



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Brigita VALENTINČIČ

**PROTIGLIVNA AKTIVNOST IZBRANIH
ETERIČNIH OLJ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Brigita VALENTINČIČ

PROTIGLIVNA AKTIVNOST IZBRANIH ETERIČNIH OLJ

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Živilstvo in prehrana. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara JERŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Brigita Valentinčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 579.24:582.28:615.282:547.913(043)=163.6
- KG eterična olja, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Artemisia annua*, *Lavandula hybrida*, *Helichrysum italicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria recutita*, *Salvia officinalis*, vodikov peroksid, protiglavno delovanje, minimalna inhibitorna koncentracija, kvasovke, *Candida albicans*, plesni, *Penicillium griseofulvum*
- AV VALENTINČIČ, Brigita
- SA JERŠEK, Barbara (mentorica), JAMNIK, Polona (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2019
- IN PROTIGLIVNA AKTIVNOST IZBRANIH ETERIČNIH OLJ
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP X, 22 str., 5 pregl., 1 sl., 4 pril., 30 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali izbrana eterična olja (EO) delujejo protiglavno. Zato smo jim določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) ter minimalno mikrobicidno koncentracijo (MBC) ter njihovo delovanje primerjali z že uveljavljenim razkužilom – vodikovim peroksidom. Testirali smo EO origana (*Origanum vulgare*), grške bazilike (*Ocimum basilicum*), sladkega pelina (*Artemisia annua*), sivke (*Lavandula hybrida*), laškega smilja (*Helichrysum italicum*), rožmarina (*Rosmarinus officinalis*), nemške kamilice (*Matricaria recutita*) in žajblja (*Salvia officinalis*) ter vodikov peroksid s kvasovkami vrste *Candida albicans* in plesnimi vrste *Penicillium griseofulvum*. Za testiranje protiglivne aktivnosti smo uporabili metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici. Natančne vrednosti MIC in MBC smo za kvasovke določili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču, za plesni pa s pregledovanjem gojišča s plesnimi v mikrotitrskih ploščicah pod lupo. Kvasovke vrste *C. albicans* so bile bolj dovzetne za EO kot plesni vrste *P. griseofulvum*. Kvasovkam smo vrednosti MIC določili v območju <0,78–6,25 mg/ml, plesnim pa v območju 3,13–12,5 mg/ml. EO origana je rast obeh gliv inhibiralo pri najnižji koncentraciji med testiranimi EO. Vodikov peroksid je rast kvasovk vrste *C. albicans* inhibiral pri nižji koncentraciji kot eterična olja, medtem ko je bila vrednost MIC za plesni vrste *P. griseofulvum* primerljiva z vrednostjo MIC EO origana. Z eksperimentalnim delom smo prišli do zaključka, da imajo eterična olja protiglavno delovanje, in sicer fungicidno aktivnost. Pri tem moramo upoštevati, da so posamezne vrste eteričnih olj različno učinkovite in da so posamezne vrste gliv zanje različno dovzetne. Rezultati kažejo, da bi nadaljnje podrobnejše preiskave eteričnih olj in različnih vrst gliv lahko vodile do uporabe eteričnih olj kot naravnih protimikrobnih snovi v živilstvu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 579.24:582.28:615.282:547.913(043)=163.6
CX essential oils, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Artemisia annua*, *Lavandula hybrida*, *Helichrysum italicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria recutita*, *Salvia officinalis*, hydrogen peroxide, antifungal activity, minimum inhibitory concentration, yeast, *Candida albicans*, mould, *Penicillium griseofulvum*
AU VALENTINČIČ, Brigita
AA JERŠEK, Barbara (supervisor), JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2019
TI ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)
NO X, 22 p., 5 tab., 1 fig., 4 ann., 30 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our research was to determine whether selected essential oils (EO) exhibit antifungal activity and to determine their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MBC). We also wanted to compare the antifungal activity of EO with that of an already established disinfectant – hydrogen peroxide. In the study we tested EO of oregano (*Origanum vulgare*), basil (*Ocimum basilicum*), sweet wormwood (*Artemisia annua*), lavender (*Lavandula hybrida*), Italian strawflower (*Helichrysum italicum*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), camomile (*Matricaria recutita*) and sage (*Salvia officinalis*) along with hydrogen peroxide against *Candida albicans* and *Penicillium griseofulvum*. Broth microdilution method was used to determine the antifungal activity of selected substances. To obtain the exact MIC and MBC for *C. albicans* we carried out the standard plate count method. To obtain the exact MIC and MBC for *P. griseofulvum* we inspected media with mould in microtiter plates under a magnifying lens. *C. albicans* was more susceptible to EO, with MIC values ranging from <0.78 to 6.25 mg/ml, in comparison with *P. griseofulvum*, with MIC values ranging from 3.13 to 12.5 mg/ml. The EO of oregano inhibited the growth of both fungi at the lowest concentration. Hydrogen peroxide inhibited the growth of *C. albicans* at a lower concentration than essential oils, while the MIC of hydrogen peroxide for *P. griseofulvum* was comparable to the MIC of EO of oregano. We can conclude that essential oils do exhibit antifungal activity; however, we have to consider the differences in activity of various types of essential oils and the fact that different species of fungi show different degrees of susceptibility to them. The results show that further studies of essential oils and different species of fungi could lead to the use of essential oils as a natural antimicrobial agent in food industry.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1. CILJI NALOGE.....	1
1.2. DELOVNI HIPOTEZI.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ETERIČNA OLJA.....	2
2.1.1 <i>Origanum vulgare</i>	2
2.1.2 <i>Grška bazilika (Ocimum basilicum)</i>	3
2.1.3 <i>Sladki pelin (Artemisia annua)</i>	3
2.1.4 <i>Sivka (Lavandula hybrida)</i>	3
2.1.5 <i>Laški smilj (Helichrysum italicum)</i>	4
2.1.6 <i>Rožmarin (Rosmarinus officinalis)</i>	4
2.1.7 <i>Nemška kamilica (Matricaria recutita)</i>	4
2.1.8 <i>Žajbelj (Salvia officinalis)</i>	4
2.2 VODIKOV PEROKSID	5
2.3 PIRA (<i>Triticum aestivum ssp. spelta</i>).....	5
2.4 <i>Candida albicans</i>	5
2.5 <i>Penicillium griseofulvum</i>	6
3 MATERIAL IN METODE	7
3.1 MATERIAL.....	7
3.1.1 Glive	7
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	7
3.1.3 Uporabljene učinkovine	7
3.1.4 Uporabljeni reagenti	7
3.1.5 Laboratorijska oprema in pribor.....	8
3.2 METODE.....	9
3.2.1 Shema eksperimentalnega dela	9
3.2.2 Revitalizacija gliv in priprava delovnih kultur.....	9

3.2.3	Priprava delovnih raztopin.....	10
3.2.4	Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici	11
3.2.5	Metoda štetja kolonij na trdnem gojišču.....	11
3.2.6	Analiza variance (ANOVA)	11
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	12
4.1	PROTIGLIVNO DELOVANJE IZBRANIH ETERIČNIH OLJ	12
4.2	PROTIGLIVNO DELOVANJE VODIKOVEGA PEROKSIDA	15
4.3	PROTIGLIVNO DELOVANJE EKSTRAKTA PIRE	16
5	SKLEPI	18
6	POVZETEK.....	19
7	VIRI	20

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Laboratorijska oprema	8
Preglednica 2: Laboratorijski pribor	8
Preglednica 3: Protiglivna aktivnost eteričnih olj določena za kvasovke vrste <i>C. albicans</i> in plesni vrste <i>P. griseofulvum</i>	12
Preglednica 4: Protiglivna aktivnost vodikovega peroksida za kvasovke vrste <i>C. albicans</i> in plesni vrste <i>P. griseofulvum</i>	15
Preglednica 5: Protiglivna aktivnost ekstrakta pire za kvasovke vrste <i>C. albicans</i> in plesni vrste <i>P. griseofulvum</i>	16

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela.....	9
--	---

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Parna destilacija

PRILOGA B: Primer načrta mikrotitrskih ploščic za določitev MIC z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici

PRILOGA C: Koncentracije delovnih raztopin po razredčevanju v mikrotitrski ploščici

PRILOGA D: Protiglivno delovanje izbranih eteričnih olj in vodikovega peroksida proti kvasovkam vrste *C. albicans* in plesnim vrste *P. griseofulvum*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

B	kontrola sterilnosti gojišča (ang. Blank)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	kolonijska enota (ang. Colony Forming Unit)
D (EO)	delovna raztopina eteričnega olja
D (EtOH)	delovna raztopina absolutnega etanola
D (H ₂ O ₂)	delovna raztopina vodikovega peroksida
DK	delovna kultura
EO	eterično olje
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2 <i>H</i> -tetrazolijev klorid
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International Organization for Standardization)
MBC	minimalna mikrobicidna koncentracija
MEA	trdno gojišče s sladnim ekstraktom (ang. Malt Extract Agar)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
NK	negativna kontrola
OGY	trdno gojišče z glukozo, kvasnim ekstraktom in oksitetraciklinom (ang. Oxytetracycline Glucose Yeast)
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>P. griseofulvum</i>	<i>Penicillium griseofulvum</i>
PK	pozitivna kontrola
SSS	raztopina za pripravo suspenzije spor (ang. Spore Suspension Solution)
YPD	tekoče gojišče s kvasnim ekstraktom, peptonom in desktrozo (ang. Yeast Extract Peptone Dextrose)
ŽM	Mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Glive predstavljajo eno od kraljestev organizmov, ki med drugim obsega glive, ki so nam v korist in jih izkoriščamo v živilski in farmacevtski industriji, ter tudi glive, ki so odgovorne za kvar živil, in patogene glive. Kvasovke vrste *Candida albicans* so naravno prisotne v mikrobioti približno polovice odrasle populacije ljudi in pri zdravih osebah ne predstavljajo nevarnosti za zdravje. Resen problem pa predstavlja prekomeren razrast kvasovk pri ljudeh z zmanjšanim delovanjem imunskega sistema, saj so kvasovke vrste *C. albicans* oportunistični patogen. Prisotnost plesni rodu *Penicillium* v živilih je po navadi nezaželena. Kljub temu, da so nekatere vrste ključnega pomena v proizvodnji določenih živil ter da se nekatere vrste uporabljajo za proizvodnjo zdravil, je veliko vrst odgovornih za kvar živil, nekatere celo tvorijo mikotoksine. Plesni vrste *P. griseofulvum* so primer plesni, ki so odgovorne za kvar živil. Med sekundarnimi metaboliti, ki jih sintetizirajo, so nekateri zdravju nevarni, nekateri pa se uporabljajo v medicini. Uveljavljen način inhibicije rasti obeh omenjenih vrst gliv je uporaba različnih kemijskih spojin – na primer vodikovega peroksida. Glivne infekcije so resen problem v medicini, dodatne izzive predstavljajo številni sevi mikroorganizmov, ki so odporni proti zdravilom, v živilski industriji pa kontaminacija živil z različnimi vrstami plesni, ki so razvila odpornost proti razkužilom, predstavlja velike ekonomske izgube in lahko tudi nevarnost za zdravje potrošnikov. V tradicionalni medicini se naravni pripravki iz zelišč uporabljajo že stoletja. Danes eno od možnih alternativ uveljavljenim protiglivnim sredstvom predstavljajo eterična olja zaradi svoje široke protimikrobne aktivnosti.

1.1. CILJI NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, ali eterična olja origana (*Origanum vulgare*), grške bazilike (*Ocimum basilicum*), sladkega pelina (*Artemisia annua*), sivke (*Lavandula hybrida*), laškega smilja (*Helichrysum italicum*), rožmarina (*Rosmarinus officinalis*), nemške kamilice (*Matricaria recutita*) in žajblja (*Salvia officinalis*) delujejo protiglivno. Določili smo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) ter mikrobicidno koncentracijo (MBC) za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*. Protiglivno aktivnost eteričnih olj smo primerjali s klasičnim razkužilom – z vodikovim peroksidom. Dodatno smo testirali še protiglivno delovanje ekstrakta pire.

1.2. DELOVNI HIPOTEZI

- Protiglivna učinkovitost eteričnih olj bo različna, saj so vrste in koncentracije protimikrobnih snovi v njih različne.
- Protiglivna učinkovitost izbranih eteričnih olj bo manjša od učinkovitosti vodikovega peroksida.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ETERIČNA OLJA

Eterična olja so kompleksne spojine z značilnimi močnimi vonjavami, ki jih proizvajajo rastline kot sekundarne metabolite (Kalemba in Kunicka, 2003). Igrajo namreč pomembno vlogo pri zaščiti rastlin, saj delujejo protibakterijsko, protiglivno in protiparazitno. Eterična olja so v tekoči obliki, so hlapna in lipofilna. V rastlini se sintetizirajo v različnih organih, na primer v listih, cvetovih, semenih, koreninah in lubju (Sharifzadeh in Shokri, 2016). Eterična olja lahko iz rastlin ekstrahiramo na različne načine, najpogosteje z destilacijo (Kalemba in Kunicka, 2003).

Parna destilacija je eden od načinov pridobivanja eteričnega olja iz rastline. Dele rastline, iz katerih želimo eterično olje izločiti, položimo v bučko, na primer stekleno, katere spodnji del je povezan z drugo bučko, v kateri je voda, zgornji del pa s kondenzatorjem. Pod drugo bučko je toplotni izvor, s katerim reguliramo temperaturo vode, vodna para pa prehaja skozi rastline. Para ekstrahira eterično olje iz rastlin v kondenzator, kjer se zaradi nižje temperature utekočini. Olje se nato od vodne faze loči z dekantacijo (Boutekedjiret in sod., 2003).

Uporaba eteričnih olj je zelo razširjena, s tem da se jih največ uporablja v kozmetični industriji kot dišavo in v živilski industriji. V zadnjem času je prišlo do obuditve uporabe naravnih produktov tudi v medicini in uporabe naravnih konzervansov v živilstvu in kozmetiki (Kalemba in Kunicka, 2003).

Protimikrobna aktivnost eteričnih olj je tesno povezana z njihovo kemijsko sestavo. Komponente eteričnih olj in njihove koncentracije niso odvisne samo od rastlinske vrste, temveč tudi od geografskega izvora rastline, dela rastline, ki je bil uporabljen za pridobitev olja, stopnje razvoja rastline, klimatskih in rastnih razmer, destilacije ter razmer shranjevanja eteričnega olja (Kalemba in Kunicka, 2003).

2.1.1 Origano (*Origanum vulgare*)

Origano je aromatična trajnica, ki spada v družino ustnatic (Lamiaceae). Ima do 50 centimetrov visoko steblo, ki je pokrito z dlačicami, ovalne liste in cvetove vijolične barve. V kulinariki je uporaba origana kot začimbe razširjena po celem svetu. V tradicionalni medicini se uporablja v obliki čajev ali tinktur pri prehladih, prebavnih težavah in težavah, povezanih z dihalo, pri okužbah in celjenju ran pa se uporabljajo mazila, pripravljena iz origana. Biološka aktivnost eteričnega olja origana je bila raziskana v številnih študijah, ki so origanu pripisale protimikrobne in antioksidativne lastnosti (Ličina in sod., 2013). Glede na raziskave Ebani in sod. (2017) so glavne komponente eteričnega olja origana karvakrol

(65,9 %), p-cimen (9,3 %) in γ -terpinen (5,3 %). Manohar in sod. (2001) so v svoji študiji testirali učinke eteričnega olja na kvasovkah vrste *C. albicans*, poleg tega so primerjali še učinke eteričnega olja z učinki karvakrola. Prišli so do ugotovitve, da eterično olje in karvakrol delujeta inhibitorno. Razlike so se pokazale v koncentracijah, potrebnih za delovanje – eterično olje je bilo namreč učinkovito pri nižjih koncentracijah kot karvakrol.

2.1.2 Grška bazilika (*Ocimum basilicum*)

Grška bazilika je pripadnica družine ustnatic (Lamiaceae). Rastlina zraste od 0,3 do 1,3 metra visoko, ima bele do vijolične cvetove in svetlo zelene liste, ki so svilnati na otip in na katerih so žleze, ki izločajo eterično olje. Bazilika, še posebej njeni aromatični listi, se zaradi izvrstnih zdravilnih lastnosti uporablja v tradicionalni medicini kot diuretik in antispazmodik ter pri okužbah zgornjih dihalnih poti. Zaradi močne arome se liste uporablja pri pripravi hrane in pijač, kot začimbo in v izdelkih za ustno higieno. Potencialni protimikrobni učinek eteričnega olja bazilike je bil raziskan v mnogih študijah (Waleed Al Abbasy in sod., 2015). Glede na študijo Ebani in sod. (2018) so glavne komponente eteričnega olja linalol (46 %), evkaliptol (5,9 %) in evgenol (11,5 %), ki mu je možno pripisati protimikrobno aktivnost.

2.1.3 Sladki pelin (*Artemisia annua*)

Sladki pelin je zeliščna rastlina, ki spada v družino nebinovk (Asteraceae). Zraste lahko do višine 2,4 metra, ima razvejano steblo, listi so temno zelene oziroma rjavozelene barve, vonj je prepoznaven in aromatičen, okus pa grenak. Pomembno vlogo igra v medicini zaradi vsebnosti snovi artemizinin, ki se jo uporablja pri zdravljenju malarije. Eterično olje sladkega pelina ima protibakterijske in protiglivne lastnosti. Glavne komponente so lahko artemisia keton (do 68 %), evkaliptol (do 51,5 %), kafra (do 48 %) in germakren D (do 18,9 %). Artemisia keton se je izkazala kot komponenta z najboljšo protimikrobno učinkovitostjo, ki inhibira rast kvasovk *C. albicans* pri zelo nizkih koncentracijah (Bilia in sod., 2014).

2.1.4 Sivka (*Lavandula hybrida*)

Sivka spada v družino ustnatic (Lamiaceae). Eterična olja, pridobljena iz rastlin rodu *Lavandula*, se že stoletja uporabljajo v tradicionalni medicini zaradi karminativnih, pomirjevalnih in antidepresivnih učinkov, popularna pa so tudi v industriji dišav. Zaradi protimikrobnih, antioksidativnih, insekticidnih in repelentnih lastnosti predstavlja potencialno naravno alternativno sintetičnim preparatom. Eterično olje sivke se je izkazalo učinkovito tudi pri inhibiciji mikroorganizmov, odgovornih za kvar živil (Erland in Mahmoud, 2016). Ebani in sod. (2017) navajajo, da so glavne komponente eteričnega olja sivke vrste *L. hybrida* linalol (31,5 %), linalil acetat (26,8 %), evkaliptol (7,7 %) in kafra (7,3 %).

2.1.5 Laški smilj (*Helichrysum italicum*)

Laški smilj spada v družino nebinovk (Asteraceae). Je 30 do 70 centimetrov visok grm z močnim vonjem in rumenimi cvetovi. Tradicionalno se je laški smilj uporabljal pri vnetjih dihal, prebavil in kože, kot protimikrobna učinkovina, pri zdravljenju ran ter tudi pri motnjah delovanja žolčnika in mehurja ter kot analgetik. Eterično olje se lahko pridobi iz vseh zelenih delov rastline. V raziskavi je eterično olje laškega smilja pokazalo protibakterijsko in protiglivno delovanje (Antunes Viegas in sod. 2013). Glavne komponente eteričnega olja so α -cedren (13,61 %), α -kurkumen (11,41 %), geranil acetat (10,05 %), limonen (6,07 %), nerol (5,04 %), neril acetat (4,91 %) in α -pinen (3,78 %). Protimikrobno aktivnost je najverjetneje moč pripisati neril acetatu, geranil acetatu in nerolu (Bouzid in sod., 2017).

2.1.6 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)

Rožmarin spada v družino ustnatic (Lamiaceae). Je zimzelen grm z modrobelim cvetovi, ki doseže višino približno enega metra. Ima 1–4 centimetre dolge usnjate liste, ki so široki le po 2–4 milimetre in imajo zelo prepoznaven vonj. Iz listov lahko s parno destilacijo pridobimo eterično olje, katerega glavne komponente so evkaliptol (15–55 %), α -pinen (9,0–26 %) in kafra (5,0–21 %). V tradicionalni medicini se listi rožmarina uporabljajo zaradi protibakterijskega delovanja, kot karminativ ter kot analgetik pri bolečih mišicah in sklepih. Poleg tega se eterično olje uporablja pri oskrbi manjši ran, izpuščajev, glavobolov, dispepsiji in slabi prekrvavitvi ter tudi kot ekspektorant, diuretik in antispazmodik. Ekstrakt, pridobljen iz rožmarina, je odobren s strani Evropske unije kot varen in učinkovit naravni antioksidant za konzerviranje živil in ima oznako E392 (Andrade in sod., 2018).

2.1.7 Nemška kamilica (*Matricaria recutita*)

Nemška kamilica spada v družino nebinovk (Asteraceae). Je enoletna rastlina s pokončnim in razvejanim stebлом, ki lahko zraste do višine od 10 do 80 centimetrov. Dolgi in ozki listi so dvakrat ali trikrat pernato deljeni, cvetovi imajo bele lističe in rumen osrednji del. V tradicionalni medicini je kamilica poznana že stoletja. V glavnem se uporablja zaradi protivnetnega delovanja, kot antiseptik in antispazmodik (Singh in sod., 2011). Kamilični čaj je poznan po svojem pomirjevalnem učinku, eterično olje kamilice pa se uporablja v farmacevtski in kozmetični industriji. Glavne komponente eteričnega olja so α -bisabolol oksid A (48,22 %), α -bisabolol oksid B (23,31 %), α -bisabolol (12,1 %) in β -farnezen (5,21 %) (Roby in sod., 2013).

2.1.8 Žajbelj (*Salvia officinalis*)

Žajbelj je trajen zimzelen grm z olesenelimi stebli, listi sivkaste barve in modrovijoličnimi cvetovi, ki spada v družino ustnatic (Lamiaceae). Listi žajblja in eterično olje imajo

karminativne, antispazmodične, antiseptične in adstringentne lastnosti, za eterično olje pa je znano protimikrobno delovanje. Glede na standard ISO 9909 so glavne komponente eteričnega olja α -tujon (18–43 %), β -tujon (3–8,5 %), kafra (4,5–24,5 %) in evkaliptol (5,5–13 %) (Abu-Darwish in sod., 2013). Protiglivno delovanje je možno pripisati evkaliptolu in kafri (Abu-Darwish in sod., 2013).

2.2 VODIKOV PEROKSID

Oksidirajoče snovi, kot je na primer vodikov peroksid, se zaradi protimikrobnih učinkov uporabljajo za razkuževanje. Vodikov peroksid lahko v Fentonovi reakciji razpade na hidroksilni radikal, ki v večjih količinah deluje na celice toksično (Cerioni in sod., 2009). Ferguson in sod. (2002) so proučevali dovzetnost kvasovk vrste *C. albicans*, izoliranih iz okuženih koreninskih kanalov zob, na nekatere protimikrobne učinkovine in ocenili vodikov peroksid kot zelo učinkovit. Cerioni in sod. (2013) so se ukvarjali s problemom, kako z oksidirajočimi snovmi preprečiti gnitje sadja zaradi plesni vrste *P. expansum* in ocenili vodikov peroksid kot učinkovit.

2.3 PIRA (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*)

Pira je starodavna žitarica, ki je daljna sorodnica navadne pšenice. Nekoč je predstavljala eno glavnih žit, danes pa velja za alternativo mnogo bolj razširjeni pšenici. Gojenje pira je okolju bolj prijazno, ker je odporna proti klimatskim razmeram in ima manjše potrebe po gnojilih v primerjavi s pšenico. Piri pripisujejo antioksidativno delovanje (Gawlik-Dziki in sod., 2012). Podatkov o protimikrobni aktivnosti ekstrakta pira v literaturi nismo zasledili.

2.4 *Candida albicans*

Kvasovke rodu *Candida* spadajo v red Saccharomycetales debela Ascomycota. Kvasovke vrste *C. albicans* so mezofilni mikroorganizmi, ki tvorijo kolonije kremne barve. Sestavljajo mikrobioto ljudi in ostalih toplokrvnih živali, naravno so prisotne pri 40–60 % odrasle populacije. Pojavljajo se v ustni votlini, gastrointestinalnem in urogenitalnem traktu. Za pojav okužb, ki jih povzročajo kvasovke vrste *C. albicans*, je slabotnost gostitelja pomembnejša od virulence mikroorganizma. Poznamo površinske okužbe, kot sta na primer okužba ustne sluznice in vaginalna kandidoza, ter sistemske okužbe, kot sta na primer endokarditis in endoftalmitis. Sistemske kandidoze lahko prizadenejo več organov, osebe z oslabljenim imunskim sistemom pa so podvržene razvoju invazivne kandidoze, ki lahko vodi do kandidemije, torej do okužbe krvi (Hommel, 2014).

Za glivne okužbe obstaja omejena izbira zdravil, zdravljenje pa otežujejo sevi, ki so proti zdravilom odporni. Zaradi tega so invazivne glivne okužbe pogosto odgovorne za visoko smrtnost pri imunsko oslabljenih bolnikih. Eterična olja so se na podlagi raziskav izkazala

kot možna alternativna protiglivna sredstva za uporabo pri glivah, ki so patogene za ljudi in rastline (Raut in Karuppayil, 2014).

2.5 *Penicillium griseofulvum*

Plesni rodu *Penicillium* so izredno razširjene in so nezahtevne glede razmer za rast. Rod obsega okoli dvesto prepoznanih vrst, od katerih se petdeset ali več vrst pojavlja pogosto. Rastejo v obliki majhnih okroglih kolonij sivozelene ali sivomodre barve. Vrstam plesni rodu *Penicillium* je skupno, da sodelujejo pri procesih razgradnje bioloških snovi, kamor spada tudi kvar živil. Plesni rodu *Penicillium* imajo zelo raznolike metabolne sposobnosti, zaradi česar proizvedejo veliko produktov, od katerih ima veliko spojin možne toksične učinke. To so mikotoksini, ki predstavljajo nevarnost za zdravje, nekateri izmed njih so lahko prisotni v živilih (Pitt, 2014). Kontaminacija živil s plesnimi je odvisna od temperature, vsebnosti vlage in časa izpostavljenosti živil neugodnim razmeram. Dodatno lahko vplivajo na razvoj plesni tudi prisotnost spor, razne poškodbe živil, bodisi mehanske bodisi povzročene s strani insektov, razpoložljivost hranil, vrednost pH, vsebnost ogljikovega dioksida ter obdelava živil s kemijskimi in fizikalnimi postopki. Ustaljena metoda inhibicije rasti plesni je uporaba kemijskih konzervansov, ki pa so s časom postali manj učinkoviti in zaradi katerih lahko pride do razvoja odpornih sevov. Poleg tega potrošniki vse bolj težijo k zmanjšanju uporabe sintetičnih fungicidov, vse to pa je raziskovalce usmerilo k iskanju naravnih alternativ (Jeršek in sod., 2014).

Plesni vrste *P. griseofulvum* se pojavljajo na koruzi, pšenici, ječmenu, rižu, moki, nekaterih oreščkih, kot so arašidi in pistacije, pekovskih izdelkih, posušenem grahu in fižolu, mesu in zamrznjenem sadnem pecivu. Proizvajajo sekundarne metabolite, med katerimi so nekateri zdravju nevarni mikotoksini, na primer patulin, drugi pa se uporabljajo v medicini za zdravljenje določenih bolezni, na primer grizeofulvin. Grizeofulvin se uporablja kot protiglivno zdravilo v medicini in veterini. Poleg omenjenih sekundarnih metabolitov je za plesni vrste *P. griseofulvum* znano, da med drugim proizvajajo tudi ciklopiazonsko kislino in rokefortin C (Pitt in Hocking, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Glive

Za izvedbo eksperimenta smo uporabili kvasovke vrste *Candida albicans* ŽMJ32 in plesni vrste *Penicillium griseofulvum* ŽMJ72.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri poskusih smo uporabili gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca:

- trdno gojišče z glukozo, kvasnim ekstraktom in oksitetraciklinom (OGY, ang. Oxytetracycline Glucose Yeast, 4018382, Biolife, Italija) z antibiotikom oksitetraciklinom (4240000, Biolife, Italija),
- trdno gojišče s sladnim ekstraktom (MEA, ang. Malt. Extract Agar, 70145, Sigma-Aldrich, ZDA),
- tekoče gojišče s kvasnim ekstraktom in pepton desktrozo (YPD, ang. Yeast Extract Peptone Dextrose, 801023, Conda Pronadisa, Španija),
- trdno gojišče s kvasnim ekstraktom, peptonom, desktrozo (YPD, ang. Yeast Extract Peptone Dextrose, 801023, Conda Pronadisa, Španija) in agarjem (4110302, Biolife, Milano, Italija).

3.1.3 Uporabljene učinkovine

- eterična olja: origano (*Origanum vulgare*), grška bazilika (*Ocimum basilicum*), sladki pelin (*Artemisia annua*), sivka (*Lavandula hybrida*), laški smilj (*Helichrysum italicum*), rožmarin (*Rosmarinus officinalis*), nemška kamilica (*Matricaria recutita*) in žajbelj (*Salvia officinalis*) pridobljena s parno destilacijo (Priloga A) (dr. Miha Jeršek, l. 2018)
- vodikov peroksid (177885, Belinka Perkemija, Slovenija)
- ekstrakt pire – pripravljen je bil na Katedri za tehnologije rastlinskih živil in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete

3.1.4 Uporabljeni reagenti

- absolutni (99,9-%) etanol (1.00983.1000, Merck, Nemčija)
- 96-% etanol (Itrij, Slovenija)
- fiziološka raztopina – destilirana voda in natrijev klorid (1.06404.1000, Merck, Nemčija)
- barvilo INT (18377-5G, Sigma-Aldrich, ZDA)
- emulgator Tween 80 (8.22187.0500, Merck, Nemčija)

- raztopina SSS (0,5 % agar (4110302, Biolife, Milano, Italija) s Tweenom 80 (8.22187.0500, Merck, Nemčija))

3.1.5 Laboratorijska oprema in pribor

Laboratorijska oprema in pribor, ki smo ga uporabili za izvedo eksperimenta, je predstavljen v preglednicah 1 in 2.

Preglednica 1: Laboratorijska oprema

Oprema	Oznaka, proizvajalec
Tehtnica	PB1502-S, Mettler Toledo, Švica
Analitska tehtnica	ME204, Mettler Toledo, Švica
Mikrovalovka	Sanyo, Japonska
Avtoklav	Sutjeska Beograd, Jugoslavija
Vodna kopel	WB-30, Kambič, Slovenija
Laminarij	SMBC 122AV, Iskra, Slovenija
Laminarij	Iskra, Slovenija
Hladilnik	LTH, Slovenija
Stresalnik za mikrotitrne ploščice	Termomikser Comfort, Eppendorf, Nemčija
Stresalnik za epruvete	Thermo Scientific, ZDA
Vrtinčasto mešalo	Fisher Scientific, ZDA
Inkubator	1.61.035, Sutjeska Beograd, Jugoslavija
Inkubator	I-115 0, Kambič, Slovenija
Lupa	MS5, Leica, Nemčija

Preglednica 2: Laboratorijski pribor

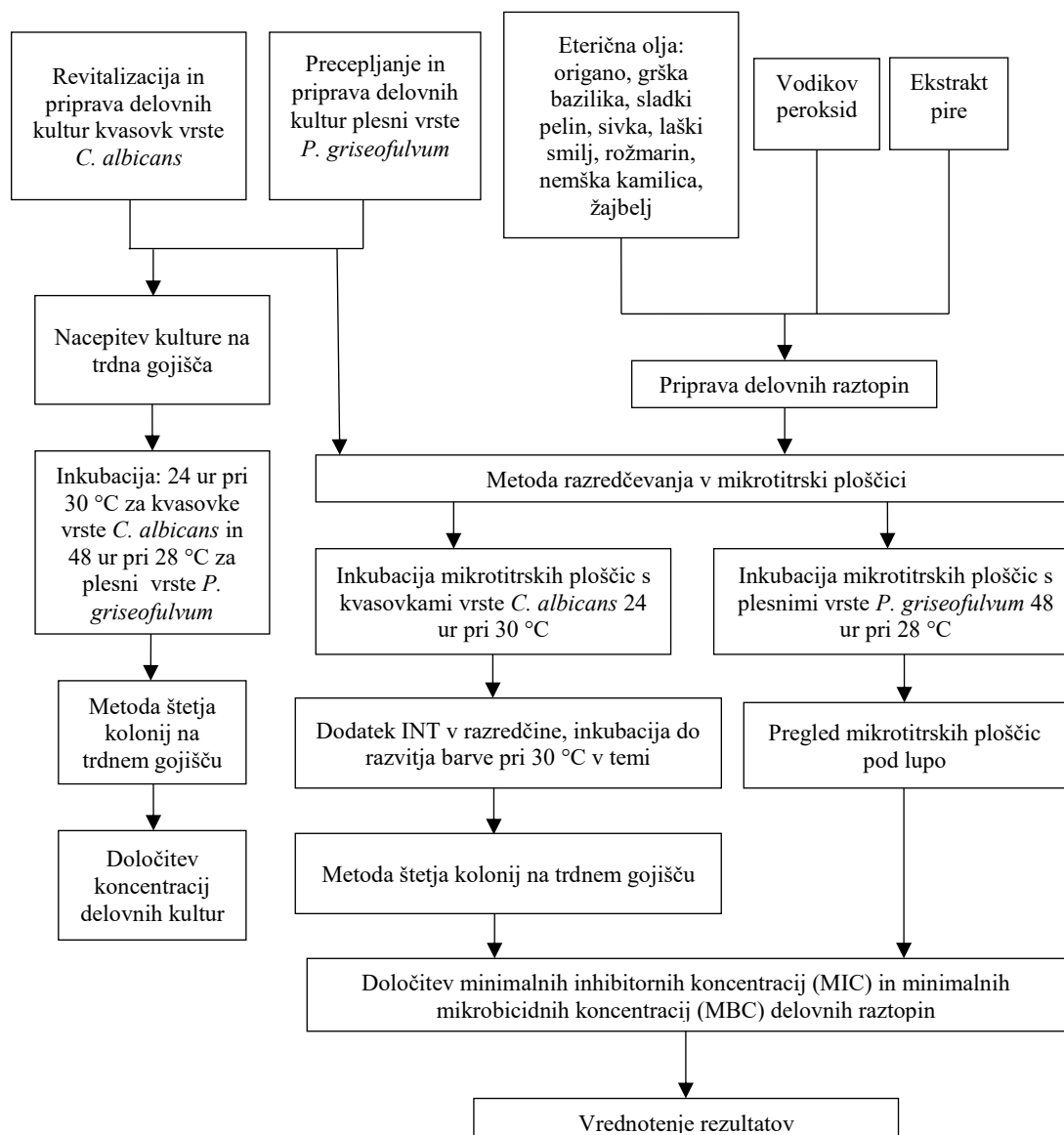
Pribor	Proizvajalec
Petrijevke	Labor tehnika Golias, Slovenija
Cepilne zanke	Labor tehnika Golias, Slovenija
Mikrocentrifugirke – 1,5 ml in 2 ml	Sarstedt, Nemčija
Mikrotitrne ploščice	Labor tehnika Golias, Slovenija
Pipete	Gilson, Francija
Konice za pipete	Gilson, Francija

Drugi uporabljeni pripomočki: sterilna destilirana voda, avtoklavirni trak, aluminijasta folija, gorilnik, cepilna igla, urinski lončki, steklena drizgalska spatula, membranski filtri z velikostjo por 0,2 μm , brizge, stojalo za epruvete, stojalo za mikrocentrifugirke, plastične epruvete, steklovina.

3.2 METODE

3.2.1 Shema eksperimentalnega dela

Na sliki 1 je predstavljen potek eksperimentalnega dela.



Slika 1: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela

3.2.2 Revitalizacija gliv in priprava delovnih kultur

Kvasovke vrste *C. albicans* smo najprej nacepili s cepilno zanko na trdno gojišče, in sicer na dve gojišči YPD in dve gojišči MEA, ter jih 48 ur inkubirali pri 30 °C. Po inkubaciji smo prenesli eno cepilno zanko namnožene kulture v 4 ml tekočega gojišča YPD. Suspenzijo smo premešali na mešalniki in jo 24 ur inkubirali pri 30 °C na stresalniku pri hitrosti 110 obratov/minuto. Namnoženo prekončno kulturo smo redčili tako, da smo

najprej 100 µl prekonočne kulture prenesli v 10 ml tekočega gojišča YPD in premešali na mešalniku. Nato smo 100 µl razredčene prekonočne kulture prenesli v 10 ml tekočega gojišča YPD, premešali na mešalniku in tako dobili delovno kulturo, ki smo jo uporabili za testiranje protiglivne učinkovitosti eteričnih olj z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici.

Kolonijo plesni vrste *P. griseofulvum* smo najprej precepili na gojišče MEA. To smo izvedli tako, da smo s cepilno zanko postrgali površino kolonije in spore prenesli v raztopino SSS. Mešanico smo premešali na mešalniku in jo nato s cepilno iglo prenesli na trdno gojišče MEA, kjer smo naredili štiri vbode. Precepljanje smo izvedli v laminariju. Gojišča z nacepljeno kulturo smo 10 dni inkubirali pri 28 °C. Po inkubaciji smo s cepilno zanko postrgali namnožene plesni in spore prenesli v 4 ml tekočega gojišča YPD, mešanico smo premešali na mešalniku in dodali 10 µl emulgatorja Tween 80 ter zopet premešali. Emulgator Tween 80 smo predhodno prefiltrirali skozi membranski filter. Dobljeno delovno kulturo smo uporabili za določitev protiglivne učinkovitosti eteričnih olj z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici.

3.2.3 Priprava delovnih raztopin

Eterična olja (EO) so bila pridobljena s parno destilacijo (dr. Miha Jeršek, l. 2018). EO origana in grške bazilike sta bili pridobljeni iz listov, cvetov in stebel rastlin, EO sladkega pelina in žajblja iz listov in stebel, EO sivke, laškega smilja in nemške kamilice iz cvetov in stebel ter EO rožmarina iz listov. Za ugotavljanje njihovega protiglivnega delovanja smo pripravili delovne raztopine olj tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 50 mg eteričnega olja in mu dodali 940 µl absolutnega etanola ter 10 µl emulgatorja Tween 80.

Za določitev protiglivnega delovanja vodikovega peroksida smo pripravili delovno raztopino s koncentracijo 0,1 mol/l za kvasovke vrste *C. albicans* in delovno raztopino s koncentracijo 1,9096 mol/l za plesni vrste *P. griseofulvum*. Za pripravo delovne raztopine, ki smo jo testirali na kvasovkah, smo razredčili 100 µl vodikovega peroksida s koncentracijo 9,2013 mol/l z 900 µl sterilne destilirane vode. 108,68 µl tako dobljene desetkrat razredčene raztopine smo nato dodali k 891,32 µl tekočega gojišča YPD in dobili delovno raztopino. Za pripravo delovne raztopine, ki smo jo testirali na plesnih, smo 500 µl vodikovega peroksida s koncentracijo 10,067 mol/l dodali k 500 µl tekočega gojišča YPD, nato pa 500 µl tako razredčenega vodikovega peroksida k 500 µl tekočega gojišča YPD. Za pridobitev delovne raztopine smo 759 µl štirikrat razredčenega vodikovega peroksida dodali k 241 µl tekočega gojišča YPD.

Za ugotavljanje protiglivnega delovanja ekstrakta pire smo pripravili dve različni delovni raztopini. Najprej smo dvakrat zatehtali 50 mg ekstrakta pire, nato pa smo k eni zatehti dodali 1 ml absolutnega etanola, k drugi pa 1 ml tekočega gojišča YPD.

3.2.4 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici

Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in mikrobicidno koncentracijo (MBC) smo določevali z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču YPD (Jeršek in sod., 2014). Primer načrta mikrotitrške ploščice je prikazan v Prilogi B. Koncentracije eteričnih olj in vodikovega peroksida so prikazane v prilogi C. Mikrotitrške ploščice s kvasovkami vrste *C. albicans* smo 24 ur inkubirali pri 30 °C, mikrotitrške ploščice s plesnimi vrste *P. griseofulvum* pa 48 ur pri 28 °C.

Po inkubaciji mikrotitrskih ploščic s kvasovkami vrste *C. albicans* smo v vsako vdolbino dodali 10 µl barvila INT, vsebino premešali (2 min, pri 650 obr./min) in jih inkubirali pri 30 °C do spremembe barve suspenzije (približno dve uri). V vdolbinah, kjer rast kvasovk ni bila zavrta oziroma je bila prisotna metabolna aktivnost, je bila suspenzija obarvana rdeče, v vdolbinah, kjer je bila rast zavrta, do obarvanja ni prišlo.

Po inkubaciji mikrotitrskih ploščic s plesnimi vrste *P. griseofulvum* smo mikrotitrške ploščice pregledali pod lupo ter določili MIC in MBC. To smo dosegli tako, da smo s pomočjo lupe ocenili, ali je bila pri posameznih koncentracijah protiglivne snovi rast plesni prisotna ali ne.

MIC smo določili pri najnižji koncentraciji protiglivne snovi, kjer je bila rast gliv inhibirana v primerjavi z rastjo glive v gojišču brez dodatka protiglivne snovi, MBC pa pri najnižji koncentraciji protiglivne snovi, kjer 99,9 % ali več gliv ni preživel (Sharifzadeh in Shokri, 2016).

3.2.5 Metoda štetja kolonij na trdnem gojišču

Za določitev števila kvasovk vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum* smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MEA za kvasovke oz. OGY za plesni (ISO 4833, 2003). Gojišča s kvasovkami smo 24 ur inkubirali pri 30 °C, gojišča s plesnimi pa 48 ur pri 28 °C. Število gliv smo določali v vzorcih delovnih kultur ter v vzorcih s kvasovkami vrste *C. albicans* iz mikrotitrskih ploščic, kjer smo preverjali MIC in določali MBC.

3.2.6 Analiza variance (ANOVA)

Rezultate smo statistično obdelali s testom ANOVA. Postavili smo ničelno hipotezo, ki trdi, da se povprečni rezultati med seboj statistično ne razlikujejo, in mejo tveganja p . Če je bila p vrednost manjša od 0,05 ($p < 0,05$), smo ničelno hipotezo zavrgli, če je bila p vrednost višja od 0,05 ($p > 0,05$), smo ničelno hipotezo potrdili.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Z našo raziskavo smo želeli določiti vrednosti MIC in MBC za eterična olja za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*, nato pa še določiti vrednosti MIC in MBC za vodikov peroksid in narediti primerjavo med učinkovinami. MIC smo določili pri najnižji koncentraciji protiglivne snovi, kjer je bila rast gliv inhibirana v primerjavi z rastjo glive v gojišču brez dodatka protiglivne snovi, MBC pa pri najnižji koncentraciji protiglivne snovi, kjer 99,9 % ali več gliv ni preživel (Sharifzadeh in Shokri, 2016).

4.1 PROTIGLIVNO DELOVANJE IZBRANIH ETERIČNIH OLJ

Za določitev protiglivne aktivnosti eteričnih olj (EO) smo le-te pripravili tako, da smo jih primerno raztopili (3.2.3) in vse delovne raztopine EO so imele koncentracijo 50 mg/ml. Koncentracije EO po razredčevanju v mikrotitrski ploščici so predstavljene v prilogi C1. Protiglivno aktivnost EO smo določili s kvasovkami vrste *C. albicans* in plesnimi vrste *P. griseofulvum* tako, da smo določili vrednosti MIC in MBC (Preglednica 3).

Preglednica 3: Protiglivna aktivnost eteričnih olj določena za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*

Eterično olje	<i>Candida albicans</i>				<i>Penicillium griseofulvum</i>		
	MIC [mg/ml]	št. celic pri MIC [CFU/ml]	MBC [mg/ml]	MBC/MIC	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]	MBC/MIC
Origano	<0,78	<10	~0,78	>2	3,13	6,25	2
Sivka	0,78	$5,8 \cdot 10^3$	1,56	2	6,25	12,5	2
Grška bazilika	0,78	$5,4 \cdot 10^3$	1,56	2	12,5	25	2
Laški smilj	0,78	$5,4 \cdot 10^3$	1,56	2	12,5	25	2
Sladki pelin	1,56	$6,7 \cdot 10$	3,13	2	12,5	25	2
Rožmarin	1,56	$<10^2$	3,13	2	12,5	25	2
Nemška kamilica	1,56	$>10^4$	3,13	2	12,5	25	2
Žajbelj	3,13	$>10^4$	6,25	2	12,5	25	2

Legenda: MIC – minimalna inhibitorna koncentracija; MBC – minimalna mikrobicidna koncentracija; CFU – kolonijska enota; MBC/MIC <4 – fungicidno delovanje

Delovni kulturi kvasovk vrste *C. albicans*, ki smo jo uporabili v raziskavi smo določili koncentracijo $1,37 \cdot 10^4$ CFU/ml.

EO origana se je med preizkušeni EO izkazalo kot najbolj učinkovito pri inhibiciji tako kvasovk vrste *C. albicans* kot plesni vrste *P. griseofulvum*. MIC za kvasovke smo določili pri <0,78 mg/ml in za plesni pri 3,13 mg/ml. Manohar in sod. (2001) so testirali komercialno EO origana, ki je rast kvasovk vrste *C. albicans* 75 % zavrlo pri koncentraciji 0,13 mg/ml (MIC), medtem ko je 0,25 mg/ml rast popolnoma onemogočila (MBC).

Učinkovitost EO origana so opredelili kot primerljivo z učinki protiglivnih zdravil, protimikrobno učinkovanje so pripisali karvakrolu in timolu. EO origana sta Sharifzadeh in Shokri (2016) pripisala, tako kot mi, najboljšo protiglivno aktivnost med analiziranimi EO. V eksperimentu sta uporabila EO, ki sta ga s parno destilacijo pripravila iz listov origana, in določila MIC pri 0,3 mg/ml ter MBC pri 0,4 mg/ml za seve kvasovk vrste *C. albicans*, ki so odporne proti protiglivni učinkovini flukonazol in tudi za seve, ki so občutljivi na flukonazol. Kot najbolj aktivno komponento EO origana proti glivam so določili timol. Protimikrobno učinkovanje EO origana so potrdili tudi Ebani in sod. (2017), ki so testirali komercialno EO na dvanajstih sevih kvasovk vrste *C. albicans* in vrednosti MIC določili v območju 0,09–3,6 mg/ml, ter Ebani in sod. (2018), ki so vrednost MIC definirali kot najnižjo koncentracijo, kjer ni bilo več vidne rasti mikroorganizmov in so za kvasovke enake vrste MIC določili pri 0,09 mg/ml. Schlösser in Prange (2018) menita, da ima EO origana dobro protiglivno delovanje proti plesnim vrste *P. verrucosum*, ki se pojavljajo v živilih. Za EO origana ki so ga pridobili iz listov in stebel s parno destilacijo, in plesni vrste *P. verrucosum*, so MIC določili pri 0,4 mg/ml.

Nizke vrednosti MIC smo za kvasovke vrste *C. albicans* določili tudi pri EO grške bazilike, sivke in laškega smilja, ki so inhibitorno delovala pri 0,78 mg/ml in so pri tej koncentraciji rast kvasovk zmanjšali za 60,6 % (EO grške bazilike in laškega smilja) oziroma 57,7 % (EO sivke). Protiglivno delovanje EO grške bazilike na kvasovke vrste *C. albicans* omenjajo tudi Ebani in sod. (2017), ki so določili MIC pri 2,29 mg/ml, ter Ebani in sod. (2018), ki so določili vrednosti MIC dvanajstim sevom kvasovk v območju med 0,09 in 4,58 mg/ml, od tega je bilo pet sevov dovzetnih za koncentracije pod 1 mg/ml. Protimikrobno učinkovanje EO grške bazilike Ebani in sod. (2018) pripisujejo spojini evgenol, ki ima zmožnost poškodovanja celične membrane kvasovk vrste *C. albicans*. Ebani in sod. (2017) so v eksperimentu testirali protimikrobno aktivnost EO sivke na kvasovke in določili MIC 4,25 mg/ml. Glede na njihove ugotovitve je EO sivke inhibiralo rast kvasovk vrste *C. albicans* pri skoraj dvakrat večji koncentraciji kot EO grške bazilike, kar se ne ujema z našimi rezultati. EO laškega smilja, ki so ga pridobili s parno destilacijo iz nadzemnih delov rastline med cvetenjem, so Bouzid in sod. (2017) pripisali fungicidne lastnosti za kvasovke vrste *C. albicans*, ker je bilo razmerje med MIC (0,006325 mg/ml) in MBC (0,01265 mg/ml) manjše od 4, dovzetnost kvasovk pa je moč pripisati vsebnosti geranil acetata v EO.

MIC za EO sladkega pelina, rožmarina in nemške kamilice smo za kvasovke vrste *C. albicans* določili pri 1,56 mg/ml, in pri tej koncentraciji je EO sladkega pelina zmanjšal rast kvasovk za 99,5 %, EO rožmarina za 99,3 % in EO nemške kamilice za 27 %. Radulović in sod. (2013) poročajo o protimikrobnem delovanju EO sladkega pelina, ki so ga pripravili s parno destilacijo iz listov, stebel in cvetov oz. sadežev. MIC so za kvasovke vrste *C. albicans* določili pri 20 mg/ml, MBC pa pri >20 mg/ml, kar odstopa od naših ugotovitev. V raziskavi so testirali tudi protiglivni učinek posameznih glavnih komponent

EO sladkega pelina, in sicer so za kvasovke določili najnižjo vrednost MIC (5 mg/ml) za evkaliptol in kafro. V študiji Ebani in sod. (2017) je EO rožmarina med testiranimi EO najslabše učinkoval pri kvasovkah vrste *C. albicans*, saj je bil MIC 9,14 mg/ml. Sharifzadeh in Shokri (2016) sta s parno destilacijo cvetov nemške kamilice pripravila EO in ga testirala na sevih kvasovk vrste *C. albicans*, ki so bile odporne proti flukonazolu in na flukonazol občutljivih sevih. Za odporne seve so MIC določili pri $1,4 \pm 0,4$ mg/ml in MBC pri $2,3 \pm 0,3$ mg/ml, za občutljive seve pa MIC pri $1,55 \pm 0,4$ mg/ml in MBC pri $2,2 \pm 0,3$ mg/ml. Protimikrobno aktivnost EO nemške kamilice so proučevali tudi Roby in sod. (2013), ki so EO pridobili s parno destilacijo cvetov rastline in določili MIC 0,01 mg/ml za kvasovke vrste *C. albicans*. Rast kvasovk vrste *C. albicans* je najslabše inhibiralo EO žajblja; MIC smo določili pri vrednosti 3,13 mg/ml.

Protiglivni učinek EO na kvasovke vrste *C. albicans* in na plesni vrste *P. griseofulvum* je bil različen ($p < 0,05$). Vsa EO so imela večji protiglivni učinek na kvasovke kot na plesni. Rezultate eksperimentalnega dela smo primerjali s podatki v strokovni literaturi. Pri pregledu literature nismo zasledili nobene raziskave, ki bi vključevala vrednosti MIC eteričnih olj oziroma vodikovega peroksida za plesni vrste *P. griseofulvum*, zato smo primerjave vrednosti MIC povzeli za nekatere druge vrste rodu *Penicillium*. Za plesni vrste *P. griseofulvum* je bilo najbolj protiglivno aktivno EO origana. EO sivke je rast plesni inhibiralo pri dvakrat večji koncentraciji kot origano, MIC EO sivke smo določili pri vrednosti 6,25 mg/ml. Vsem ostalim EO, to so EO grške bazilike, sladkega pelina, laškega smilja, rožmarina, nemške kamilice in žajblja, smo določili MIC 12,5 mg/ml. Stević in sod. (2014) so v svoji raziskavi proučevali protiglivno delovanje izbranih vrst komercialnih EO, med drugim tudi na plesni vrste *Penicillium* sp. Za EO grške bazilike so MIC določili pri 5,95 mg/ml, za EO nemške kamilice pa pri 25,20 mg/ml, kar kaže na odstopanja med našimi in njihovimi ugotovitvami. Nikkhah in sod. (2017) so se ukvarjali s problemom zatiranja določenih patogenov sadja. EO rožmarina so uvrstili med manj učinkovita v primerjavi z ostalimi testiranimi EO (EO timijana (*Thymus vulgaris*) in cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) sta bili med bolj učinkovitimi EO, EO rožmarina in majarona (*Origanum majorana*) pa med manj učinkovitimi) proti plesnim vrste *P. expansum*, MIC so določili pri 5 mg/ml, pri enaki vrednosti so določili tudi MBC.

Z izračunom razmerja med MBC in MIC smo določili fungistatično in fungicidno delovanje EO. Razmerje enako ali višje od vrednosti 4 nakazuje fungistatično delovanje, razmerje nižje od 4 pa fungicidno (Bouzid in sod, 2017). Razmerje MBC/MIC za vsa testirana EO je enako 2, zato jih lahko opredelimo kot fungicidna.

Kemijska sestava EO je povezana s stanjem rastline (starost rastline, pri kateri je bila ta uporabljena za pridobitev EO, kateri rastlinski del je bil za to uporabljen in v kakšnih klimatskih razmerah je rastlina rastla), iz katere je bilo EO pridobljeno, kemijska sestava pa vpliva na protimikrobno učinkovitost eteričnega olja (Kalemba in Kunicka, 2003). Zato

je med enakimi vrstami EO težko delati natančne primerjave, čeprav gre za EO, pridobljena iz enakih rastlinskih vrst.

4.2 PROTIGLIVNO DELOVANJE VODIKOVEGA PEROKSIDA

Delovna raztopina vodikovega peroksida, ki smo jo uporabili za kvasovke, je imela koncentracijo 0,1 mol/l, delovna raztopina vodikovega peroksida, ki smo jo uporabili za plesni, pa koncentracijo 1,9096 mol/l. Koncentracije delovnih raztopin po razredčevanju v mikrotitrski ploščici so predstavljene v prilogi C2.

Preglednica 4: Protiglivna aktivnost vodikovega peroksida za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*

	<i>C. albicans</i>			<i>P. griseofulvum</i>	
	MIC [mmol/l]	št. celic pri MIC [CFU/ml]	MBC [mmol/l]	MIC [mmol/l]	MBC [mmol/l]
H ₂ O ₂	1,56	<10 ²	3,13	119	239

Legenda: **MIC** – minimalna inhibitorna koncentracija; **MBC** – minimalna mikrobicidna koncentracija; **CFU** - kolonijska enota

MIC vodikovega peroksida za kvasovke vrste *C. albicans* (1,56 mmol/l oziroma 0,05306 mg/ml) je bila nižja od najnižje MIC za eterična olja (<0,78 mg/ml), vendar se MIC za vodikov peroksid in eterična olja med seboj statistično niso razlikovala ($p > 0,05$). Ferguson in sod. (2002) poročajo o visoki učinkovitosti vodikovega peroksida pri inhibiciji kvasovk vrste *C. albicans*. Pri poskusu, ki je bil opravljen *in vitro*, so MIC določili pri 234 $\mu\text{g/ml}$ in vodikov peroksid opredelili kot učinkovito protiglivno sredstvo, ki bi ga lahko uporabljali v koreninskih kanalih zob, okuženih s kvasovkami vrste *C. albicans*.

Minimalna koncentracija vodikovega peroksida, ki je bila potrebna za inhibicijo rasti plesni vrste *P. griseofulvum*, je bila primerljiva z učinkovitostjo EO origana. MIC za vodikov peroksid je namreč bila 119 mmol/l oziroma 4,05 mg/ml, MIC za EO origana pa 3,13 mg/ml. Kljub temu pa se je protiglivna učinkovitost vseh testiranih eteričnih olj in vodikovega peroksida statistično razlikovala ($p < 0,05$), kar potrjuje našo hipotezo o razlikah v delovanju eteričnih olj in vodikovega peroksida za plesni vrste *P. griseofulvum*. Cerioni in sod. (2013) v svoji študiji pišejo o učinkovitosti vodikovega peroksida pri razkuževanju sadja in zelenjave ter pri poskusih *in vitro*, kjer so na gojišču preverjali rast plesni vrste *P. expansum* po inkubaciji ob dodatku različnih koncentracij vodikovega peroksida, kar je v skladu z našimi ugotovitvami. Opaziti pa je razliko pri minimalnih inhibitornih koncentracijah, naše vrednosti MIC so namreč nižje od vrednosti, podanih v članku (400 mmol/l).

Protiglivno učinkovanje vodikovega peroksida proti kvasovkam vrste *C. albicans* in plesnim vrste *P. griseofulvum* se je statistično razlikovalo ($p < 0,05$). MIC proti kvasovkam

(1,56 mmol/l oziroma 0,05306 mg/ml) je bila nižja od MIC proti plesnim (119 mmol/l oziroma 4,0477 mg/ml).

4.3 PROTIGLIVNO DELOVANJE EKSTRAKTA PIRE

Delovne raztopine ekstrakta pire so imele koncentracijo 50 mg/ml. Koncentracije delovnih raztopin po razredčevanju v mikrotitrski ploščici so bile enake kot pri eteričnih oljih (priloga C1).

Preglednica 5: Protiglivna aktivnost ekstrakta pire za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*

Ekstrakt pire	<i>C. albicans</i>			<i>P. griseofulvum</i>	
	MIC [mg/ml]	št. celic pri MIC [CFU/ml]	MBC [mg/ml]	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]
Raztopljen v YPD	Opažena zmanjšana rast; nemogoče določiti MIC in MBC			ni vpliva do koncentracije 25	
Raztopljen v etanolu	~ 6,25 (samo ocena)	/	~ 12,5 (samo ocena)	12,5	25

Legenda: **MIC** – minimalna inhibitorna koncentracija; **MBC** – minimalna mikrobicidna koncentracija; **CFU** – kolonijska enota

Suspenzije celic pri izbranih koncentracijah ekstrakta iz mikrotitrške ploščice smo nacepili na trdna gojišča in tako preverili rast kvasovk vrste *C. albicans*. Pri ekstraktu pire v gojišču YPD je bila rast kvasovk določena pri vseh treh raztopinah (25 mg/ml, 1,56 mg/ml in 0,195 mg/ml). Vendar smo, kljub temu, da delovna raztopina ekstrakta pire v YPD ni inhibirala rasti kvasovk, opazili zmanjšano rast mikroorganizmov premo sorazmerno z naraščajočo koncentracijo delovne raztopine. Pri ekstraktu pire v etanolu pri 12,5 mg/ml ni prišlo do rasti kvasovk, rast je bila opažena pri 3,13 mg/ml. Ker raztopine s koncentracijo delovne raztopine 6,25 mg/ml nismo nacepili na trdno gojišče, ne moremo določiti točnih vrednosti MIC in MBC. Lahko podamo okvirne vrednosti, in sicer je MIC ekstrakta pire v etanolu ~ 6,25 mg/ml, MBC pa ~ 12,5 mg/ml.

Pri eksperimentu s plesnimi vrste *P. griseofulvum* smo opazili razlike v delovanju delovne raztopine ekstrakta pire, pripravljene v tekočem gojišču YPD, in etanolu. Pri opazovanju rasti plesni pod lupo v mikrotitrski ploščici nismo opazili protiglivnega delovanja ekstrakta pire v YPD, zaznali pa smo ga pri ekstraktu pire v etanolu. Vrednosti MIC ekstrakta pire v etanolu, 12,5 mg/ml, in MBC, 25 mg/ml, ki smo ju določili, sta primerljivi s protiglivno aktivnostjo manj učinkovitih eteričnih olj, ki smo jih analizirali.

Kljub temu da iz rezultatov našega eksperimenta ne moremo podati točnih koncentracij delovnih raztopin ekstrakta pire, potrebnih za inhibicijo rasti kvasovk vrste *C. albicans*, lahko predvidimo potencialno protiglivno aktivnost ekstrakta pire. Za potrditev

protiglivnega učinkovanja bi bile potrebne nadaljnje raziskave, enako velja tudi za plesni vrste *P. griseofulvum*.

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov opravljenega eksperimentalnega dela smo prišli do naslednjih sklepov:

- Eterična olja origana, grške bazilike, sladkega pelina, sivke, laškega smilja, rožmarina, nemške kamilice in žajblja so imela fungicidno aktivnost za kvasovke vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum* pri različnih koncentracijah. Kvasovke vrste *C. albicans* so bile za protiglivno delovanje eteričnih olj dovzetne pri nižjih koncentracijah kot pa plesni vrste *P. griseofulvum* ($p < 0,05$). Najboljše protiglivno delovanje proti obema vrstama gliv je imelo eterično olje origana.
- Vodikov peroksid je inhibiral rast kvasovk vrste *C. albicans* in plesni vrste *P. griseofulvum*. Kvasovke vrste *C. albicans* so bile dovzetne za protiglivno delovanje vodikovega peroksida pri nižji koncentraciji kot pa plesni vrste *P. griseofulvum* ($p < 0,05$).
- Protiglivna učinkovitost izbranih eteričnih olj in vodikovega peroksida za kvasovke vrste *C. albicans* je primerljiva ($p > 0,05$), medtem ko je za plesni vrste *P. griseofulvum* večja za vodikov peroksid kot za eterična olja ($p < 0,05$).
- Ekstrakt pire je pokazal protiglivno aktivnost proti kvasovkam vrste *C. albicans* in plesnim vrste *P. griseofulvum*.

6 POVZETEK

Določene rastline in iz njih pripravljene pripravki imajo svoje mesto v tradicionalni medicini že stoletja. Uporabljajo se pri oskrbi raznih zdravstvenih tegob, med drugim tudi kot protimikrobno sredstvo pri okužbah. S parno destilacijo lahko pridobimo iz rastlin eterična olja, ki se lahko poleg v tradicionalni medicini, uporabljajo tudi v kozmetični in živilski industriji, bodisi kot dišava bodisi kot naravni konzervans.

Cilj naše raziskave je bil testirati protiglivno delovanje izbranih eteričnih olj – EO origana, grške bazilike, sladkega pelina, sivke, laškega smilja, rožmarina, nemške kamilice in žajblja – in njihovo delovanje primerjati z razkužilom, katerega uporaba kot protimikrobno sredstvo je že uveljavljena – vodikov peroksid. Tekom eksperimentalnega dela smo v raziskavo vključili še ekstrakt pire. Učinkovine smo testirali na dveh glivah, in sicer kvasovkah vrste *C. albicans* ter plesni vrste *P. griseofulvum*. Kot metodo, s katero smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo testiranih učinkovin, smo uporabili metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici. Z razredčevanjem učinkovin smo dobili različne koncentracije raztopin, v katere smo dodali kulture mikroorganizmov, sledila je inkubacija. Po inkubaciji smo za določitev metabolne aktivnosti v suspenzije s kvasovkami vrste *C. albicans* dodali barvilo INT. Glede na obarvanje in z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili, ali je bila rast kvasovk zavrtta ali ne. Ali je bila rast plesni vrste *P. griseofulvum* inhibirana, smo določili s pregledovanjem suspenzij pod lupo.

EO so bila bolj učinkovita pri inhibiciji kvasovk vrste *C. albicans* kot pa plesni vrste *P. griseofulvum*. Najboljše protiglivno učinkovanje je imelo EO origana, kateremu smo vrednosti MIC določili pri $<0,78$ mg/ml za kvasovke in 3,13 mg/ml za plesni. Zelo dobra protiglivna aktivnost EO origana je v skladu s podatki, ki smo jih zasledili v literaturi. Pri inhibiciji kvasovk vrste *C. albicans* je bila večina testiranih EO učinkovita pri nizkih koncentracijah; najslabšo protiglivno delovanje smo pripisali EO žajblja. Pri plesnih vrste *P. griseofulvum* je večina EO bila slabše učinkovita, izjema sta bila EO origana in sivke. Pri inhibiciji kvasovk je bil vodikov peroksid učinkovit pri nižji koncentraciji v primerjavi z EO, vendar s statistično obdelavo rezultatov nismo določili razlik med vrednostmi MIC. Pri testiranju vodikovega peroksida na plesnih se je izkazal kot manj učinkovit v primerjavi s kvasovkami. MIC za vodikov peroksid je bil nekoliko višji od vrednosti, ki smo jo določili za EO origana, kar ponovno kaže na močan protiglivni učinek EO origana. Ekstrakt pire je pokazal protiglivne učinke, vendar smo lahko določili le okvirne MIC.

Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo, da so EO potencialna protiglivna sredstva. Pri tem je potrebno upoštevati razlike v delovanju različnih vrst EO in veliko variiranje kemijske sestave EO med enakimi vrstami EO, pridobljenih iz rastlin enake vrste, ki niso imele enakih razmer za rast. Prav tako so različne glive različno dovzetne za protiglivno delovanje EO.

7 VIRI

- Abu-Darwish M. S., Cabral C., Ferreira I. V., Gonçalves M. J., Cavaleiro C., Cruz M. T., Al-bdour T. H., Salgueiro L. 2013. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International*, 2013: 538940, doi: 10.1155/2013/538940: 9 str.
- Andrade J. M., Faustino C., Garcia C., Ladeiras D., Reis C. P., Rijo P. 2018. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4, 4: FSO283, doi: 10.4155/fsoa-2017-0124: 17 str.
- Antunes Viegas D., Palmeira-de-Oliveira A., Salgueiro L., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira R. 2013. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 1: 54-65
- Bilia A. R., Santomauro F., Sacco C., Bergonzi M. C., Donato R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 159819, doi: 10.1155/2014/159819: 7 str.
- Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J. M. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 6: 481-484
- Bouزيد D., Nouioua W., Soltani E., De Haro J. P., Angeles Esteban M., Zerroug M. M. 2017. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, 5: 780-787
- Cerioni L., Rapisarda V. A., Hilal M., Prado F. E., Rodríguez-Montelongo L. 2009. Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cupric sulfate against *Penicillium digitatum*. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1660-1665
- Cerioni L., de los Ángeles Lazarte M., Villegas J. M., Rodríguez-Montelongo L., Volentini S. I. 2013. Inhibition of *Penicillium expansum* by an oxidative treatment. *Food Microbiology*, 33, 2: 298-301
- Ebani V. V., Nardoni S., Bertelloni F., Najar B., Pistelli L., Mancianti F. 2017. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against pathogens responsible for

otitis externa in dogs and cats. *Medicines*, 4, 21: E21, doi: 10.3390/medicines4020021: 8 str.

Ebani V. V., Nardoni S., Bertelloni F., Pistelli L., Mancianti F. 2018. Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. *Molecules*, 23, 7: E1668, doi: 10.3390/molecules23071668: 12 str.

Erland L. A. E., Mahmoud S. S. 2016. Lavender (*Lavandula angustifolia*) oils. V: Essential oils in food preservation, flavor and safety. 1st ed. Preedy V. R. (ur.). Amsterdam, Academic Press: 501-508

Ferguson J. W., Hatton J. F., Gillespie M. J. 2002. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*, 28, 2: 68-71

Gawlik-Dziki U., Świeca M., Dziki D. 2012. Comparison of phenolic acids profile and antioxidant potential of six varieties of spelt (*Triticum spelta* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 18: 4603-4612

Hommel R. K. 2014. *Candida*: Introduction. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 1. 2nd ed. Batt C. A., Tortorello M. L. (ur.). Amsterdam, Academic Press: 367-373

ISO 4833. Methods for microbiological examination of food and animal feeding stuffs – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. 2003: 9 str.

Jeršek B., Poklar Ulrih N., Skrt M., Gavarić N., Božin B., Smole Možina S. 2014. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 65, 2: 199-208

Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 10: 813-829

Ličina B. Z., Stefanović O. D., Vasić S. M., Radojević I. D., Dekić M. S., Čomić L. R. 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*, 33, 2: 498-504

Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N. A., Echard B. W., Bagchi D., Preuss H. G. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 228, 1-2: 111-117

- Nikkhah M., Hashemi M., Habibi Najafi M. B., Farhoosh R. 2017. Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257: 285-294
- Pitt J.I., Hocking A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York, Springer: 169-273
- Pitt J.I. 2014. *Penicillium: Penicillium and Talaromyces: Introduction*. V: *Encyclopedia of food microbiology*. Vol. 3. 2nd ed. Batt C. A., Tortorello M. L. (ur.). Amsterdam, Academic Press: 6-13
- Radulović N. S., Randjelović P. J., Stojanović N. M., Blagojević P. D., Stojanović-Radić Z. Z., Ilić I. R., Djordjević V. B. 2013. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 37-49
- Raut J. S., Karuppayil S. M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62: 250-264
- Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A.-H., Khalel K. I. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44: 437-445
- Schlösser I., Prange A. 2018. Antifungal activity of selected natural preservatives against the foodborne molds *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 365, 13: fny125, doi: 10.1093/femsle/fny125: 8 str.
- Sharifzadeh A., Shokri H. 2016. Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6, 2: 215-222
- Singh O., Khanam Z., Misra N., Srivastava M. K. 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5, 9: 82-95
- Stević T., Berić T., Šavikin K., Soković M., Gođevac D., Dimkić I., Stanković S. 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55: 116-122
- Waleed Al Abbasy D., Pathare N., Al-Sabahi J. N., Khan S. A. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5, 8: 645-649

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici,izr. prof. dr. Barbari Jeršek, za vso pomoč, koristne nasvete, vložen čas, prijaznost in posredovano znanje med izdelavo diplomskega dela.

Za temeljit pregled in popravke diplomskega dela se zahvaljujem recenzentki, prof. dr. Poloni Jamnik.

Za pripravo eteričnih olj, ki so bila uporabljena pri poskusu, se zahvaljujem dr. Mihi Jeršku.

PRILOGE

PRILOGA A

Parna destilacija



PRILOGA B

Primer načrta mikrotitrne ploščice za določitev MIC z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 µl D (EO) 50 µl DK	100 µl D (EO) 50 µl DK	100 µl D (EO) 50 µl DK	100 µl D (EO) 50 µl DK	100 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	100 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			100 µl D (EtOH) 50 µl DK	100 µl D (EtOH) 50 µl DK	PK 50 µl YPD 50 µl DK	B 100 µl YPD
B	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	PK 50 µl YPD 50 µl DK	B 100 µl YPD
C	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	PK 50 µl YPD 50 µl DK	B 100 µl YPD
D	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK		
E	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK		
F	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	NK 50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂)	
G	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	NK 50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂)	
H	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EO) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂) 50 µl DK			50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	50 µl YPD 50 µl D (EtOH) 50 µl DK	NK 50 µl YPD 50 µl D (H ₂ O ₂)	

Legenda: MIC – minimalna inhibitorna koncentracija; D (EO) – delovna raztopina eteričnega olja; D (H₂O₂) – delovna raztopina vodikovega peroksida; YPD – tekoče gojišče YPD; DK – delovna kultura *C. albicans* oz. *P. griseofulvum*; D (EtOH) – delovna raztopina absolutnega etanola; PK – pozitivna kontrola; NK – negativna kontrola; B – kontrola sterilnosti gojišča (ang. blank)

PRILOGA C

Koncentracije delovnih raztopin po razredčevanju v mikrotitrski ploščici

Priloga C1: Koncentracije delovnih raztopin eteričnih olj po razredčevanju

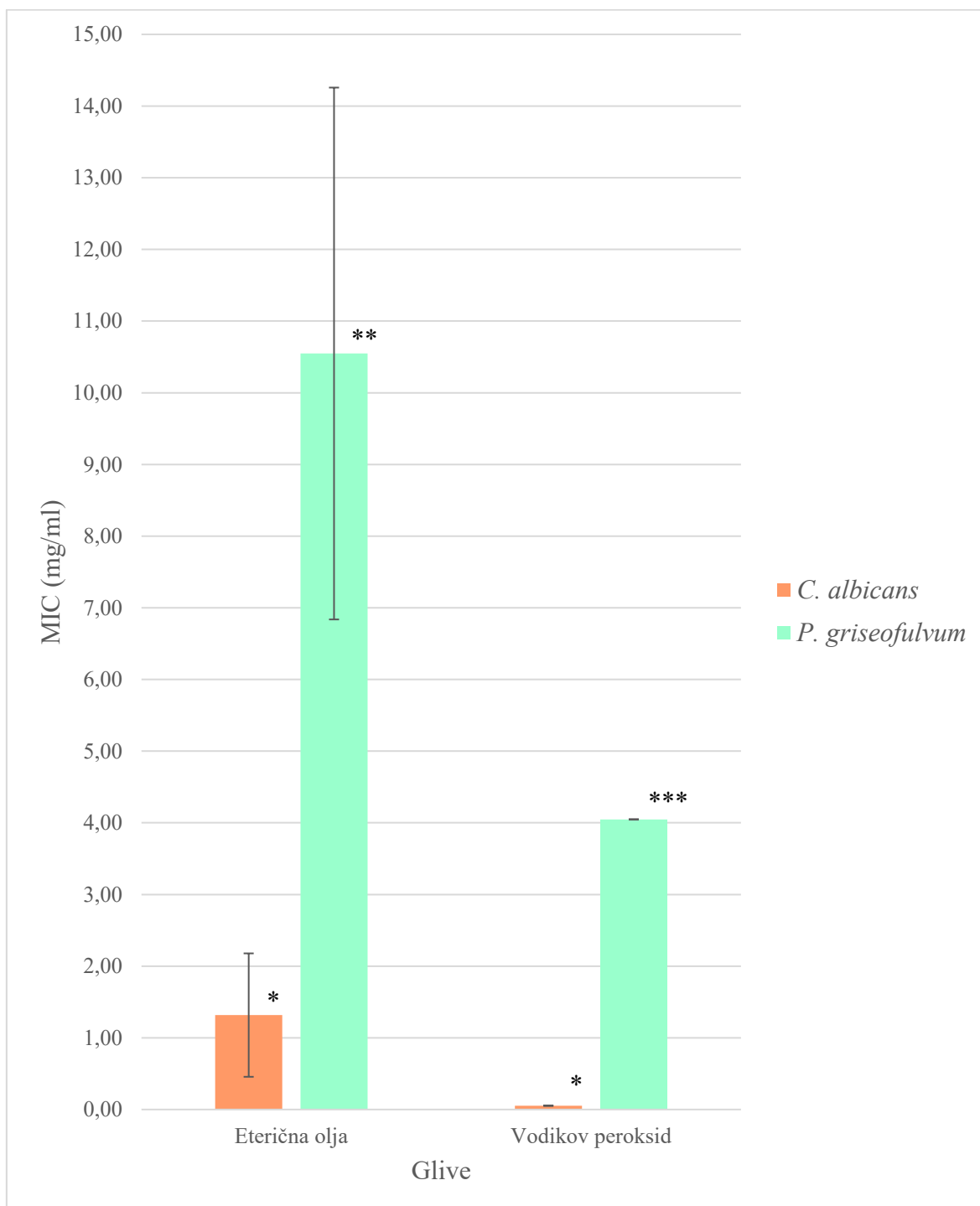
Oznaka	Koncentracija delovne raztopine eteričnega olja [mg/ml]
A	25
B	12,5
C	6,25
D	3,125
E	1,56
F	0,78
G	0,39
H	0,195

Priloga C2: Koncentracije delovnih raztopin vodikovega peroksida po razredčevanju

	<i>C. albicans</i>	<i>P. griseofulvum</i>
Oznaka	Koncentracije delovnih raztopin vodikovega peroksida [mol/l]	
A	0,05	0,955
B	0,025	0,477
C	0,0125	0,239
D	0,00625	0,119
E	0,003125	0,0597
F	0,00156	0,0298
G	0,00078	0,0149
H	0,00039	0,00746

PRILOGA D

Protiglivno delovanje izbranih eteričnih olj in vodikovega peroksida proti kvasovkam vrste *C. albicans* in plesnim vrste *P. griseofulvum*



Legenda: MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (za eterična olja sta podani povprečni vrednosti vseh izbranih eteričnih olj); *, **, *** – povprečne vrednosti MIC z različnimi oznakami se statistično razlikujejo ($p < 0,05$)