

»Mladi za napredek Maribora 2013«
30. srečanje

Protimikrobni učinek rastlinskih etanolnih in vodnih ekstraktov na *Escherichio coli* in *Candido albicans*

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

CE d | KUVCEZAWT UCE

T ^} d | KSEVROZP UŠPVPCEP ÒÜÁZUÜÒÒ

¥[| aKÖQ P OZ RÖA ÖÜ ÖUÜ

Maribor, januar 2013

Povzetek

Številne raziskave potrjujejo, da ekstrakti različnih rastlin zavirajo razmnoževanje mikroorganizmov. V raziskovalni nalogi smo želeli raziskati protimikrobni učinek vodnih in etanolnih ekstraktov rožmarina, melise, žajblja, timijana in mete na bakterijo *Eschericho coli* in glivo *Candido albicans*. Z metodo difuzije v trdnem gojišču z diski smo določali premere inhibicijskih con, z metodo razredčevanja v tekočem gojišču (indikator jodo-nitro-tetrazol vijolično) pa minimalne inhibitorne (MIC) in minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije.

Rezultati so pokazali, da vse proučevane rastline kažejo protimikrobno aktivnost. Etanolni ekstrakti so se izkazali za učinkovitejše, *Candida* pa za bolj odporno. Najmočnejše protibakterijsko delovanje sta pokazala etanolni ekstrakt mete in timijana ter vodni ekstrakt melise, najmočnejšo protiglivična aktivnost pa vodni ekstrakt mete in timijana. Potrebne bodo še nadaljne raziskave s standariziranimi metodami.

Kazalo

Povzetek.....	2
1 Uvod	5
1.1 Raziskovalno vprašanje	6
1.2 Hipoteze	6
2 Teoretično ozadje.....	7
2.1 Rastline.....	7
2.1.1 Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	8
2.1.2 Žajbelj (<i>Salvia officinalis</i>).....	8
2.1.3 Melisa (<i>Melissa officinalis</i>).....	9
2.1.4 Meta (<i>Mentha piperita</i>).....	9
2.1.5 Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>).....	10
2.2 Organizmi	10
2.2.1 <i>Candida albicans</i>	10
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	11
2.3 Metode za določanje pritimikrobne aktivnosti.....	11
2.3.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski.....	11
2.3.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotiterski plošči	11
3 Materiali in metode.....	12
3.1 Seznam materiala.....	12
3.2 Nabiranje in priprava materiala	12
3.3 Priprava etanolnih izvlečkov	12
3.4 Priprava vodnih izvlečkov.....	13
3.5 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski.....	13
3.6 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotiterski plošči.....	14
3.7 Statistične obdelava podatkov.....	16
4 Rezultati	17
4.1 Metoda difuzije na trdnem gojišču z diski.....	17
4.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski plošči	20
4.3 Statistična analiza.....	24
4.3.1 ANOVA test.....	24

4.3.2 T-test	24
5 Razprava	25
5.1 Hipoteza 1	25
5.2 Hipoteza 2	26
5.3 Hipoteza 3	27
5.4 Hipoteza 4	28
5.5 Hipoteza 5	29
5.7 Ocena metode difuzije na trdnem gojišču z diski	30
5.8 Ocena metode razredčevanja v tekočem gojišču	31
6 Zaključek.....	33
7 Zahvale	35
8 Viri	36
9 Priloge	41

1 Uvod

V raziskovalni nalogi smo proučevali protimikrobno delovanje alkoholnih in vodnih ekstraktov petih zdravilnih rastlin: rožmarina (*Rosmarinus officinalis*), melise (*Melissa officinalis*), žajblja (*Salvia officinalis*), timijana (*Thymus vulgaris*) in mete (*Mentha piperita*) na mikroorganizma *Escherichia coli* in *Candido albicans*.

Mikroorganizmi so povzročitelji številnih bolezni, lahko povzročajo tudi kvarjenje hrane in zato se intenzivno razvijajo ter masovno proizvajajo novi produkti za njihovo zatiranje. Njihova učinkovitost je omejena, saj se odpornost mikroorganizmov proti njim povečuje. Znano je, da imajo bakterije sposobnost prenašanja genov in pridobivanja odpornosti proti zdravilom, kar podaljšuje razvijanje učinkovitih zdravil. Pomembnost tega naravnega pojava je vzpodbudila številne raziskave na področju mikrobiologije in iskanje načinov zatiranja mikroorganizmov z rastlinskimi preparati.

Zdravilne rastline oz njihovi ekstrakti se v tradicionalni medicini že stoletja uporabljajo v preventivi in zdravljenju številnih obolenj. Po navedbah Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) zdravilne rastline predstavljajo pomemben potencial za razvoj zdravil, v razvitih državah sveta pa po produktih tradicionalne medicine posega kar 80 % populacije (Nascimento in sod., 2000).

Kot **protimikrobne** definiramo snovi, ki upočasnjujejo in preprečujejo rast mikroorganizmov. Glede na njihovo učinkovitost jih delimo v dve skupini. **Bakteriostatične** oz. **fungistatične** snovi lahko le inhibirajo oz. upočasnijo rast mikroorganizmov, **baktericidne** oz. **fungicidne** snovi pa mikroorganizme uničijo (Petauer 1993).

Številne rastline izkazujejo protimikrobno delovanje, ki je rezultat vsebnosti fenolov in terpenoidov. (Petauer 1993). Ker predstavljajo omenjene fitokemikalije velik potencial v razvoju protimikrobnih zdravil in alternativo klasičnim zdravilom menimo, da bi jim znanstveniki morali posvetiti še več raziskav.

Rezultati številnih študij o uspešnosti rastlinskih preparatov pri zatiranju mikroorganizmov so me spodbudili k lastnemu raziskovanju. Večje število raziskav pomeni več znanja in večje možnosti za izkoriščanje spojin, ki so na dosegu roke, imajo manj stranskih učinkov kot klasična zdravila in lahko tudi pripomorejo k razvoju sodobne medicine.

V sodobnem zdravilstvu sta najbolj uporabljani rastlini timijan (*Thymus vulgaris*) in poprova meta (*Mentha piperita*), poleg njiju pa med znane rastline z antimikrobnim učinkom uvrščamo še meliso (*Melissa officinalis*), rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) in žajbelj (*Salvia officinalis*) (Tepe et al. 2003, Bassolé et al. 2003, Mangena et al. 1999, Rostami H, Kazemi M, Shafiei S 2012, Tape et al. 2011). Število raziskav na področju protimikrobnega delovanja rastlinskih ekstraktov je v zadnjih letih močno narastlo in mi s tem pomagalo pri pridobivanju teoretičnega znanja ter načrtovanju eksperimentalnega dela.

1.1 Raziskovalno vprašanje

Kakšen je protimikrobni učinek etanolnih in vodnih preparatov melise (*Melissa officinalis*), žajblja (*Salvia officinalis*), timijana (*Thymus vulgaris*), rožmarina (*Rosmarinus officinalis*) in mete (*Mentha piperite*) na *Escherichia coli* in *Candida albicans*?

Za določevanje protimikrobnega delovanja smo uporabili metodo difuzije v trdnem gojišču z diski in metodo razredčevanja v tekočem gojišču.

1.2 Hipoteze

1. Etanolni ekstrakti vseh uporabljenih rastlin bodo izkazali protimikrobno delovanje pri testiranju z metodo difuzije na trdnem gojišču. O takšnih rezultatih poročajo številni raziskovalci (Bupesh et al 2007, Schelz et al 2006, Rostami et al 2012, Sonoboli et al 2006, Alsaied et al 2010, Stefanović 2012, Tepe 2005). Na podlagi njihovih izsledkov domnevamo, da bodo učinki naših rastlin podobni.

2. Vodni ekstrakti vseh uporabljenih rastlin bodo izkazali protimikrobno delovanje pri testiranju z metodo difuzije na trdnem gojišču. To potrjujejo tudi številne raziskave (Bupesh et al 2007, Schelz et al 2006, Rostami et al 2012, Sonoboli et al 2006, Alsaied et al 2010, Stefanović 2012, Tepe 2005).
3. Domnevamo, da bodo etanolni ekstrakti pokazali močnejšo protimikrobno delovanje kot vodni ekstrakti, saj je etanol primernejše topilo za protimikrobne spojine v rastlinah (flavonoide in terpene) (Bremness 1994, Petauer 1993).
4. Domnevamo, da bodo rastlinski ekstrakti delovali učinkoviteje na *E. coli* kot na *C. albicans*. V primerjavi z bakterijami, ki spadajo med prokarionte, je gliva *C. albicans* kompleksnejši organizem (evkariont), znan po svoji odpornosti (Tepe et al. 2003, Bassolé et al. 2003, Mangena et al. 1999, Rostami H, Kazemi M, Shafiei S 2012, Tape et al. 2011, Molero et al. 1998).
5. V skladu s podatki v literaturi predvidevam, da bo močnejše protimikrobno delovanje in s tem nižje vrednost MIC, MBC in MFC prisotno pri ekstraktih timijana in mete, saj vsebujeta večjo količino aktivnih učinkovin (Tepe et al. 2003, Bassolé et al. 2003, Mangena et al. 1999, Rostami H, Kazemi M, Shafiei S 2012, Tape et al. 2011, Petauer 1993).

2 Teoretično ozadje

2.1 Rastline

Rastline imajo veliko sposobnost izgradnje velikega števila različnih spojin, številne izmed njih imajo tudi protimikrobni učinek. Med najpomembnejšimi so fenolne spojine, na primer enostavni fenoli, fenolne kisline, kinoni, flavonoidi, tanini. Za rastlino imajo velik pomen, saj jo med drugim ščitijo pred virusi, bakterijami, plesnimi, žuželkami in rastlinojedi (Cowan, 1999). Njihova protimikrobna učinkovitost je najverjetneje posledica sposobnosti vezave na zunajcelične topne beljakovine, vezave na celično steno bakterij, poškodovanja celičnih membrane (Tsuchiya, H. et al 1994, po Cowan, 1994). Protimikrobno aktivnost kažejo tudi terpenoidi, ki povzročajo poškodbe celičnih membran (Cichewicz et al., 1996, po Cowan, 1994).

2.1.1 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)



Rožmarinovi listi vsebujejo 2% eteričnega olja. Njegove glavne sestavine so cineol (do 35%), pipen, kafra in borneol.

Sestavina, zaradi katere ima rožmarin močne protivirusne, protibakterijske, protivnetne in antioksidativne lastnosti, je rožmarinova kislina, ki jo najdemo tudi v drugih rastlinah družine ustnatic.

Slika 1: *Rosmarinus officinalis* (lastni vir)

Rožmarinova kislina je bila najprej izolirana iz listov istoimenske rastline. Ostale sestavine v listih rožmarina so še različni flavonoidi, tanini in diterpeni (karnosol in rosmanol) in triterpenske grenke snovi (Kovačević 2004).

2.1.2 Žajbelj (*Salvia officinalis*)



Prevod imena te rastline iz latinščine (*Salvia* pomeni "zdraviti") nam razkrije njeno raznoliko zdravilno rabo. Pripisujejo ji protibakterijske, spazmolitične, protiglivične, hipoglikemične, diuretične, razkužilne in estrogenske učinke (Petauer 1993).

Slika 2: *Salvia officinalis* (Fugh-Berman 2010)

Khalil in Li (2011) poročata o zaviralnih učinkih žajbljovega eteričnega olja na *Escherichia coli* in *Candido albicans*. V njihovi poskusu so bile izolirane aktivne učinkovine borneol, α -pinen, kamfene in kariofilen. Kovačević (2004) poroča, da vsebuje list žajblja 1,5% do 2,5% eteričnega olja, katerega glavne sestavine so monoterpen tujon (30-60%), 1,8 cineol (15%) in kafra.

2.1.3 Melisa (*Melissa officinalis*)

Ena najpomembnejših lastnosti melise je njena protimikrobna učinkovitost. Najučinkovitejše aktivne sestavine v njenem eteričnem olju naj bi bile po raziskavah Dukića (2004) geranial, citronelal, izomenton in kariofilen. Protimikrobni učinek ji daje tudi rožmarinova kislina, ki ima velik vpliv na viruse in tudi na bakterije (Kovačević 2004).



2.1.4 Meta (*Mentha piperita*)



Slika 3: *Mentha piperita* (lastni vir)

Eterično olje mete uporabljamo pri zdravljenju in preprečevanju bolezni, ki jih povzroča *Candida albicans* (Fugh-Berman 2010 iz: Duke 2000). Deluje spazmolitično, protimikrobno in kot karminativ. Zaradi teh lastnosti je pogosto uporabljeno za zdravljenje bolezni prebavnega trakta, več tipov kašlja in za pranje ustne sluznice ob vnetjih (Soković D. M. 2001 iz: Jančić et al. 1995).

Pramila et al (2011) trdijo, da ima metanolni izvleček mete protibakterijske in protiglivične učinke zaradi prisotnih taninov in flavonoidov. Njihova študija je pokazala protibakterijski učinek metinih listov proti določenim patogenim mikrobov v ustni votlini. Znano je, da se mentol ravno iz tega razloga dodaja zobnim pastam.

2.1.5 Timijan (*Thymus vulgaris*)

Zaradi značilnega močnega antiseptičnega učinka ga uporabljamo za zdravljenje manjših ran (Fugh-Berman 2010 iz: Brunton 1999) in kot ustno vodico ter grgramo pri vnetjih ustne votline (Fugh-Berman 2010 iz: Gruwnwald, et al 2004).



Slika 4: *Thymus vulgaris* (lastni vir)

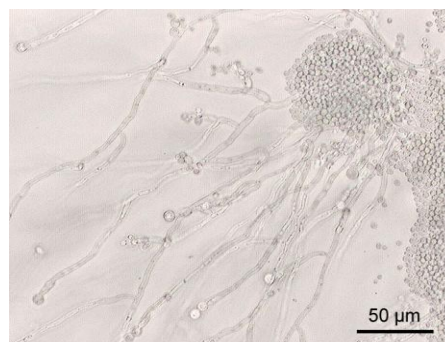
Timijanovo eterično olje ima protimikrobne učinke, tako kot vsa eterična olja z visoko koncentracijo fenolov (Kovačević 2004). Zaradi močnega baktericidnega in fungicidnega delovanja ga uporabljamo za razkuževanje kože in zdravljenje lokalnih glivičnih okužb (Soković D. M. 2001 iz: Janičić 1995). Plinska kromatografija za masno spektroskopija, ki sta jo izvedla Ocana in Reglero (2012), je pokazala, da so glavne dejavne spojine v timijanu monoterpenski alkohol timol, 1,8-cineol, karvakrol in borneol.

2.2 Organizmi

V poskusu sta bila uporabljena mikroorganizma glivica *Candida albicans* in bakterija *Escherichia coli* (nepatogeni sev). Izbrali smo jih, ker nas je zanimal protimikrobni učinek različnih rastlinskih izvlečkov na evkariontske in prokariotske celice.

2.2.1 *Candida albicans*

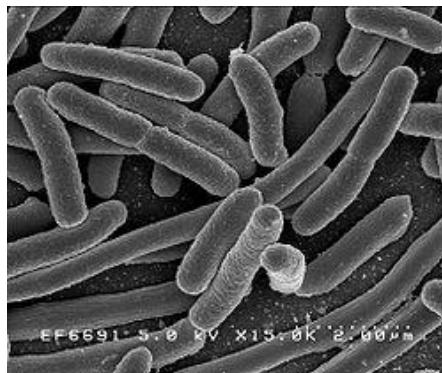
Candida albicans spada med glive. Hrani se v živalih s stalno telesno temperaturo in ljudeh. Kolonizira sluznice v ustih, nožnici, prebavilih in lahko povzroči različne okužbe, odvisne od fiziološkega stanja gostitelja (Molero et al. 1998).



Slika 5: *Candida albicans* (Wikipedia 2005)

2.2.2 *Escherichia coli*

Gre za paličasto, Gram-negativno, giblivo aerobno bakterijo, ki jo najdemo v prebavnem traktu vretenčarjev. Veliko jo uporabljajo v mikrobioloških in genetskih raziskavah. Večinoma živi kot komenzal, določeni sevi so patogeni in lahko povzročijo hude oblike zastrupitve s hrano. (Oxford dictionary for biology 2008).



Slika 6: *Escherichia coli* (Wikipedia 2005)

2.3 Metode za določanje protimikrobne aktivnosti

2.3.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

Pri tej metodi na trdno gojišče z agarjem nacepimo bakterijsko kulturo in nato na gojišče položimo sterilne diske, prepojene s testirano protimikrobno snovjo, običajno antibiotikom. Snov iz diskov difundira v gojišče, koncentracija snovi z oddaljenostjo od diska sorazmerno pada. Bakterijska kultura zaradi zaviralnega učinka protimikrobnih snovi v okolici diska ne zraste – oblikuje se tako imenovana inhibicijska cona. Z merjenjem premera inhibicijskih con lahko ugotovimo, kako je testirana bakterija občutljiva na testirano snov.

2.3.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotiterski plošči

Pri tej metodi uporabljamo tekoče gojišče za mikroorganizme, ki mu dodajamo različne koncentracije protimikrobnih snovi in testirane mikroorganizme ter vse to v zelo majhnih volumnih (200 μ l) nanašamo na mikrotiterske plošče. Po inkubaciji dodamo ustrezen indikator in z njegovo pomočjo ugotavljamo aktivnost mikroorganizmov. Na ta način lahko določimo minimalne inhibitorne (MIC) in minimalne bactericide/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije protimikrobnih snovi.

3 Materiali in metode

3.1 Seznam materiala

- *Rosmarinus officinalis*
- *Thymus vulgaris*
- *Mentha piperita*
- *Salvia officinalis*
- *Melissa officinalis*
- *Candida albicans* (sev ATCC 10231)
- *Escherichia coli* (sev ATCC 35218)
- 30% etanol
- 5% DMSO
- indikator idonitrotetrazolium vijolično (I 8377–SIGMA)
- Ampicilin
- Ketoconazol
- avtoklav
- inkubator
- laminarij
- TSB (triptični soja bujon)
- maltozni bujon
- agar
- Sabourad dextrozno gojišče
- mikrotitrne plošče z 96 luknjicami
- petrijevke
- liofilizator
- Bunsenov gorilnik
- ultrazvočna kopel
- digitalni kaliper (Vernier, ±0,01)
- Buchijev uparjalnik
- cepilna zanka (eza)
- 9 mm diski iz filtrirnega papirja
- avtomatska pipeta
- spatula Drigalski

3.2 Nabiranje in priprava materiala

Rastlinski material smo nabrali na dveh vrtovih v Mariboru konec junija 2012. Rastline smo sušili 5 dni na sobni temperaturi, nato smo njihove liste zdrobili v terilnici.

3.3 Priprava etanolnih izvlečkov

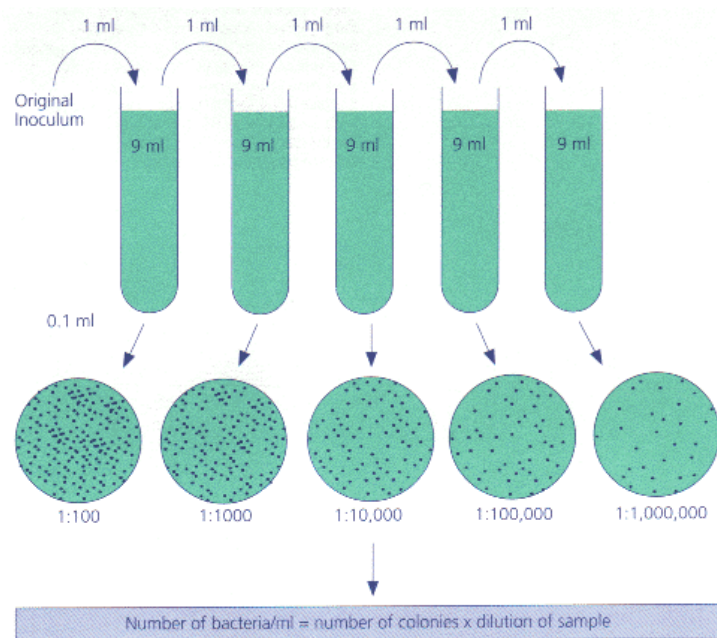
Postopek ekstrakcije smo prigodili protokolu, ki ga predlaga Ankit s sodelavci (2012). 30g suhih zdrobljenih listov smo prelili z 300ml 100% etanola in pustili na temi pri sobni temperaturi (25°C) več kot 24 ur. Po 24 urah smo mešanico prefiltrirali, da smo ločili pridobljen izvleček od rastlinskega materiala. S pomočjo Buchijevega uparjevalnika smo iz izvlečka izparili etanol in pridobili suho maso. Od tega suhega materiala smo odmerili 500 mg in jih zmešali s 5ml 30% etanola. Izvleček smo homogenizirali s pomočjo ultrazvočne kopeli (30 minut).

3.4 Priprava vodnih izvlečkov

Prvi del postopka je enak pripravi etanolnih izvlečkov. Pri pridobivanju suhega mase smo vodni izvleček zmrznili in postavil v liofilizator za 4 dni. Od tega suhega materiala smo odmerili 500 mg in jih zmešali s 5ml 5% DMSO. Izvleček smo homogenizirali s pomočjo ultrazvočne kopeli (10 minut) (Ankit et al. 2012).

3.5 Metoda difuzije v trdem gojišču z diski

Metoda je prirejena po navodilih iz priročnika “Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing” (Stephen J. et al 2005). Iz trdnih gojišč z čistima kulturama *E. coli* in *C. albicans*, ki smo jih pridobili iz zbirke inštituta Siniša Stanković, smo s sterilno ezo odvzeli po eno kolonijo bakterije/glive in jo suspendirali v ustrezno tekoče gojišče (TSB za bakterije in maltozni bujon za glive). Na ta način smo dobili predvideno koncentracijo bakterij/ gliv 10^9 CFU/ml (colony forming units/ml). Kulturi smo inkubirali čez noč (bakterije pri 37°C , glive pri 28°C). Pred uporabo smo bakterijsk/glivno suspenzijo razredčili do koncentracije 1.0×10^6 CFU/ml (slika 8).



Slika 7: Razredčevanje mikroorganizmov (Sigma-Aldrich 2013)

Po trdnem gojišču – agarni plošči (ustreznemu tekočemu gojišču smo dodali agar: 1,5 g na 100 ml gojišča) smo razlili po 300 µl suspenzije kultur *E. coli* in *C. albicans* in jo razmazali s sterilno spatulo. Na površino agarja smo v enakomerni oddaljenosti namestili pet sterilnih papirnatih diskov (premer 9mm), na katere smo dodali po 30 µl rastlinskega izvlečka. Gojišča smo inkubirali 24 ur pri 37°C (bakterije) in 48 ur pri 28°C (glive). Nato smo z digitalnim kaliprom (slika 10) izmerili premere inhibicijskih con (slika 9)



Slika 9: Inhibicijske cone na gojišču z etanolnim ekstraktom timijana (lastni vir)



Slika 10: Digitalni kaliper (Niigata Seiki 2012)

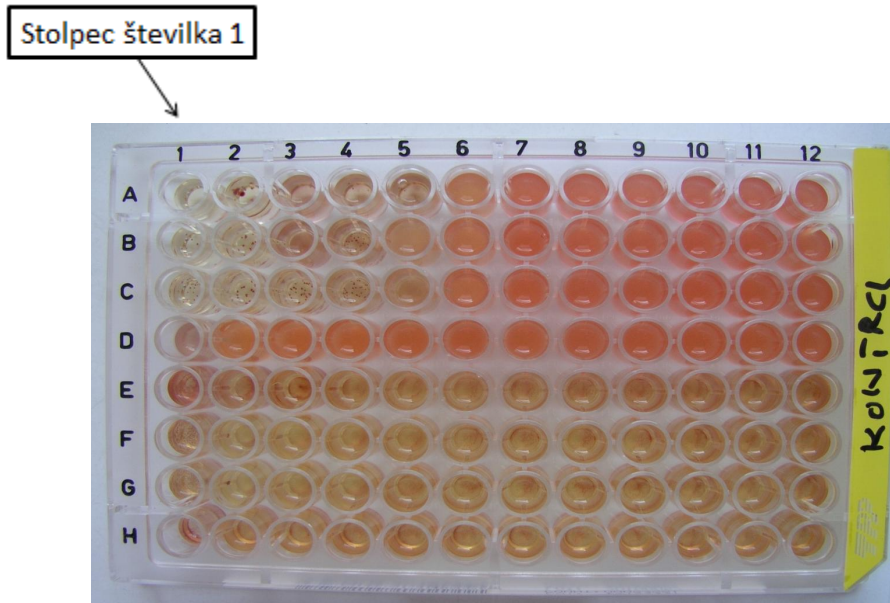
Vsako inhibicijsko cono smo izmerili v treh smereh, upoštevajoč premer kroga filtrirnega papirja. Meritve so bile izvedene s merilom s sistematično napako $\pm 0,01$ mm. Za pozitivno kontrolo *E.coli* smo uporabili Ampicilin (Sigma P 7794) in za *C.albicans* Ketoconazol. Vse poskuse smo izvedli v dveh paralelah/petrijevkah (torej za vsak izvleček 10 paralel, v dveh petrijevkah. Kot negativno kontrolo smo izvedli test z 5% DMSO in 30% etanolom. (Shimeld, A.L., Rodgers, A.T. 2001)

3.6 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotiterski plošči

V vse luknjice mikrotiterske plošče smo z avtomatsko pipeto dodali po 200 µl steriliziranega TBS tekočega gojišča (za bakterije) in Sabourad dextroznega gojišča za glive. V vsako luknjico smo dodali tudi po 5µl suspenzije *E. coli* ozirom *C. albicans* v koncentraciji 1.0×10^6 CFU/ml. V stolpec številka 1

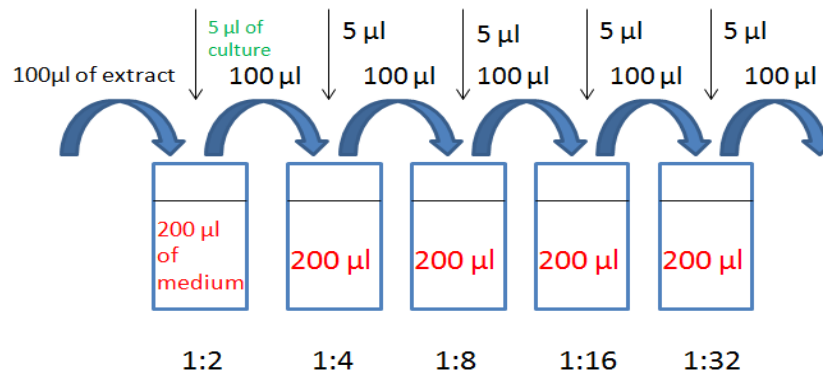
(slika 11) smo dodali 100 μl izvlečka, ki je vseboval 10mg rastlinskega materiala. Koncentracija v prvi luknjici mikrotiterske plošče je bila $50 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ (ml gojišča), kar je bilo izračunano na naslednji način:

$$\frac{10\text{mg rastlinskega materiala}}{200\mu\text{l gojišča}} = \frac{10\text{mg}}{0,2\text{mL}} = 50 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$



Slika 11: Mikrotiterska plošča z 96 luknjicami z dvanajstimi stolpci in osmimi vrsticami

S tehniko razredčevanja (slika 12) sem v vsaki sledeči luknjici mikrotitrske plošče dosegla polovično koncentracijo ($25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $12.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $7.25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $3.63 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $1.81 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$). Mikrotitrske plošče z mikroorganizmi smo pokrili in inkubirali 24 ur pri 37°C (bakterije) in 72 ur pri 28°C (glive).



Slika 12: Metoda razredčevanja (lastni vir)

Po končani inkubaciji smo v vsako luknjico dodali po 30 μ l indikatorja jodo-nitro-tetrazol vijolično (I 8377–SIGMA), s katerim zaznavamo metabolno aktivnost preiskovanih mikroorganizmov. Med celičnim dihanjem se tvori NADH + H⁺, ki reagira z indikatorjem in se zato spremeni iz rumene v rdečo barvo. Sprememba barve pomeni torej metabolno aktivnost mikroorganizma. Če se barva ne spremeni, je rastlinski izvleček reagiral in popolnoma preprečil aktivnost mikroorganizma, metabolizem je zaustavljen. Za vsak pogoj (tip ekstrakta: etanolni/ vodni, tip mikroorganizma) smo naredili po štiri ponovitve.

Najnižjo koncentracijo s komaj vidno spremembo barve indikatorja (prisotnost mikroorganizmov smo preverili s svetlobnim mikroskopom na 400-kratni povečavi) smo opredelili kot MIC – minimalno inhibitorno koncentracijo, najnižjo koncentracijo brez kakršnekoli vidne rasti pa smo definirali kot MBC – minimalno baktericidno ozirom MFC – minimalno fungicidno koncentracijo. Za pozitivno kontrolo za bakterije smo uporabili Amipicilin (1 mg/ml) in za glive Ketoconazol. Kot negativno kontrolo pa 5% DMSO in 30% etanol, vse kontrole smo opravili v dveh ponovitvah. (Shimeld, A.L., Rodgers, A.T., 2001)

Eksperiment smo načrtovali s pomočjo študija literature in metodo preizkusili v šolskem laboratoriju junija 2012. Ugotovili smo, da zaradi neustreznih pogojev (zagotavljanje sterilnosti) za izvajanje tovrstnega eksperimenta in pomanjkljive opreme eksperiment v šoli ni izvedljiv, zato smo za pomoč prosili mikrobiološki laboratorij. Praktični del eksperimenta je iz navedenih razlogov potekal v laboratoriju za mikologijo Inštituta za biološke raziskave “Siniša Stanković” v juliju in avgustu 2012. Delo z mikroorganizmi je potekalo v aseptičnih pogojih, z uporabo laminarija in pod nadzorom za to usposobljenega osebja laboratorija.

3.7 Statistične obdelava podatkov

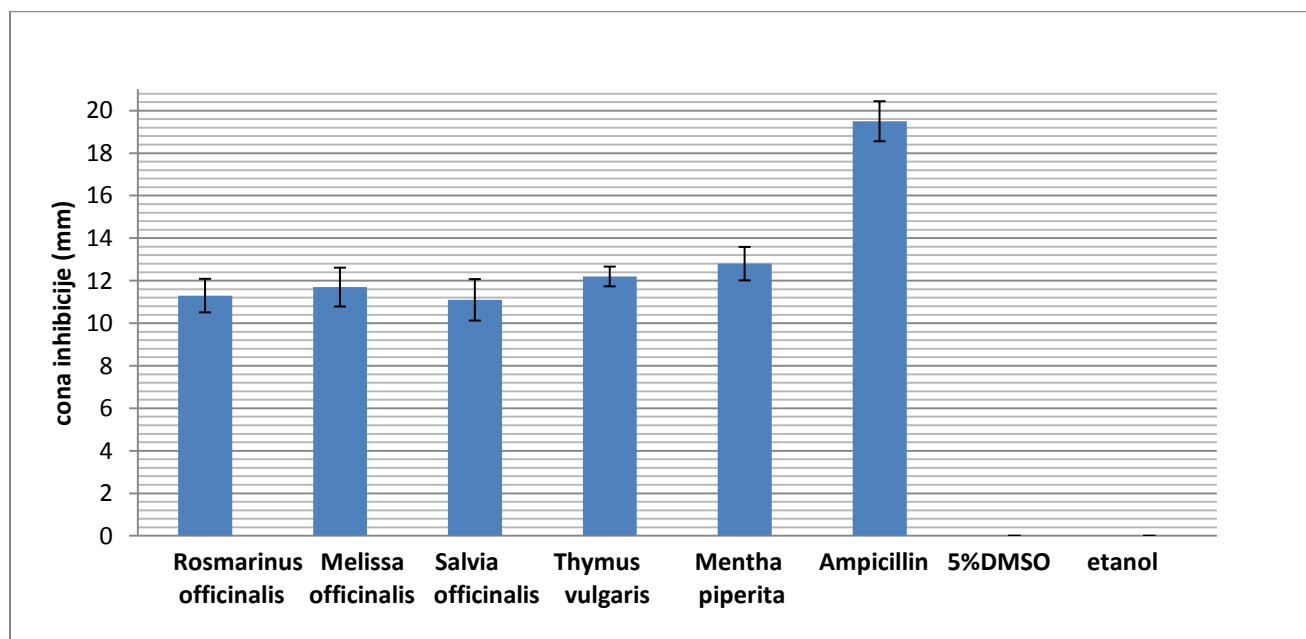
Rezultati metode difuzije na trdem gojišču z diski so predstavljeni kot srednja vrednost desetih meritev \pm 1 vrednost standardnega odklona. Podatki so bili analizirani z enosmerno analizo variance (ANOVA), z uporabo programa SPSS. S testom ANOVA smo preverjali ali so razlike med delovanjem različnih izvlečkov statistično pomembne ($p < 0,05$). Rezultati metode razredčevanja v tekočem gojišču so izraženi kot povprečne vrednosti meritev štirih paralel.

4 Rezultati

4.1 Metoda difuzije na trdem gojišču z diski

Tabela 1: Protimikrobni učinki vodnih in etanolnih rastlinskih izvlečkov na *Escherichio coli*, izmerjeni z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski (povprečne vrednosti $\pm 1SD^*$)

Ime rastlinskega izvlečka	Cona inhibicije (mm) $\pm 0,1$ mm z SD vrednostmi	
	Izvleček v etanolu	Izvleček v vodi
<i>Rosmarinus officinalis</i>	11,3 \pm 0,8	0,00
<i>Melissa officinalis</i>	11,7 \pm 0,9	0,00
<i>Salvia officinalis</i>	11,1 \pm 0,9	0,00
<i>Thymus vulgaris</i>	12,2 \pm 0,5	0,00
<i>Menthe piperita</i>	12,8 \pm 0,8	0,00
Kontrole		
5% DMSO		0,00
30% etanol		0,00
Ampicillin		19,5 \pm 0,9

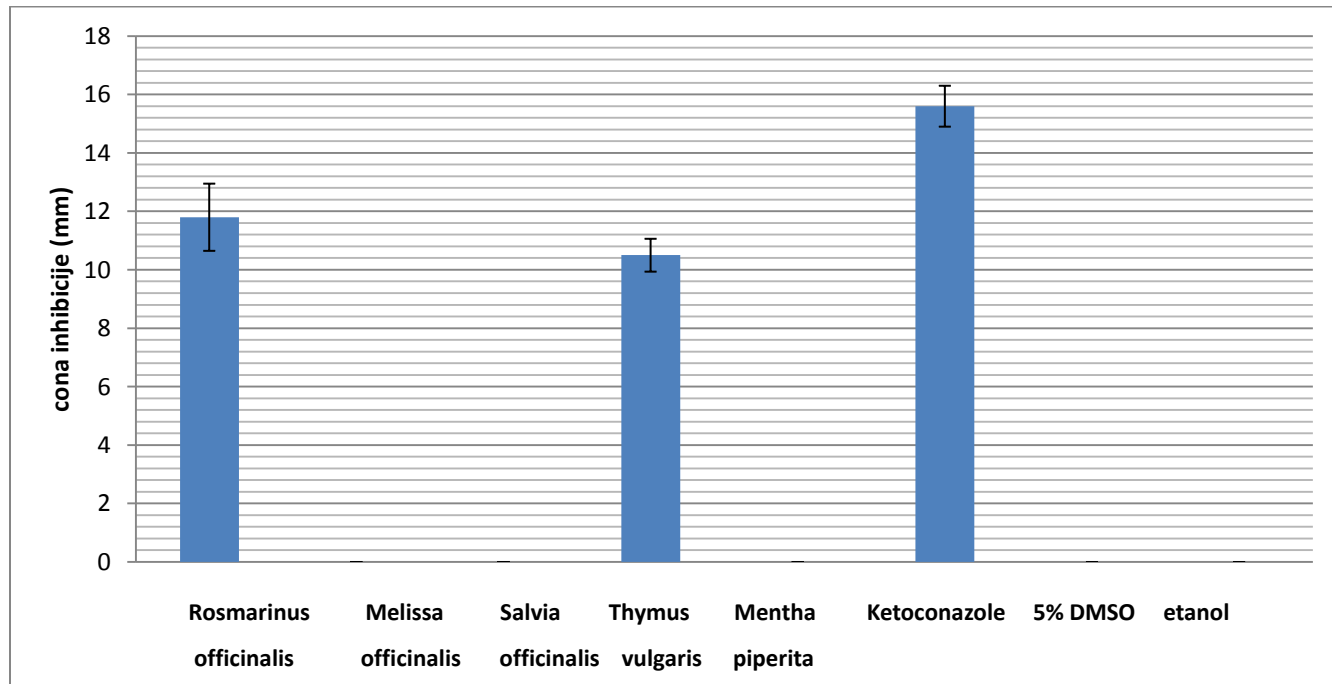


Graf 1: Protimikrobni učinek rastlinskih izvlečkov v vodi in etanolu na *E.coli*, izmerjeni z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski (povprečne vrednosti $\pm 1SD^*$)

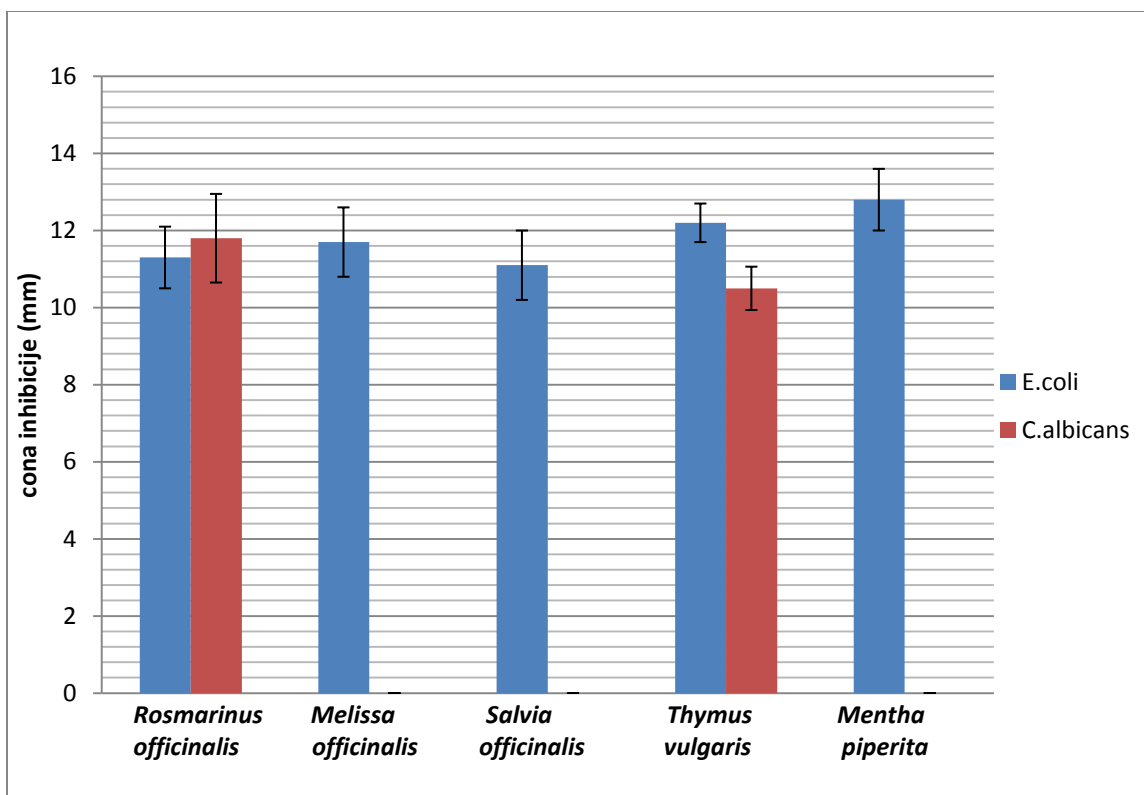
Tabela 2: Protimikrobni učinki vodnih in etanolnih rastlinskih izvlečkov na *Candido albicans*, izmerjeni z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski (povprečne vrednosti \pm 1SD*)

Ime rastline	Cona inhibicije (mm) \pm 0,1mm s SD vrednostmi	
	Izvleček v etanolu	Izvleček v vodi
<i>Rosmarinus officinalis</i>	11,8 \pm 1,2	0,00
<i>Melissa officinalis</i>	0,00	0,00
<i>Salvia officinalis</i>	0,00	0,00
<i>Thymus vulgaris</i>	10,5 \pm 0,6	0,00
<i>Menthe piperita</i>	0,00	0,00
Kontrole		
Ketoconazole	15.6 \pm 0.7	
5% DMSO	0.00	
30% etanol	0.00	

* SD – standardna deviacija



Graf 2: Protimikrobni učinki vodnih in etanolnih rastlinskih izvlečkov na *Candido albicans*, izmerjeni z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski (povprečne vrednosti \pm 1SD*)



Graf 3: Primerjava protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov v vodi in etanolu na *E.coli* in *C.albicans*, metoda difuzije na trdnem gojišču z diski ($\pm 1SD^*$)

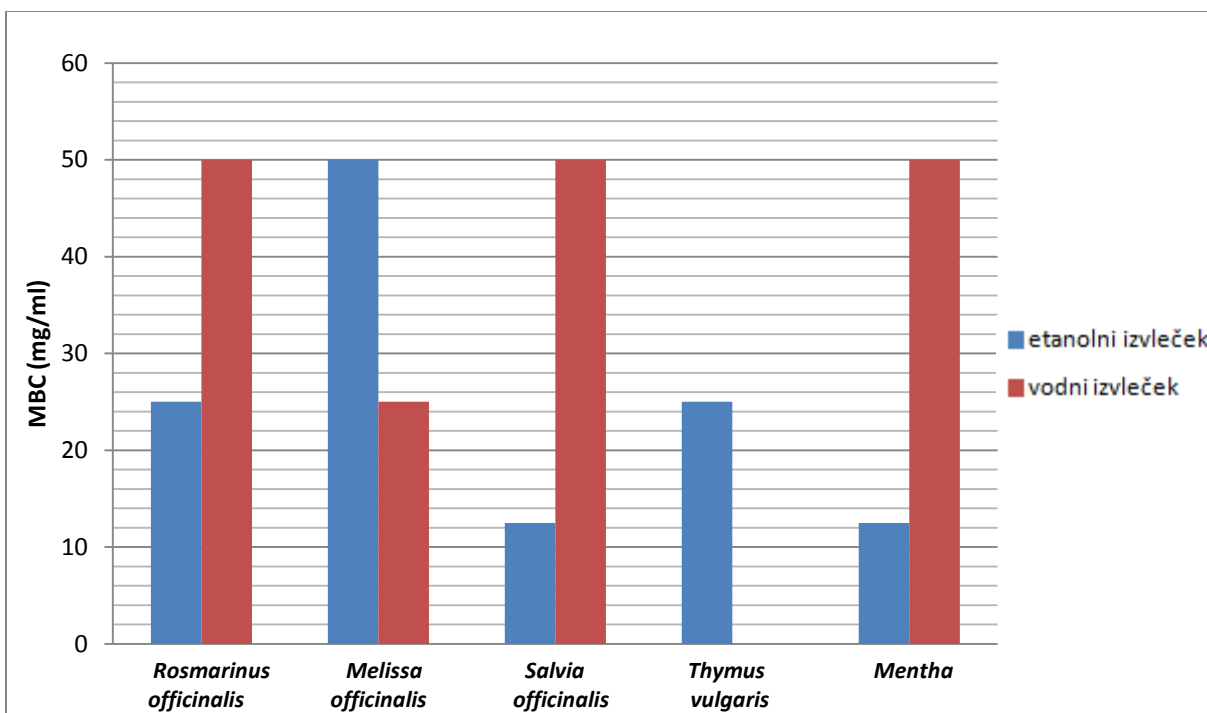
4.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski plošči

Tabela 3: Povprečne vrednosti MIC in MBC za vsak rastlinski izvleček v vodi in etanolu, določene za *E.coli*

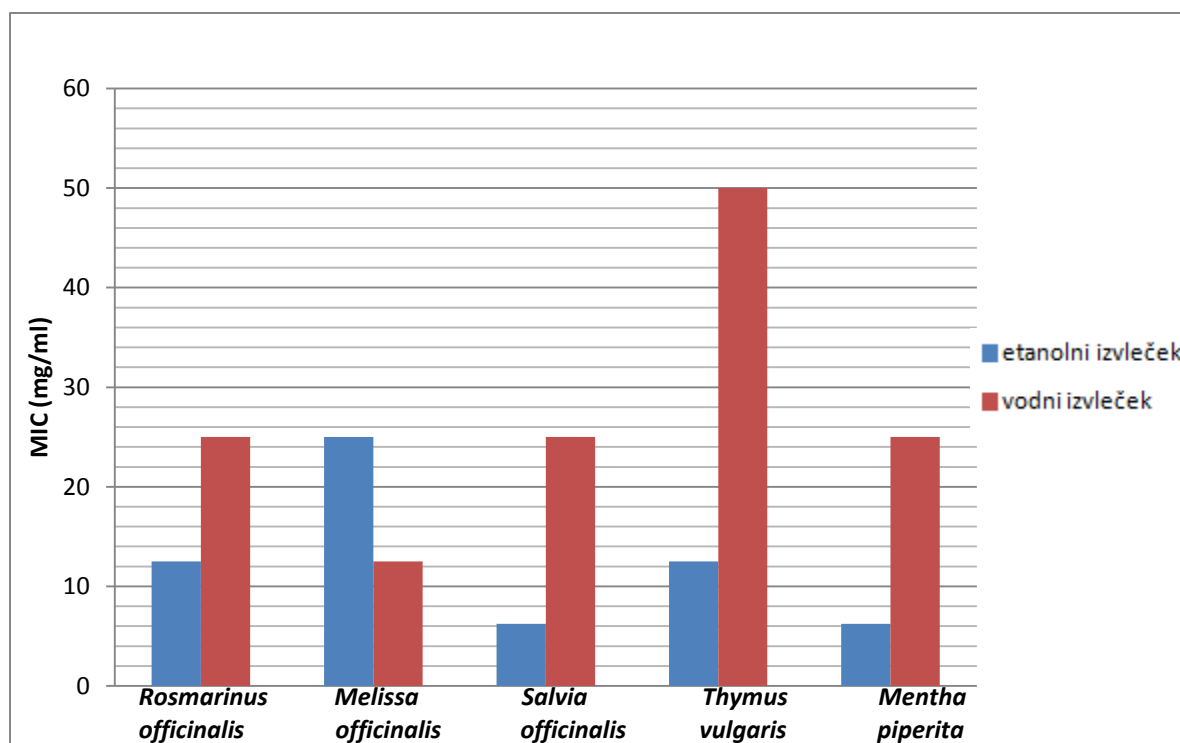
Ime rastline	Etanolni izvleček		Vodni izvleček	
	MBC (mg/ml)*	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	25,0	12,5	50,0	25,0
<i>Melissa officinalis</i>	50,0	25,0	25,0	12,5
<i>Salvia officinalis</i>	12,5	6,25	50,0	25,0
<i>Thymus vulgaris</i>	25,0	12,5	nd**	50,0
<i>Menthe piperita</i>	12,5	6,25	50,0	25,0
Kontrole		MIC		MBC
Ampicilin		1,56		3,13
5% DMSO		nd		nd
30% etanol		nd		nd

* mg rastlinskega materiala/ml tekočega gojišča

**nd- ni določeno



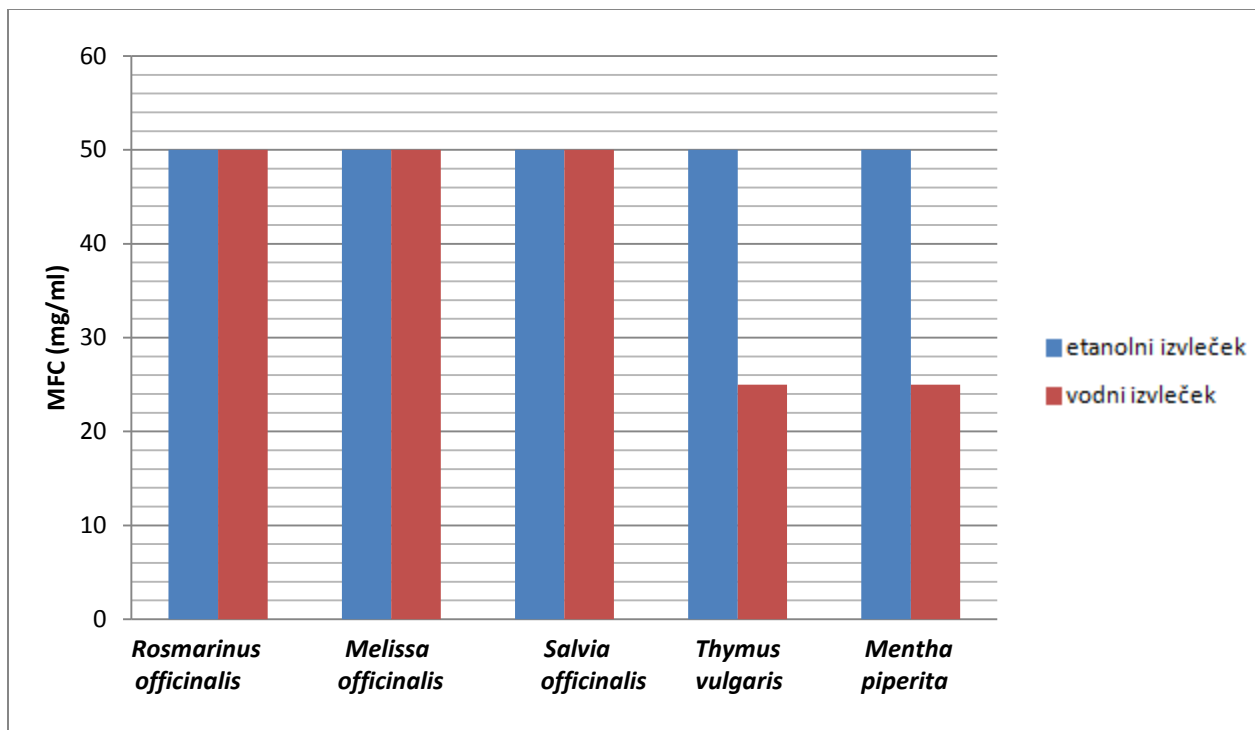
Graf 4: Primerjava MBC vrednosti etanolnih in vodnih rastlinskih izvlečkov, določenih za *E. coli*



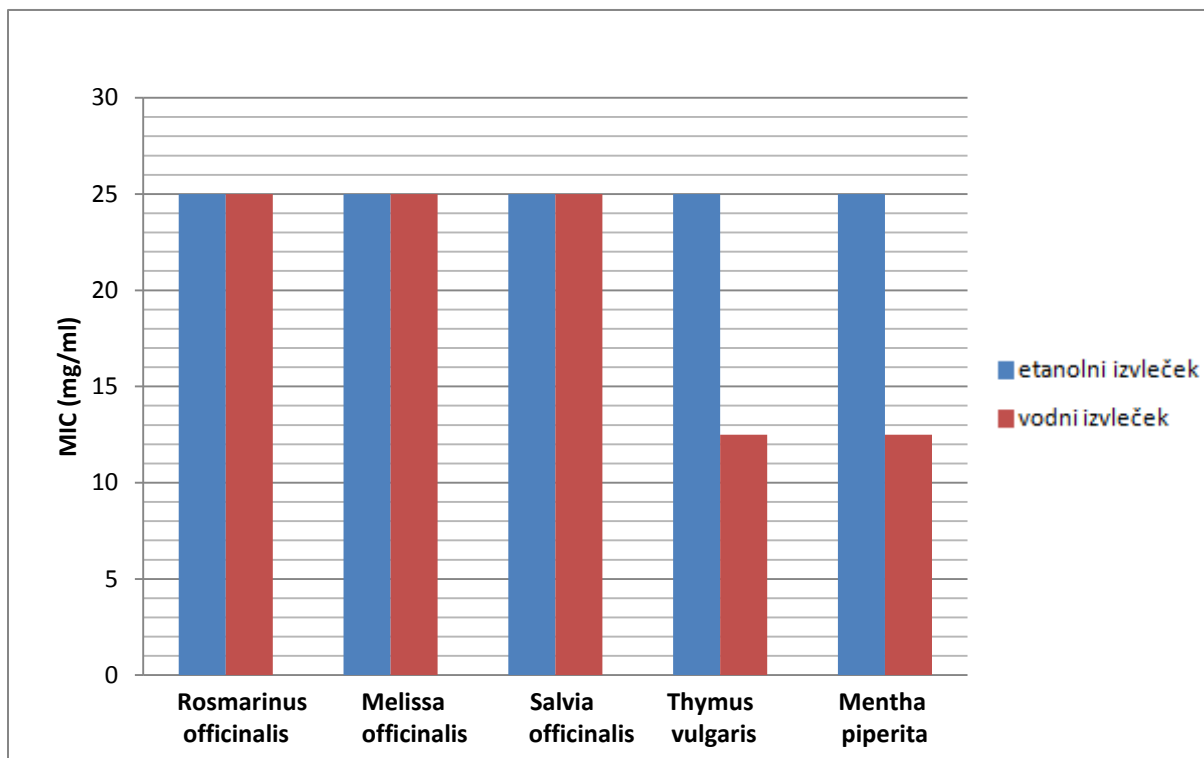
Graf 5: Primerjava MIC vrednosti etanolnih in vodnih rastlinskih izvlečkov, določenih za *E. coli*

Tabela 4: Povprečne vrednosti MIC in MFC za etanolne in vodne rastlinske izvlečke, določene za *C.albicans*

Ime rastline	Etanolni izvleček		Vodni izvleček	
	MFC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	MIC (mg/ml)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	50,0	25,0	50,0	25,0
<i>Melissa officinalis</i>	50,0	25,0	50,0	25,0
<i>Salvia officinalis</i>	50,0	25,0	50,0	25,0
<i>Thymus vulgaris</i>	50,0	25,0	25,0	12,5
<i>Menthe piperita</i>	50,0	25,0	25,0	12,5
Kontrole		MIC		MFC
Ketoconazol		12.5		25
5% DMSO		nd		nd
30% etanol		nd		nd



Graf 6: Primerjava MFC vrednosti vodnih in etanolnih rastlinskih izvlečkov za *C.albicans*



Graf 7: Primerjava MIC vrednosti etanolnih in vodnih rastlinskih izvlečkov, določenih za *C.albicans*

4.3 Statistična analiza

4.3.1 ANOVA test

Predstavljen je samo del t.i. „post hoc“ analiz, ki prikazuje statistično pomembnost razlik ($p < 0,05$) inhibicijskih con etanolnih ekstraktov različnih zelišč. Ostali izračuni so predstavljeni v prilogi 2.

Tabela 5: Primerjava inhibicijskih con etanolnih rastlinskih izvlečkov

(I)-rastline	(J)-rastline	p vrednost
Meta	Rožmarin	0,001
	Melisa	0,016
	Žajbelj	0,001
	Timijan	0,080
Rožmarin	Meta	0,001
	Melisa	0,330
	Žajbelj	0,569
	Timijan	0,016
Melisa	Meta	0,016
	Rožmarin	0,330
	Žajbelj	0,154
	Timijan	0,295
Žajbelj	Meta	0,001
	Rožmarin	0,569
	Melisa	0,154
	Timijan	0,004
Timijan	Meta	0,080
	Rožmarin	0,016
	Melisa	0,295
	Žajbelj	0,004

4.3.2 T-test

Rezultat t-testa kaže, da je pri poskusu s *C. albicans* razlika med inhibicijskima conama etanolnih izvlečkov timijana in rožmarina statistično pomembna.

$$p = 0,0325 \quad (p < 0,05)$$

5 Razprava

5.1 Hipoteza 1

Bakterijska rast (razmnoževanje) okoli diskov, namočenih v etanolne rastlinske izvlečke, je bila zavrta. Pojavile so se inhibicijske cone različnih premerov (tabela 1). Okoli diskov, prepojenih z etanolom (kontrola), razmnoževanje *E. coli* ni bilo zavrto. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da etanolni rastlinski izvlečki vseh petih rastlin kažejo protimikrobni učinek na bakterijo *Escherichia coli*. Moje rezultate podpira veliko drugih poskusov s enakimi rastlinami in metodo. (Bupesh et al 2007, Schelz et al 2006, Rostami et al 2012, Sonoboli et al 2006).

Največje inhibicijske cone ($12,8 \text{ mm} \pm 0,8$) sem izmerila pri etanolnem izvlečku mete, kjer je bil viden večji protibakterijski učinek ($p < 0,05$) kot pri melisi, rožmarinu in žajblju (Tabela 6). Timijan je imel večji protibakterijski učinek ($p < 0,05$) kot rožmarin in žajbelj. Pojav večjih inhibicijskih con pri meti in timijanu je verjetno posledica večje koncentracije aktivnih fitokemikalij z protimikrobnim učinkom, ki naj bi se nahajale predvsem v listih (Pramila et al 2011, Ocana nad Reglero 2012), ki smo jih tudi mi uporabili v našem poskusu. Ob primerjavi inhibicijskih con zelišč (v povprečju $11,8 \text{ mm} \pm 0,7$) in Ampicilina ($19,5 \text{ mm} \pm 0,9$) lahko ugotovimo, da antimikrobna aktivnost zelišč ni izrazita.

Inhibicijske cone pri *Candidi albicans* so pokazale, da njeno rast zavirata le etanolna izvlečka rožmarina in timijana. Pri ostalih rastlinah protiglivičnega učinka nismo dokazali (inhibicijske cone se niso pojavile). Različni avtorji (Soković D.M. 2001 iz: Janičić 1995, Ocana nad Reglero 2012) poročajo o protiglivičnih učinkih etanolnih ekstraktov timijana. Tudi etanolni ekstrakt rožmarina je izkazal protiglivično aktivnost, celo večjo kot timijan ($p < 0,05$). Rožmarin je znan po antioksidativnih lastnostih, ki so posledica različnih fenolnih spojin kot so karnosol, rosmanol, rosmadiol, rožmarinska kislina... (Schwarz 2002) in ki so verjetno tudi glavni razlog za njegovo protimikrobno aktivnost. Tudi tukaj lahko ugotovimo, da je antimikrobna aktivnost zelišč manjša kot aktivnost fungicida Ketoconazola ($15,6 \pm 0,6$)

Moja prva hipoteza je tako delno potrjena. Vsi etanolni izvlečki so imeli protibakterijski učinek, medtem ko sta imela le dva (timijan in rožmarin) protiglivičen učinek. Metodo difuzija na

trdnem gojišču z diski priporočajo bolj za kvalitativno analizo – za ugotavljanje, če je učinkovina deluje antimikrobno ali ne.

5.2 Hipoteza 2

Vodni izvlečki, preizkušeni z difuzijsko metodo, protimikrobnega učinka ne kažejo. Inhibicijske cone se niso pojavile. Rezultati torej ne podpirajo druge hipoteze. Številni avtorji sicer poročajo o protimikrobnih učinkih vodnih izvlečkov. Bupesh (2008) poroča, da so imeli vodni izvlečki mete močan protibakterijski učinek, čeprav šibkejši od etanolnih izvlečkov. Alsaid (2010) poroča o protimikrobnem učinku vodnega izvlečka timijana (Alsaid et al 2010).

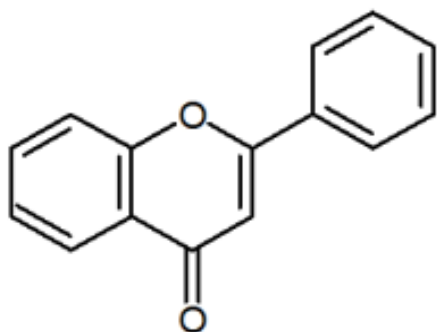
Pričakovanih rezultatov nismo dobili morda zaradi premajhne koncentracije vodnega ekstrakta. Možni vzroki za odstopanje od navedb v člankih so tudi različni uporabljeni mikroorganizmi, drugačen izvor rastlin (uporabili smo rastline iz lokalnih vrtov), različnih koncentracij in netopnosti aktivnih sestavin v vodi, morda tudi zaradi prisotnosti inhibitorjev protimikrobnih sestavin. Ker so molekule vode polarne, se v njej flavonoidi (pomembni protimikrobne snovi v izvlečkih) ne topijo tako dobro kot v etanolu. Amadioha in Obi (1999), Okgibo in Ajale (2005a), Okgibo et al (2005b) trdijo, da lahko neučinkovitost izvlečkov morda pripišemo tudi starosti rastline, topilu za ekstrakcijo, metodi ekstrahiranja in času nabiranja rastlinskega materiala (Nwinyi et al 2009).

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču smo dobili drugačne rezultate, protimikrobno aktivnost so pokazali tudi vodni izvlečki. Možna razlaga je, da je pri omenjeni metodi kontakt med aktivnimi sestavinami v izvlečku z mikroorganizmi boljši, ker je rastni medij tekoč namesto trden in se organizmi v luknjicah mikrotitrne plošče direktno mešajo z izvlečki. Pri difuzijski metodi morajo aktivne učinkovine difundirati skozi agar. Zaradi hidrofobnosti številnih aktivnih sestavin in velikosti molekul je njihova enakomerna difuzija skozi trdno gojišče otežena. Koncentracija aktivnih sestavin se z oddaljenostjo od diska zmanjšuje, zato mikroorganizmi verjetno niso bili izpostavljeni dovolj visoki koncentraciji, ki bi preprečila njihovo rast.

5.3 Hipoteza 3

Flavonoidi so nepolarne, organske spojine (estri), ki bolje reagirajo z manj polarnimi molekulami kot so alkoholi, kot pa z močno polarno vodo. V reakciji z vodo se flavonoidi ločijo na kislino in vodo in nastane kislo okolje, ugodno za glive. Nasprotno so alkoholi manj kisli in tvorijo delno bazične spojine, ki lahko uničujejo glivice in bakterije (Havsteen, B, 1983).

Etanol je tako zelo primerno topilo za protimikrobne spojine ko so flavonoidi, enostavni fenoli in terpeni, ki naj bi prevladovali v rastlinah, uporabljenih v poskusu. (Bremnes 1994, Petauer 1993).



Slika 13: Struktura flavonoida (Wikipedia 2005)

Rezultati metode difuzije v trdnem gojišču z diski so pokazali, da ima vseh pet etanolnih rastlinskih izvlečkov protibakterijski učinek in dveh etanolnih izvlečkov protiglivični učinek. Z omenjeno metodo nobeden od petih vodnih rastlinskih izvlečkov ni pokazal protimikrobnega učinka. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču pa smo protimikrobno delovanje vseh rastlinskih izvlečkov potrdili, v večini primerov je bil učinek vodnih rastlinskih izvlečkov šibkejši (višje vrednosti MBC/MFC) v primerjavi z delovanjem etanolnih ekstraktov.

Za učinkovitejše od etanolnih so se pokazali le vodni izvlečki melise (nižja vrednost MBC, $25 \frac{mg}{ml}$). Izjemi sta tudi vodna izvlečka timijana in mete, ki sta učinkoviteje delovala na *C. albicans* kot njuna etanolna izvlečka, saj sta imela nižje MFC vrednosti ($25 \frac{mg}{ml}$).

Ekstrahiranje s različnimi topili je pomemben del pridobivanja posameznih aktivnih spojin iz rastline. Spojine v vodnih izvlečkih ohranijo hidrofilne dele, bogate s polisaharidi in nekaterimi polifenoli, ki lahko delujejo protimikrobno (Singh, N, 2010). To je morda razlog, zakaj so se v nekaterih primerih vodni izvlečki pokazali kot boljši protimikrobni dejavnik. Nekatere aktivne snovi so topne le v vodi, v etanolu pa ne (polipeptidi, lektini), zato lahko reagirajo in pokažejo svoj protimikrobni učinek. Skratka, protimikrobna aktivnost je odvisna tudi od topila.

Rezultati torej ne podpirajo moje hipoteze, etanolni ekstrakti niso vedno uspešnejši kot vodni. Odvisno je od tipa mikroorganizma in rastlinskih vrst, ki se med sabo razlikujejo po vsebnosti aktivnih substanc.

5.4 Hipoteza 4

C.albicans je kompleksen evkariontski organizem. Znana je po veliki odpornosti in ki se je je težko „znebiti“ (Tepe et al. 2003, Bassolé et al. 2003, Mangena et al. 1999, Rostami H, Kazemi M, Shafiei S 2012, Tape et al. 2011, Molero et al. 1998). *E.coli* se od nje razlikuje v zgradbi (prokariontska celica, peptidoglikanska celična stena) in delovanju (metabolizem). Na podlagi analize rezultatov metode difuzije na trdnem gojišču z diski lahko sklepam, da je *E.coli*, kot prokariontski organizem, bolj dovzetna za več različnih rastlinskih izvlečkov kot bolj odporna *C.albicans*, kar sovpada s rezultati raziskav, ki jih je opravil Ceyhan (2012) in Okigbo (2010). Naši rezultati kažejo, da le dva rastlinska izvlečka (rožmarin in timijan) delujeta protiglavno. (Tabela 2).

Našo hipotezo potrjujejo tudi rezultati metode razredčevanja. Vrednost MFC za vse etanolne izvlečke je $50 \frac{mg}{ml}$ (najvišja koncentracija, uporabljena v poskusu). To so vrednosti, ki so višje od tistih iz poskusa z *E.coli*, iz česar sledi, da so učinki izvlečkov na *E.coli* večji od tistih na *C.albicans*, torej za uničenje slednje potrebujemo višjo koncentracijo izvlečkov.

Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da je četrta hipoteza potrjena.

5.5 Hipoteza 5

Rezultati metode razredčevanja nam pokažejo protimikrobni učinek vseh uporabljenih rastlinskih izvlečkov, saj so bile za vsa zelišča uspešno določene minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Pri poskusu s *C. albicans* opazimo, da imata timijan in meta najmočnejši protiglivičen učinek, kar kažejo njune nizke vrednosti MFC vodnega izvlečka ($25 \frac{mg}{ml}$). Meta se je z vrednostma MBC $12,5 \frac{mg}{ml}$ za etanolni izvleček in $50 \frac{mg}{ml}$ za vodni izvleček izkazala z dobrim protibakterijskim delovanjem, kar kažejo tudi rezultati številnih raziskav (Bupesh et al. 2007, Soković 2010). Raziskave Pramila et al. (2011) kažejo, da ima metanolni izvleček listov mete protibakterijske in protiglivične učinke zaradi flavonoidov in taninov. Protimikrobno delovanje slednjih naj bi bilo posledica vezave na celične stene in poškodb celičnih membran (Cowan 1999). Pramila je dokazala tudi protibakterijsko učinkovitost listov mete proti določenim patogenim bakterijam ustne votline. Vemo, da je mentol pogosto dodan zobnim pastam kot zaščita pred ustnimi mikrobnimi vnetji. Eterično olje mete se uporablja za zdravljenje in preprečevanje bolezni, ki jih povzroča *C. albicans* (Fugh-Berman 2010 iz: Duke 2000). Vodni izvleček mete ima tudi znaten učinek proti *Helicobacter pylori*, ki je glavni vzrok kroničnega gastritis rane na želodcu (Castillo-Juarez et al 2009 iz: Pramila et al 2011).

Timijan se ni izkazal za tako uspešen protimikrobni dejavnik. Vodni izvleček je imel najvišjo vrednost MIC ($50 \frac{mg}{ml}$) in vrednosti MBC niti ni bilo mogoče določiti, tudi etanolni izvleček je imel visoko vrednost MFC ($25 \frac{mg}{ml}$). Proti bakterijam je bil poleg mete učinkovit tudi etanolni ekstrakt žajblja.

Rezultati le delno potrjujejo postavljeno hipotezo. Učinkovitost rastlinskih izvlečkov je odvisna od toliko dejavnikov, da je primerjava z rezultati ostalih raziskav težka, saj metoda ni standardizirana.

5.7 Ocena metode difuzije na trdnem gojišču z diski

To metodo pogosto uporabljajo za ugotavljanje protimikrobno učinkovitost rastlinskih izvlečkov, saj je enostavna in hitra. Pri izvedbi našega poskusa lahko navedemo nekaj pomanjkljivosti.

Uporabili smo ročno izrezane diske iz filtrirnega papirja (9 mm), saj smo lahko na ta način nanesli več rastlinskega ekstrakta (30 μ l), kot bi ga lahko ob uporabi strojno narezanih diskov standardne velikosti (premer 6 mm). S škarijami ni bilo lahko izrezati več kot 50 enako velikih krogov. Zaradi neenakih velikosti in nezaobljenih robov bi lahko te razlike vplivale na natančnost in s tem tudi na zanesljivost rezultatov.

Težava so bile tudi kolonije gliv. Zaradi razredčene suspenzije *Candida* ni enakomerno prekrila celotne površine gojišča (ni bilo konfluentne rasti). Oblikovale so se posamezne kolonije, zato je bilo težje določiti meje inhibicijskih con.

Poskus bi lahko tudi izboljšali. Filtrirni papir bi izrezali natančneje, z inštrumentom, ki bi zagotovil enake kroge s prej določenim premerom. Lahko bi uporabili tudi debelejši filtrirni papir, ki bi vpil večjo količino izvlečka.

Iz inhibicijske cone bi lahko odvzeli majhen vzorec in ga inkubirali na ustreznem gojišču. Če bi se pojavila rast *E. coli* (*C. albicans*), bi sklepali da je izvleček deloval le bakteriostatično (samo zavrl je rast mikroorganizmov), če pa rasti ne bi bilo, bi to pomenilo baktericidno delovanje (mirkoorganizmi so uničeni).

Zaradi negativnih rezultatov z vodnimi izvlečki predlagam ponovitev poskusa z izvlečki višjih koncentracij (več rastlinskega materiala in manjšo količino uporabljenega topila). Kot topilo bi lahko uporabili tudi metanol, za katerega poročajo, da je dobro topilo za večino protimikrobnih substanc v rastlinah (Cowan 1999).

Za izboljšanje natančnosti bi bila dobra uporaba Haloes merilca (Slika 14) namesto digitalnega kalipra.



Slika 14: Merilec Haloes (Neutec Gropu Inc, 2012)

Zaradi različnih topil, metod ekstrakcije, uporabljenih testnih mikroorganizmov, klimatskih razmer in nadmorske višine, kjer so bile nabrane rastline, je primerjava naših podatkov z izsledki drugih avtorjev težka. Uporabnost te metode je omejena v glavnem za pridobivanje kvalitativnih podatkov. Rezultate te metode tudi težko primerjamo z rezultati metode razredčevanja.

5.8 Ocena metode razredčevanja v tekočem gojišču

Metoda mikrorazredčevanja je dandanes zelo popularna in jo veliko uporabljajo. Ponekod je že nadomestila metodo difuzije na trdnem gojišču. Največja prednost te metode je, da omogoča določanje natančnih vrednosti koncentracije, potrebne za inhibicijo ali uničenje mikroorganizmov. Seveda ima ta metoda tudi pomanjkljivosti.

Težko je natančno določiti luknjico, kjer je potekla inhibicija ali popolno uničenje mikroorganizmov. Da bi se izognili napakam, smo prisotnost mikroorganizmov preverili še z mikroskopom.

Z avtomatsko mikropipeto je bilo potrebno napolniti na desetine luknjic, v katere smo nato dodali potrebne volumne mikroorganizmov in izvlečkov. Predlagamo uporabo avtomatskega

pipetirnega sistema ali vsaj uporabo elektronske multikanalske pipete, s katerima bi zmanjšali verjetnost človeške napake in s tem povečali natančnost rezultatov.



Slika 85: Elektronska avtomatska multikanalska pipeta (Wikipedia 2012)



Slika 96: Avtomatski pipetni sistem (Medicalexpo 2012)

Za določanje MIC, MBC in MBC rastlinskih izvlečkov poznamo več metod, ampak nobena ni standardizirana, tako kot to obstaja za antibiotike. Zato je tudi pri tej metodi težko primerjati naše rezultate z rezultati drugih raziskovalcev. Prav tako težko primerjamo rezultate obeh metod, ki smo jih uporabili mi, saj gre za različne pristope.

6 Zaključek

Cilj poskusa je bil dokazati učinek vodnih in etanolnih izvlečkov rožmarina (*Rosmarinus officinalis*), melise (*Melissa officinalis*), žajblja (*Salvia officinalis*), timijana (*Thymus vulgaris*) in mete (*Mentha piperita*) na dve vrsti mikroorganizmov: *Escherichia coli* in *Candida albicans*.

Pri uporabi metode difuzije na trdem gojišču z diski so vsi etanolni izvlečki delovali protibakterijsko, medtem ko sta le dva rastlinska izvlečka (timijan in rožmarin) tudi protiglivično, tako da je moja prva hipoteza, ki trdi da bodo imeli izvlečki vseh preizkušanih rastlin protimikrobni učinek, le delno potrjena. Etanolna izvlečka timijana in mete sta se z difuzijsko metodo izkazala kot najboljša protibakterijska agenta.

Z difuzijsko metodo vodni izvlečki niso pokazali protimikrobnih učinkov, inhibicijske cone se niso pojavile in tako rezultati ne podpirajo moje druge hipoteze. Predlagam nadaljne raziskave z večjo koncentracijo vodnih izvlečkov.

Prisotnost inhibicijskih con in nižje vrednosti MIC etanolnih izvlečkov kažejo na to, da so le-ti učinkovitejši od vodnih izvlečkov. Verjetno je to posledica slabše topnosti flavonoidov v vodi. Nekaj izjem, ko so bili izvlečki v vodi bolj učinkoviti (melisa pri *E.coli* ter timijan in meta pri *C. albicans*) onemogoča potrditev tretje hipoteze.

Candida se je pokazala za bolj odporno na delovanje rastlinskih izvlečkov kot bakterija *E. coli*. V difuzijski metodi sta le timijanov in rožmarinov etanolni ekstrakt zavrla njeno rast. MFC vrednosti vseh etanolnih ekstraktov so znašale $50 \frac{mg}{ml}$, kar je najvišja uporabljena koncentracija. Pri *E. coli* smo (z izjemo melise) določili nižje vrednosti MBC. To pomeni, da je bilo *E.coli* lažje ustaviti kot *C.albicans*. Vzroki so verjetno v različni strukturi in metabolizmu prokariontskih in evkariontskih celic. Upoštevajoč rezultate obeh metod lahko potrdimo četrto hipotezo.

Trdimo lahko, da imajo vodni in etanolni izvlečki vseh preiskovanih rastlin protimikrobno delovanje. Rezultati difuzijske metode kažejo, da sta najbolj proti *E. coli* najbolj učinkovita

etanolna izvlečka timijana in mete, metode razredčevanja kažejo, da sta v svojem protibakterijskem delovanju najmočnejša etanolni izvleček mete (MBC $12,5 \frac{mg}{ml}$) in vodni izvleček melise (MBC $25 \frac{mg}{ml}$). Glede *C.albicans* rezultati niso tako jasni – najuspešnejši pri difuzijski metodi je bil etanolni izvleček rožmarina ($11,8 \text{ mm} \pm 1,2$), pri metodi razredčevanja pa so vse rastline pokazale enak protiglivičen učinek (MFC $50 \frac{mg}{ml}$). Največjo protiglivično dejavnost imata vodna izvlečka mete in timijana (MFC $25 \frac{mg}{ml}$).

Razlike med rezultati obeh metod kažejo, da sta težko primerljivi in da so nujni nadaljni poskusi z metodami, ki bi bile standardizirane.

Poskus nam je omogočil narediti korak naprej v raziskovanju naravnih zdravil in upamo, da smo vsaj malo pripomogli k razumevanju njihovega delovanja in uporabnosti pri zdravljenju bakterijskih in glivičnih obolenj. S pomočjo izsledkov v že objavljenih strokovnih člankih in z rezultati našega poskusa smo dokazali, da imajo nekatere rastline iz domačih vrtov protimikroben učinek. Upamo, da bo ljudje začeli pogosteje posegati po naravnih zdravilih, ki imajo manj stranskih učinkov in na ta način s pridom izkoristili, kar nam ponuja narava.

7 Zahvale

Tukaj se želim iz vsega srca zahvaliti moji profesorici biologije, ki mi je pomagala in me podpirala vseskozi moj poskus.

Prav tako se želim iskreno zahvaliti Inštitutu za biološke raziskave "Siniša Stanković," za dovoljenje za rabo njihovih prostorov in pomoč pri večih delih mojega poskusa, sploh vodji laboratorija, ki je bila moja neizmerno potrpežljiva in razumna nadzornica.

Hkrati se zahvaljujem še vsem, ki so dali vse od sebe in mi na kakršen koli način pomagali med raziskovanjem.

8 Viri

1. Al-Hussaini, J. S., Al-Mohana, A. M. G., 2010, 'An evaluation of the antifungal activity of some local medicinal plants against growth of *Candida albicans* in vitro', *AL-Qadisiya Journal of Vet.Med.Sci.*, vol. 9, issue 2, available at:
<<http://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=33034>> [Accessed 6 January 2013]
2. Alsai, M., Daud, H., Bejo, S., K., Abuseliana, A., 2010, 'Antimicrobial Activities of Some Culinary Spice Extracts against *Streptococcus agalactiae* and Its Prophylactic Uses to Prevent Streptococcal Infection in Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis* sp.)', *World Journal of Fish and Marine Sciences*, vol. 2, issue 6: 532-538, available at:
<<http://idosi.org/wjfm/wjfm2%286%2910/11.pdf>> [Accessed 6 January 2013]
3. Ankit, G., Madhu, N., Vijay, K., 2012, 'Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts', *International Journal of Applied and Natural Sciences*, vol. 1, issue 1, p. 8-26
4. Bassolé, I.H., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié R.C., Dicko, M. H., 2010, 'Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination', *Molecules*, vol. 15, p. 7826-7839, doi: 10.3390/molecules15117825
5. Bremness, L., 1994, *Herbs*, New York: DK Publishing
6. Bupesh, G., Amutha, C., Nandagopal, S., Ganeshkumar, A., Sureshkumar, P., Saravana, Murali, K., 2006, 'Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant', *Acta agriculturae Slovenica*, vol. 89, issue 1, p. 73 – 79, available at: <<http://aas.bf.uni-lj.si/avgust2007/09bupesh.pdf>> [Accessed 6 January 2013]
7. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H. A., 2003, 'Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)', *Jurnal of Ethnopharmacology*, vol.87, issues 2-3, p. 215-220, doi: 10.1016/S0378-8741(03)00149-1
8. Celiktas, O., Y., Kocabas, E., E., H., Bedir, E., Sukan, F., V., Ozek, T., Baser, T., K., H., C., 2007, 'Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*

- officinalis, depending on location and seasonal variations', *Food chemistry*, vol 100, p. 553-559, available at: <www.elsevier.com/locate/foodchem> [Accessed 6 January 2013]
9. Ceyhan, N., Keskin, D., Uğur, A., 2012, 'Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microorganisms', *Journal of Food, Agriculture & Environment*, vol.10, issue 1, p. 193-197, available at: <<http://www.isfae.org/scientificjournal/2012/issue1/pdf/food/f38.pdf>> [Accessed 6 January 2013]
 10. Cowan, M., M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, issue 4.
 11. Fugh-Berman, A., 2010, *Urban Herbs*, [photograph] available at: <<http://pharmacology.georgetown.edu/urbanherbs/urban2.htm>> [Accessed 15 September 2012]
 12. Havsteen, B., 1983, 'Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency', *Biochemical Pharmacology*, vol. 32, issue 7, p. 1141–1148, doi: 10.1016/0006-2952(83)90262-9
 13. Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H., Kamei, C., 2002, 'Antiallergic Effect of Flavonoid Glycosides Obtained from *Mentha piperita* L.', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, issue 2, p. 256-259
 14. Khalil, R., Li, Z., 2011, 'Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia Officinalis* L. collected in Syria', *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, issue 42, p. 8397-8402, available at: <<http://www.academicjournals.org/JMPR>> [Accessed 6 January 2013]
 15. Kovačević, N., 2004, *Osnovi farmakogonoziije*, Beograd: Srpska Školska Knjiga
 16. Mangena, T., Muyima N.Y.O., 1999, 'Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains', *The Society for Applied Microbiology*, vol. 28, p. 291-296
 17. Medicaexpo, 2012, *Automatic pipetting system*, [photograph] available at: <<http://www.medicaexpo.com/prod/biotek-instruments/automatic-pipetting-systems-67858-434969.html>> [Accessed 30 December 2012]
 18. Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro-García, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sánchez-Pérez, M., Nombela, C., 1998, 'Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity', *Internatl Microbiol*, vol. 1, p. 95-106

19. Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L., 2000, 'Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria', *Brazilian Journal of Microbiology*, vol 31, p.247-256
20. Neutec Gropu Inc, 2012, *Haloos Caliper*, [photograph] available at:
<<http://www.neutecgroup.com/haloosmp.htm>> [Accessed 21 December 2012]
21. Niigata, S., 2012, *Digital Caliper*, [photograph] available at:
<http://i00.i.aliimg.com/photo/v0/110685080/Niigata_Seiki_DIGITAL_CALIPER_150mm_151292_.jpg> [Accessed 26 October 2012]
22. Nwinyi, Obinna, C., Chinedu, Nwodo, S., Ajani, Olayinka, O., Ikpo, Chinwe, O., Ogunniran, Kehinde, O., 2009, 'Antibacterial effects of extracts of *Ocimum gratissimum* and *piper guineense* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*', *African Journal of Food Science*, vol. 3, issue 3, p. 077-081
23. Ocaña, A., Reglero, G., 2012, 'Effects of Thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages', *Journal of Obesity*, vol. 2012 ,
doi:10.1155/2012/104706
24. Okigbo, R., N., Mmeka, E., C., 2008, 'Antimicrobial Effects of Three Tropical Plant Extracts on *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans*', *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*, vol. 5, issue 3, p. 226–229, available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2816559/>> [Accessed 6 January 2013]
25. Oxford, 2008, *Oxford Dictionary for Biology- 6th Edition*, London: Oxford university press
26. Petauer, T., 1993, *Leksikon rastlinskih bogastev*, Ljubljana: Tehniška založba Slovenije
27. Pramila, D. M., Xavier, R., Marimuthu, K., Kathiresan, S., Khoo, M. L., Senthilkumar, M., Sathya, K., Sreeramanan, S., 2012, 'Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint', *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, issue 2, p. 331-335, available at: <<http://www.academicjournals.org/AJB>> [Accessed 6 January 2013]
28. Rostami, H., Kazemi, M., Shafiei, S., 2012, 'Antebacterial acitivity of *Lavandulla offininalis* and *Melissa officinalis* against some human pathogenic bacteria' *Asian Journal of Biochemistry*, vol. 7, issue 3, p. 133-142, available at:

- <<http://scialert.net/qredirect.php?doi=ajb.2012.133.142&linkid=pdf>> [Accessed 6 January 2013]
29. Rostami, H., Kazemi, M., Shafiei, S., 2012, 'Antibacterial Activity of *Lavandula officinalis* and *Melissa officinalis* Against some Human Pathogenic Bacteria', *Asian Journal of Biochemistry*, vol. 7, issue 3, p. 133-142, doi: 10.3923/ajb.2012.133.142
 30. Rusenova, N., Parvanov, P., 2009, 'Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance', *Trakia Journal of Sciences*, vol. 7, issue 1, p. 37-43, available at: <http://tru.unisz.bg/tsj/Vol7No1_2009/Rusenova_N.pdf> [Accessed 6 January 2013]
 31. Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006, 'Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils', *Fitoterapia*, Vol 77, p. 279–285
 32. Schwarz, K., 2002, 'Phenolic Diterpenes from Rosemary and Sage', *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects*, vol.2, doi: 10.1201/9781420012873.ch6
 33. Sharafi, S. M, Rasooli, I., Owalia, P., Taghizadeh, M., Astaneh, S. D. A., 2010, 'Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials', *Pharmacognosy Magazine*, vol 6, issue 23, p. 147-153
 34. Shimeld, A. L., 2001, *Essentials of Diagnostic Microbiology*, USA: Delmar Publishers
 35. Sigma-Aldrich Co., *Dilution technique of microorganisms*, [photograph] available at: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/learning-center/theory/introduction.html>> [Accessed 26 January 2013]
 36. Singh, N., 2010, *A comparison of both water and ethanol extracts prepared from *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* on the response to Influenza A/PR/8/34 infection in mice*, Graduate Theses and Dissertations, Paper 11290
 37. Soković, D. M., 2001, *Antifungal activities of essential oil of selected aromatic and medical plants in vitro and in vivo*, Ph.D. Thesis, Faculty of Biology, University of Belgrade, Yugoslavia
 38. Sonoboli, A., Babakhani, B., Mehrabian A. R., 2005, 'Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from *Salvia*', s.n., available at: <<http://www.znaturforsch.com/ac/v61c/s61c0160.pdf>> [Accessed 6 January 2013]
 39. Stephen, J., Cavalieri, Ivonne, D., Rankin, Ronald, J., Harbeck, Robert, L., Sautter, Susan, E., Sharp, José, H., Ortez, Carol, A., Spiegel, Yvette, S., McCarter, 2005, 'Manual of

Antimicrobial Susceptibility Testing', *American Society for Microbiology*, p. 39-53, available at:

<<http://forms.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/Filename/000000002484/Manual%20of%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Testing.pdf>> [Accessed 19 October 2012]

40. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., 2005, 'Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae)', *Food Chemistry*, vol 90, issue 3, p. 333-340, doi: 10.1016/j.foodchem.2003.09.013
41. Tepe, B., Sarikurkcu, C., Berk, S., Alim, A., Akpulat, H. A., 2011, 'Chemical Composition, Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*', *Academy of Chemistry of Globe Publications*, p. 208-220
42. Wikipedia, 2005, *Structure of flavonoid*, [photograph] available at: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Flavon.svg>> [Accessed 17 November 2012]
43. Wikipedia, 2005, *Candida albicans*, [photograph] available at: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Candida_albicans.jpg> [Accessed 07 December 2012]
44. Wikipedia, 2005, *Escherichia coli*, [photograph] available at: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:EscherichiaColi_NIAID.jpg> [Accessed 07 December 2012]
45. Wikipedia, 2012, *Electronic multichannel automatic pipette*, [photograph] available at: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electronic_multichannel_automatic_pipette.jpg#filehistory> [Accessed 30 December 2012]

9 Priloge

Tabela 1: Učinek etanolnega izvlečka izvlečka Thymus v etanolu na E.coli

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	12,02	11,40	12,06
2.	11,23	13,29	12,16
3.	10,80	11,75	11,03
4.	10,46	11,31	9,69
5.	11,78	12,11	11,97
6.	12,38	12,18	12,20
7.	12,84	11,79	11,57
8.	11,56	12,19	12,72
9.	11,91	10,32	12,69
10.	12,18	10,90	11,68



Slika 1: Učinek etanolnega izvlečka timijana na E.coli

Tabela 2: Učinek etanolnega izvlečka žajblja na E.coli

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	11,00	11,28	10,83
2.	12,49	12,48	12,50
3.	10,71	10,76	10,81
4.	10,20	9,91	10,11
5.	11,54	11,86	11,72
6.	10,28	10,13	10,43
7.	9,62	11,23	10,12
8.	9,50	10,00	9,75
9.	13,06	12,82	12,90
10.	11,23	11,52	10,94



Slika 2: Učinek etanolnega izvlečka žajblja na E.coli

Tabela 3: Učinek etanolnega izvlečka rožmarina na E.coli

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	11,48	11,60	11,36
2.	12,53	12,11	11,69
3.	10,80	11,54	11,17
4.	13,29	12,86	12,43
5.	11,17	10,65	11,69
6.	11,65	11,45	11,25
7.	10,14	9,78	9,96
8.	12,00	11,39	10,78
9.	10,98	11,29	10,67
10.	10,40	10,58	10,76



Slika 3: Tabela 4: Učinek etanolnega izvlečka rožmarina na E.coli

Tabela 5: Učinek etanolnega izvlečka mete na *E.coli*

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	12,35	11,52	13,18
2.	11,03	11,76	10,30
3.	13,28	13,62	12,94
4.	12,28	11,74	12,82
5.	13,03	13,19	12,87
6.	13,24	13,37	13,11
7.	13,92	14,35	13,49
8.	13,17	13,48	12,86
9.	13,06	13,14	12,98
10.	13,01	12,50	13,52



Slika 4: Učinek etanolnega izvlečka mete na *E.coli*

Tabela 6: Učinek etanolnega izvlečka melise na E.coli

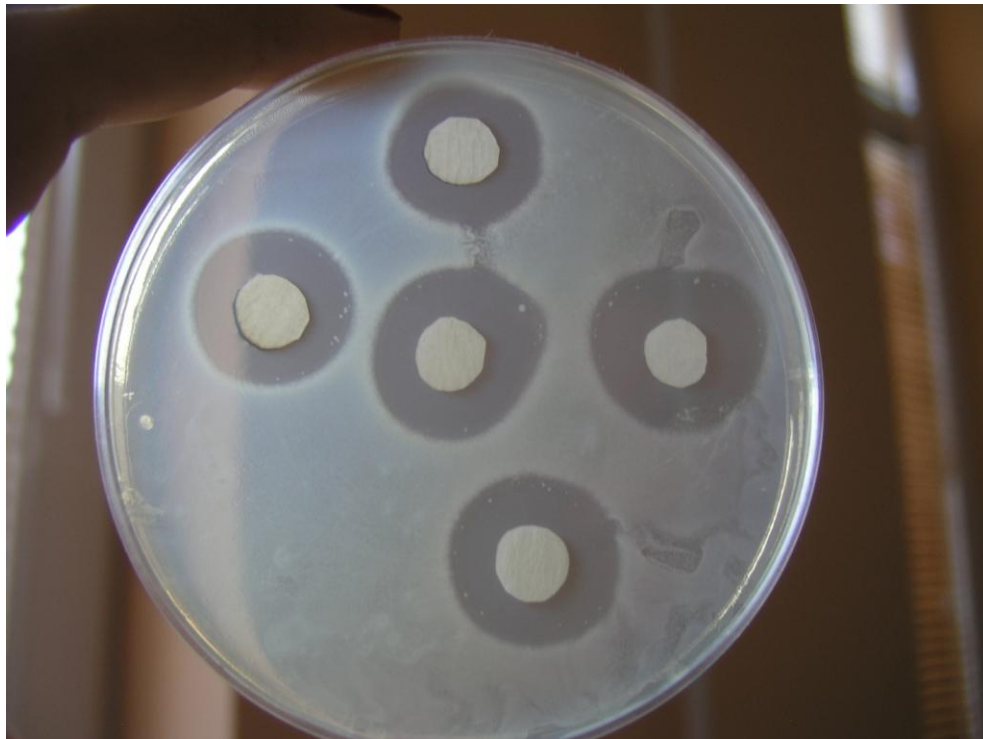
Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	12,91	12,73	12,82
2.	11,10	10,48	10,79
3.	11,12	10,80	10,96
4.	12,83	12,25	12,54
5.	11,37	11,83	11,60
6.	0,00	0,00	0,00
7.	0,00	0,00	0,00
8.	0,00	0,00	0,00
9.	0,00	0,00	0,00
10.	0,00	0,00	0,00



Slika 5: Učinek etanolnega izvlečka melise na E.coli

Tabela 7: Učinek Ampicillina na E.coli

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	18,82	19,18	19,16
2.	21,05	18,49	20,18
3.	19,87	20,06	18,66
4.	21,13	19,31	20,77
5.	18,56	18,67	18,59



Slika 6: Učinek Ampicillina na E.coli

Tabela 8: Učinek etanolnega izvlečka rožmarina na *C.albicans*

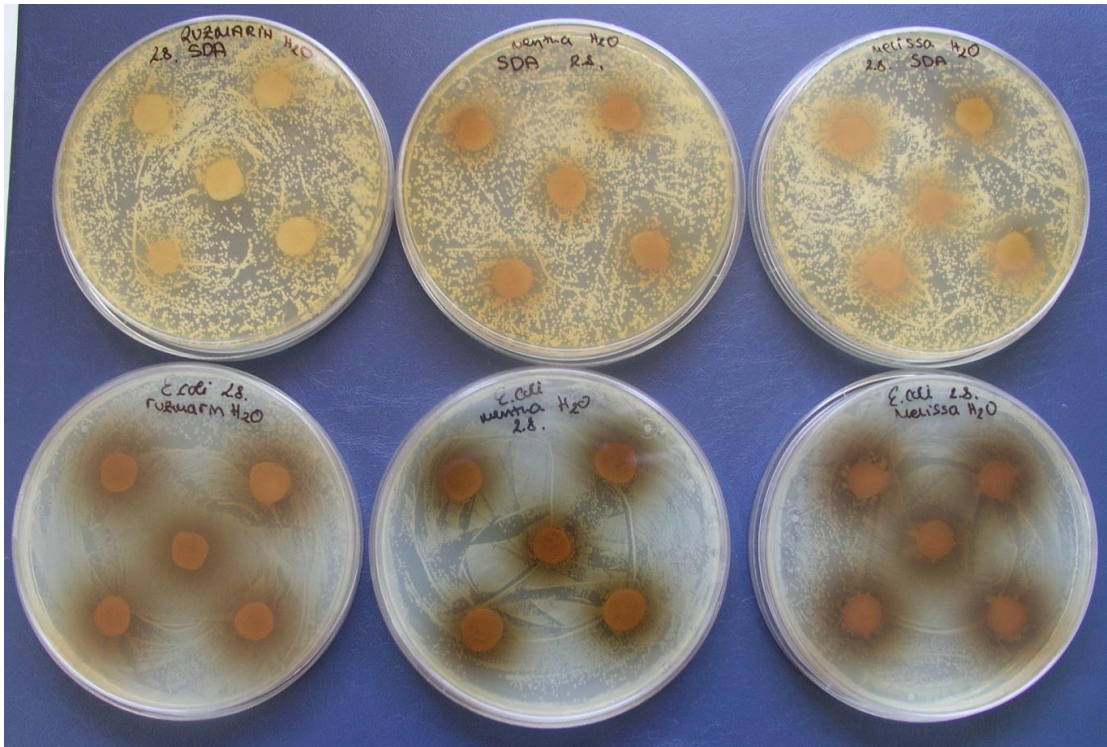
Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	13,15	13,72	12,58
2.	10,40	10,56	10,24
3.	12,39	12,76	12,02
4.	12,34	12,08	12,60
5.	10,85	11,02	10,68
6.	0,00	0,00	0,00
7.	0,00	0,00	0,00
8.	0,00	0,00	0,00
9.	0,00	0,00	0,00
10.	0,00	0,00	0,00



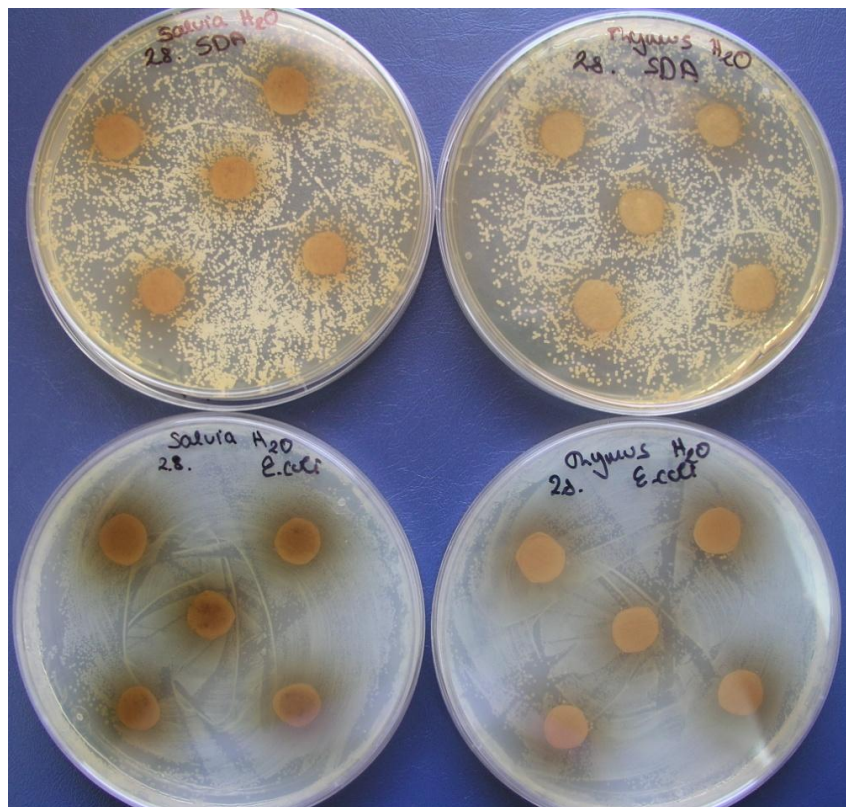
Slika 7: Učinek etanolnega izvlečka rožmarina na *C.albicans*

Številka diska	Inhibicijska cona (mm)		
	Prva meritev	Druga meritev	Tretja meritev
1.	9,96	10,05	9,87
2.	9,78	10,07	9,49
3.	10,90	10,27	11,53
4.	10,27	10,51	10,03
5.	11,30	11,04	11,56
6.	10,99	10,65	11,33
7.	0,00	0,00	0,00
8.	0,00	0,00	0,00
9.	0,00	0,00	0,00
10.	0,00	0,00	0,00

Tabela 9: Učinek etanolnega izvlečka timijana na *C.albicans*



Slika 8: Učinki vodnih izvlečkov na *E.coli* in *C.albicans*



Slika 9: Učinki vodnih izvlečkov na *E.coli* in *C.albicans*

Slika 10: MIC in MBC/MFC vrednosti prikazane za kontrolo

MBC MIC

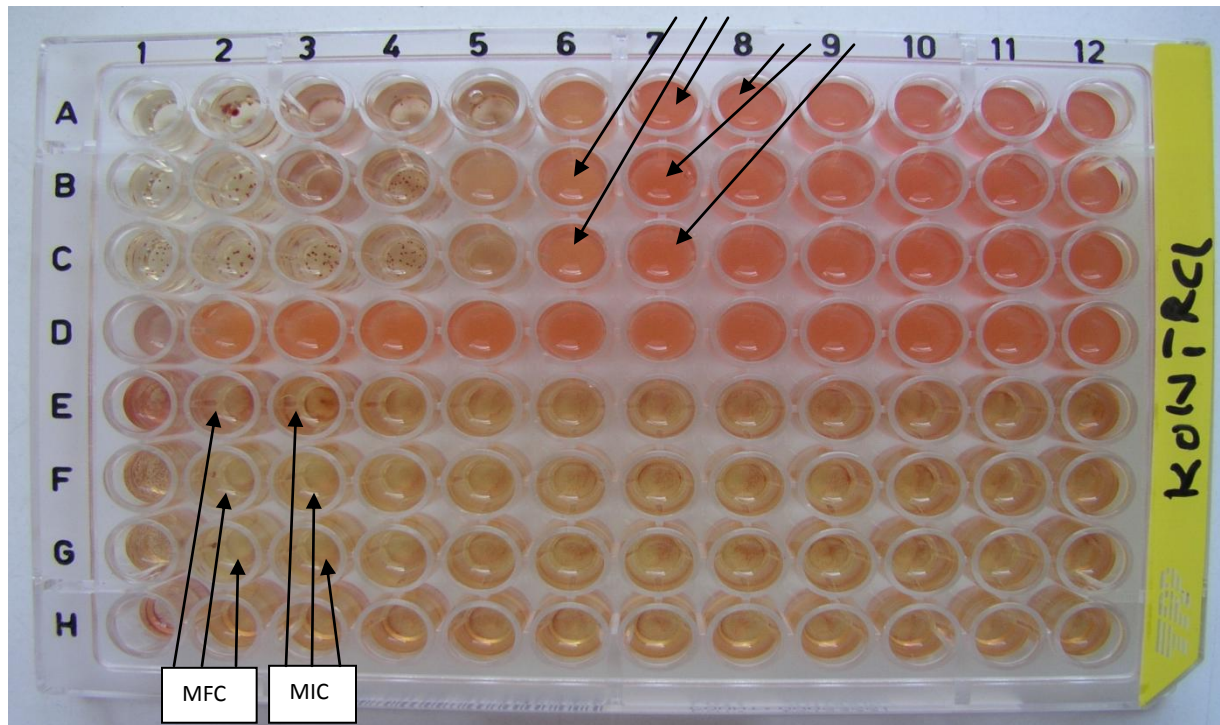
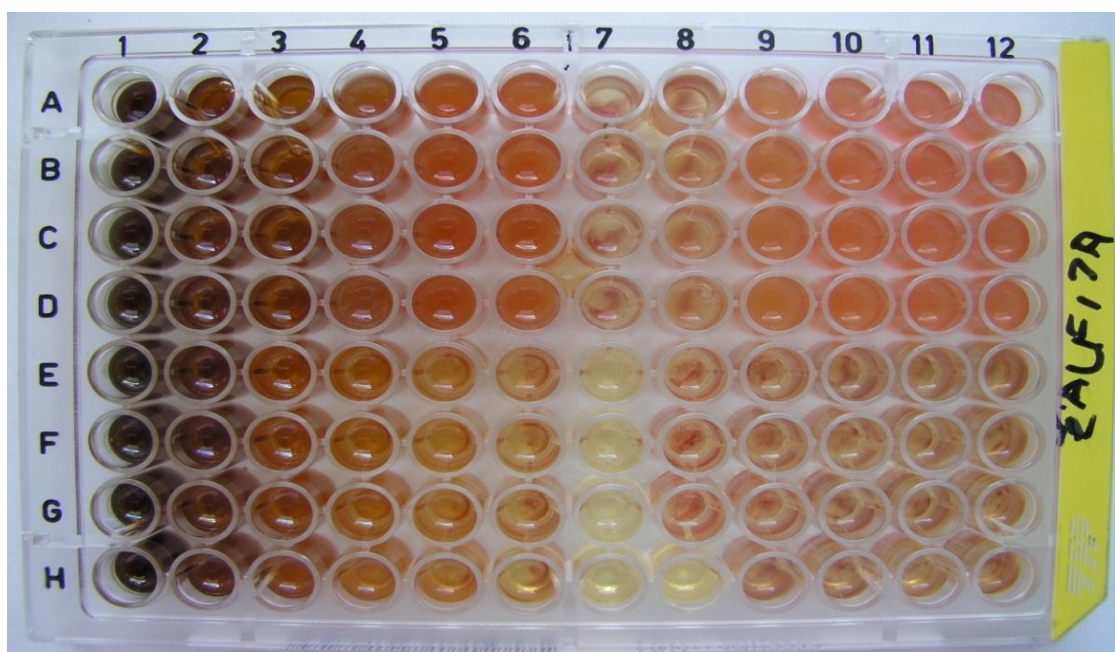


Tabela 10: MIC in MBC vrednosti za vodni in etanolni izvleček žajblja

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	6,25	12,5	25	50
2.	6,25	12,5	25	50
3.	6,25	12,5	25	50
4.	6,25	12,5	25	50

Tabela 11: MIC in MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček žajblja

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
1.	25	50	25	50
2.	25	50	25	50
3.	25	50	25	50
4.	25	50	25	50



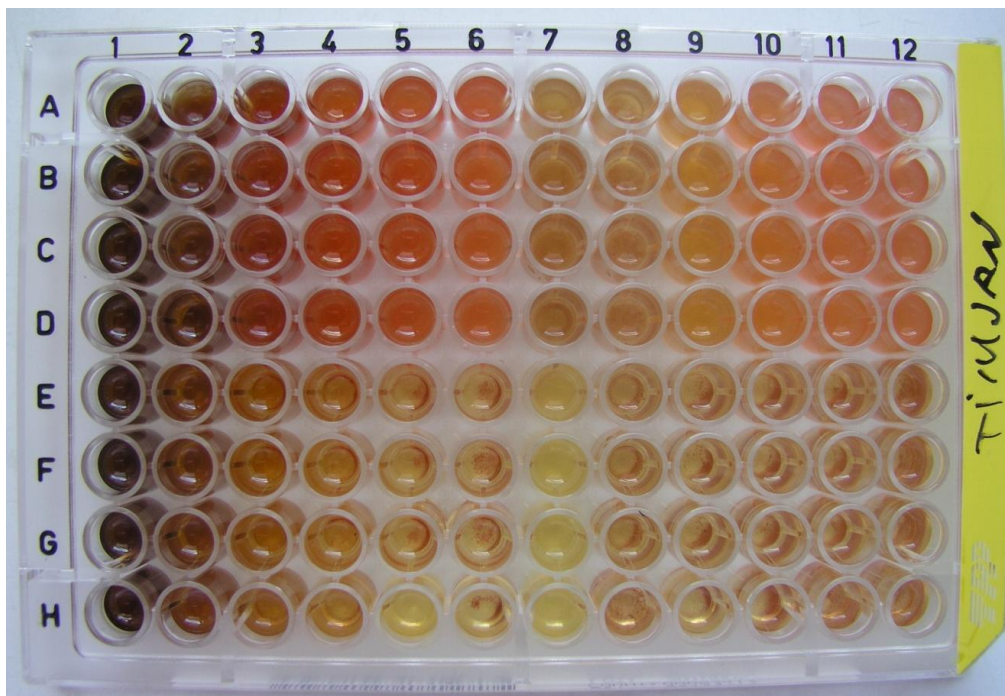
Slika 11: Določanje MIC in MBC/MFC vrednosti za etanolne in vodne izvlečke žajblja

Tabela 12: MIC in MBC vrednosti za vodni in etanolni izvleček timijana

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	12,5	25,0	50	nd
2.	12,5	25,0	50	nd
3.	12,5	25,0	50	nd
4.	12,5	25,0	50	nd

Tabela 13: MIC in MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček timijana

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	25	50	12,5	25
2.	25	50	12,5	25
3.	25	50	12,5	25
4.	25	50	12,5	25



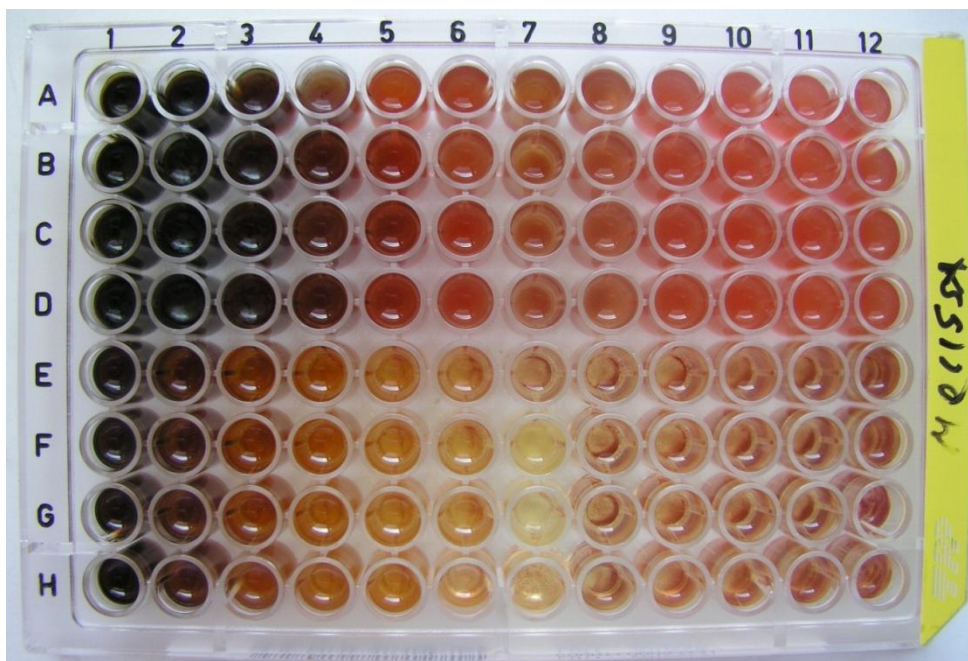
Slika 12: Določanje MIC in MBC/MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček timijana

Tabela 14: MIC in MBC vrednosti za vodni in etanolni izvleček melise

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	25	50	12,5	25
2.	25	50	12,5	25
3.	25	50	12,5	25
4.	25	50	12,5	25

Tabela 15: MIC in MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček melise

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	25	50	25	50
2.	25	50	25	50
3.	25	50	25	50
4.	25	50	25	50



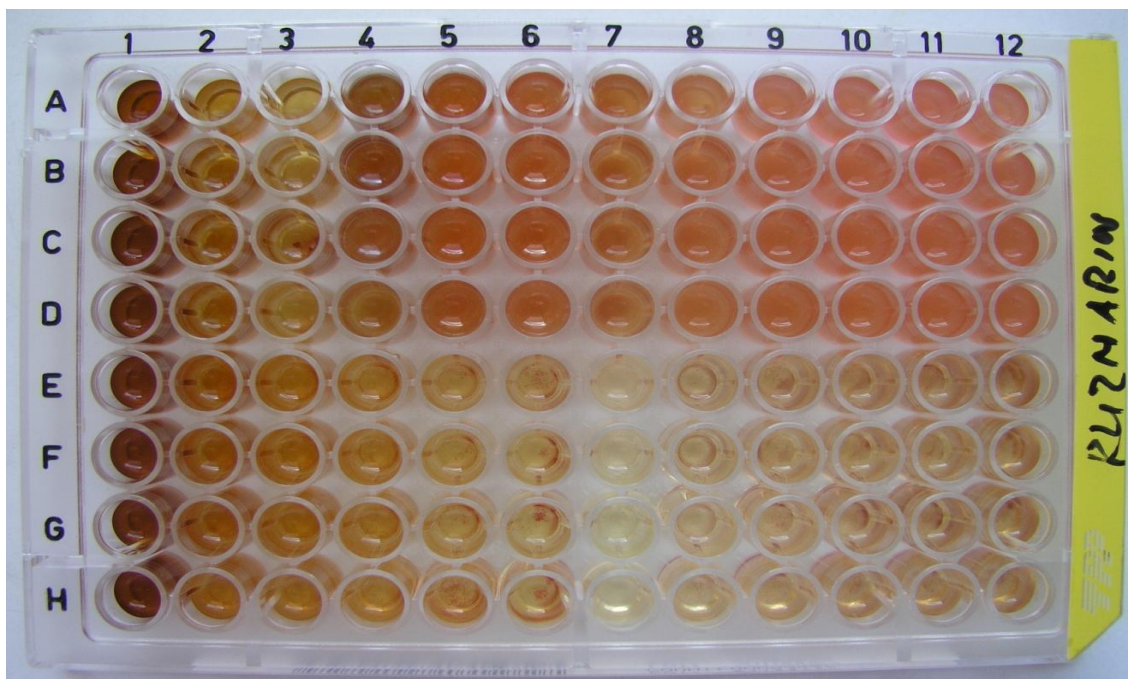
Slika 13: Določanje MIC in MBC/MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček melise

Tabela 16: MIC in MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček rožmarina

Number of trial	Ethanol extract (mg/ml)		Water extract (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	12,5	25	25	50
2.	12,5	25	25	50
3.	12,5	25	25	50
4.	12,5	25	25	50

Tabela 16: MIC in MFC vrednosti za vodni in etanolni izvleček rožmarina

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
1.	25	50	25	50
2.	25	50	25	50
3.	25	50	25	50
4.	25	50	25	50



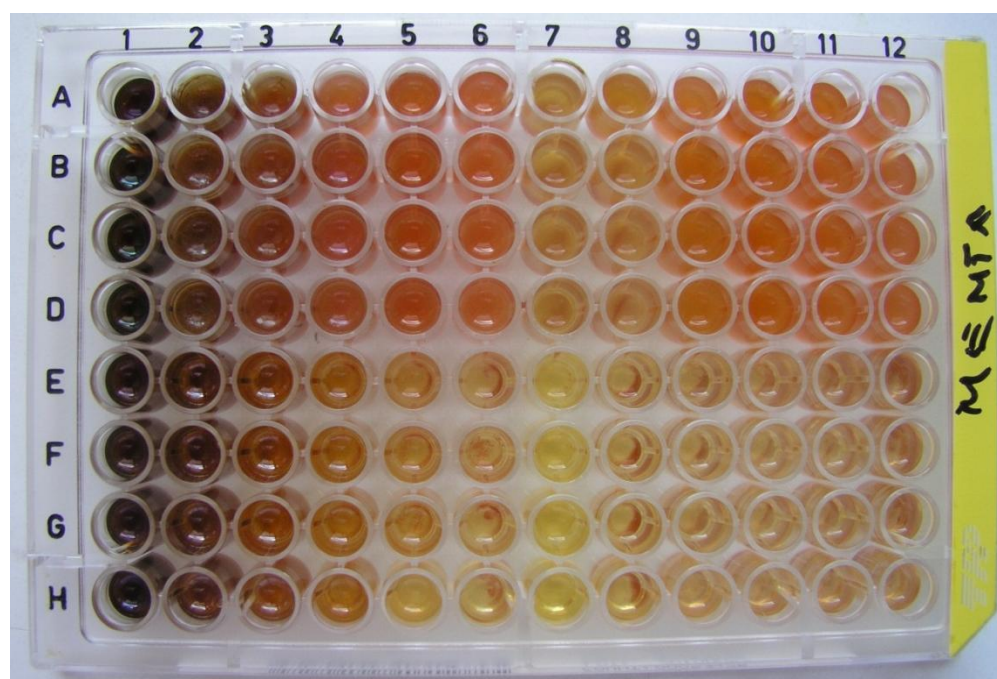
Slika 14: Določanje MIC, MBC in MFC vrednosti za vodne in etanolne izvlečke rožmarina

Tabela 17: MIC in MFC vrednosti vodnih in etanolnih izvlečkov mete

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1.	6,25	12,5	25	50
2.	6,25	12,5	25	50
3.	6,25	12,5	25	50
4.	6,25	12,5	25	50

Tabela 18: MIC in MFC vrednosti vodnih in etanolnih izvlečkov mete

Številka poskusa	Etanolni izvleček (mg/ml)		Vodni izvleček (mg/ml)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
1.	25	50	12,5	25
2.	25	50	12,5	25
3.	25	50	12,5	25
4.	25	50	12,5	25



Slika 15: Določanje MIC in MBC/ MFC vrednosti za vodne in etanolne izvlečke mete

PRILOGA 2: statistična obdelava podatkov ANOVA testom

V mojem primeru je korelacija določena med organizmom in rastlino.

Tabela 19 : Statistična analiza rezultatov vpliva etanolnih rastlinskih izvlečkov na E.coli (metoda difuzije na trdem gojišču z diski)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	P value	ϵ^2
Corrected Model	29,934 ^a	6	4,989	7,734	<0,001	0,481
Intercept	5214,325	1	5214,325	8083,142	<0,001	0,994
Plants	15,711	4	3,928	6,086	<0,001	0,328
Organism	2,453	1	2,453	3,802	0,057	0,071
Plants*Organism	8,721	1	8,721	13,519	0,001	0,213
Error	32,254	50	0,645			
Total	7849,950	57				
Corrected Total	62,188	56				

a. R Squared 0 0,481 (Adjusted R Squared = 0,419)

Legenda:

df = degree of freedom

F = f ratio

ϵ^2 = effect size

Tabela 5: Post Hoc Test

(I)-rastline	(J)-rastline	Povprečne razlike (I-J)	Standardna napaka	p vrednost	95% interval zaupanja	
					Spodnja meja	Zgornja meja
Meta	Rožmarin	1,52200*	0,35381	0,000	0,8069	2,2371
	Melisa	1,09500*	0,43332	0,016	0,2192	1,9708
	Žajbelj	1,72500*	0,35381	0,000	1,0099	2,4401
	Timijan	0,63500	0,35381	0,080	-0,0801	1,3501
Rožmarin	Meta	-1,5220*	0,35381	0,000	-2,2371	-0,8069
	Melisa	-0,42700	0,43332	0,330	-1,3028	0,4488
	Žajbelj	0,20300	0,35381	0,569	-0,5121	0,9181
	Timijan	-0,88700*	0,35381	0,016	-1,6021	-0,1719
Melisa	Meta	-1,09500*	0,43332	0,016	-1,9708	-0,2192
	Rožmarin	0,42700	0,43332	0,330	-0,4488	1,3028
	Žajbelj	0,20300	0,43332	0,154	-0,2458	1,5058
	Timijan	-0,88700	0,43332	0,295	-1,3358	0,4158
Žajbelj	Meta	-1,72500*	0,35381	0,000	-2,4401	-1,0099
	Rožmarin	-0,20300	0,35381	0,569	-0,9181	0,5121
	Melisa	-0,63000	0,43332	0,154	-1,5058	0,2458
	Timijan	-1,09000*	0,35381	0,004	-1,8051	-0,3749
Timijan	Meta	-0,63500	0,35381	0,080	-1,3501	0,0801
	Rožmarin	0,88700*	0,35381	0,016	0,1719	1,6021
	Melisa	0,46000	0,43332	0,295	-0,4158	1,3358
	Žajbelj	1,09000*	0,35381	0,004	0,3749	1,8051

