

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

ANTIBIOTIČNI UČINKI EKSTRAKTOV LISTOV BELE MURVE

(*Morus alba* L.)

Področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Prostor za nalepko

Avtor: URŠKA ŠUMAK

Mentor: BERNARDA DEVETAK, ANDREJA URBANEK KRAJNC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 162

Mesto: 3

Priznanje: zlato

Maribor, februar 2019

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje


ANTIBIOTIČNI UČINKI EKSTRAKTOV LISTOV BELE MURVE

(Morus alba L.)

Področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Prostor za nalepko



Maribor, februar 2019

KAZALO

KAZALO SLIK.....	4
KAZALO TABEL.....	4
KAZALO GRAFOV.....	5
1. POVZETEK.....	6
2. ZAHVALA.....	7
3. UVOD.....	8
3.1 Raziskovalno vprašanje.....	9
3.2 Hipoteze.....	9
4. TEORETIČNO OZADJE.....	10
4.1 Aktivne učinkovine rastlin.....	10
4.1.1 Bela murva.....	11
4.2 Mikroorganizmi.....	13
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	13
4.3 Antibiotiki.....	13
5 MATERIALI IN METODE.....	14
5.1 Seznam materiala.....	14
5.2. Rastlinski material.....	15
5.3 Priprava vodnega ekstrakta.....	17
5.3 Priprava etanolnega ekstrakta.....	18
5.4 Metoda difuzije trdega gojišča z diski.....	18
5.4.1 Vodni ekstrakt:.....	19
5.4.2 Etanolni ekstrakt.....	19
6 REZULTATI.....	21
6.1 Metoda na trdnem gojišču z diski.....	21
6.2 Statistična analiza.....	33
6.2.1 Standardni odklon.....	33
6.2.2 T-test.....	37
6.2.3 Tukey-jev in Duncanov test.....	40
7 RAZPRAVA.....	41
7.1 Ocena metode difuzije trdega gojišča z diski.....	43
8 ZAKLJUČEK.....	44
9 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	45

10 VIRI IN LITERATURA	46
11 PRILOGE	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Bela murva (pridobljeno 20.1. iz: http://murve.um.si/sl/bela/)	11
Slika 2: Klorogena kislina (pridobljeno 7.2., iz http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants_-_Veberic.pdf).....	12
Slika 3: Bakterija <i>Escherichia coli</i> (pridobljeno 20.1.2019 iz: https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/).....	13
Slika 4: Vzorci A 16, A 18 in A 47 (lastni vir)	16
Slika 5: Priprava vodnega ekstrakta (lastni vir)	17
Slika 6: Priprava vodnega ekstrakta (lastni vir)	18
Slika 7: Digitalni kaliper (pridobljeno 23.1.2019 iz: https://www.hotukdeals.com/deals/powerfix-digital-calliper-or-angle-finder-899-per-individual-item-instore-lidl-1979044)	20
Slika 8: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca A 18 (lastni vir)	26
Slika 9: Antibiogram pozitivne kontrole – kloramfenikol (lastni vir).....	27
Slika 10: Antibiogrami etanolnih ekstraktov vseh vzorcev in negativne kontrole po enem tednu (lastni vir)	28
Slika 11: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca KP 150.....	31
Slika 12: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca P 136.4 (lastni vir).....	32

KAZALO TABEL

Tabela 1: Rezultati 1. meritve inhibicijskih con vodnega in etanolnega ekstrakta	21
Tabela 2: Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah	22
Tabela 3: Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 1 tednu	23
Tabela 4: Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnih ekstraktov	25
Tabela 5: Ponovno merjenje inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po enem tednu	27
Tabela 6: Premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev)	30
Tabela 7: Premeri inhibicijskih con vseh ekstraktov ± 1 SD	33

Tabela 8: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah \pm 1 SD.....	34
Tabela 9: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po enem tednu \pm 1 SD	34
Tabela 10: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov pri prvi ponovitvi po 24 urah \pm 1 SD	35
Tabela 11: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov pri prvi ponovitvi po enem tednu \pm 1 SD.....	36
Tabela 12: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev) (\pm 1 SD).....	37
Tabela 13: T-test: primerjava vzorca A 47 in negativne kontrole po 24 urah.....	37
Tabela 14: T-test : primerjava vzorca A47 in negativne kontrole po enem tednu	38
Tabela 15: T-test: primerjava etanolnih ekstraktov 1 in 2 vzorca A 47	39
Tabela 16: Tukey-ev in Duncan-ov test	40

KAZALO GRAFOV

Grafikon 1: Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenih in prefiltriranih etanolnih ekstraktov.....	22
Grafikon 2: Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con etanolnega ekstrakta	24
Grafikon 3: Primerjava povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po prvem in drugem merjenju	29
Grafikon 4: Premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev).....	32

1. POVZETEK

Raziskave potrjujejo, da so številne vrste znotraj družine murvovk bogati vir farmakološko aktivnih snovi. Z raziskovalno nalogo sem želela natančneje preiskati antibiotične lastnosti etanolnega ekstrakta listov bele murve (*Morus alba* L.) na ne virulentni sev bakterije *Escherichia coli*. Z metodo difuzije v trdnem gojišču sem določala premere inhibicijskih con. Predpostavljala sem, da bodo učinki etanolnega ekstrakta večji od učinkov vodnega ekstrakta.

Na osnovi rezultatov lahko uspešno sklepamo, da so v etanolnih ekstraktih suhih listov spojine, ki kažejo antibiotično aktivnost, ki je genotipsko specifična. Spojine so po večini fenoli in terpenoidi, saj so spojine v vodi bile veliko manj topne, kakor etanolu.

Največji antibiotični učinek sta imela etanolni ekstrakt vzorcev A 18 in A 47, ki smo jih nabrali v občini Ajdovščina ter listi murve KP 150, ki smo jo vzorčili v Obalno-kraški regiji.

2. ZAHVALA

Iskreno bi se želela zahvaliti zunanji mentorici za priskrbljene vzorce in za strokovne nasvete in pripombe, zahvala gre tudi šolski mentorici, za konstantno spodbudo in potrpežljivost pri delu.

3. UVOD

V raziskovalni nalogi sem preučevala antibiotični učinek etanolnega ekstrakta listov lokalnih genotipov bele murve iz različnih delov Slovenije na bakterijo *Escherichia coli*. Za kontrolna tretiranja sem uporabila vodo, antibiotik kloramfenikol in 99,8% etanol.

Bakterije in drugi mikroorganizmi so znani povzročitelji raznih bolezni, poleg tega pa lahko povzročajo tudi kvarjenje hrane. Zaradi tega se intenzivno razvijajo sredstva za njihovo zatiranje oziroma uničenje. Kot posledica prevelike uporabe antibiotikov, so mnogi mikroorganizmi preko mutacij na njih postali odporni. Z željo reševanja problemov, ki jih povzročajo mikroorganizmi, so se na področju mikrobiologije pričele številne raziskave in iskanje načinov zatiranja bakterij (in drugih mikroorganizmov) z rastlinskimi preparati.

Kot protimikrobne učinkovine definiramo snovi, ki upočasnjujejo in preprečujejo rast mikroorganizmov. Glede na njihovo učinkovitost jih delimo v dve skupini: (1) bakteriostatske oz. fungistatske snovi, lahko le inhibirajo oz. upočasnijo rast mikroorganizmov, (2) baktericidne oz. fungicidne snovi pa mikroorganizme uničijo (Petauer, 1993).

Ena izmed že v Kitajski medicini prepoznanih rastlin, ki vsebuje bioaktivne učinkovine, je murva. Vsebuje komponente kot so polifenolske spojine, vlakna, probiotike in prebiotike, aktivne proteine in peptide, polinenasičene maščobne kisline, minerale in vitamine. Fenolske spojine vključno z flavonoidi so najvišje skupine naravnih antioksidantov (Grajek, Wawro in Pieprzyk-Kokocha, 2013).

Antimikrobno aktivnost lahko testiramo z večimi metodami, da določimo najmanjšo količino sredstva, ki je potrebna za zaviranje rasti mikroorganizma. Dobljena vrednost je znana kot minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) (Wistreich, 1997).

Zaradi velikega deleža bioaktivnih substanc o katerih poročajo avtorji sem sklepala, da bi ekstrakti listov lahko pokazali antibiotično aktivnost, kar bi bilo potencialno koristno v medicini kot naravno zdravilo. Z raziskovalno nalogo sem želela ugotoviti, ali je bil moj sklep pravilen ali ne.

3.1 Raziskovalno vprašanje

V svoji raziskovalni nalogi sem želela odgovoriti na naslednje vprašanje:

»Kakšen je antibiotični učinek vodnega in etanolnega ekstrakta murvinih listov na bakterijo *Escherichia coli*?«

Za določanje antibiotičnih lastnosti sem uporabljala metodo difuzije v trdnem gojišču z diski.

3.2 Hipoteze

1. VSI EKSTRAKTI BODO V VEČJI ALI MANJŠI MERI POKAZALI ANTIBIOTIČNE LASTNOSTI

Murvini listi vsebujejo fenolske spojine med katerimi so flavonoidi znani po antimikrobnem učinku. Iz tega lahko domnevamo, da bodo ekstrakti kazali antibiotično aktivnost tudi proti bakteriji *E. coli*.

2. ETANOLNI EKSTRAKT BO POKAZAL VEČJO ANTIBIOTIČNO AKTIVNOST KOT VODNI

Domnevamo, da bo etanolni ekstrakt pokazal večjo antibiotično aktivnost kot vodni ekstrakti, saj je etanol bolj primerno topilo za spojine v rastlinah (flavonoide in terpene) (Bremness 1994, Petauer 1993).

3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST IZBRANIH LOKALNIH GENOTIPOV MURV SE BO MEDSEBOJNO RAZLIKOVALA

Listi murv, ki smo jih vzorčili na različnih lokacijah in predstavljajo stare lokalne genotipe se razlikujejo po kemijski sestavi, zato domnevamo razlike v antimikrobni aktivnosti.

4. TEORETIČNO OZADJE

4.1 Aktivne učinkovine rastlin

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 (Cowan, 1999). Medicinske rastline so ogromni viri novih zdravil in lahko konstituira alternativno tistim zdravilom, ki jih uporabljamo ponavadi (Al-Mariri in Saf, 2014).

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatičnih snovi. Z izjemo aromatskih kislin je večina sekundarnih metabolitov, od katerih je bilo izoliranih vsaj 12.000, kar je ocenjeno na manj kot 10% skupnega števila metabolitov. Večina teh sekundarnih metabolitov je fenolov ali njihovih derivatov. V mnogih primerih te snovi služijo kot obrambni mehanizem rastlin pred škodljivimi organizmi, kot so patogeni in škodljivci. Nekateri, kot so terpenoidi, dajejo rastlinam svoje vonjave; drugi (kinoni in tanini) so odgovorni za rastlinski pigment.

Flavoni so fenolne strukture, ki vsebujejo eno karbonilno skupino. Z dodatkom 3-hidroksilne skupine nastane flavonol. Flavonoidi so tudi hidroksilirane fenolne snovi, vendar se pojavijo kot C6-C3 enota, povezana z aromatskim obročem. Znano je, da jih rastline sintetizirajo kot odziv na mikrobno okužbo, zato ne bi smelo biti presenetljivo, da so in vitro ugotovili, da so učinkovita protimikrobna sredstva proti širokemu nizu mikroorganizmov. Njihova aktivnost je verjetno posledica njihove sposobnosti, da tvorijo komplekse z zunajceličnimi in topnimi proteini ter, da tvorijo kompleks z bakterijskimi celičnimi stenami. Več lipofilnih flavonoidov lahko ovira tudi mikrobne membrane (Murphy, Cowan, 1999).

4.1.1 Bela murva

Bela murva (*Morus alba* L.) je listopadno do 18 metrov visoko drevo. Deblo je kratko in grčavo, skorja je rdečkastorjava in vzdolžno razpokana. Poganjki bele murve so sprva dlakavi in pozneje goli, rumenosivi. Listi bele murve so dvoji, enostavni ali dlanasto krpsti. Pojav, da se na isti rastlini listi razlikujejo po obliki in velikosti, imenujemo heterofilija. Tendencia k tvorjenju krpstih listov je odvisna od genotipa in starosti listov in poganjkov. Listi so pri beli murvi na zgornji strani svetlo zeleni in bleščeči, na spodnji strani so samo ob žilah dlakavi, kar je ključno pri prepoznavanju te vrste (Brus, 2004).



Slika 1: Bela murva (pridobljeno 20.1. iz: <http://murve.um.si/sl/bela/>)

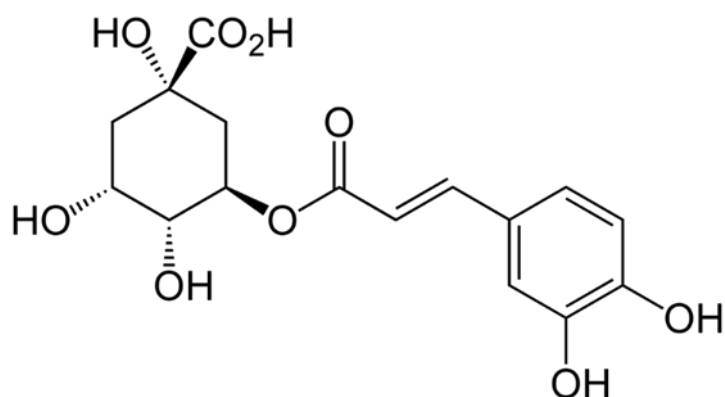
Bela murva vsebuje beljakovine, ogljikove hidrate, kalcij, železo, askorbinsko kislino, β -karoten, tiamin, folno kislino, vitamin D in različne fenolne spojine. Fenoli (flavonoidi, fenolne kisline, antocianini, stilbeni, tanini, lignani, lignini) so pomembni tako pri rasti in razvoju rastlin, kot tudi pri obrambi pred okužbami in poškodbami. Spojine so pogosto prisotne v rastlinskih tkivih in so močni antioksidanti. (Urbanek Krajnc s sod. 2014)

Fenolne spojine kot antioksidanti rastlino ščitijo na različne načine; neposredno reagirajo s prostimi radikali, jih odstranjujejo iz celic, razgrajujejo na manj reaktivne snovi, nadzorujejo aktivnost mnogih encimov.

Glavne fenolne spojine v listih murv so različne kisline: klorogena, galna, vanilinska, kavna, kumarna, p-hidroksibenzojna, in še nekatere druge kisline. Najbolj pogosta fenolna kislina v beli murvi je klorogena (povz. po Veberič, 2010). Bela murva vsebuje oksiresveratrol in 5,7-

dihidroksikumarin 7-metil eter, ki ima antioksidativni potencial (Oh s sod., 2002). Podobno kot pri beli, tudi črna murva vsebuje primerljive snovi, s tem da si bili v črni najdeni tudi karotenoidi (Radojkovič s sod. 2012, Zafar s sod., 2013).

Ekstrakti iz listov imajo nevroprotektivni, imunomodulatorni, antihiperглиkemični, protivirusni in protirakavi učinek. Hkrati deluje kot antipiretik proti povišani telesni temperaturi (Zafar et al., 2013).



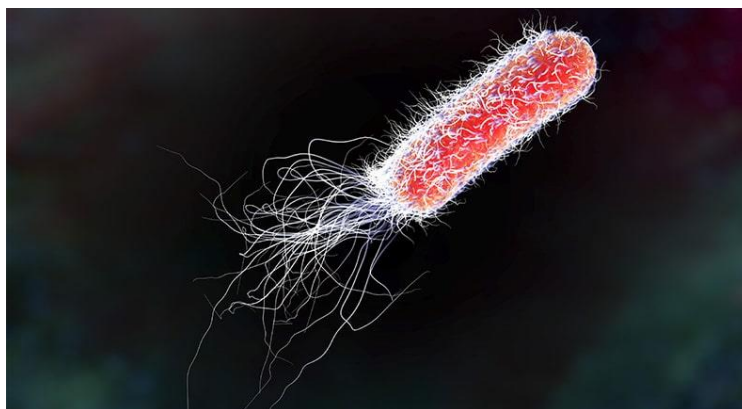
Slika 2: Klorogena kislina (pridobljeno 7.2., iz http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants_-_Veberic.pdf)

Antimikrobno aktivnost murvinih listov avtorji pripisujejo predvsem nekaterim aktivnim snovem kot so kuanon C, mulberofuran G, albanolnim kislina in flavonolom. Avtorji navajajo, da so hladni vodni ekstrakti antimikrobno manj učinkoviti kot etanolni. Prav tako navajajo, da lahko z ekstrakti murve zdravimo bakterijske in glivične okužbe, zaradi prisotnosti fitokemikalij in mineralov (Zafar s sod., 2013).

4.2 Mikroorganizmi

4.2.1 *Escherichia coli*

Gre za paličasto, Gram-negativno, gibljivo 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 3: Bakterija *Escherichia coli* (pridobljeno 20.1.2019 iz: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>)

4.3 Antibiotiki

Kloramfenikol je antibiotično zdravilo, ki se je nekoč pogosto uporabljalo pri zdravljenju okužb, ki jih povzročajo različne bakterije, vključno s tistimi v rodovih *Rickettsia* in *Mycoplasma*. Kloramfenikol je bil prvotno ugotovljen kot produkt metabolizma bakterije *Streptomyces venezuelae* (red Actinomycetales) in je bil nato sintetiziran kemično. Svoj antibakterijski učinek doseže tako, da v teh mikroorganizmih ovira sintezo beljakovin (Chloramphenicol, s.a.).

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Seznam materiala

- Posušeni listi murve
- Voda
- Absolutni etanol, čistost $\geq 99,8\%$ (Honeywell)
- Kultura ne virulentnega seva bakterije *Escherichia coli*
- Tripton
- Kvasni ekstrakt
- Natrijev klorid
- Destilirana voda
- Kloramfenikol (Bioanalyse)
- Čaše
- Epruvete
- Bučke
- Centrifuga (Mikro + polo Rotofix 32 A)
- Tehnica (Kern)
- Merilni valj
- Steklena palčka
- Žlička
- Epruvete
- Petrijevke
- Kuhalnik
- Avtoklav (CertoClav)
- Laminarij
- Avtomatska pipeta (LLG Labware)
- Eza
- Magnetno mešalo

- Vorteks (Phoenix RS-VA 10)
- Rotavapor
- Digitalni kaliper (Powerfix)
- Inkubator (Binder)
- Mikrofiltri
- LB trdno gojišče

5.2. Rastlinski material

Vzorci murv sem pridobila na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede in sicer v okviru projekta Vpliv hranjenja ličink hibridov sviloprejk (*Bombyx mori* L.) z listi starih lokalnih madžarskih in slovenskih genotipov murv (*Morus alba* L.) na razvoj in zdravstveni status ličink (ARRS N1-0041). Gre za bilateralno projektno sodelovanje madžarskih (Veterinarska univerza, Budimpešta) in slovenskih (Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerza v Mariboru) partnerjev. Usmerjeno je v ohranjanje lokalnih genotipov in na preučevanje učinkov hranjenja z listjem na razvoj in zdravstveno stanje sviloprejke.

Na začetku sem raziskavo opravljala le na treh vzorcih, nato pa sem celoten poskus ponovila še enkrat s starimi in tremi novimi vzorci.

Prvi trije vzorci bele murve so označeni z A 16, A 18 in A 47. Vsi prihajajo iz iste regije (kotline in ravnine Primorska), natančneje iz Ajdovščine. Murva A 16 se nahaja na evtričnih rjavih tleh, na eocenskem flišu; tla so psevdoglejena 70%. Njihova efektivna poljska kapaciteta je srednja (3. razred). Murva A 18 se nahaja na evtrični, mineralni, zmerno močni podlagi, katere efektivna poljska kapaciteta je velika (2. razred). Murva A 47 se nahaja na enaki podlagi, kot vzorec A 16, torej na evtričnih rjavih tleh, eocenskem flišu. Efektivna poljska kapaciteta je srednja (3. razred).

Poleg tipa podlage, na kateri se rastlina nahaja, bi na koncentracijo snovi z antibiotičnim in učinkom lahko vplivala tudi povprečna temperatura okolja, v katerem se rastlina nahaja. Pri

vzorcih A 16 in A 47 povprečna temperatura znaša preko 12°C, pri vzorcu A 18 pa med 9°C in 12°C.

Vzorca A 16 in A 18 sta bila vzorčena 27. 5. 2015, vzorec A 47 pa 2. 6. 2015.

Vzorca P 136.4 in KP 129 prihajata iz iste regije (Koprska brda; natančneje iz Pirana in Kopra).

Vzorec KP 150 se nahaja v regiji Podgorški Kras, Čičarija in Podgrajsko podolje; natančneje v Kopru.

Vzorca P 136.4 in KP 129 sta bila vzorčena 22. 2. 2016, vzorec KP 150 pa 6. 6. 2016



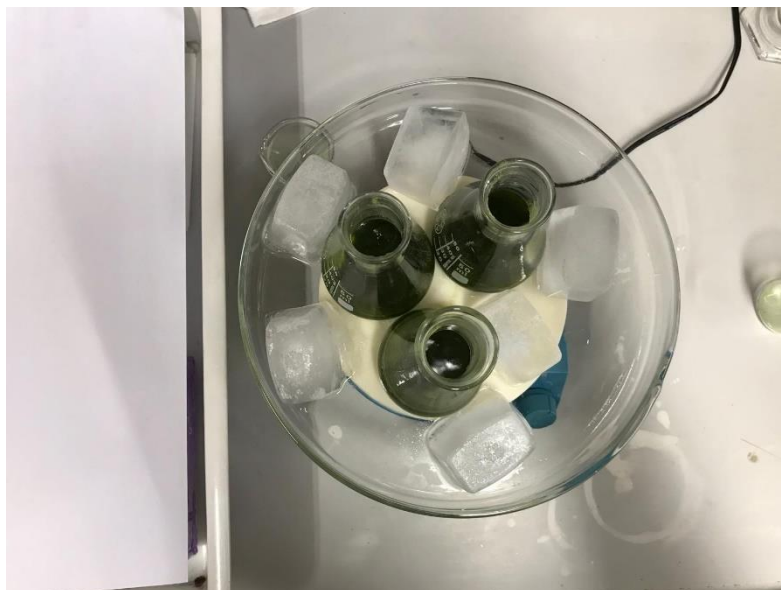
Slika 4: Vzorci A 16, A 18 in A 47 (lastni vir)

5.3 Priprava vodnega ekstrakta

Polovico vzorcev zmešamo s 15 mililitri vode, ki ima 10°C in smo jo predhodno ohlajali v zmrzovalniku. Nato s pomočjo magnetnega mešala zmes stresamo 30 minut. Da preprečimo otoplitev vzorca, posodo, na kateri imamo vzorec, obložimo z ledom. Dobljeno zmes prelijemo v epruveto ter damo v centrifugo. Centrifugiramo 5 minut pri frekvenci 300 rpm. Po centrifugiranju shranimo tekočino, ki nastane pri separaciji, saj jo bomo kasneje testirali za antibiotične lastnosti. Postopek ponovimo z istim vzorcem, vendar da zdaj namesto mrzle dodamo vročo vodo, segreto na 85°C. To ponovimo z vsakim vzorcem.



Slika 5: Priprava vodnega ekstrakta (lastni vir)



Slika 6: Priprava vodnega ekstrakta (lastni vir)

5.3 Priprava etanolnega ekstrakta

Ta istim vzorcem dodamo 15 mL 99,8% etanola. S pomočjo magnetnega mešala vzorce stresamo 30 minut. Zmes ki jo dobimo prelijemo v epruvete. Epruvete damo v centrifugo in ponovno stresamo pri enaki frekvenci, torej 300 rpm 5 minut. Ekstrakt nato uparimo s pomočjo rotavaporja.

5.4 Difuzijski antibiogram

Difuzijski antibiogram je preprosta metoda s katero testiramo odpornost bakterij na antibiotike. Pri postopku difuzije agarja se petrijevka, ki vsebuje ustrezen medij, močno inokulira z mikroorganizmom, katerega antibiotično občutljivost je treba določiti. Komercialno dostopni diski iz filtrirnega papirja, ki vsebujejo določene koncentracije specifičnih antibiotikov, se dajo na površino agarja. Pripravek se inkubira določen čas, med katerim antibiotiki difundirajo iz diskov v agar. Na določeni razdalji od vsakega diska dosežemo MIC za

antibiotik. MIC-e prepoznamo po prisotnosti območij zaviranja rasti (jasnih conah), ki obdajajo različne uporabljene antibiotične diske. Premer takšnih območij se lahko meri z ravnilom. Rezultati predstavljajo antibiogram (Wistreich, 1997).

Poudariti je treba, da se celoten postopek izvaja v skladu s pravili aseptične tehnike. Za testiranje na antibiotične lastnosti si najprej pripravimo gojišče. V čašo in merilni valj odtehtamo ustrezne količine snovi, nato v čašo dolijemo vodo. Dobljeno zmes segrevamo do vretja, potem čašo pokrijemo z aluminijasto folijo in damo v avtoklav za 15 minut pri 121 stopinjah Celzija. Gojišče nato prelijemo v petrijevke in pustimo, da se strdi.

5.4.1 Vodni ekstrakt:

Na gojišče naneseemo 100 µl prekonočne kulture tekočega gojišča *E.coli* in razmažemo. Ekstrakte prefiltriramo in jih shranimo v sterilne epruvete. Na vsako petrijevko naneseemo 5 diskov iz filtrirnega papirja, ki smo jih omočili z ekstraktom. Za negativno kontrolo uporabimo gole diske, za pozitivno kontrolo pa antibiotik kloramfenikol. Ko z nanosom končamo, petrijevke damo v inkubator in pustimo, da se razvije kultura.

5.4.2 Etanolni ekstrakt

Tekočino, ki smo jo dobili po evaporaciji prefiltriramo s pomočjo filtrov za odstranjevanje bakterij – do sterilnega. Na petrijevke naneseemo 100 µl prekonočne kulture tekočega gojišča bakterije *E. coli* in razmažemo. Ko se to posuši, na vsako petrijevko naneseemo 5 diskov iz filtrirnega papirja, omočenih z ekstraktom. Za pozitivno kontrolo uporabimo antibiotik kloramfenikol, za negativno kontrolo pa diske, pomočene v 99,8% etanol.

Ko končamo z nanosom ekstraktov na vse petrijevke, jih odnesemo v inkubator in pustimo, da se razvije kultura.

Po 24-ih urah preverimo rezultate. Nastalim inhibicijskim conam izmerimo premere s pomočjo digitalnega kalibra. Vsako inhibicijsko cono izmerimo iz treh smeri, upoštevajoč premer diska.

Da bi videla, kako se bodo velikosti inhibicijskih con spremenile, sem merjenje ponovila večkrat, po različnih časovnih intervalih.



Slika 7: Digitalni kaliper (pridobljeno 23.1.2019 iz: <https://www.hotukdeals.com/deals/powerfix-digital-calliper-or-angle-finder-899-per-individual-item-instore-lidl-1979044>)

Za najbolj optimalne rezultate smo celoten poskus večkrat ponovili.

6 REZULTATI

6.1 Metoda na trdnem gojišču z diski

Pri prvem merjenju smo želeli ugotoviti, ali imajo vodni in etanolni ekstrakti naših vzorcev antibiotične aktivnosti. Rezultati so pokazali, da imajo antibiotične lastnosti le etanolni ekstrakti, in sicer vzorcev A 16 in A 47.

Tabela 1: Rezultati 1. meritve inhibicijskih con vodnega in etanolnega ekstrakta

Rezultati 1. meritve inhibicijskih con vseh treh ekstraktov [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE (mm)					POVPREČNA VREDNOST
A 16	5,21	5,52	5,14	4,65	4,21	4,97
A 18	0	0	0	0	0	0
A 47	7,69	7,16	8,58	7,24	/	7,8
E1 A 16	0	0	0	0	0	0
E1 A 18	0	0	0	0	0	0
E1 A 47	0	0	0	0	0	0
E2 A 16	0	0	0	0	0	0
E2 A 18	0	0	0	0	0	0
E2 A 47	0	0	0	0	0	0
Negativna kontrola (voda)		0	0	0	0	0
Pozitivna kontrola	19,19	17,5	18,07	19,07	17,59	14,77

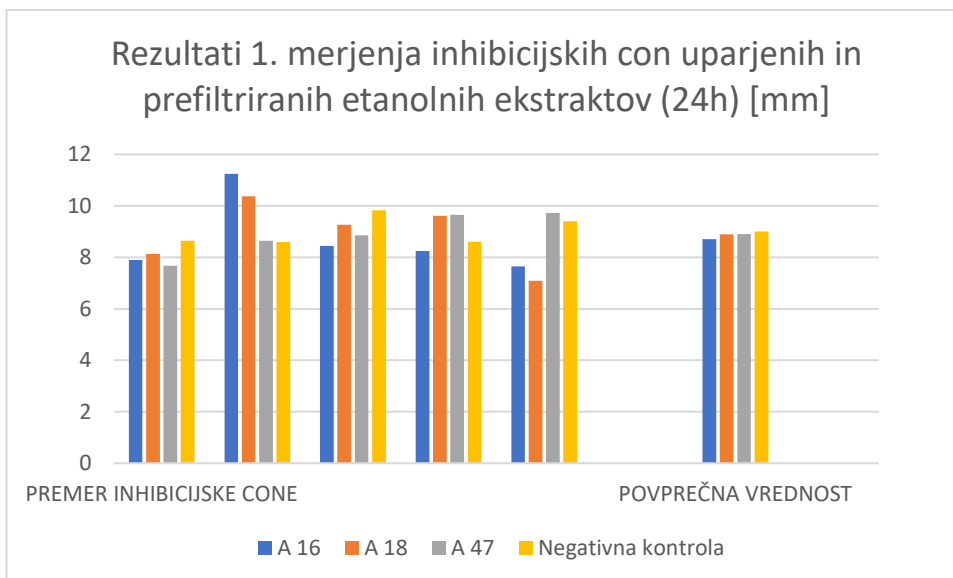
Po prvem merjenju antibiotičnih lastnosti, smo se odločili preizkus ponoviti, zdaj samo z etanolnim ekstraktom, saj je edini kazal antibiotične učinke. Zanimivo je, da so rezultati veliko boljši; ne le, da smo cone lahko izmerili pri vseh ekstraktih, temveč so tudi večje, v primerjavi z prvimi vrednostmi (ki jih vidimo v Tabeli 1).

Tabela 2: Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah

Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h) [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
A 16	7,9	11,24	8,45	8,24	7,65	8,71
A 18	8,14	10,37	9,26	9,61	7,09	8,89
A 47	7,67	8,65	8,86	9,65	9,73	8,91
Negativna						
kontrola	8,64	8,6	9,83	8,61	9,4	9,01
Pozitivna						
kontrola	19,19	17,5	18,07	19,07	17,59	14,77

Tukaj lahko vidimo še grafično primerjavo med posameznimi vzorci. Najboljše rezultate (najvišja povprečna vrednosti vseh izmerjenih premerov inhibicijskih con) smo dobili pri ekstraktu vzorca A 47.

Grafikon 1: Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenih in prefiltriranih etanolnih ekstraktov



Merjenje inhibicijskih con smo izvajali dvakrat, po 24 urah in po enem tednu. Premeri inhibicijskih con so se po enem tednu povečali, vendar so se znotraj con pojavile posamezne kolonije. V primerjavi z negativno kontrolo (99,8% etanol), smo se te kolonije odločili zanemariti, saj jih je bilo v inhibicijskih conah etanolnih ekstraktov manj, hkrati pa je izvorna inhibicijska cona bila večja kakor pri negativni kontroli.

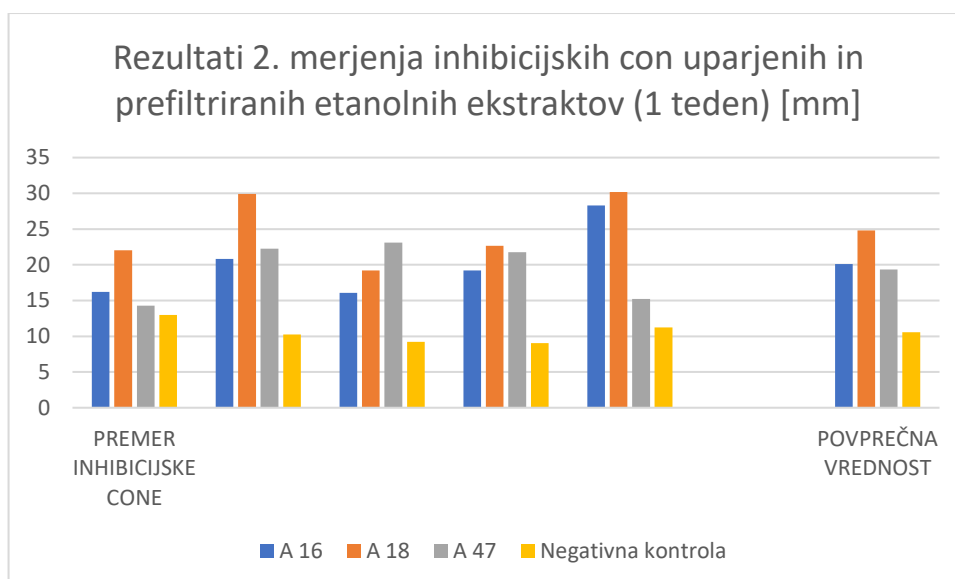
Tabela 3: Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 1 tednu

Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenih in prefiltriranih etanolnih ekstraktov (1 teden) [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
A 16	16,22	20,82	16,07	19,21	28,28	20,12
A 18	22,02	29,9	19,22	22,65	30,17	24,79
A 47	14,29	22,25	23,12	21,78	15,21	19,33
Negativna kontrola	12,97	10,25	9,24	9,05	11,24	10,55

Dobljene vrednosti smo primerjali s prvotnimi (se pravi tistimi, izmerjenimi po 24 urah).

Najboljše rezultate smo dobili z etanolnimi ekstrakti vzorca A 18.

Grafikon 2: Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con etanolnega ekstrakta



Meritev antibiotičnih lastnosti smo se odločili ponavljati še enkrat, da se popolnoma prepričamo o veljavnosti naših rezultatov, ki ob drugi ponovitvi ne bi smeli biti drastično različni od prej dobljenih vrednosti (premeri inhibicijskih con, oz. povprečne vrednosti le-teh, bi si med seboj morale biti dokaj podobne). Tokrat smo za vsak ekstrakt uporabili po dve

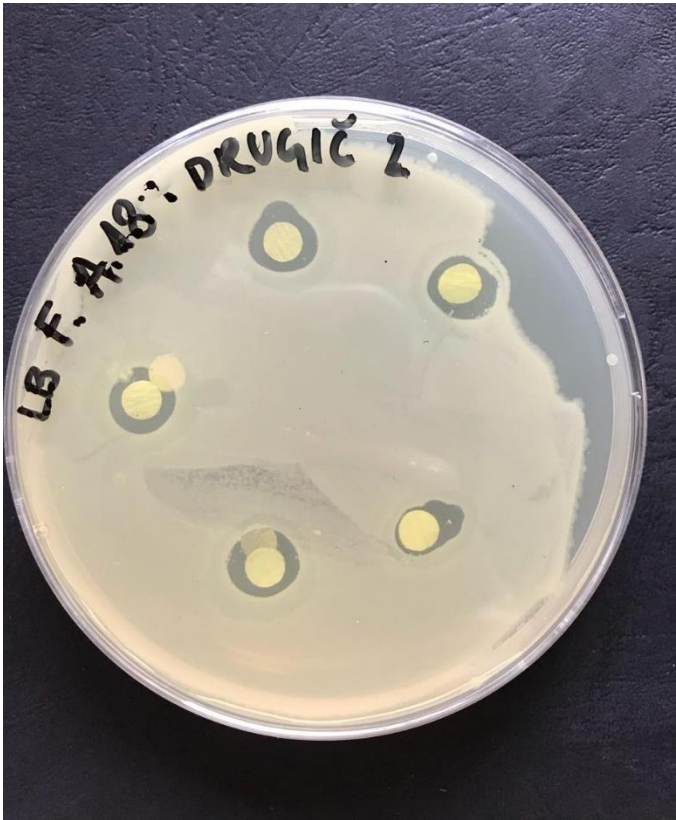
petrijevki. Številki 1 ali 2 pred oznako pomenita predhodno filtriran ekstrakt (1), ali ekstrakt filtriran takoj pred izvedbo določanja antibiotičnih aktivnosti (2), da bi tako hkrati tudi preizkusili, ali ima tudi čas filtracije kakšen vpliv na naše rezultate

Tabela 4: Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnih ekstraktov

Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnih ekstraktov [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
1. A 16 1/2	7,68	7,71	7,12	9,46	7	7,79
1. A 16 2/2	7,85	7,42	8,21	8,32	7,05	7,77
1. A 18 1/2	7,77	10,78	7,77	8,45	7,29	8,41
1. A 18 2/2	10,18	8,11	12,23	9,91	6,98	9,48
1. A 47 1/2	8,15	6,9	6,86	7,68	7,03	7,32
1. A 47 2/2	6,72	7,85	6,59	5,82	0	5,40
2. A 16 1/2	8,5	6,39	6,45	5,97	9,26	7,31
2. A 16 2/2	6,79	5,59	6,08	6,41	/	6,22
2. A 18 1/2	8,57	9,3	8,11	8,91	7,69	8,52
2. A 18 2/2	9,36	8,72	7,37	8,98	8,63	8,52
2. A 47 1/2	10,45	9,05	9,54	6,54	9,39	8,98
2. A 47 2/2	8,61	10,48	10,96	10,02	0	8,01
Pozitivna kontrola	22,09	22,44	20,92	19,67	23,42	21,71

Negativna						
kontrola	23,04	23,29	22,8	21,59	17,85	21,71

Naši rezultati so bili veliko boljši ob ponovitvi poskusa, torej, ko smo ekstrakt filtrirali takoj pred izvedbo testa za antibiotično aktivnost. Največjo antibiotično aktivnost je tokrat pokazal vzorec A 18, povprečne vrednosti inhibicijskih con vseh treh ekstraktov pa presegajo povprečno vrednost premerov inhibicijskih con negativne kontrole (99,8% etanol).



Slika 8: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca A 18 (lastni vir)



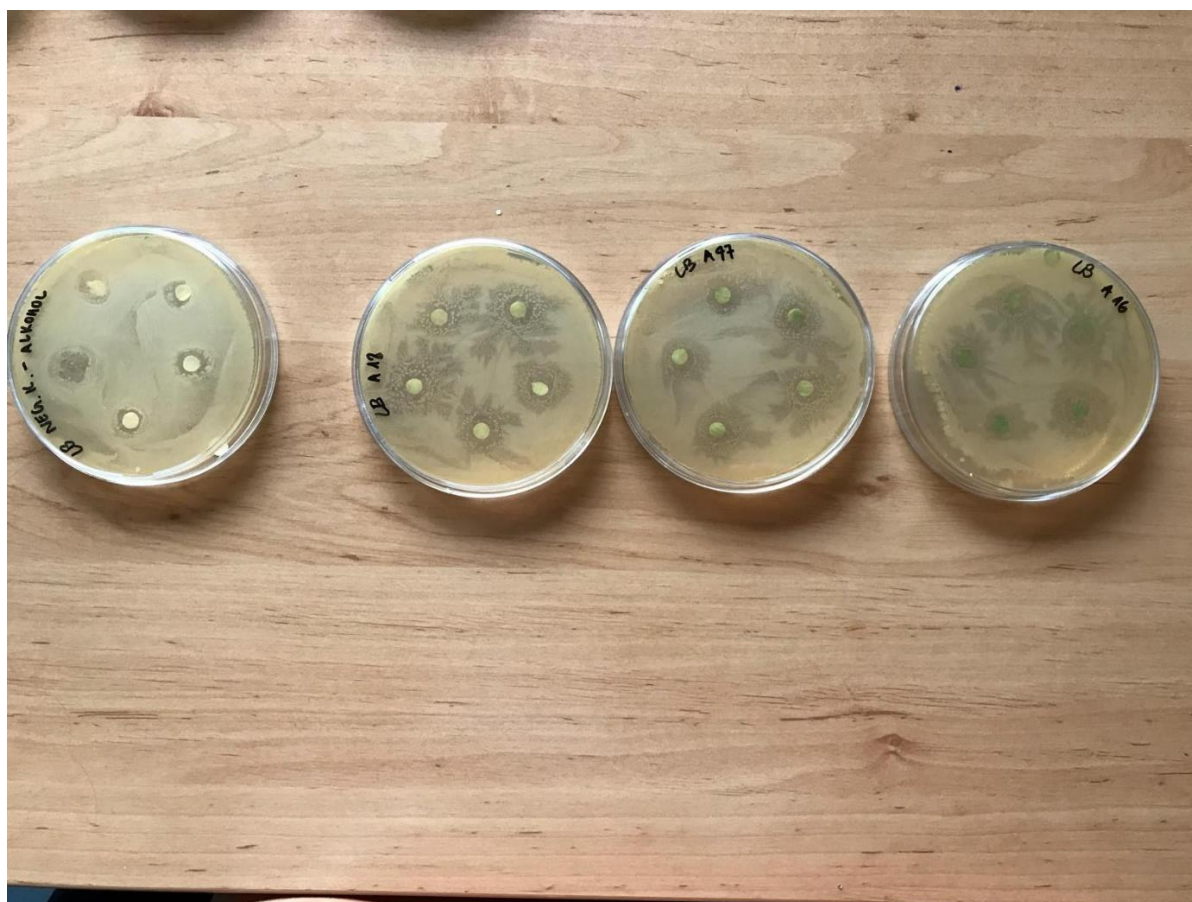
Slika 9: Antibiogram pozitivne kontrole – kloramfenikol (lastni vir)

Petrijevke smo po merjenju inhibicijskih con po 24 urah dali nazaj v inkubator in premere inhibicijskih con ponovno izmerili po 48 urah, da bi videli, do kakšnih sprememb je prišlo.

Tabela 5: Ponovno merjenje inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po enem tednu

Ponovno merjenje inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po enem tednu [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
1. A 16 1/2	8,51	7,71	6,32	8,6	6,38	7,50
1. A 16 2/2	7,94	8,24	8,38	8,01	7,5	8,01
1. A 18 1/2	7,57	13,35	9,32	8,17	7,73	9,23
1. A 18 2/2	0	7,66	6,63	5,64	0	3,99
1. A 47 1/2	7,8	7,37	6,72	7,6	7,93	7,48
1. A 47 2/2	6,8	5,82	0	7,32	8,11	5,61
2. A 16 1/2	8,87	5,95	6,06	5,94	8,24	7,01
2. A 16 2/2	7,89	0	7,37	6,61	/	4,83

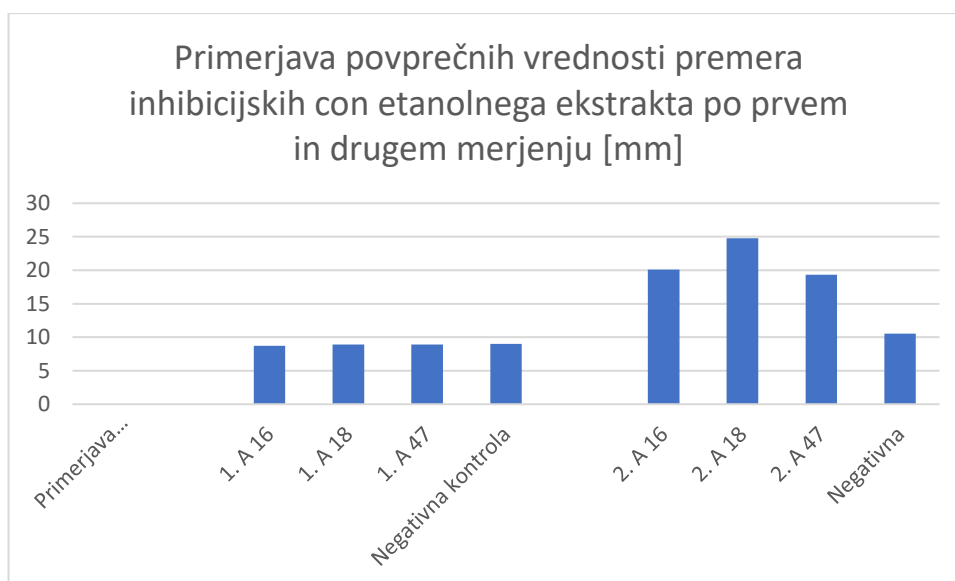
2. A 18 1/2	7,79	8,74	8,56	8,88	8,26	8,45
2. A 18 2/2	9,68	10	9,98	8,93	8,7	9,46
2. A 47 1/2	8,49	7,4	8,45	6,72	9,48	8,12
2. A 47 2/2	0	0	0	0	0	0
Negativna						
kontrola	9,87	10,33	10,24	9,22	6,73	9,28
	18,87					
Pozitivna						
kontrola		18,12	19,11	19,77	19,85	19,14



Slika 10: Antibiogrami etanolnih ekstraktov vseh vzorcev in negativne kontrole po enem tednu (lastni vir)

Premeri inhibicijskih con so se po enem tednu znatno povečali, čeprav so se znotraj pojavile majhne kulture. Kakor prej, smo se kolonije odločili zanemariti na račun tega, da so kulture znotraj inhibicijskih con etanolnih ekstraktov manj številčne ter, da so same inhibicijske cone etanolnih ekstraktov večje od premerov inhibicijskih con negativne kontrole, za katero smo uporabili 99,8% etanol.

Grafikon 3: Primerjava povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po prvem in drugem merjenju



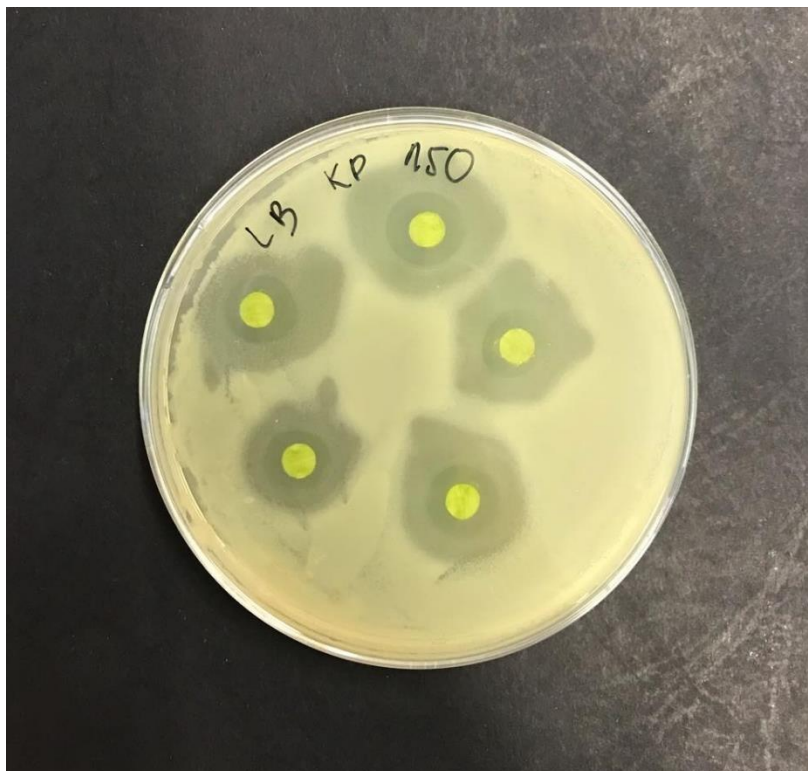
Poskus smo se odločili ponoviti še enkrat, tokrat z (novimi) etanolnimi ekstrakti istih vzorcev (A 16, A 18 in A 47) in z etanolnimi ekstrakti treh dodatnih vzorcev (KP 129, KP 150 in P 136.4) ter dobljene vrednosti med seboj primerjati.

Rezultati so pokazali, da ima največjo antibiotično aktivnost vzorec A 16, povprečna vrednost premerov njegovih inhibicijskih con pa je hkrati tudi večja od povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con negativne kontrole (99,8 % etanol).

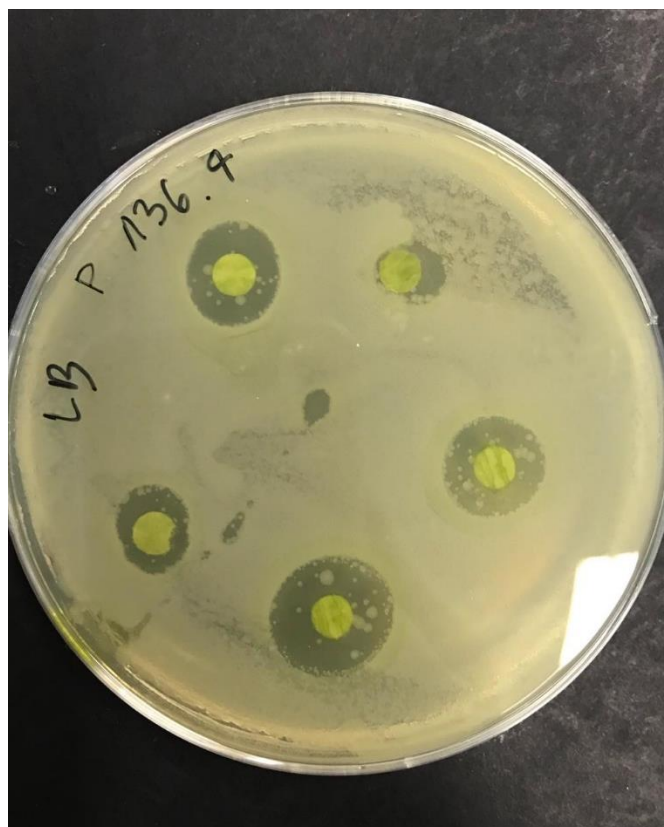
Potrebno je izpostaviti, da so po 24 urah znotraj vseh inhibicijskih con (razen vseh pri ekstraktu vzorca KP 150 in posameznih inhibicijskih conah ekstraktov vzorcev A 47 in negativne kontrole) nastale manjše kolonije. Ponovno smo se jih odločili zanemariti iz istih razlogov kakor poprej (kulture so manj številčne znotraj inhibicijskih con ekstraktov, prav tako so inhibicijske cone ekstraktov večje od inhibicijskih con negativne kontrole).

Tabela 6: Premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev)

3. ponovitev: premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah						
[mm]						
	PREMER (mm)	INHIBICIJSKE CONE				POVPREČNA VREDNOST (mm)
A 16	10,92	13,18	12,37	11,05	12,35	11,97
A 18	10,37	12,11	8,89	8,05	9,47	9,78
A 47	8,91	9,18	9,13	13,17	10,4	10,16
KP 129	12,68	11,17	8,6	10,91	9,49	10,57
KP 150	12,89	10,04	11,4	9,22	11,64	11,04
P 136.4	11,97	8,08	12,89	15,79	10,69	11,88
Pozitivna kontrola	15,42	16,99	16,56	15,34	15,59	15,98
Negativna kontrola	10,03	11,15	12,47	10,28	10,3	10,85

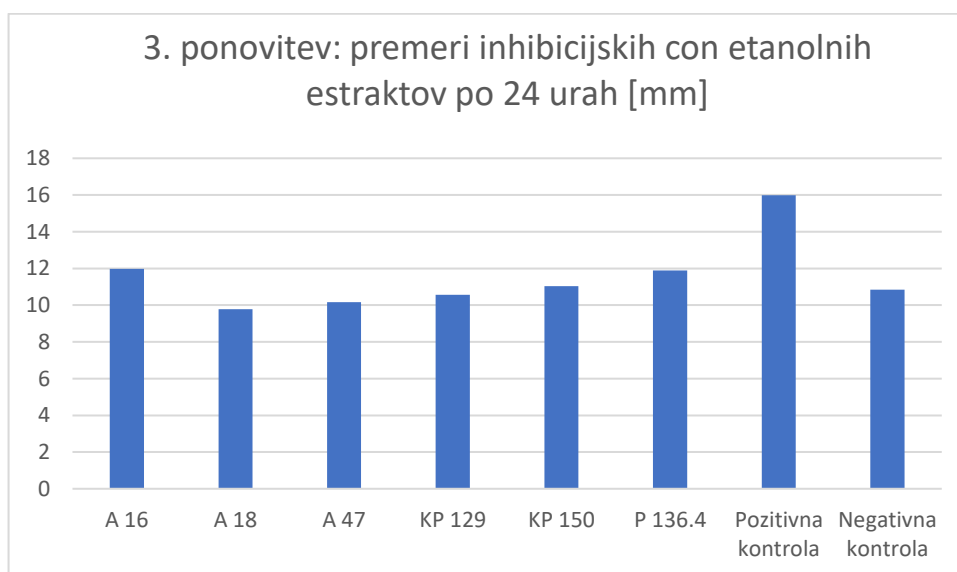


Slika 11: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca KP 150



Slika 12: Antibiogram etanolnega ekstrakta vzorca P 136.4 (lastni vir)

Grafikon 4: Premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev)



6.2 Statistična analiza

6.2.1 Standardni odklon

Med seboj smo pri posameznih meritvah primerjali povprečne vrednosti s standardnim odklonom ± 1 SD.

Tabela 7: Premeri inhibicijskih con vseh ekstraktov ± 1 SD

Rezultati 1. meritve inhibicijskih con na vseh treh ekstraktih (mrzla voda, vroča voda, etanol) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	4,97 \pm 0,46176
A 18	/
A 47	7,8 \pm 0,56424
E1 A 16	/
E1 A 18	/
E1 A 47	/
E2 A 16	/
E2 A 18	/
E2 A 47	/
Negativna kontrola	/
Pozitivna kontrola	14,77 \pm 0,71843

Tabela 8: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah ± 1 SD

Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	8,71 \pm 1,30139
A 18	8,89 \pm 1,15309
A 47	8,91 \pm 0,75202
Negativna kontrola	9,01 \pm 0,5078

Tabela 9: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po enem tednu ± 1 SD

Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (1 teden) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	20,12 \pm 4,4613
A 18	24,79 \pm 4,43472
A 47	19,33 \pm 3,77542
Negativna kontrola	10,55 \pm 1,44143

Tabela 10: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov pri prvi ponovitvi po 24 urah \pm 1 SD

Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost \pm 1 SD)	
1. A 16 1/2	7,79 \pm 0,88094
1. A 16 2/2	7,77 \pm 0,4782
1. A 18 1/2	8,41 \pm 1,24033
1. A 18 2/2	9,48 \pm 1,8091
1. A 47 1/2	7,32 \pm 0,50804
1. A 47 2/2	5,4 \pm 2,77479
2. A 16 1/2	7,31 \pm 1,3115
2. A 16 2/2	6,22 \pm 0,50075
2. A 18 1/2	8,52 \pm 0,5692
2. A 18 2/2	8,52 \pm 0,67074
2. A 47 1/2	8,98 \pm 1,3115
2. A 47 2/2	8,01 \pm 4,08322
Pozitivna kontrola	21,71 \pm 1,29515
Negativna kontrola	21,71 \pm 2,01828

Tabela 11: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov pri prvi ponovitvi po enem tednu \pm 1 SD

Ponovno merjenje druge ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost \pm 1 SD)	
1. A 16	
1/2	7,5 \pm 0,99206
1. A 16	
2/2	8,0 \pm 0,30157
1. A 18	
1/2	9,2 \pm 2,14996
1. A 18	
2/2	4,0 \pm 3,31666
1. A 47	
1/2	7,5 \pm 0,42636
1. A 47	
2/2	5,6 \pm 2,90194
2. A 16	7,0 \pm
1/2	1,2762
2. A 16	4,8 \pm
2/2	3,4574
2. A 18	8,4 \pm
1/2	0,388
2. A 18	
2/2	9,5 \pm 0,54201
2. A 47	8,1 \pm
1/2	8,108
2. A 47	
2/2	0
Negativna kontrola	9,3 \pm 1,33254
Pozitivna kontrola	19,1 \pm 0,63484

Tabela 12: Povprečne vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev) (± 1 SD)

3. ponovitev: premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah ± 1 SD [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	11,974 \pm 0,862244
A 18	9,778 \pm 1,389826
A 47	10,158 \pm 1,593831
KP 129	10,57 \pm 1,442445
KP 150	11,038 \pm 1,282535
P 136.4	11,884 \pm 2,536625
Pozitivna kontrola	15,98 \pm 0,668102
Negativna kontrola	10,846 \pm 0,89004

6.2.2 T-test

Rezultate smo statistično obdelali s t - testom, pri katerem smo primerjali vzorec z najvišjo povprečno vrednostjo premerov inhibicijskih con etanolnega ekstrakta (to je bil vzorec A 47) in povprečno vrednost premerov inhibicijskih con negativne kontrole (kar je predstavljal 99,8% etanol). Vrednosti so bile vzete od prvega merjenja antibiotičnih aktivnosti.

Tabela 13: T-test: primerjava vzorca A 47 in negativne kontrole po 24 urah

t-test - primerjava etanolnega ekstrakta A 47 in Negativne kontrole		
A 47 [mm]	Negativna kontrola [mm]	t vrednost
7,76	8,64	0,42522038
8,65	8,6	
8,86	9,83	
9,65	8,61	
9,73	9,4	

Rezultati prvega t-testa žal niso pokazali signifikantne razlike med vzorcem A 47 in negativno kontrolo, saj vrednost ni pod 0,05, kar nakazuje na to, da je antibiotična aktivnost vzorca A 47 šibka.

T-test smo se odločili opraviti tudi za vrednosti, ki smo jih izmerili po enem tednu.

Tabela 14: T-test : primerjava vzorca A47 in negativne kontrole po enem tednu

t-test etanolni ekstrakt A 47 in negativna kontrola (1 teden)		
A 47 [mm]	Negativna kontrola [mm]	t vrednost
14,29	12,97	0,00123053
22,25	10,25	
23,12	9,24	
21,78	9,05	
15,21	11,24	

Tokratni rezultati pa so pokazali na čvrsto signifikantno razliko med vzorcem A 47 in negativno kontrolo (99,8% etanolom). To pomeni, da smo lahko antibiotično aktivnost vzorca A 47 z gotovostjo potrdili.

T-test smo opravili tudi z vrednostmi vzorcev A 47 1 in A 47 2, pri čemer je oznaka 1 pomenila, da je bil ekstrakt filtriran pred enim tednom, oznaka 2 pa, da je bil ekstrakt filtriran takoj pred izvajanjem testa za antibiotično aktivnost.

Tabela 15: T-test: primerjava etanolnih ekstraktov 1 in 2 vzorca A 47

t-test etanolni ekstrakt A 47 1 in etanolni ekstrakt A 47 2		
1. A 47 [mm]	2. A 47 [mm]	t vrednost
8,15	10,45	0,0533397
6,9	9,05	
6,86	9,54	
7,68	6,54	
7,03	9,39	
6,72	8,61	
7,85	10,48	
6,59	10,96	
5,82	10,02	
0	0	

Rezultati so pokazali, da razlika med obema obravnavanjema A 47 1 in A 47 2 sicer istega vzorca ni signifikantno pomembna, čeprav se kaže trend k večji inhibicijski coni A 47 2, ki je bil filtriran nemudoma pred izvajanjem poskusa antibiotične aktivnosti.

6.2.3 Tukey-jev in Duncanov test

Zraven t – testa smo opravili tudi Tukey-jev in Duncanov test. Oznaka 01 zraven številke vzorca pomeni vodni ekstrakt, oznaka 02 pa etanolni ekstrakt.

Tabela 16: Tukey-ev in Duncan-ov test

		Subset for alpha = 0.05			
		N	c	b	a
Tukey HSD ^{a,b}	1601	4	4,8800		
	4701	4		6,9375	
	4702	9		7,0667	
	1602	10		7,7730	7,7730
	1802	10			8,9469
	Sig.		1,000	0,671	0,349
Duncan ^{a,b}	1601	4	4,8800		
	4701	4		6,9375	
	4702	9		7,0667	
	1602	10		7,7730	7,7730
	1802	10			8,9469
	Sig.		1,000	0,216	0,070

Po Tukey-ju in Duncanu dobimo isto razvrstitev. Imamo 3 homogene skupine, med vzorci znotraj posamezne homogene skupine ni signifikantnih razlik. V homogeni skupini a sta vzorca 1802 in 1602, to sta etanolna ekstrakta vzorcev A 16 in A 18, ki sta dala signifikantno največje premere inhibicijskih con; etanolni ekstrakt vzorca A 16 sicer signifikantno ne odstopa od skupine b. Z oznako c je označen vodni ekstrakt vzorca A 16, ki je dal najslabše rezultate (premer inhibicijske cone je bil signifikantno najmanjši).

7 RAZPRAVA

Namen moje raziskave je bil dokazati, da listi bele murve oz. ekstrakti le-teh posedujejo antibiotične učinke ter tako potrditi ali ovreči svoje predhodne hipoteze.

Dobljeni rezultati pri metodi difuzije trdega gojišča z diski jasno kažejo, da imajo spojine v listih bele murve antibiotične učinke. Inhibicijske cone so nastale le okrog diskov, namočenih v etanolni ekstrakt. Naši rezultati so tako pokazali le uspešnost etanolnih ekstraktov, kar je najverjetneje posledica boljše topnosti terpenoidov v etanolu, kakor v vodi. Ti podatki podpirajo mojo drugo hipotezo, ki je trdila, da bodo etanolni ekstrakti izkazovali večjo antibiotično aktivnost kot vodni ekstrakti, hkrati pa se sklada z najdbami, predstavljenimi v delu Zafarja s sod. leta 2013.

Vodni ekstrakti niso kazali nobenih antibiotičnih učinkov (okrog nobenega izmed diskov, namočenih v vodni ekstrakt ni nastala inhibicijska cona). Tako sem svojo prvo hipotezo, ki trdi, da bodo antibiotične učinke kazali tako vodni, kot etanolni ekstrakti listov bele murve, morala ovreči.

Pri prvem merjenju antibiotične aktivnosti, se je za najbolj uspešnega izkazal etanolni ekstrakt vzorca A 47. Poleg njega je antibiotično aktivnost v skoraj enkrat manjši meri kazal samo še etanolni ekstrakt vzorca A 16. Povprečna vrednost izmerjenih inhibicijskih con najbolj uspešnega etanolnega ekstrakta pa je bila še vedno enkrat manjša od povprečne vrednosti izmerjenih vrednosti inhibicijskih con negativne kontrole (kloramfenikola), kar pa sicer ni presenetljivo.

Po drugem merjenju antibiotične aktivnosti pa smo dobili nekoliko drugačne rezultate. Antibiotično aktivnost so tokrat v nekoliko večji meri izkazovali prav vsi etanolni ekstrakti, za najbolj uspešnega pa se je izkazal vzorec A 18. Merjenje inhibicijskih con smo pri prvi ponovitvi izvajali dvakrat, po 24 urah in enem tednu. V nasprotju z našimi pričakovanji, so se vrednosti inhibicijskih con po enem tednu povečale.¹

¹ Kolonije znotraj inhibicijskih con smo se zaradi prej omenjenih razlogov odločili zanemariti.

Tretje merjenje je potrdilo verodostojnost naših že prej dobljenih rezultatov in sklepa, da vsi etanolni ekstrakti posedujejo antibiotične lastnosti. Pri tokratnem merjenju smo uporabljali ekstrakte (istih vzorcev), filtrirane ob različnih časih (nekateri so bili filtrirani teden predhodno merjenju, drugi pa na dan merjenja antibiotične aktivnosti). S tem smo želeli ugotoviti, ali ima tudi čas filtracije vpliv na antibiotično aktivnost. Rezultati so bili boljši pri ekstraktih, filtriranih nemudoma pred izvajanjem ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti. Največji učinek je imel etanolni ekstrakt vzorca A 18

Meritev smo kasneje opravili še na treh drugih vzorcih in ponovno na istih vzorcih ter dobljene rezultate medsebojno primerjali. Trije »novi« vzorci so prihajali iz drugih regij kot predhodno testirani vzorci (A 16, A 18, A 47). Največjo antibiotično aktivnost sta pokazala etanolna ekstrakta vzorcev A 16 in P 136.4, povprečne vrednosti izmerjenih inhibicijskih con obeh pa presegajo povprečno vrednost izmerjenih inhibicijskih con negativne kontrole (99,8% etanol). Potrebno pa je poudariti, da je iz vidika »čistosti« inhibicijskih con največjo antibiotično aktivnost pokazal vzorec PK 150, saj je edini katerega (poleg pozitivne kontrole – kloramfenikola) inhibicijske cone niso vsebovale popolnoma nobene manjše kolonije. Izjema so tudi posamezne inhibicijske cone etanolnega ekstrakta vzorca A 47 in negativne kontrole.

Inhibicijske cone vzorcev so se zaradi različne kemijske sestave vzorčnih murv razlikovale, zato je lahko v celoti potrdili tudi našo tretjo hipotezo.

Po vseh dobljenih rezultatih lahko z gotovostjo trdimo, da imajo etanolni ekstrakti listov bele murve (*Morus alba* L.) antibiotične učinke.

7.1 Ocena metode difuzije trdega gojišča z diski

Cilj našega eksperimenta je bil dokazati antibiotični učinek spojin murvinih listov. Iz tega vidikov metodo difuzije trdega gojišča z diski ocenjujemo kot primerno. Nazorno smo lahko spremljali širjenje oziroma krčenje inhibicijskih con različnih ekstraktov na antibiogramih.

Ker ne gre za potrjena antibiotična zdravila, temveč za do sedaj še ne raziskane posamezne ekstrakte listov bele murve, nismo morali določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), preko katere bi lahko videli, ali naše vrednosti odstopajo od standardnih.

Za primerjavo in korelacijo bi lahko izvedli tudi metodo tekočega gojišča in s spektrofotometrom merili prosojnost gojišč z dodanimi posameznimi ekstrakti po različnih časovnih intervalih.

Prav tako ne moremo zagovarjati, da se na vseh diskah nahaja enaka koncentracija ekstrakta ali etanola. Diskov namreč nismo posadili na antibiograme in po tem nanj odpipetirali določeno količino ekstrakta ali etanola, temveč smo disk predhodno nasajanju na antibiogram v ekstrakt oziroma etanol pomočili. Tako smo se izognili razlivanju ekstraktov ali etanola po gojišču, kar bi lahko privedlo do nerealnega premera inhibicijske cone, vseeno pa ne moremo trditi, da se na vseh diskah nahaja enaka koncentracija, posledica različnih koncentracij pa so lahko odstopanja v rezultatih.

8 ZAKLJUČEK

Cilj raziskovalne naloge je bil dokazati antibiotični učinek ekstraktov listov bele murve (*Morus alba* L.) na bakterijo *Escherichia coli*.

Z metodo difuzijskega diagrama so antibiotično aktivnost pokazali vsi etanolni ekstrakti in vodni ekstrakt vzorcev A 16 in A 47, največjo antibiotično aktivnost pa sta pokazala etanolna ekstrakta vzorcev A 18 in A 47. Tako sem morala svojo prvo hipotezo ovreči, saj antibiotične aktivnosti niso kazali vsi ekstrakti. Pri metodi tekočega gojišča smo najboljše rezultate dobili pri ekstraktu vzorca KP 150.

Premeri inhibicijskih con so pokazali, da imajo etanolni ekstrakti večjo antibiotično aktivnost kot vodni. Razlog zato je morda v tem, da je etanol bolj primerno topilo za prisotne flavonoide.

Razni viri zraven antibiotičnih in antioksidativnih učinkov mnogokrat omenjajo tudi antikancerogeni učinek, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave s standardiziranimi metodami.

V nadaljevanju bi bilo testirati učinek etanolnih ekstraktov na *E. coli* v tekočem gojišču in preveriti, ali med dobljenimi podatki pride do korelacije. Prav tako bi bile potrebne nadaljnje raziskave s standardiziranimi metodami, da bi se lahko prepričali, da naši rezultati ne odstopajo od normale.

Poskus nam je zagotovo omogočil napredek v raziskovanju naravne medicine in upamo, da smo z raziskovalno nalogo pripomogli k boljšemu razumevanju in delovanju spojin murvinih listov na bakterijske okužbe. S pomočjo že poznanih rezultatov smo dokazali, da imajo spojine v murvinih listih antibiotični učinek.

Raziskovalna naloga je z analizo vpliva ekstraktov različnih genotipov murv na *E. coli* bistveno doprinesla k odbiri in selekciji tistih lokalnih, v večini historičnih murv z večjo vsebnostjo aktivnih snovi za nadaljnjo selekcijo in razmnoževanje. Družbeno-ekonomska korist je ohranjanje in oživetev starih slovenskih genotipov murv in tradicionalnih sadovnjakov na nekdanjih sviligojskih področjih in analiza možnosti uporabe v farmakološke namene.

9 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Osrednji namen takšnih raziskav je delovati v dobrovit človeštvu, njegovemu zdravju in bivanju. Naloge smo se lotili z namenom opozarjanja na potencial bele murve v alternativni medicini oz. na možnost pozitivnega izkoriščanja naravnih danosti, brez invazivnega ali škodljivega poseganja v naravo. Pri izvajanju eksperimenta in pridobljenih rezultatih smo upoštevali osnovna načela družbene odgovornosti. Vsi dobljeni rezultati so pristni.

Eksperimentalnega dela smo se lotili odgovorno, ves kontaminiran material, ki je ostal od eksperimenta (antibiogrami, eze...) smo pravilno zavrgli.

10 VIRI IN LITERATURA

AL-MARIRI, A., SAFI, M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. V: *Iranian journal of medical sciences* [online]. 2014, vol. 39 (1), str. 36-43 [10. 1. 2019]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895893/>

BREMNESS, L.. Herbs. New York: DK Publishing, 1994.

Britannica. Chloramphenicol. [online]. Dostopno na: <https://www.britannica.com/science/chloramphenicol> [19. 1. 2019]

COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. V: *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, vol. 12 (4), str. 564-582 [14. 1. 2019]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/>

GRAJEK, K., WAWRO, A. in PIPERZYK-KOKOCHA, D. Bioactivity of *Morus alba* l. extracts – an overview. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 2017, 1-8-
Murve, 2019. Hranilna vrednost listov. [online]. Dostopno na: <http://murve.um.si/sl/hranilna-vrednost-listov/> [19. 1. 2019]

Oxford, 2008, Oxford Dictionary for Biology- 6 th Edition, London: Oxford university press

PETAUER, T. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije, 1993

WISTREICH, G. A. Microbiology laboratory: fundamentals and applications. Los Angeles: Prentice Hall, 1997.

11 PRILOGE

Priloga 1: Tabela z rezultati 1. meritve inhibicijskih con vseh treh ekstraktov

Rezultati 1. meritve inhibicijskih con vseh treh ekstraktov [mm]						
	PREMER		INHIBICIJSKE			POVPREČNA VREDNOST
	CONE (mm)					
A 16	5,21	5,52	5,14	4,65	4,21	4,97
A 18	0	0	0	0	0	0
A 47	7,69	7,16	8,58	7,24	0	7,8
E1 A 16	0	0	0	0	0	0
E1 A 18	0	0	0	0	0	0
E1 A 47	0	0	0	0	0	0
E2 A 16	0	0	0	0	0	0
E2 A 18	0	0	0	0	0	0
E2 A 47	0	0	0	0	0	0
Pozitivna kontrola		0	0	0	0	0
Negativna kontrola	19,19	17,5	18,07	19,07	17,59	14,77

Priloga 2: Tabela z rezultati 1. meritve inhibicijskih con na vseh treh ekstraktih (mrzla voda, vroča voda, etanol) (± 1 SD)

Rezultati 1. meritve inhibicijskih con na vseh treh ekstraktih (mrzla voda, vroča voda, etanol) (± 1 SD) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	4,97 \pm 0,46176
A 18	0
A 47	7,8 \pm 0,56424
E1 A 16	0
E1 A 18	0
E1 A 47	0
E2 A 16	0
E2 A 18	0
E2 A 47	0
Negativna kontrola	0
Pozitivna kontrola	14,77 \pm 0,71843

Priloga 3: Tabela z rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h)

Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h)						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
	A 16	7,9	11,24	8,45	8,24	7,65
A 18	8,14	10,37	9,26	9,61	7,09	8,89
A 47	7,67	8,65	8,86	9,65	9,73	8,91
Negativna kontrola	8,64	8,6	9,83	8,61	9,4	9,01

Priloga 4: Tabela z rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h) (± 1 SD)

Rezultati 1. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (24h) (± 1 SD)	
[mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	8,71 \pm 1,30139
A 18	8,89 \pm 1,15309
A 47	8,91 \pm 0,75202
Negativna kontrola	9,01 \pm 0,5078

Priloga 5: Tabela z rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (1 teden)

Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (1 teden) [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
A 16	16,22	20,82	16,07	19,21	28,28	20,12
A 18	22,02	29,9	19,22	22,65	30,17	24,79
A 47	14,29	22,25	23,12	21,78	15,21	19,33
Negativna kontrola	12,97	10,25	9,24	9,05	11,24	10,55

Priloga 6: Tabela z rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (1 teden) (± 1 SD)

Rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenega in prefiltriranega etanolnega ekstrakta (1 teden) (± 1 SD) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
A 16	20,12 \pm 4,4613
A 18	24,79 \pm 4,43472
A 47	19,33 \pm 3,77542
Negativna kontrola	10,55 \pm 1,44143

Priloga 7: Tabela z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta

Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
1. A 16 1/2	7,68	7,71	7,12	9,46	7	7,79
1. A 16 2/2	7,85	7,42	8,21	8,32	7,05	7,77
1. A 18 1/2	7,77	10,78	7,77	8,45	7,29	8,41
1. A 18 2/2	10,18	8,11	12,23	9,91	6,98	9,48
1. A 47 1/2	8,15	6,9	6,86	7,68	7,03	7,32
1. A 47 2/2	6,72	7,85	6,59	5,82	0	5,40
2. A 16 1/2	8,5	6,39	6,45	5,97	9,26	7,31
2. A 16 2/2	6,79	5,59	6,08	6,41	/	6,22
2. A 18 1/2	8,57	9,3	8,11	8,91	7,69	8,52
2. A 18 2/2	9,36	8,72	7,37	8,98	8,63	8,52
2. A 47 1/2	10,45	9,05	9,54	6,54	9,39	8,98
2. A 47 2/2	8,61	10,48	10,96	10,02	0	8,01
Pozitivna						
kontrola	22,09	22,44	20,92	19,67	23,42	21,71
Negativna						
kontrola	23,04	23,29	22,8	21,59	17,85	21,71

Priloga 8: Tabela z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (24 ur)

Ponovitev merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost \pm 1 SD)	
1. A 16 1/2	7,79 \pm 0,88094
1. A 16 2/2	7,77 \pm 0,4782
1. A 18 1/2	8,41 \pm 1,24033
1. A 18 2/2	9,48 \pm 1,8091
1. A 47 1/2	7,32 \pm 0,50804
1. A 47 2/2	5,4 \pm 2,77479
2. A 16 1/2	7,31 \pm 1,3115
2. A 16 2/2	6,22 \pm 0,50075
2. A 18 1/2	8,52 \pm 0,5692
2. A 18 2/2	8,52 \pm 0,67074
2. A 47 1/2	8,98 \pm 1,3115
2. A 47 2/2	8,01 \pm 4,08322
Pozitivna kontrola	21,71 \pm 1,29515
Negativna kontrola	21,71 \pm 2,01828

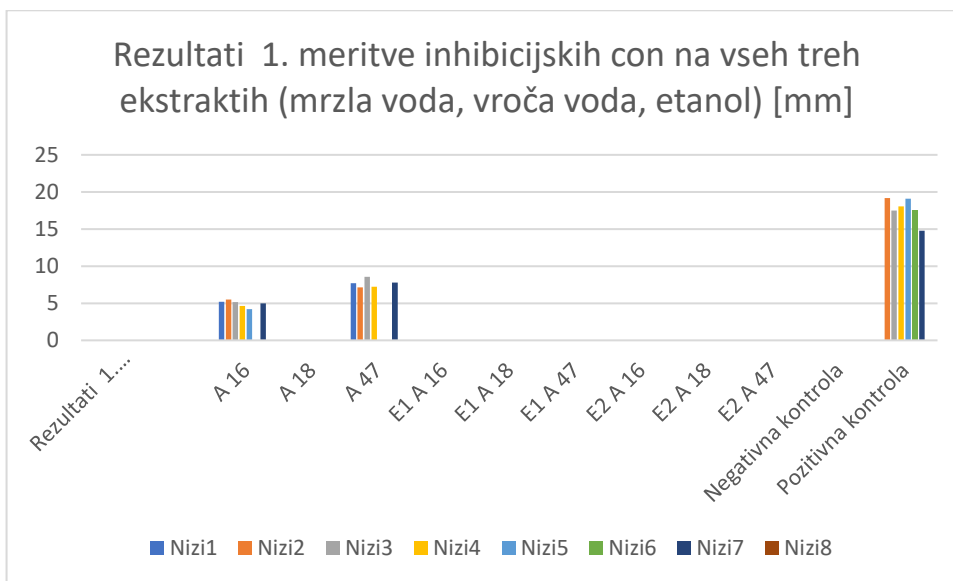
Priloga 9: Tabela z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (1 teden)

Ponovno merjenje druge ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta [mm]						
	PREMER INHIBICIJSKE CONE					POVPREČNA VREDNOST
1. A 16 1/2	8,51	7,71	6,32	8,6	6,38	7,50
1. A 16 2/2	7,94	8,24	8,38	8,01	7,5	8,01
1. A 18 1/2	7,57	13,35	9,32	8,17	7,73	9,23
1. A 18 2/2	0	7,66	6,63	5,64	0	3,99
1. A 47 1/2	7,8	7,37	6,72	7,6	7,93	7,48
1. A 47 2/2	6,8	5,82	0	7,32	8,11	5,61
2. A 16 1/2	8,87	5,95	6,06	5	8,24	6,82
2. A 16 2/2	7,89	0	7,37	6,61	/	4,83
2. A 18 1/2	7,79	8,74	8,56	8,88	8,26	8,45
2. A 18 2/2	9,68	10	9,98	8,93	8,7	9,46
2. A 47 1/2	8,49	7,4	8,45	6,72	9,48	8,12
2. A 47 2/2	0	0	0	0	0	0
Negativna						
kontrola	9,87	10,33	10,24	9,22	6,73	9,23
Pozitivna						
kontrola	18,87	18,12	19,11	19,77	19,85	19,14

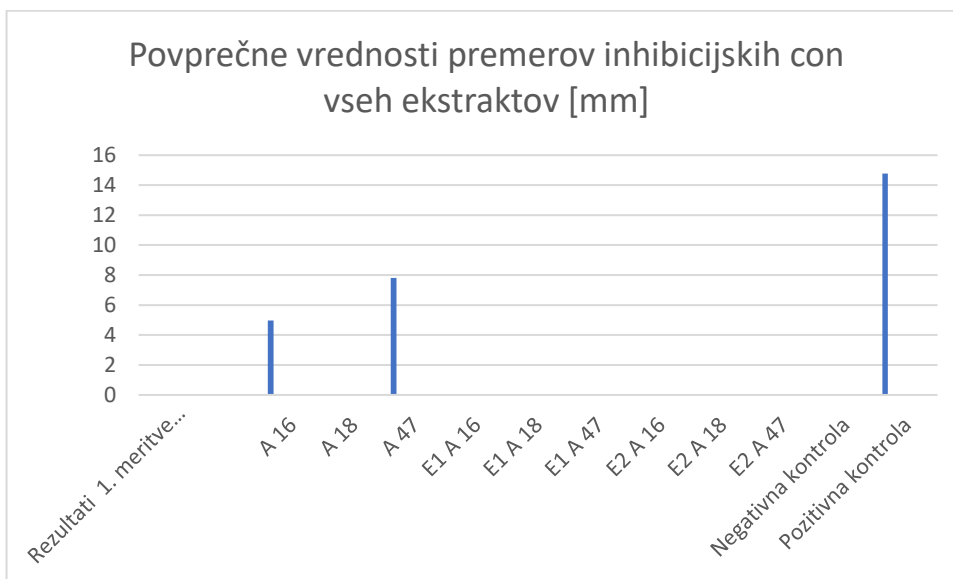
Priloga 10: Tabela z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (1 teden) (± 1 SD)

Ponovno merjenje druge ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (± 1 SD) [mm]	
PREMER INHIBICIJSKE CONE (povprečna vrednost ± 1 SD)	
1. A 16 1/2	7,5 \pm 1,99206
1. A 16 2/2	8,0 \pm 0,30157
1. A 18 1/2	9,2 \pm 2,14996
1. A 18 2/2	4,0 \pm 3,31666
1. A 47 1/2	7,5 \pm 0,42636
1. A 47 2/2	5,6 \pm 2,90194
	7,0 \pm
2. A 16 1/2	1,2762
	4,8 \pm
2. A 16 2/2	3,4574
2. A 18 1/2	8,4 \pm 0,388
2. A 18 2/2	9,5 \pm 0,54201
2. A 47 1/2	8,1 \pm 8,108
2. A 47 2/2	0
Negativna kontrola	9,3 \pm 1,33254
Pozitivna kontrola	19,1 \pm 0,63484

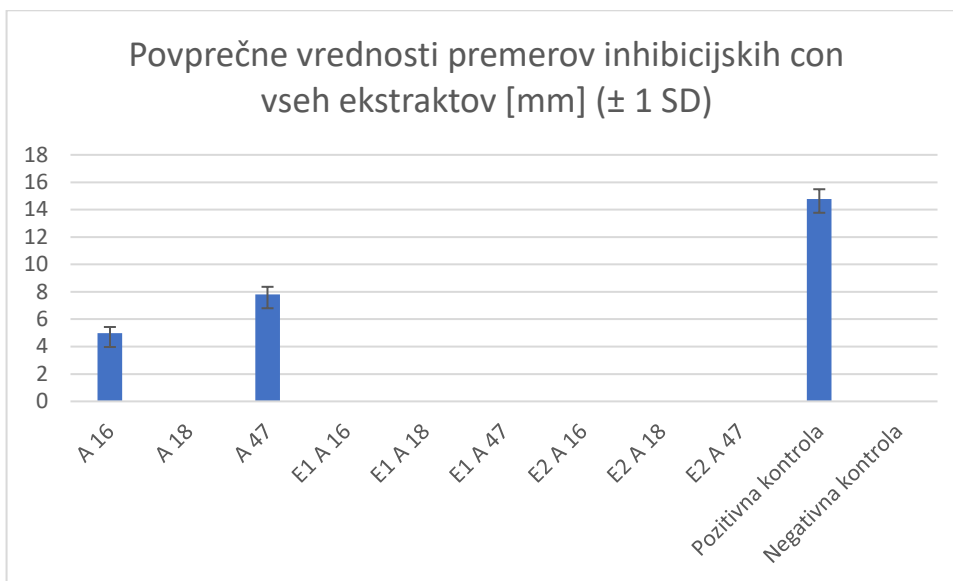
Priloga 11: Graf z rezultati 1. meritve inhibicijskih con na vseh treh ekstraktih



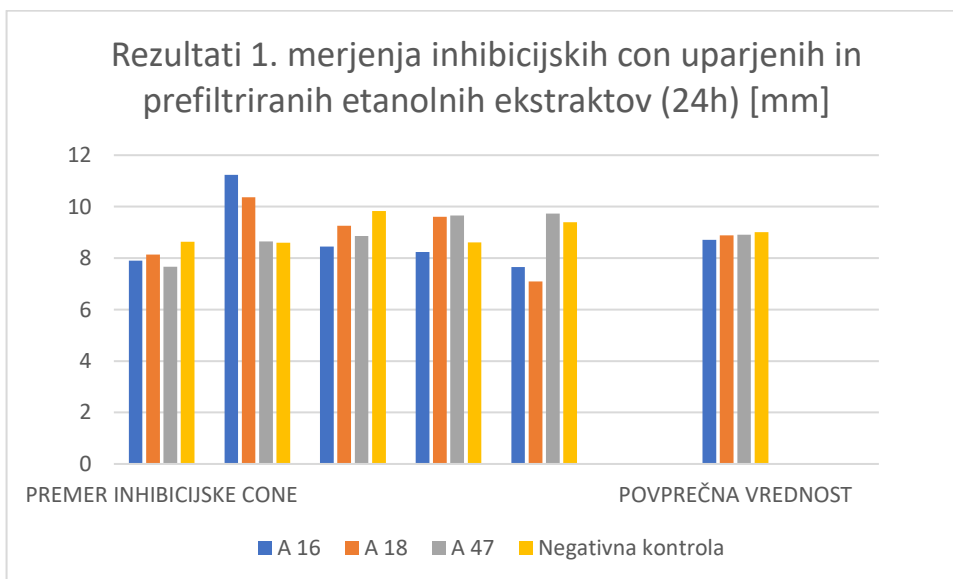
Priloga 12: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con vseh ekstraktov (mm)



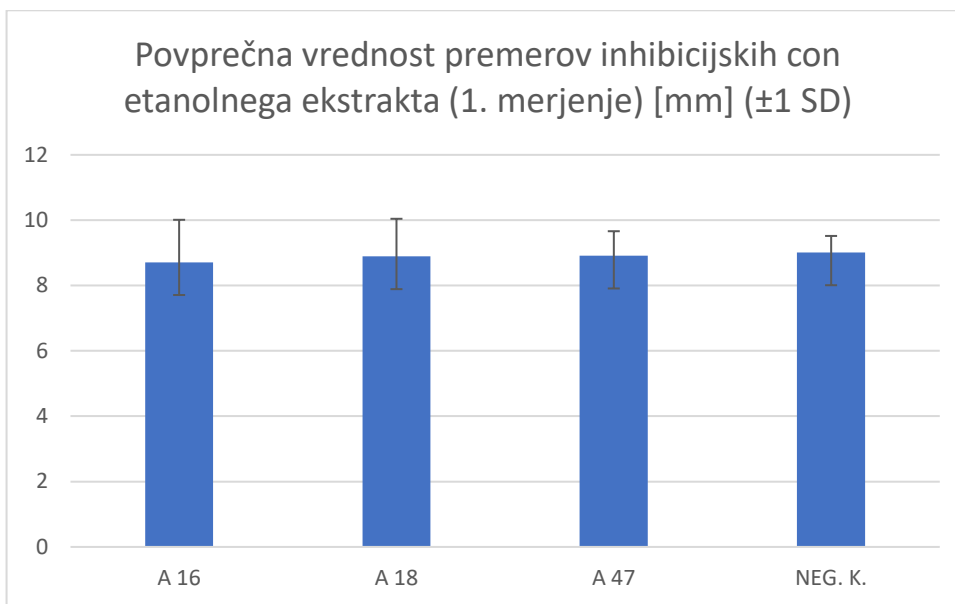
Priloga 13: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con vseh ekstraktov (mm) (± 1 SD)



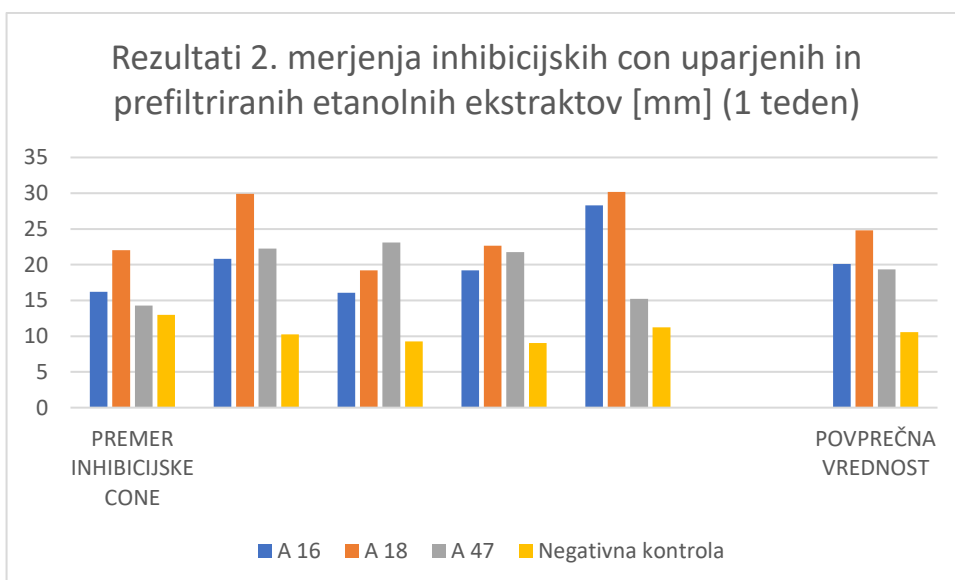
Priloga 14: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnega ekstrakta (24 ur)



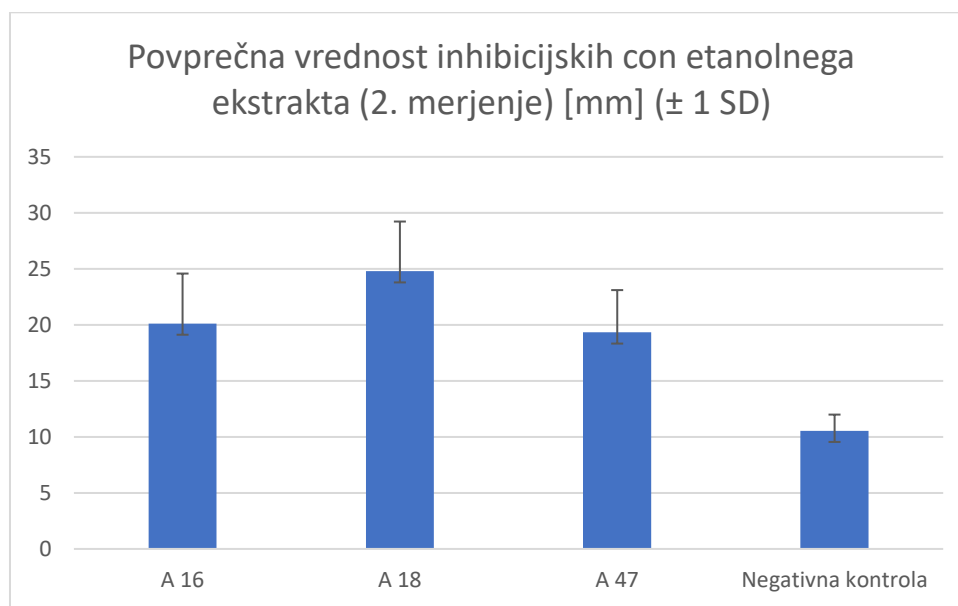
Priloga 15: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnega ekstrakta (24 ur) (± 1 SD)



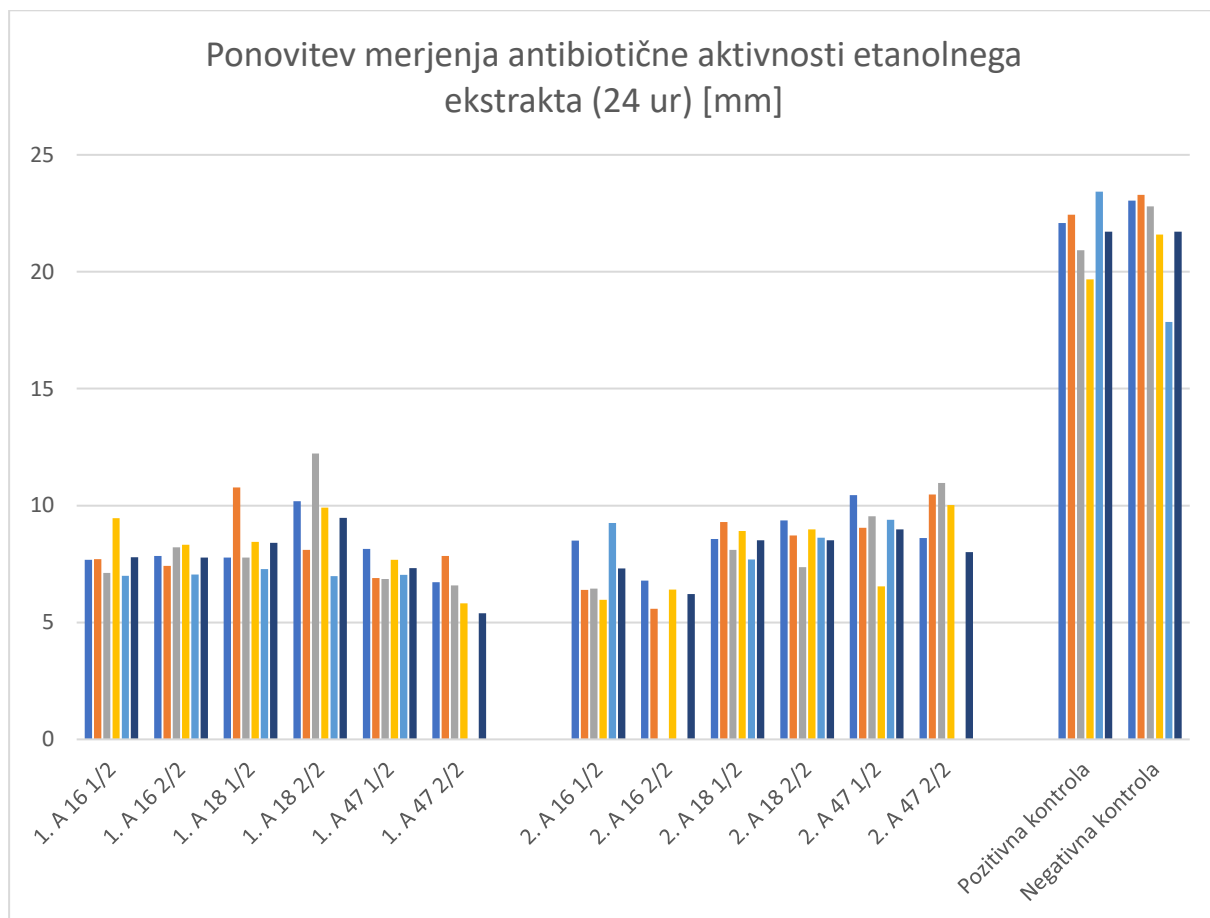
Priloga 16: Graf z rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenih in prefiltriranih etanolnih ekstraktov (mm) (1 teden)



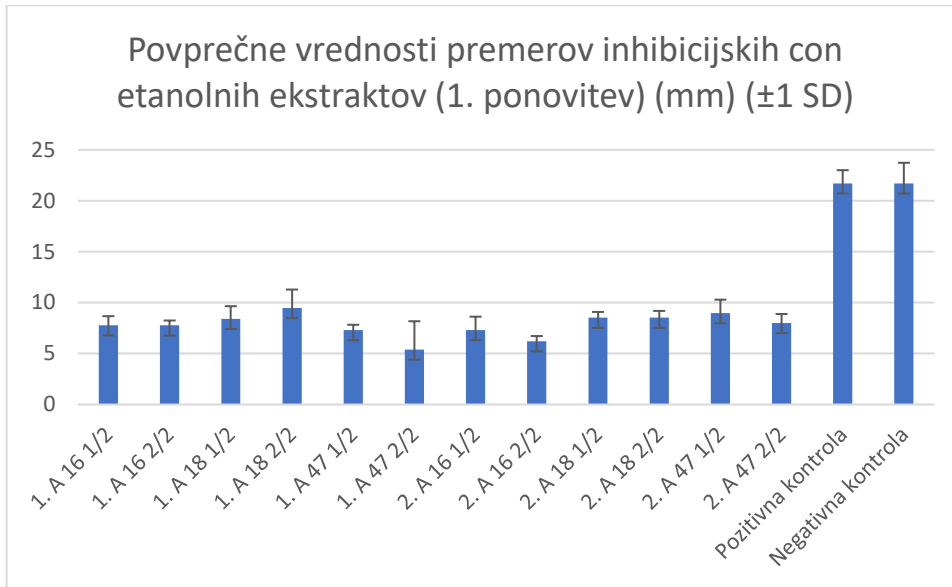
Priloga 17: Graf z rezultati 2. merjenja inhibicijskih con uparjenih in prefiltriranih etanolnih ekstraktov (mm) (1 teden) (± 1 SD)



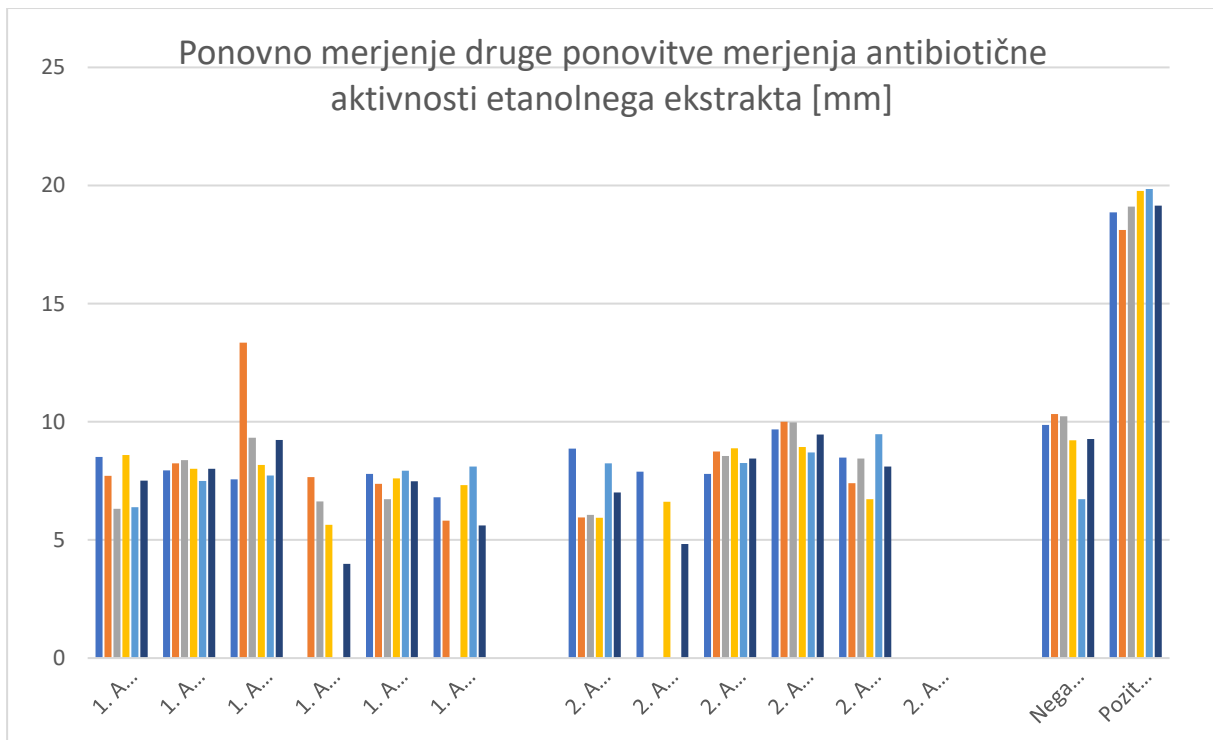
Priloga 18: Graf z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (24 ur)



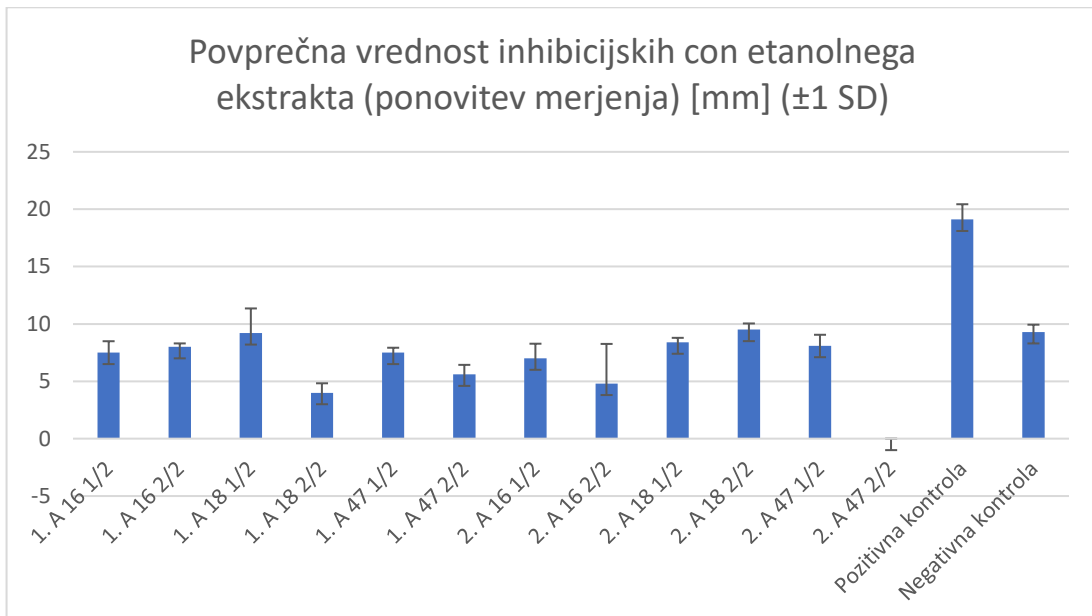
Priloga 19: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov (1. ponovitev) [mm] (± 1 SD)



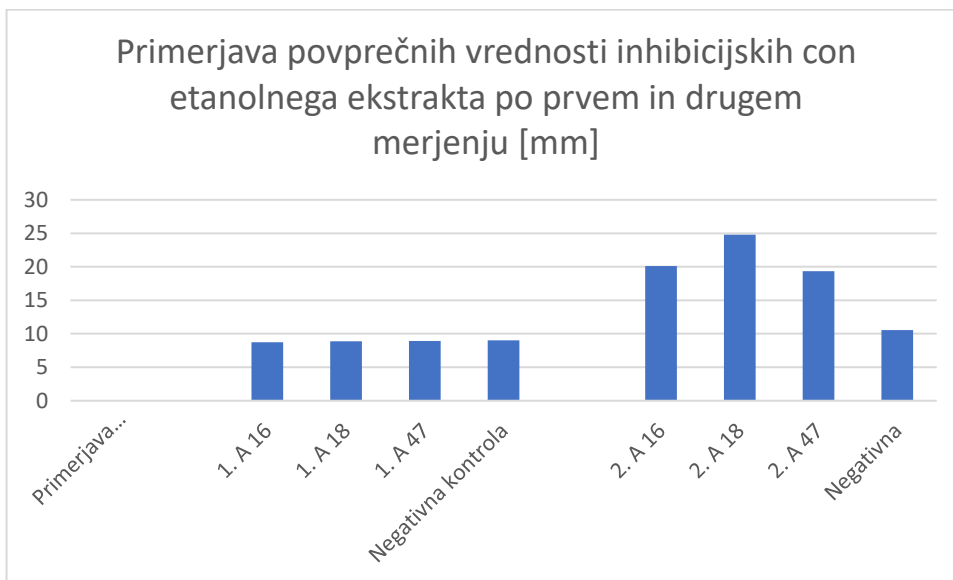
Priloga 20: Graf z rezultati ponovitve merjenja antibiotične aktivnosti etanolnega ekstrakta (1 teden)



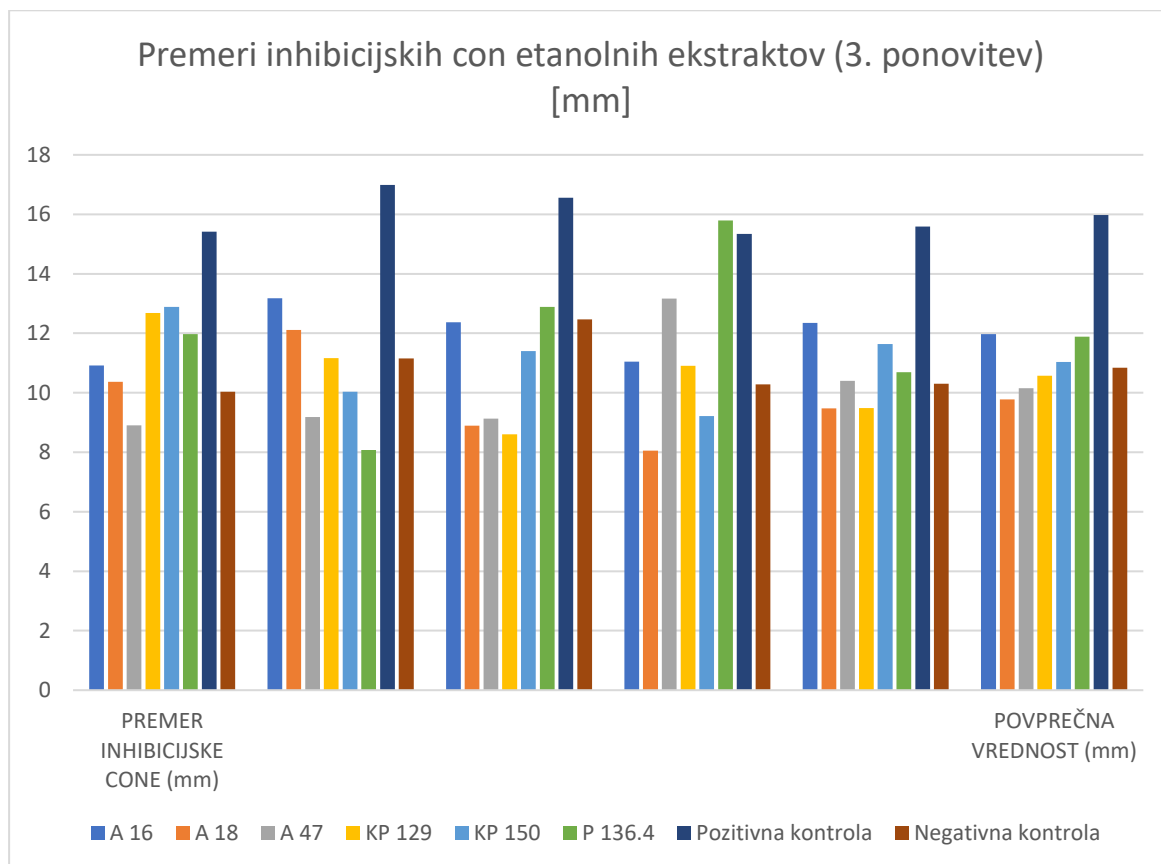
Priloga 21: Graf povprečnih vrednosti premerov inhibicijskih con etanolnih ekstraktov (1 teden) (mm) (± 1 SD)



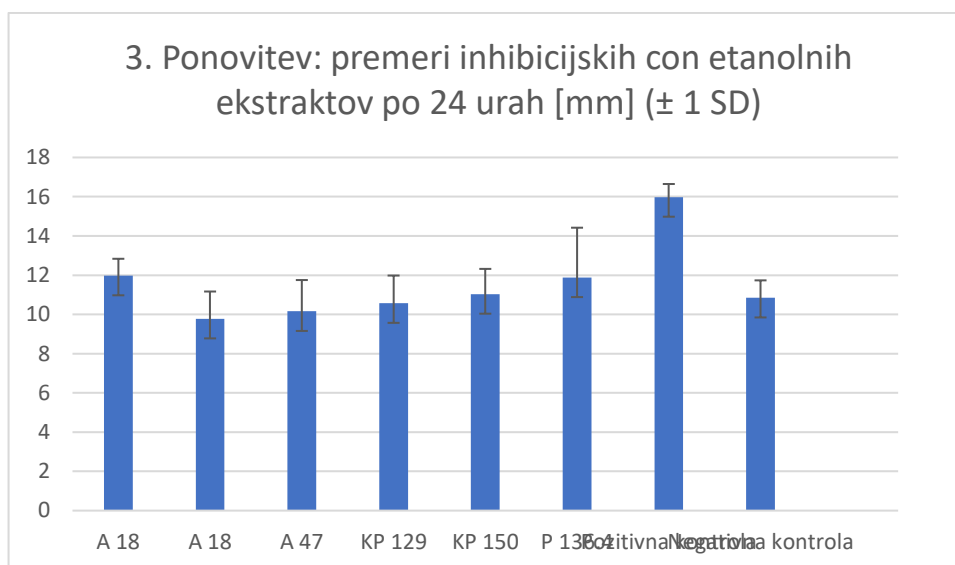
Priloga 22: Graf primerjave povprečnih vrednosti inhibicijskih con etanolnega ekstrakta po prvem in drugem merjenju



Priloga 23: Graf s premeri inhibicijskih con etanolnih ekstraktov po 24 urah (3. ponovitev) (mm)



Priloga 24: Graf s povprečnimi vrednostmi inhibicijskih con etanolnih ekstraktov (3. ponovitev) (24 ur) (± 1 SD)



Priloga 25: Tabela z rezultati Tukey-jevega in Duncanovega testa

			Subset for alpha = 0.05		
		N	c	b	a
Tukey HSD ^{a,b}	1601	4	4,8800		
	4701	4		6,9375	
	4702	9		7,0667	
	1602	10		7,7730	7,7730
	1802	10			8,9469
	Sig.		1,000	0,671	0,349
	Duncan ^{a,b}	1601	4	4,8800	
4701		4		6,9375	
4702		9		7,0667	
1602		10		7,7730	7,7730
1802		10			8,9469
Sig.			1,000	0,216	0,070