aspergillus flavus*. International Journal of Food Microbiology, 137: 55-60
- Ouyang J., Pei Z., Lutwick L., Dalal S., Yang L., Cassai N., Sandhu K., Hanna B., Wiczorek R. L., Bluth M., Pincus M. R. 2008. Case Report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: A new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. Annals of Clinical & Laboratory Science, 38, 4: 393-400
- Ozcelik S., Ozcelik N., Beuchat L. R., 1990. Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. International Journal of Food Microbiology, 11: 187-194
- Pisseri F., Bertoli A., Pistelli L. 2008. Essential oils in medicine: principles of therapy. Parassitologia, 50, 1-2: 89-91

- Paibon W., Yimnoi C. A., Tembab N., Boonlue W., Jampachaisri K., Nuengchamnong N., Wawanuch N., Ingkaninan K. 2011. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. *International Journal of Cosmetic Science*, 33: 150-156
- Pauli A., Kubeczka K. H. 2010. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Natural Product Communications*, 5: 1387-1394
- Prakash B., Kedia A., Singh A., Yadav S., Singh A., Yadav A., Dubey D. K., Dubey N. K. 2015. Antifungal, aflatoxin and antioxidant activity of plant essential oils and their *in vivo* efficacy in protection of chickpea seeds. *Journal of Food Quality*, 39: 36-44
- Radonić N. 2014. Uporedna analiza hemijskog sestava etarskog ulja izolovanog iz listova i cvjetova vrsta roda *Solidago* sp., Asteraceae. Završni rad. Podgorica, Univerzitet Črne Gore, Farmaceutski fakultet u Podgorici: 45 str.
- Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K., Remmal A. 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 356-362
- Roller S., Ernest N., Buckle J. 2009. The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15, 3: 275-279
- Romagnoli C., Bruni R., Andreotti E., Rai M. K., Vicentini C. B., Mares D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*, 225: 57-65
- Rossmann P., Krassnig M., Wagner M., Hein I. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology*, 157: 763-771
- Roux V., Fenner L., Raoult D. 2008. *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 682-687

- Sabir S. M., Ahmad S. D., Hamid A., Khan M. Q., Athayde M. L., Santos D. B., Boligon A. A., Rocha J. B. T. 2012. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chemistry*, 131: 741-747
- Saei-Dehkordi S. S., Tajik H., Mordani M., Khalighi-Sigaroodi F. 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1562-1567
- Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A. P. L., Echeverrigaray S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, 103: 823-828
- Scrivanti L. R., Zunino M. P., Zygodlo J. A., 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 563-572
- Sharma N., Tripathi A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163: 337-344
- Schmidt E. 2010. Production of essential oils. V: Handbook of essential oils. Science, technology and applications. Baser K. H. C., Buchbauer G. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 83-118
- Solgi M., Ghorbanpour M. 2014. Application of essential oils and their biological effects on extending the shelf-life and quality of horticultural crops. *Trakia Journal of Science*, 2: 198-210
- Sonwa M. M. 2000. Isolation and structure. Elucidation of essential oil constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus* and *Cyperus rotundus*. Doctor dissertation. Hamburg, University of Hamburg, Faculty of Chemistry: 158 str.
- Starks C. M., Williams R. B., Goering M. G., O'Neil-Johnson M., Norman V. L., Hu J. F., Garo E., Hough G. W., Rice S. M., Eldridge G. R. 2010. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry*, 71: 104-109

- Strgulc Krajšek S. 2008a. Kanadska zlata rozga *Solidago canadensis*. V: Tujerodne vrste: informativni listi izbranih invazivnih vrst. Jogan N. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 45-47
- Strgulc Krajšek S. 2008b. Orjaška zlata rozga *Solidago gigantea*. V: Tujerodne vrste: informativni listi izbranih invazivnih vrst. Jogan N. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 48-50
- Szymura M., Szymura T. 2013. Soil preferences and morphological diversity of goldenrods (*Solidago* L.) from south-western Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82, 2: 107-115
- Šutovská M., Capek P., Kocmálová M., Fraňová S., Pawlaczyk I., Gancarz R. 2013. Characterization and biological activity of *Solidago canadensis* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52: 192-197
- Tajkarimi M., Ibrahim S. A. 2012. Phytochemicals as anti-microbial food preservatives. V: Dietary phytochemicals and microbes. Patra A. K. (ur.). Dordrecht, Springer: 207-235
- Tamura E. K., Jimenez R. S., Waisman K., Gobbo-Neto L., Lopes N. P., Malpezzi-Marinho E. A. L., Marinho E. A. V., Farsky S. H. P. 2009. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 478-485
- Thaler N., Bajc M. 2013. Vpliv glivnih in rastlinskih sekundarnih metabolitov na verižno reakcijo s polimerazo (PCR). *Acta Silvae et Ligni*, 100: 25-40
- Thiem B., Goślińska O. 2002. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures. *Fitoterapia*, 73: 514-516
- Tolouee M., Alinezhad S., Saberi R., Eslamifar A., Zad S. J., Jamand K., Taeb J., Rezaee M.-B., Kawachi M., Shams-Ghahfarokhi M., Razzaghi-Abyaneh M. 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 127-133

- Veldhuizen E. J. A., Tjeerdsma-Van Bokhoven J. L. M., Zweijter C., Burt S. A., Haagsman H. P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1874-1879
- Verdeguer M., Amparo Blázquez M., Boira H. 2009. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 362-369
- Vitoratos A., Bilalis D., Karkanis A., Efthimiadou A. 2013. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41, 1: 86-92
- Weber E. 2003. Invasive plant species of the world: a reference guide to environmental weeds. New York, Oxford University Press: 560 str.
- Willis D., Saidman S. 2013. Botanical essential oils as natural food preservatives. 13th annual frechman engineering conference, University of Pittsburgh: 4 str. <http://136.142.82.187/eng12/history/spring2013/pdf/3059.pdf> (5. jan. 2016)
- Witt H. C. D. 1978. Rastlinski svet. 2, Semenovke 2. Ljubljana, Mladinska knjiga: 378 str.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 1: 3-19
- Wraber T. 2007. Asteraceae. V: Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. (ur.). 4. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 651 str.
- Yahyazadeh M., Omidbaigi R., Zare R., Taheri H. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1445-1450
- Yigit F., Ozcan M., Akgul A. 2000. Inhibitory effect of some spice essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. *Grasas Aceites*, 4: 237-240
- Yoshinari T., Yaguchi A., Takahashi-Ando N., Kimura M., Takahashi H., Nakajima T., Sugita-Konishi Y., Nagasawa H., Sakuda S. 2008. Spiroethers of German chamomile

inhibit production of aflatoxin G₁ and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in thie biosynthesis. Federation of European Microbiological Societies, 284: 184-190

WHO. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva, WHO-World Health Organization: 255 str.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1

(3. jan. 2016)

WHO. 2014. Antimicrobial resistance, Global Report on Surveillance. Geneva, WHO-World Health Organization: 232 str.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1

(3. jan. 2016)

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se zahvalila mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce, ki me je sprejela v prijetno in sproščeno delovno okolje Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin. Hvala za strokovno vodenje, vso pomoč, predloge, spodbudne besede in razumevanje.

Iskrena hvala somentorici asist. dr. Sabini Anžlovar za idejno zasnovo magistrskega dela, pomoč pri praktičnem delu, predano znanje, prijaznost, nasvete in potrpežljivost.

Doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin se zahvaljujem za pomoč pri praktičnem delu na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov ter končni pregled dela.

Prav tako hvala recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za hiter in skrben pregled dela.

Posebna zahvala gre mojima staršema, ki sta mi z možnostjo odraščanja in vzgajanja v naravi dala odlično popotnico za življenje. Hvala da sta mi zaupala, me spodbujala in predvsem vedno verjela vame, ne glede na moje odločitve.

Hvala tudi mojemu Mihi, ki me je dobronamerno opominjal na čimprejšnji zaključek študija in me sprejel takšno kot sem. Za prijetno in sproščeno vzdušje v času študentskih let se zahvaljujem Tedi, Nataliji in Diani. Ker brez vmesne sprostitev ne bi šlo, hvala tudi Zali in Almi, sestri Nini in sodelavki Kaji za vse kave, skupna kosila in čveke.

PRILOGE

PRILOGA A

Kemijska sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. canadensis*

(prirejeno po: Radonič, 2014)

Spojine	<i>S. canadensis</i> - list (%)	<i>S. canadensis</i> - cvet (%)
n-Heksanal	-	0,02
3-Metilpenta-1,3-dien-5-ol, (E)	0,13	-
Triciklen	-	0,04
α -Tujen	-	0,04
α -Pinen	2,72	33,11
Kamfen	0,50	0,73
Tuja-2,4(10)-dien	0,03	0,33
Sabinen izomer 1	0,04	0,41
Sabinen izomer 2	-	2,59
β -Pinen	0,72	-
Mircen	0,20	0,98
α -felandren	-	0,09
p-Cimen	0,06	0,85
Limonen	2,79	21,47
Nonanal	0,02	-
β -Ocimen, (E) izomer 1	0,03	0,10
γ -Terpinen	-	0,06
Linalol	-	0,10
Menta-2,8-dien-1-ol (<i>trans</i> -, <i>para</i> -)	-	0,11
α - Kamfolenik aldekid	0,07	0,69
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 1	0,05	0,39
Verbenol (<i>cis</i> -)	-	0,59
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 2	0,36	2,31
Pinokarvon	0,07	0,37
Terpinen-4-ol	-	0,07
Mirtenal	0,10	0,74
Verbenon	0,06	0,58
Karvon	0,11	0,52
Bornil acetat	5,45	3,83
δ -Elemen	0,24	-
α -Kubeben	-	0,02
Ciklosativen	0,06	0,06
α -Kopaen	0,15	0,15
β -Burbonen	0,25	0,06

β-Element	0,96	0,66
α-Gurjunen	2,86	0,76
Kariofilen, (E)	1,58	0,98
γ-Element	0,17	0,08
α-Bergamoten (<i>trans</i> -)	0,18	0,11
α-Guaien	0,10	0,03
α-Humulen	0,41	0,35
γ-Gurjunen	1,50	0,30
γ-Murolen izomer 1	0,24	-
Germakren D	0,04	10,36
γ-Murolen izomer 2	48,68	-
β-Selinen	0,57	1,15
Biciklogermakren	1,81	0,54
α-Murolen	0,24	0,10
α-Bulnesen	0,62	0,39
γ-Kadinen	0,10	0,08
δ-Kadinen	0,42	0,26
Germakren B	1,12	0,92
Spatulenol	2,00	1,40
Kariofilen oksid	1,22	1,12
Salvial-4(14)-en-1-on	-	0,19
Viridiflorol izomer 1	1,70	0,26
Viridiflorol izomer 2	1,46	0,27
Humulen epoksid II	0,43	0,26
Kubenol <1,10-di-epi->	0,22	-
Neofitadien	0,04	-
Fiton	-	0,06
Fitol	0,05	-

PRILOGA B

Kemijška sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. gigantea*

(prirejeno po: Radonić, 2014)

Spojine	<i>S. gigantea</i> - list (%)	<i>S. gigantea</i> - cvet (%)
n-Heksanal	0,04	0,02
Heks-(2E)-enal	0,43	-
4-Heksen-1-ol	0,08	-
1-Heksanol	0,08	-
n-Nonan	-	0,04
Triciklen	-	0,02
α -Tujen	-	0,07
α -Pinen	1,76	7,55
Kamfen	0,48	0,46
Tuja-2,4(10)-dien	0,04	0,15
Sabinen izomer 1	0,04	0,37
β -Pinen	0,44	0,95
Mircen	0,57	0,65
α -Felandren	0,07	0,47
α -Terpinen	-	0,07
p-Cimen	0,17	3,62
Limonen	0,77	0,97
β -Ocimene, (E) izomer 1	0,02	-
γ -Terpinen	-	0,14
Linalol	-	0,19
Undekan	-	0,04
Nonanal	-	0,17
α -kamfolenik aldehyd	0,09	0,35
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 1	0,06	0,21
Verbenol (<i>cis</i> -)	-	0,24
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 2	0,18	0,76
Pinokarvon	-	0,15
Terpinen-4-ol	-	0,22
Cimen-8-ol (<i>para</i> -)	-	0,11
Mirtenal	0,11	0,39
Dekanal	-	0,42
Ciminaldehyd	-	0,07
Bornil acetat	9,05	4,07
Timol	-	0,08
Undekanal	-	0,09
δ -Elemen	0,14	0,08
α -Kubeben	0,23	0,16
Ciklosativen	-	0,13
α -Kopaen izomer 1	0,22	-
α -Kopaen izomer 2	0,35	-
α -Kopaen	-	0,20
β -Burbonen	0,92	0,07
β -Elemen	0,76	0,46
n-Tetradekan	0,17	0,17
α -Gurjunen	-	4,36
Kariofilen, (E)	1,30	2,68

γ -Elemen	0,42	0,20
α -Bergamoten	0,15	0,26
α -Guaien	-	0,13
Guaia-6,9-dien	0,11	-
Izogermakren D	0,07	-
α -Humulen	0,43	0,38
γ -Gurjunen	-	1,41
γ -Murolen izomer 1	2,01	1,25
γ -Murolen izomer 2	33,83	20,77
β -Selinen	0,82	1,19
α -Murolen	0,56	0,43
α -Bulnesen	0,18	0,25
γ -Kadinen	1,34	0,84
δ -Kadinen	2,25	1,48
β -Kadinen	0,10	0,10
α -Kadinen	0,09	0,08
α -Kalakoren	0,29	0,14
Germakren B	0,30	0,27
Spatulenol	2,42	2,33
Kariofilen oksid	1,15	1,93
Salvia-4(14)-en-1-on	1,89	1,96
Viridiflorol izomer 2	-	1,59
Humulen epoksid II	0,46	0,64
Neofitadien	0,07	-
Fiton	0,04	0,34
Fitol	0,44	-

PRILOGA C

Kemijska sestava eteričnega olja listov in cvetov vrste *S. virgaurea*

(prirejeno po: Radonić, 2014)

Spojine	<i>S. virgaurea</i> - list (%)	<i>S. virgaurea</i> - cvet (%)
n-Heksanal	0,08	0,09
Heks-(2E)-enal	0,28	0,03
4-Heksen-1-ol	0,09	-
1-Heksanol	0,03	-
n-Nonan	-	0,05
Triciklen	0,02	0,04
α -Tujene	-	0,04
α -Pinen	13,14	28,47
Kamfen	0,62	0,74
Tuja-2,4(10)-dien	0,22	0,23
Benzaldehid	0,09	0,17
Sabinen izomer 1	1,06	0,73
β -Pinen	2,68	4,58
Hept-5-en-2-on (6-metil-)	0,10	-
Mircen	2,28	5,05
α -Felandren	-	0,05
δ -Karen	0,05	0,22
Heptadienal (2,4- <i>trans</i> -, <i>trans</i> -)	0,02	-
p-Cimen	0,27	-
Limonen	2,77	3,60
β -Ocimen, (E) izomer 2	0,24	0,23
Fenilacetaldehid	-	0,05
β -Ocimene, (E) izomer 1	0,30	0,27
γ -Terpinen	0,12	0,15
Acetofenon	0,04	-
Terpinolen	-	0,23
Linalol	0,19	0,30
Nonanal	0,07	0,23
α -Terpinen	0,04	0,08
Perilen	0,14	0,15
Heptadi-3,5-en-2-on (6-metil-)	0,07	-
Nona-1,3,7-trien (4,8-dimetil-, (E))	-	0,05
α - Kamfolenik aldehid	0,73	0,37
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 1	0,42	0,32
Verbenol (<i>cis</i> -)	0,52	0,36
Sabinol (<i>trans</i> -) izomer 2	2,01	1,22
Pinokarvon	0,37	0,28
Terpinen-4-ol	0,19	0,23
Mirtenal	1,02	0,71
Dodekan	-	0,05
Verbenon	0,39	-
Karvon	0,18	0,07
Bornil acetat	1,53	1,21
Benzoat (izobutil-)	-	0,02
δ -Elemen	-	0,03
α -Kubeben	0,34	0,35

Ciklosativen	0,09	0,07
α -Kopaen	1,01	0,93
β -Burbonen	0,17	-
β -Kubeben	4,09	2,98
α -Gurjunen	-	0,08
α -Bergamoten (<i>trans</i> -)	-	0,10
Kariofilen, (E)	3,02	4,33
γ -Elemen	0,16	0,17
α -Bergamoten (<i>trans</i> -)	-	0,07
Benzoat (izopentil-)	0,28	0,41
Kadina-3,5-dien	-	0,08
α -Humulen	4,25	4,94
Kadina-1(6),4-dien	0,13	0,16
γ -Murolen izomer 1	0,27	0,28
Germakren D	6,31	8,39
β -Bergamoten (<i>trans</i> -)	-	0,03
β -Selinen	0,14	0,17
β -Chamigren	-	1,09
Viridifloren	1,16	-
α -Murolen	0,74	0,73
α -Farnezen, (E,E)	-	0,15
α -Bulnesen	0,14	0,19
δ -Kadinen	1,49	1,58
β -Seskvifelandren	0,20	0,94
β -Kadinen	-	0,13
Germakren B	0,20	0,59
1,6,10-Dodekatrien-3-ol,3,7,11-trimetil, (E)	0,27	-
Benzoat, (3Z)-heksenil	0,32	0,36
Spatulenol	6,49	2,02
Kariofilen oksid	10,17	4,75
Salvial-4(14)-en-1-on	1,08	0,21
Humulene epoksid II	6,66	3,12
Kubenol (1,10-di-epi-)	-	0,17
Kadin-4-en-10-ol	0,81	0,49
Neofitadien	0,10	-
Fiton	-	0,06
