

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andrej ANDERLIČ

**PROTIGLIVNA IN PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST ETERIČNEGA
OLJA VRTNE MATERINE DUŠICE (*Thymus vulgaris*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andrej ANDERLIČ

**PROTIGLIVNA IN PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST ETERIČNEGA
OLJA VRTNE MATERINE DUŠICE (*Thymus vulgaris*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Thymus vulgaris*
ESSENTIAL OIL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo ter v laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce, za somentorico asist. dr. Sabino Anžlovar in za recenzentko prof. dr. Deo Baričevič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jasna Dolenc Koce
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: asist. dr. Sabina Anžlovar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Dea Baričevič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andrej Anderlič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn

DK UDK 665.525:579(043.2)=163.6

KG *Thymus vulgaris*/eterično olje/*Escherichia coli*/*Bacillus cereus*/*Staphylococcus aureus*/*Klebsiella pneumoniae*/*Buttiauxella* sp./*Armillaria mellea*/*Fusarium* sp./protiglivna učinkovitost/protibakterijska učinkovitost

AV ANDERLIČ, Andrej

SA DOLENC KOCE, Jasna (mentor)/ANŽLOVAR, Sabina (somentor)/BARIČEVIČ, Dea (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN PROTIGLIVNA IN PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST ETERIČNEGA OLJA VRTNE MATERINE DUŠICE (*Thymus vulgaris* (L.))

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP X, 55 str., 18 pregl., 9 sl., 3 pril., 67 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI V nalogi smo testirali protimikrobno učinkovitost eteričnega olja (EO) vrtne materine dušice (*Thymus vulgaris* (L.)) proti izbranim vrstam in sevom bakterij *Escherichia coli*-K12, *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST 131, *E. coli* 1138, *Bacillus cereus*, *Buttiauxella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* in proti glivama *Fusarium* sp. in *Armillaria mellea*. Protimikrobno učinkovitost smo testirali z difuzijskim testom na agarju pri 0,1, 1 in 10 % koncentraciji EO. Različne koncentracije EO smo pripravili tako, da smo EO razredčili z etanolom. Bakterije smo inkubirali 24 ur, glive pa dokler niso dosegle katere od testnih jamic. Rast vseh bakterij je bila zaustavljena pri koncentracijah večjih od 1 % EO. Povprečni polmeri inhibicijskih con bakterij pri 1 % koncentraciji EO so bili med 1,9 mm pri *S.aureus* in 3,9 mm pri sevu *Buttiauxella* sp. Pri 10 % koncentraciji EO so bile cone velike med 5,6 mm pri *K. pneumoniae* in 10,6 mm pri *E. coli*-KM; ST131. Na glivi EO ni imelo takega učinka, saj je bila rast zavrta pri koncentracijah višjih od 10 % EO. Povprečni polmeri inhibicijskih con so bili veliki 4,1 mm pri glivi *Fusarium* sp. in 4,9 mm pri glivi *Armillaria mellea*. Med testiranimi bakterijami so bili tudi sevi, za katere je bila predhodno dokazana rezistenca proti antibiotikom, in sicer *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST 131, *E. coli* 1138 in *Klebsiella pneumoniae*. Rezultati nakazujejo potencialno uporabo EO za zaviranje rasti proti antibiotikom odpornih bakterij kot tudi uporabo proti vrstam bakterij in gliv, ki povzročajo kvarjenje živil, ter s tem zaščito pred boleznimi in posledicami, ki jih povzročajo.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC UDK 665.525:579(043.2)=163.6
- CX *Thymus vulgaris*/essential oil/*Escherichia coli*/*Bacillus cereus*/*Staphylococcus aureus*/*Klebsiella pneumoniae*/*Buttiauxella* sp./*Armillaria mellea*/*Fusarium* sp./antifungal activity/antibacterial activity
- AU ANDERLIČ, Andrej
- AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/ANŽLOVAR, Sabina (co-advisor)/BARIČEVIČ, Dea (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2012
- TI ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Thymus vulgaris* (L.) ESSENTIAL OIL
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X., 51 p., 18 tab., 9 fig., 3 ann., 67 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We have tested the antimicrobial activity of thyme's (*Thymus vulgaris* (L.)) essential oil (EO) against selected species and strains of bacteria *Escherichia coli* -K12, *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST131, *E. coli* 1138, *Bacillus cereus*, *Buttiauxella* sp., *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* and against fungi *Fusarium* sp. and *Armillaria mellea*. Antimicrobial activity was tested with the agar diffusion test and 0.1, 1 and 10 % concentration of EO. Different concentrations of EO were prepared by diluting EO with ethanol. Bacteria were incubated for 24 hours. Fungi were incubated until their growth reached any of the test wells. The growth of all bacteria stopped at concentrations higher than 1 % EO. The average diameters of inhibition zones of bacterial cultures with 1 % concentration of EO were between 1.9 mm in *S. aureus* and 3.9 mm in *Buttiauxella* sp. In 10 % EO inhibition zones were 5.6 mm in *K. pneumoniae* and 10.6 mm in *E. coli*-KM; ST 131, EO didn't have the same effect on fungi since growth was inhibited at concentrations higher than 10 % EO. The average diameters of inhibition zones were 4.1 mm in *Fusarium* sp. and 4.9 mm in *Armillaria mellea*. Among the tested bacteria there were also strains with known resistance to antibiotics, namely *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST 131, *E. coli* 1138 and *Klebsiella pneumoniae*. Results suggest the potential use of EO for growth inhibition against multidrug-resistant bacteria, as well as use against food spoilage bacteria and fungi, and thus protection against diseases and effects they cause.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZGODOVINA UPORABE ZDRAVILNIH RASTLIN	4
2.2 RASTLINSKE PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	5
2.2.1 Eterična olja	6
2.3 VRTNA MATERINA DUŠICA (<i>Thymus vulgaris</i> (L.))	10
2.3.1 Značilnosti materine dušice (<i>Thymus vulgaris</i> (L.))	10
2.3.2 Zgodovina	12
2.3.3 Zdravilni deli rastline in njihovi pripravki	13
2.3.4 Eterično olje timijana	14
2.4 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Escherichia coli</i>	15
2.5 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.6 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.7 BAKTERIJSKA VRSTA <i>Bacillus cereus</i>	19
2.8 BAKTERIJSKI ROD <i>Buttiauxella</i> sp.	20

2.9	GLIVNA VRSTA <i>Armillaria mellea</i>	21
2.10	GLIVA RODU <i>Fusarium</i> sp.	22
3	MATERIALI IN METODE	23
3.1	RASTLINSKI VZORCI	23
3.2	DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE	24
3.3	DESTILACIJA ZMESI OLJA IN VODE S PRIREJENIM DESTILATORJEM	26
3.4	KONCENTRIRANJE IN DOLOČANJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA Z APARATURO CLEVANGER	27
3.5	DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU	29
3.6	DOLOČANJE PROTIGLIVNE AKTIVNOSTI Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU	32
3.7	STATISTIČNE METODE	33
4	REZULTATI	34
4.1	KVALITETA RASTLINSKEGA MATERIALA	34
4.2	PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST	34
4.3	PROTIGLIVNA UČINKOVITOST	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.2	SKLEPI	47
6	POVZETEK	48
7	VIRI	50
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Glavne sestavine nekaterih EO, ki imajo protibakterijsko učinkovitost (Burt, 2004)	8
Pregl. 2: Taksonomska uvrstitev vrtno materine dušice (Martinčič in sod., 2007).....	11
Pregl. 3: Klasifikacija rodu <i>Klebsiella</i> po različnih avtorjih (Podschun in Ullmann, 1998)...	17
Pregl. 4: Uporabljene bakterijske vrste in sevi v poskusu	31
Pregl. 5: Koncentracije EO v protibakterijskih poskusih	32
Pregl. 6: Koncentracije EO v protiglivnih poskusih.....	33
Pregl. 7: Vsebnost vode v osušeni drogi vrtno materine dušice	34
Pregl. 8: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>E. coli</i> -K12.....	35
Pregl. 9: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>E. coli</i> -Z.	36
Pregl. 10: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti sevu <i>E. coli</i> -KM iz sekvenčne skupine ST 131.....	36
Pregl. 11: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>E. coli</i> 1138.....	37
Pregl. 12: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>S. aureus</i>	37
Pregl. 13: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>B. cereus</i>	38
Pregl. 14: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>Buttiauxella</i> sp.	38
Pregl. 15: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji <i>K. pneumoniae</i>	39
Pregl. 16: Studentov t-test za testiranje statističnih razlik v velikosti inhibicijske cone pri sevih bakterije <i>E. coli</i> , ki so rastle pri 1 in 10 % EO.....	40
Pregl. 17: Protiglivna učinkovitost raztopin EO proti glivi <i>Fusarium</i> sp.....	41
Pregl. 18: Protiglivna učinkovitost raztopin EO proti glivi <i>A. mellea</i>	41

KAZALO SLIK

Sl. 1: Strukturne formule nekaterih sestavin eteričnih olj (Burt, 2004)	9
Sl. 2: Vrtna materina dušica (<i>Thymus vulgaris</i> (L.))	12
Sl. 3: β -laktamski obroč (http://flashcarddb.com/cardset/140084-antibacs-i-anaerobes-oppor-infections-flashcards , http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/neopharma/neopharma2.html)	16
Sl. 4: <i>Staphylococcus aureus</i> (http://www.bioquell.com/technology/microbiology/staphylococcus-aureus/)	18
Sl. 5: <i>Bacillus cereus</i> (http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_cereus).....	19
Sl. 6: <i>Fusarium verticillioides</i> (http://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium).....	22
Sl. 7: Prirejen destilator s hladilnikom (kondenzatorjem)	27
Sl. 8: Aparatura Clevenger (http://medilabexports.com/lab-instruments_10_1.htm)	28
Sl. 9: Povprečni polmeri inhibicijskih con EO vrtna materine dušice proti izbranim bakterijam (N=3).	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *S. aureus*

Priloga B: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *E. coli*-K12

Priloga C: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *B. cereus*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp ^C _R	β-laktamaze razreda C
EO	eterično olje
ESBL	β-laktamaze z razširjenim spektrom (ang. Extended Spectrum Beta Lactamase)
EtOH	etanol
LD ₅₀	smrtonosni odmerek, ki ubije 50 % testiranih organizmov (ang. Lethal Dosage)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. Minimal Inhibitory Concentration)
PDA	krompirjevo gojišče (ang. Potato Dextrose Agar)
ST131	sekvenčna skupina 131 (sequence type 131)
TSB	gojišče triptični soja bujon (ang. Tryptic Soy Broth)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

1 UVOD

Uporaba naravnih proizvodov s terapevtskimi lastnostmi je stara toliko kot civilizacija sama. Dolgo časa so bili minerali in organski proizvodi glavni vir zdravilnih učinkovin (Rates, 2001). Najstarejša zeliščarska knjiga je verjetno delo kitajskega cesarja Shen Nunga, za katerega se smatra, da je živel 2700 let pr. n. š. (The lessons of ... , 2011). Hipokrat je že v 5. stol. pr. n. št. v svojih zapisih opisal 300 – 400 zdravilnih rastlin. Dioskorid je v 1. stol. n. št. napisal katalog zdravilnih rastlin – De Materia Medica, ki je postal prototip modernih farmakopej. Tudi Biblija opisuje približno 30 zdravilnih rastlin (Cowan, 1999).

Z industrijsko revolucijo ter razvojem organske kemije je narasla uporaba sintetičnih proizvodov za farmakološke namene. Razlogi za to so enostavno pridobivanje čistih spojin, s strukturnimi spremembami pa so pridobili tudi močnejša in varnejša zdravila. S tem se je krepila tudi finančna moč farmacevtskih družb. V industrializiranih zahodnih družbah so namreč rastlinske droge obravnavali kot versko praznoverje oz. so tak način zdravljenja pripisovali revnejšim, neizobraženim ljudem (Rates, 2001).

V zadnjih letih narašča zanimanje za alternativne terapije in s tem uporaba naravnih rastlinskih proizvodov v terapevtske namene. Razlogov je veliko. Klasična (konvencionalna) medicina je lahko neučinkovita, pojavljajo se stranski učinki zaradi nepravilne uporabe oz. zlorabe sintetičnih zdravil. Poleg tega obstaja velik del svetovne populacije, ki nima dostopa do klasičnega zdravljenja (Rates, 2001).

Zato postaja klasična medicina vedno bolj dovzetna za uporabo protimikrobnih učinkovin izoliranih iz rastlin. Rastlinske protimikrobne učinkovine predstavljajo alternativo sintetičnim proizvodom. Zanimive so predvsem iz dveh vidikov: za zdravljenje okužb in za preprečevanje kvarjenja hrane. Hkrati z izumiranjem rastlinskih vrst se vse bolj veča tudi zavedanje, da se s tem zmanjšuje tudi možnost odkrivanja novih rastlinskih protimikrobnih učinkovin (Cowan, 1999).

Med znanimi rastlinskimi vrstami je le majhen odstotek takih, ki so fitokemično raziskane, še manj je takih, ki so farmakološko in zdravstveno raziskane (Rates, 2001). Zelo malo rastlin uporabljamo za prehrano ljudi in živali, po ocenah le 1 – 10 % (Cowan, 1999).

Vse večje potrebe po varni in naravni hrani, brez prisotnih kemičnih konzervansov so spodbudile raziskovanje protimikrobnih učinkov naravnih sestavin. Izsledki številnih raziskav so potrdili protimikrobne učinke eteričnih olj (EO) v modelnih suspenzijskih kulturah in živilih (Dimitrijević in sod., 2006). Naravne protimikrobne učinkovine morajo delovati proti širokemu spektru kvarljivcev in hkrati sinergistično učinkovati z milimi načini konzerviranja (Smole Možina in sod., 2009).

Ocene kažejo, da 30 % ljudi razvitih držav vsako leto zboli zaradi okužb s hrano, prav tako so raziskave pokazale, da je v letu 2000 vsaj dva milijona ljudi po celem svetu umrlo zaradi diareje. Zato je vedno večja potreba po novih metodah zmanjševanja oz. odstranjevanja patogenov, po vsej verjetnosti v kombinaciji z obstoječimi metodami. Obenem se v zahodnem svetu pojavlja trend »zelenega« potrošništva, ki stremi k zmanjšanju sintetične hrane in dodatkov ter k proizvodom z manjšim negativnim vplivom na okolje. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je obenem pozvala k zmanjšani porabi soli zaradi naraščajočih srčno-žilnih bolezni. Če se bo količina soli v hrani res zmanjšala, je velika verjetnost, da se bo zaradi ohranjanja varnosti živil količina ostalih dodatkov povečala (Burt, 2004).

Eterično olje (EO) materine dušice se uporablja kot antiseptik v mnogih farmacevtskih pripravkih ter kot začimbno sredstvo v živilski industriji (Papageorgio, 1980). Protiglivne in protibakterijske učinke EO rastlinskega rodu *Thymus* so raziskovali mnogi raziskovalci (Cruz in sod., 1989; Karaman in sod, 2001; Rasooli in Mirmostafa, 2003; Rota, 2004), vendar je raziskav, ki bi obravnavale različne seve iste bakterijske vrste in proti antibiotikom odporne bakterije, le peščica.

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Namen oz. cilji diplomskega dela so bili naslednji:

- določiti protibakterijsko in protiglivno učinkovitost EO vrtno materine dušice,
- ugotoviti, ali obstajajo razlike v delovanju proti različnim sevom ene bakterijske vrste,
- ugotoviti, ali deluje EO protibakterijsko tudi na seve bakterij, ki se pojavljajo v živilski industriji,
- ugotoviti in dokazati protibakterijsko učinkovitost EO proti antibiotikom odpornim bakterijskim vrstam,
- ugotoviti, ali deluje EO zaviralno na rast gliv *Fusarium* in *Armillaria*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- EO vrtno materine dušice ima protibakterijsko in protiglivno učinkovitost.
- Različni sevi bakterije *E. coli* so različno odporni proti EO vrtno materine dušice.
- EO vrtno materine dušice zavira rast sevov bakterij *E. coli* 1138 in *Buttiauxella* sp., ki sta bila izolirana iz živil.
- EO ima protibakterijsko učinkovitost proti antibiotikom odpornim bakterijskim vrstam (*E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST 131, *E. coli* 1138, *K. pneumoniae*).
- EO vrtno materine dušice zavira rast gliv *Fusarium* sp. in *Armillaria mellea*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA UPORABE ZDRAVILNIH RASTLIN

Zgodovina pridelave in gojenja zdravilnih rastlin je prepletena z zgodovino ljudi in civilizacije. Danes izhajamo iz tega, da so ljudje že od nekdaj uporabljali rastline v zdravilne namene (Bown, 2002). Divje rastoče rastline so ljudje že v najzgodnejših časih uporabljali za hrano, zdravila, vlakna, surovine in sredstvo menjave (Bown, 2002).

Prve pisane vire o zdravilnih rastlinah zasledimo vsaj pred 5000 leti v zgodovini Sumercev, a arheološki zapisi predvidevajo še starejšo uporabo rastlin (Raskin, 2002). Med drugimi ohranjenimi viri velja omeniti dva zelo obsežna primerka medicinskih papirusov, znana kot papirus Ebers in papirus Smith. Zvitka izvirata iz obdobja 1600 let pr. n. št. Tudi tradicionalna indijska medicina že tisočletja sledi celostni zasnovi ajurvede »polnega življenja«. Le-to so zapisali pred več kot 3000 leti v »štiri temeljne knjige znanosti«, imenovane Vede. V zgodovinskih virih je skupno navedenih okrog 3000 različnih rastlin, ki so se uporabljale v medicinske namene. Iz Mezopotamije, zibelke naše civilizacije, izhajajo najstarejši zapisi o farmacevtski praksi. Glinene tablice iz obdobja 2600 let pr.n.št. so vsebovale medicinska besedila o raznih boleznih. O zgodnji grški medicini vemo malo. Marsikaj se je razvilo iz egipčanskih virov. Hipokratova šola je razvila nauk o štirih elementih, ki je bistveno zaznamoval zahodnjaško medicino vse do novega veka. Teofrastova Zgodovina rastlin (*Historia plantarum*) velja za prvo ohranjeno strnjeno delo o rastlinah. Že Teofrastov učitelj Aristotel je že pisal botanične študije, od katerih se je večji del izgubil. Grška medicina je močno zaznamovala tudi rimsko medicino. S področja, ki močno zaznamuje zdravilstvo, poznamo delo O zdravilnih snoveh (*De materia medica*) Pedaniosa Dioskurida. Njegovo delo obsega napotke za rabo približno 600 rastlin in je vse do zgodnjega srednjega veka veljalo za standardno medicinsko delo. V Rimu je deloval Klavdij Galen, ki je zapustil izjemno kompleksne recepture in velja za najpomembnejšega zdravnika antike po Hipokratu (Grünwald, 2006). Po njem farmacija poimenuje izdelke iz rastlin (Baričević, 1996a).

Še pred slabimi dvesto leti so bila naravna zdravilna sredstva edina zdravila, ki jih je imel človek na voljo (Raskin, 2002). Preprosti ljudje so večino znanja o zdravilnih rastlinah in metodah, kako jih uporabljati, prenašali iz generacije v generacijo z ustnim izročilom. Sčasoma so začeli te informacije beležiti v zeliščarske knjige (Škrinjar, 2009). Kako so stara omikana ljudstva pridobila to znanje, ne vemo, ampak moderne raziskave so pokazale, da so njihove ideje učinkovite (Zaika, 1987).

Močna zgodovinska povezava med rastlinami in človekom se je začela počasi razpletati po letu 1897, ko je Friedrich Bayer s sodelavci predstavil svetu sintetično acetil salicilno kislino (aspirin) (Raskin, 2002).

Rastlin niso uporabljali le v zdravstvene namene, ampak tudi za začinjanje in konzerviranje hrane. Odkritja arheologov so pokazala, da so ljudje že 50000 pr. n. št. uporabljali rastlinske liste za začinjanje mesa. Tudi Rimljani in Grki so zelišča uporabljali za konzerviranje hrane, saj protimikrobne učinkovine v rastlinah zavirajo rast mikroorganizmov in s tem podaljšujejo obstojnost živil (Kaefer in Milner, 2008).

Protimikrobna učinkovitost ni odvisna samo od vrste začimbe ali zdravilnega zelišča, ampak tudi od tipa živila in mikroorganizma, proti kateremu deluje, pa tudi od kemične sestave in vsebine ekstraktov ali EO (Škrinjar, 2009).

2.2 RASTLINSKE PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Rastline poleg vrstno nespecifičnih primarnih metabolitov, med katere sodijo ogljikovi hidrati, aminokisliline, maščobne kisline, nukleinske kisline in njihovi polimeri, sintetizirajo tudi sekundarne metabolite. Primarni metaboliti so v rastlinskem organizmu neposredno povezani z energijskim metabolizmom in so bistveni za sintezo strukturnih elementov ter za rast in razvoj rastlin. Sekundarni metaboliti pa nimajo bistvene vloge pri rasti in razvoju rastlin, ampak imajo predvsem ekološko vlogo. Primarni in sekundarni metabolizem sta med seboj tesno povezana, zato ločnica med njima ni vedno jasna (Baričević, 1996a).

Na določeni stopnji ontogenetskega razvoja rastline nastajajo sekundarni metaboliti v specifičnih razmerah, saj je njihova sinteza vezana na prilagajanje fiziološkim in ekološkim posebnostim. Na primer, mnogo sekundarnih metabolitov v rastlini nastaja z namenom kontrole razvoja sosednjih organizmov. Zato je treba pri proučevanju in pojasnjevanju proizvodno-ekološkega ozadja sekundarnih metabolitov, poleg genetskih in taksonomskih značilnosti, upoštevati tudi številne ekološke parametre (Baričevič, 1996a).

2.2.1 Eterična olja

Eterična olja, imenovana tudi hlapna olja (aetherolea), so hlapne zmesi, sestavljene iz različnih biogenih spojin, med katerimi prevladujejo mono- in seskviterpeni in aromatski fenilpropanovi derivati (Baričevič, 1996a). EO so aromatične oljne tekočine, pridobljene iz rastlinske droge; cvetov, popkov, semen, listov, vejic, skorje, zelišča, lesa, sadežev in korenin (Burt, 2004).

Za njih je značilno, da so hlapljiva, močnega vonja (večinoma prijetnega) in na papirju ne puščajo madežev. EO najpogosteje vsebujejo vrste iz družin ustnatic (Lamiaceae), kobulnic (Apiaceae), rutičevk (Rutaceae), lovorovk (Lauraceae) in mirtovk (Myrtaceae). Pridobivajo jih z različnimi metodami; s stiskanjem, vrenjem, enfleražo ali z ekstrakcijo. Najpogostejša metoda pridobivanja je s parno destilacijo ali z ekstrakcijo s topili (Petauer, 1993).

Že dolgo je znano, da nekatera EO učinkujejo protimikrobno in le-ta so v preteklosti s pridom uporabljali. Nedavno povečano zanimanje za »zeleno« potrošništvo je pripeljalo do obuditve znanstvenega zanimanja za protibakterijske in druge lastnosti zelišč (Burt, 2004).

Številne študije so potrdile protimikrobno učinkovanje rastlinskih ekstraktov, tudi proti patogenom v hrani. Poleg protibakterijskih imajo tudi protivirusne, protiglivne, protiparazitske, insekticidne in druge lastnosti (Burt, 2004).

Delovanje EO je prav tako raznoliko kot njihova sestava; lahko imajo lokalni protibolečinski učinek, delujejo proti črevesnim zajedavcem, proti vnetjem, razkuževalno,

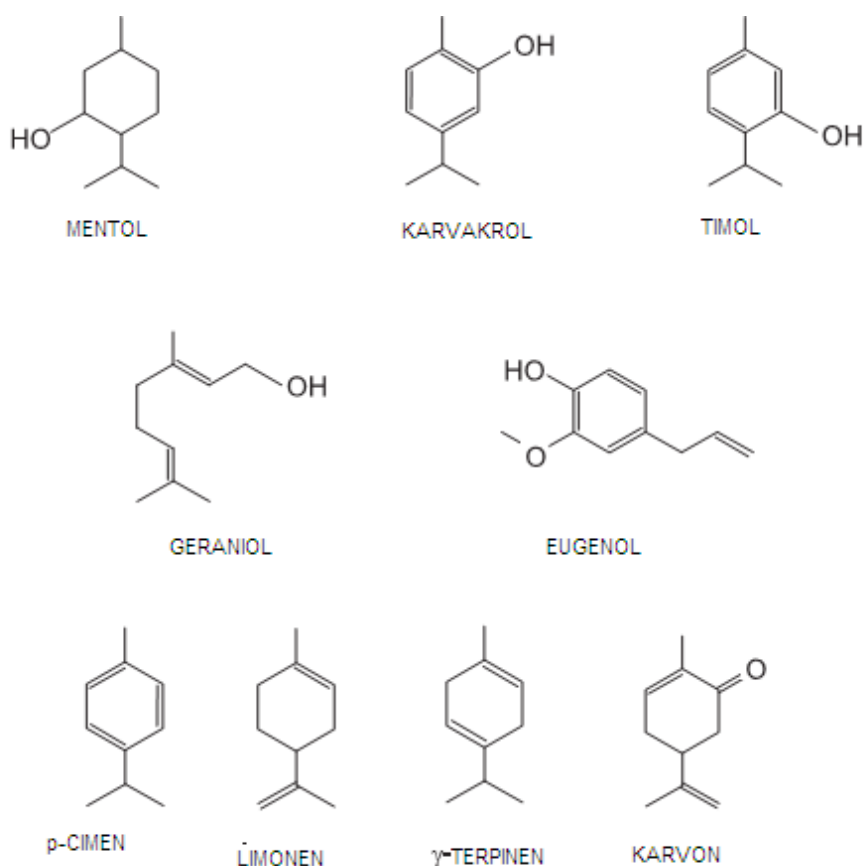
proti krčem, proti kašlju, so diuretiki, izzovejo menstruacijo, pospešujejo tvorbo žolča, odganjajo črevesne vetrove, dražijo kožo, delujejo pomirjevalno, poživljajoče itd. (Petauer, 1993).

Pri ekstrakciji s pomočjo ogljikovega dioksida, nizkih temperatur in visokega pritiska, imajo EO boljše organoleptične lastnosti, vendar je tak način pridobivanja zelo drag. EO so hlapna, zato jih je potrebno shranjevati v nepredušni embalaži in v temi, da bi preprečili spremembe v njihovi sestavi. Za podrobno analizo sestavin EO uporabljamo plinsko ali masno spektrometrijo. EO lahko vsebujejo več kot 60 posameznih sestavin. Glavne sestavine lahko predstavljajo do 85 % vseh sestavin, medtem ko so druge prisotne samo v sledih (preglednica 1, slika 1). Znanstvene raziskave dokazujejo, da imajo sestavine v sledih kritično vlogo pri protimikrobnem delovanju, saj z glavnimi sestavinami učinkujejo sinergistično. To je bilo ugotovljeno na primeru žajblja, nekaterih vrst materine dušice in navadne dobre misli. V raziskavah so pomešali le nekatere glavne sestavine EO ter primerjali učinke te zmesi z učinki, ki jih ima EO. Ugotovili so, da ima EO večje protimikrobne učinke kot zmes glavnih sestavin EO (Burt, 2004).

Sestava EO določene rastlinske vrste je odvisna od različnih dejavnikov: časa žetve, geografske lege, uporabljenega rastlinskega dela, metode izolacije, sestave tal, itd. Tako je Delaquis s sod. (2002) dokazal, da imata EO pridobljeni iz semen ali iz mladih listov koriandra različno sestavo.

Preglednica 1: Glavne sestavine nekaterih EO, ki imajo protibakterijsko učinkovitost (Burt, 2004)

Slovensko ime	Latinsko ime	Glavna sestavina	Okvirni delež sestavine (%)	Vir
Koriander (semena)	<i>Coriandrum sativum</i> (L.)	linalool	70	Delaquis et al., 2002
Cimet	<i>Cinnamomum verum</i> (J.Presl)	trans-cinamaldehyd	65	Lens-Lisbonne et al., 1987
Origano	<i>Origanum vulgare</i> (L.)	karvakrol timol γ -terpinen p-cimen	V sledeh-80 V sledeh-64 2-52 V sledeh-52	Lawrence, 1984; Prudent et al., 1995; Charai et al., 1996; Sivropoulou et al., 1996; Kokkini et al., 1997; Russo et al., 1998; Daferera et al., 2000; Demetzos in Perdetzoglou, 2001; Marino et al., 2001
Rožmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> (L.)	α -pinen bornilacetat kamfor 1,8-cineol	2 – 25 0 – 17 2 – 14 3 – 89	Daferera et al., 2000, 2003; Pintore et al., 2002
Žajbelj	<i>Salvia officinalis</i> (L.)	α -pinen β -pinen 1,8-cineol α -tujon	4 – 5 2 – 10 6 – 14 20– 42	Marino et al., 2001
Nageljnovc žbice	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)	eugenol eugenol acetat	75– 85 8 – 15	Bauer et al., 2001
Materina dušica	<i>Thymus vulgaris</i> (L.)	timol karvakrol γ -terpinen p-cimen	10-64 2-11 2-31 10-56	Lens-Lisbonne et al., 1987; McGimpsey et al., 1994; Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999; Daferera et al., 2000; Juliano et al., 2000



Slika 1: Strukturne formule nekaterih sestavin eteričnih olj (Burt, 2004)

Sestava in protimikrobno delovanje nekaterih EO sta dobro raziskana, a o mehanizmih njihovega delovanja je le malo znanega. Glede na količino različnih sestavin v EO je velika verjetnost, da njihova protimikrobna aktivnost ni odvisna le od enega samega mehanizma delovanja ter da obstaja tudi več tarčnih mest, na katera delujejo (Burt, 2004).

Pomembna lastnost EO in njihovih sestavin je hidrofobnost, ki jim omogoča vgraditev v lipidni dvosloj bakterijske celične membrane. S tem rušijo strukturo membrane in jo delajo bolj prepustno. Celica lahko prenese majhno izgubo svoje vsebine, vendar so velike količine izgubljene vsebine lahko kritične za njen obstoj in na koncu privedejo do celične smrti. Ker se sestavine EO vežejo tudi na proteine v celični membrani, lahko preko prekursorjev povzročijo inaktivacijo določenih encimov ali poškodujejo genski material (Burt, 2004).

Na protimikrobno aktivnost vpliva tudi prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura (Kure, 2006). Pri nižjem pH se protimikrobna učinkovitost povečuje, saj se z nižanjem vrednosti pH hidrofobnost EO povečuje, to pa jim omogoča še lažje vrivanje v membrano tarčne celice. Velika količina lipidov v okolici celice zmanjša protimikrobno učinkovitost EO in njihovih sestavin, saj se le-te vežejo z drugimi lipidi, posledično pa se jih manj veže z lipidi v celični membrani. Visoke vrednosti soli pripomorejo k večjemu učinku EO, saj delujejo sinergistično z nekaterimi polifenoli (Burt, 2004). Splošno gledano imajo EO z največjim odstotkom fenolnih komponent največjo protibakterijsko učinkovitost (Burt, 2004).

Študije EO kažejo rahlo večje protibakterijske učinke na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije (Brenes, 2010). Chao s sodelavci (2000, cit. po Brenes, 2010) je raziskoval učinkovanje 45 različnih EO proti široki paleti mikroorganizmov iz osmih različnih rodov bakterij. Štirje od teh so bili po Gramu pozitivni, štirje po Gramu negativni. Prišli so do zaključka, da so bile po Gramu negativne bakterije bolj odporne kot po Gramu pozitivne.

2.3 VRTNA MATERINA DUŠICA (*Thymus vulgaris* (L.))

2.3.1 Značilnosti materine dušice (*Thymus vulgaris* (L.))

Slovensko ime za rod *Thymus* je materina dušica ali timijan, različna narečja in ljudska imena zanjo pa so tudi divji timijan, materin dušek, babja dušica, duša, dušje, bukvice, bukoviča, mačešica, materinka, timas, popovec, preprišč, prprišč, prežilka, poljska materina dušica, tuša (Petauer, 1993).

Preglednica 2: Taksonomska uvrstitev vrtna materine dušice (Martinčič in sod., 2007)

Kraljestvo	Plantae (rastline)
Deblo	Spermatophyta (semenke)
Poddeblo	Magnoliophytina (kritosemenke)
Razred	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Podrazred	Asteridae
Nadred	Lamianae
Red	Lamiales (usnatičevci)
Družina	Lamiaceae (ustnatice)
Poddružina	Nepetoidea
Rod	<i>Thymus</i> (L.) (materina dušica, timijan)
Vrsta	<i>Thymus vulgaris</i> (L.) (vrtna materina dušica, timijan)

Materina dušica je trajni, do 30 cm visok, močno olesenel polgrmiček, ki cveti od maja do septembra. Ima podolgovate do široko eliptične liste brez ali s pecljem, ki so običajno dolgi od 4 do 12 mm in široki 3 mm. Listi so nasprotno nameščeni. Imajo navzgor zavahane robove, zgornja površina listov je gola in temno zelena, spodnja pa dlakava in sivo zelena. Dlačice so lahko enocelične, vendar je več dvoceličnih, kolenasto oblikovanih, s kutikularnimi odebelitvami, redke so tricelične. Na prerezu lista so vidne številne žlezne celice, ki se nahajajo med povrhnjico in kutikulo. Dvoustnata čaša je zelena, pogosto z vijoličnimi lisami in cevasta. Zgornja ustna je upognjena nazaj in ima tri kratke zobce, spodnja ustna je daljša in dvodelna. Za cvetno čašo so značilne kratke, dozorevajoče dlačice v vratu. Po cvetenju se čašna cev zapre s krono dolgih in togih dlak. Cvetni venec je približno dvakrat daljši od čaše in neizrazito dvoustnat. Deli cvetnega venca so prekriti z enoceličnimi dlakami in žlezami z EO (Ahačič, 1998).



Slika 2: Vrtna materina dušica (*Thymus vulgaris* (L.))

Za družino ustnatic, kamor sodi rod *Thymus*, je značilno, da ima okoli 5500 različnih vrst, ki so razširjene po vsem svetu (največja pestrost je v Sredozemlju in prednji Aziji) (Jogan, 2001).

Timijan izvira iz Sredozemlja, kjer je sestavni del makije, njegovo pridelovanje je v svetu močno razširjeno, tudi v hladnejših območjih. Na večjih površinah ga pridelujejo v Franciji, Španiji, severni Afriki, Rusiji in Severni Ameriki. Za rast so ugodna lažja tla na apnenčasti podlagi, ne prenaša pa zamočvirjenih, kislih rastišč (Baričević, 1996).

2.3.2 Zgodovina

Ime *Thymus* bržkone izvira iz staroegipčanske besede »tam«, s katero so Egipčani imenovali timijanu podobno rastlino, ki so jo zaradi močnega aromatičnega vonja in razkuževalnega učinka uporabljali pri balzamiranju umrlih. Iz egipčanskega »tam« je nastalo grško poimenovanje »tymon«, pozneje pa latinsko »thymus«.

Opis timijana izpod peresa Plinija ml. se natančno ujema z rastlino, ki so jo Benediktinci v 11. stoletju prinesli v naše kraje in se je iz samostanskih vrtov razširila na kmečke vrtove. Najbolj zanesljivo potrditev najdemo pri poznavalcu zelišč škofu Albertu Magnusu, čigar opis in risba jasno označujeta vrtni timijan. Učinkovino timol je leta 1719 odkril Caspar Neumann, vendar je bil prepričan, da je to kafra. Šest let pozneje je Charles Brown popravil zmoto. Šele po zaslugi številnih uspehov v ljudskem zdravilstvu je znanstvena medicina postala pozorna na to edinstveno zdravilno snov (Willfort, 2006).

2.3.3 Zdravilni deli rastline in njihovi pripravki

Rastlinske droge so posušene rastline ali rastlinski deli, v stanju, sposobnem za skladiščenje (Baričevič, 1996a). V zdravilstvu se uporablja grobo zdrobljeno ali uprašeno drogo za izdelavo zdravilnih čajev, tekočih in suhih ekstraktov, tinktur in sirupov. Iz droge pridobivajo EO, iz katerega lahko izoliramo glavno sestavino timol (Ahačič, 1998).

Pri timijanu se kot drogo uporablja njegov nadzemni del (*Thymi herba*). V fitoterapiji uporabljamo drogo in pripravke na njeni osnovi kot sredstvo proti kašlju (sirup) (Baričevič, 1996).

Notranje se timijan uporablja pri suhem kašlju, oslovskem kašlju, bronhitisu, bronhialnem katarju, astmi, laringitisu, dispepsiji, gastritisu, diareji in mokrenju pri otrocih. Zunanje se ga uporablja pri angini, boleznih dlesni, revmatizmu, artritisu in glivičnih okužbah. Olje se uporablja za aromaterapijo, proti bolečinam, izčrpanosti, depresiji, okužbi zgornjih dihalnih poti, problemih s kožo in lasiščem (Bown, 2002).

Notranje deluje tako, da olajšuje izkašljevanje (ekspektorans) in sprošča krče bronhijev ter s tem olajšuje dihanje. Ekspektorativni učinek ima EO, predvsem sestavini timol in karvakrol. Timijan redči gost bronhialni izloček in povečuje gibanje migetalk. Poleg tega vpliva na sestavo in transport izločka ter s tem olajšuje izkašljevanje (Ahačič, 1996).

2.3.4 Eterično olje timijana

Droga vsebuje poleg čreslovin, flavonoidov in triterpenskih spojin tudi do 2,5 % EO. Glavni sestavini sta izomerna fenola timol (30 – 70 %) in karvakrol (3 – 15 %), ki ju spremljajo metoksi-timol, p-cimen, cineol, linalol in drugi terpeni (Baričević, 1996a) (slika 1).

Timol (slika 1), poznan tudi pod imenom 2-izopropil-5-metilfenol, spada med monoterenske alkohole. Ob ekstrakciji tvori bele kristale s prijetnim vonjem »po timijanu«. Je sestavina EO različnih rastlin. Pridobivajo ga iz EO rodu *Thymus*, vrste *Monarda didyma* (L.) in *Trachyspermum copticum* (L.) (Ahačič, 1996; Petauer, 1993).

Ima tudi protiglivno delovanje. Zaradi velike toksičnosti (LD_{50} za podgane je 980 mg/kg) in vplivov na zdravje (v manjših količinah lahko škoduje žlezi ščitnici) opuščajjo notranjo uporabo in ga ne dodajajo več zobnim pastam ter ustnim vodicam (Petauer, 1993; Szentandrašsy, 2004).

Karvakrol (slika 1) ali 2-p-cimenol z znanstvenim imenom 2-metil-5-(1-metil etil) fenol je terpenski fenol in je sestavina EO navadne mačje mete (*Nepeta cataria* (L.)), navadne dobre misli (*Origanum vulgare* (L.)), šetraja (*Saturea* sp.), in timijana (*Thymus* sp.). Čisti karvakrol je v obliki tekočine in močno draži kožo. Uporablja se v industriji dišav in kot razkužilo, zlasti kot fungicid. Uničuje tudi črevesne gliste. LD_{50} za podgane je 810 mg/kg. Za njegovo protimikrobno delovanje naj bi bila pomembna hidroksilna skupina ter prisotnost delokaliziranih elektronov na benzenskem obroču. (Kisko in Roller, 2005; Petauer, 1993).

Sestavina EO p-cimen (slika 1) ali 1-metil-4-(1-metil etil)-benzen, je biološki prekurzor karvakrola. Je monoterpen in sestavina EO velike trobelike (*Cicuta virosa* (L.)), rimske kumine (*Cuminum cyminum* (L.)), navadne dobre misli (*Origanum vulgare* (L.)), žajblja (*Salvia officinalis* (L.)), šetraja (*Saturea hortensis* (L.)) in timijana (*Thymus* sp.). Ob samostojni uporabi ima p-cimen v primerjavi s karvakrolom šibkejšo protimikrobno delovanje, saj p-cimenu manjka ena hidroksilna skupina, ki naj bi imela pomembno vlogo pri protimikrobni učinkovitosti (Kisko in Roller, 2005).

2.4 BAKTERIJSKA VRSTA *Escherichia coli*

Bakterijo je leta 1885 odkril nemški pediater dr. Theodor Escherich. Bakterija spada med γ -proteobakterije, družino *Enterobacteriaceae*. Je fakultativno anaerobna, gibljiva, po Gramu negativna bakterija paličaste oblike.

E. coli je del komezalne mikrobiote pri ljudeh in drugih toplokrvnih živalih, vendar lahko postane patogena ob padcu imunske odpornosti ali če se razširi v sicer sterilne dele telesa (ledvica, kri, dihala). *E. coli* lahko povzroča črevesne ali izvenčrevesne okužbe. Sevi, ki so bolj patogeni, imajo praviloma več genskih zapisov za dejavnike virulence. *E. coli* v črevesju sintetizira vitamin K in sodeluje pri ohranjanju ravnotežja mikrobne združbe. Ker je fakultativni anaerob, porablja kisik in s tem skrbi za anoksično okolje.

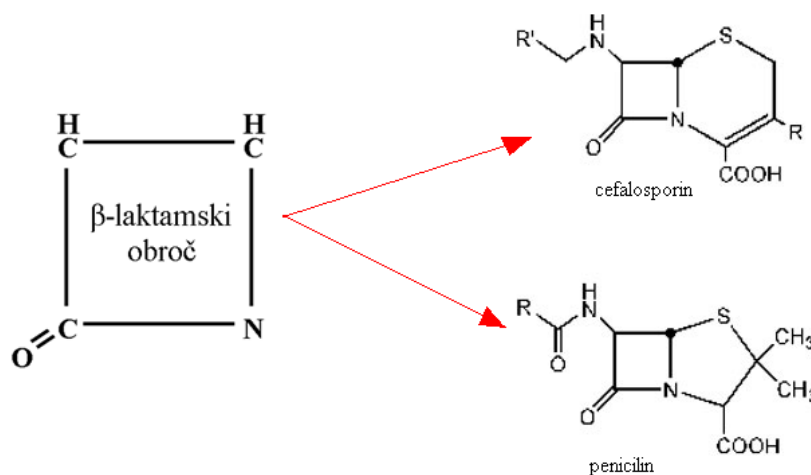
Protimikrobne snovi delujejo na različna tarčna mesta v bakterijski celici. Bakterijske okužbe lahko zdravimo s farmacevtskimi protimikrobnimi učinkovinami. Vendar je tako zdravljenje čedalje bolj težavno zaradi odpornosti sevov proti tem učinkovinam. Iz tega razloga išče stroka nove učinkovine v rastlinah, ki bi pomagale pri tej naraščajoči nevarnosti.

Odporne po Gramu negativne bakterije, ki so se razširile v zadnjem desetletju, izdelujejo številne encime, ki protimikrobne učinkovine razgrajujejo. Med najbolj problematične uvrščamo beta-laktamaze razreda C (AmpC) in beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL).

V zadnjih 8-ih letih predstavlja pomemben zdravstveni problem klonalna skupina ESBL-sevov *E. coli* z naborom številnih genov za virulentne dejavnike, ki ju uvrščamo v t.i. sekvenčni tip 131 (ST131).

Najpogosteje uporabljena protimikrobna sredstva so β -laktamski antibiotiki. Mednje spada tudi penicilin (Madigan in sod. 2003). Zaradi pogoste uporabe teh antibiotikov so bakterije sčasoma razvile odpornost tudi proti tem učinkovinam.

β -laktami so skupine antibiotikov, ki imajo osnovni β -laktamski obroč (slika 3). Beta laktami so inhibitorji tvorbe celične stene. Vežejo se na encime transpeptidaze, ki katalizirajo navzkrižno povezavo stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige, ki je sestavina celične stene bakterij. Celična stena je zaradi nepovezanih linearnih verig peptidoglikana zelo šibka. Transpeptidaze vežejo tudi peniciline in druge β -laktamaze, zato jih imenujemo tudi penicilin vezavni proteini (PBP-ang. Penicilin Binding Proteins). Takšni kompleksi β -laktamov in PBP povzročijo sproščanje avtolizinov, le-ti pa razgradijo že tako šibko celično steno in celica propade (Madigan, 2003).



Slika 3: β -laktamski obroč (<http://flashcarddb.com/cardset/140084-antibacs-i-anaerobes-oppo-infecions-flashcards>, <http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/neopharma/neopharma2.html>)

E. coli-KM; ST131 ima zapise za virulentne dejavnike, kot tudi zapise za odpornost proti β -laktamazam z razširjenim spektrom delovanja (ESBL). *E. coli*, ki pripada sekvenčni skupini 131, spada tudi v filogenetsko skupino B2, kar pomeni, da se fenotipsko loči od sevov iz drugih skupin, glede na razmere v katerih živijo, glede na odpornost proti različnim antibiotikom in glede na virulentni potencial. Večina *E. coli* iz sekvenčne skupine 131 pripada serološki skupini O25:H4. Ta skupina je povezana s hudimi zunaj črevesnimi okužbami in je pogosto izolirana iz krvi in trebušne tekočine obolelih. Ta skupina predstavlja velik zdravstveni problem, saj je odporna proti številnim protibakterijskim učinkovinam, prav tako je močno virulentna in vedno bolj razširjena (Nicolas-Chanoine in sod., 2008; Coelho in sod., 2011; Leflon-Guibout in sod., 2008; Tartof in sod., 2005).

2.5 BAKTERIJSKA VRSTA *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae spada v rod *Klebsiella*, ki ga je identificiral nemški bakteriolog Edwin Klebs. Ta rod uvrščamo med γ -proteobakterije, v družino *Enterobacteriaceae* (Podschun in Ullmann, 1998).

K. pneumoniae je po Gramu negativna, paličasta, negibljiva bakterija, ki vsebuje kapsulo iz polisaharidov. Je fakultativno anaerobna in fermentira laktozo. Je predstavnik normalne mikrobiote nosno-žrelne votline, kože in črevesja ljudi ter živali. *K. pneumoniae* je zraven *K. oxytoca* klinično najpomembnejši član rodu *Klebsiella* (Podschun in Ullmann, 1998).

Na površini bakterij *Klebsiella* so raziskovalci odkrili dva tipa antigenov, na podlagi katerih lahko rod razdelimo na različne seve. Sprva so rod delili na tri vrste *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* in *K. rhinoscleromatis* glede na bolezni, ki so jih povzročale. Z vedno boljšimi metodami razvrščanja in novimi odkritimi vrstami so se pojavile tri klasifikacije rodu (Preglednica 3).

Preglednica 3: Klasifikacija rodu *Klebsiella* po različnih avtorjih (Podschun in Ullmann, 1998)

Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	- subsp. <i>pneumoniae</i>
- subsp. <i>edwardsii</i>	- <i>sensu stricto</i>	- subsp. <i>ozaenae</i>
- subsp. <i>atlantae</i>	- <i>sensu lato</i>	- subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. "unnamed group"</i>	<i>K. planticola</i> (syn. <i>K. trevisanii</i>)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>

Sevi iz rodu *Klebsiella* so vzrok za osem % vseh bolnišničnih infekcij, kar uvršča ta rod med osem najbolj problematičnih bakterij. *K. pneumoniae* povzroča pljučnico, ki je zaradi

pogostih gnojnih abscesov in nekroze delov pljuč smrtna v 50 % primerov (Podschun in Ullmann, 1998).

Količina bakterij pri hospitaliziranih bolnikih je trikrat večja kot sicer in narašča s časom, ki ga bolnik preživi v bolnišnici. V zadnjem času vedno pogosteje prihaja do izbruhov bolnišničnih okužb s sevi iz rodu *Klebsiella*, ki so rezistentni proti velikemu številu protibakterijskih učinkovin med drugim tudi β -laktamskim antibiotikom. Vzrok je pogosta uporaba teh učinkovin, kar je povzročilo razvoj odpornosti pri teh bakterijah.

2.6 BAKTERIJSKA VRSTA *Staphylococcus aureus*



Slika 4: *Staphylococcus aureus* (<http://www.bioquell.com/technology/microbiology/staphylococcus-aureus/>)

S. aureus je po Gramu pozitivna bakterija (slika 4). Ko gledamo kolonije, rastoče na krvnem agarju pod mikroskopom, se posamezne celice združujejo v skupke, ki izgledajo kot grozdi. Prav zato je odkritelj tega rodu bakterij, Alexander Ogston, leta 1880 te poimenoval kot *Staphylococcus*, kar v grščini pomeni grozd. Rosenbach jim je zaradi zlatorumene barve dodal ime *aureus*. Vrsta spada v družino *Staphylococcaceae* in razred Bacilli (Food Doctors ... , 2011).

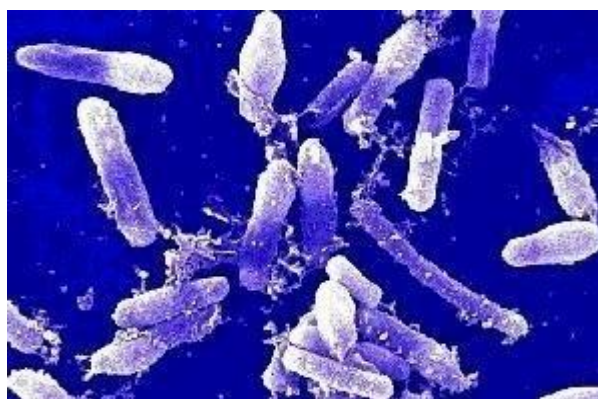
Pri približno 20 % zdravih posameznikov predstavlja *S. aureus* del normalne mikrobiote kože, kjer kolonizira številne predele, od nosu, kožnih gub, pazduh, dimelj, presredka in tudi žrela. Največ se jih nahaja ravno v nosu in žrelu. Okrog 30 % ljudi je le prenašalcev

klic, okrog 50 % pa jih sploh ni koloniziranih s to bakterijo. Najpogostejši vzrok za prenos je predvsem slaba higiena rok (Dancer, 2008).

S. aureus je eden izmed najpomembnejših povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Globalno gledano so bolezni, ki jih povzroča, tretje najbolj pogoste. Pri človeku so najpogostejše zastrupitve s hrano. Klinični znaki zastrupitve so slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu in driska, tudi dehidracija, glavoboli, krči, padec krvnega tlaka in nihanje telesne temperature. Smrtnih primerov je malo (Normanno in sod., 2007).

Število sevov bakterije *S. aureus*, ki imajo razvito protimikrobno odpornost narašča in povzroča vedno več težko ozdravljivih okužb, hkrati s tem tudi narašča tveganje za prenos te odpornosti na človeško mikrobioto preko hrane (Normanno in sod., 2007).

2.7 BAKTERIJSKA VRSTA *Bacillus cereus*



Slika 5: *Bacillus cereus* (http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_cereus)

Rod *Bacillus*, katerega predstavnik je tudi *B. cereus*, nosi svoje ime od leta 1872, ko je Ferdinand Cohn preimenoval *Vibrio subtili* v *Bacillus subtilis*. Vrsto *B. cereus* pa sta leta 1887 prva izolirala in opisala mikrobiologa Frankland in Frankland (Kramer in Gilbert, 1989).

B. cereus je po Gramu pozitivna, sporogena bakterija. Je paličaste oblike, velika 1 x 3-4 μm , gibljiva in ima peritriho nameščene bičke. Je ubikvitarna aerobna bakterija, njen primaren življenjski prostor pa je prst (Kramer in Gilbert, 1989).

Sev je prisoten v večini surovih živil, spore, s katerimi preživi neugodne življenjske pogoje, pa mu omogočajo, da se lahko ohrani skozi vse faze proizvodnje hrane, če temperatura obdelave ni dovolj visoka.

B. cereus povezujemo z dvema vrstama zastrupitev s hrano. Ena povzroča bruhanje, druga diarejo. Če je koncentracija *B. cereus* manj kot 10^3 /g živila, se ta ne smatra kot patogena, saj mora biti količina, ki povzroča zastrupitve pri človeku, večja od 10^5 /g živila (*Bacillus cereus ...*, 2011).

2.8 BAKTERIJSKI ROD *Buttiauxella* sp.

Bakterijski rod *Buttiauxella* je dobil ime po francoskem mikrobiologu Reneju Buttiauxu. Rod *Buttiauxella* spada v družino Enterobacteriaceae. Sevi iz tega rodu so po Gramu negativni, gibljivi s peritrihimi flageli, veliki $0,5 - 0,7 \times 2,3 \mu\text{m}$. Pojavljajo se v parih ali posamezno. So fakultativni anaerobi in kemoorganotrofi. Optimalna temperatura njihove rasti je med 25 in 35 °C, večina jih je psihrotolerantnih in rastejo tudi pri temperaturi 4 °C (hladilnik).

Leta 1996 so Müller in sod. opisali šest novih vrst *Buttiauxella*. Med seboj jih je fenotipsko zelo težko ločiti. Tipična vrsta *B. agrestis* je edina vrsta tega rodu, ki jo lahko identificiramo s pomočjo testa Api 20E. Stopnja sorodnosti vseh sedmih tipov sevov iz rodu *Buttiauxella* je zelo visoka (99,1 - 99,7 %), zato jih s pomočjo analize 16S rRNA lahko določimo le kot rod *Buttiauxella*, ne pa tudi vrste (Trontelj, 2010).

Čeprav so jo do sedaj največkrat izolirali iz polžev, je pogosto prisotna tudi v živilih, vendar je napačno identificirana kot *E. coli* (Ambrožič, 2012.).

O pomenu vrst iz tega rodu je znanega bolj malo, zato tudi patogenost za ljudi in živali ni povsem razjasnjena.

V Sloveniji so na Inštitutu za varovanje zdravja med letom 2007 in 2008 iz živil izolirali bakterije in jih identificirali kot *E. coli*. Leta 2010 so ugotovili, da je bilo izmed 124 sevov, sprva identificiranih kot *E. coli*, 26 sevov napačno identificiranih (Trontelj, 2010). Na podlagi molekularnih analiz so večino uvrstili v rod *Buttiauxella*.

2.9 GLIVNA VRSTA *Armillaria mellea*

Gliva *Armillaria mellea* ali sivo-rumena mraznica spada v skupino prostotrošnic (*Basidiomycetes*). Gre za glivo, ki je pogojno užitna (Ofentavšek, 2009). Poznamo jo tudi kot povzročiteljico mnogih težav, saj je poznana kot parazit približno 600 lesnih vrst. Povzroča gnilobo korenin dreves in različnih pridelkov (Perazzolli, 2010). Simptomi okužb dreves so vidni na nadzemnih delih, predvsem na krošnjah in listih. Za vrsto je značilna rahla bioluminiscenca.

Rod *Armillaria* je leta 1821 prvi opisal Elias Magnus Fries. Večina gliv iz tega rodu je saprofitov in živijo na razpadajočem lesu. *A. mellea* spada med parazitske predstavnike tega rodu. Do poznih 70. let je *A. mellea* med raziskovalci veljala za vrsto s široko paleto gostiteljev ter veliko razširjenostjo. Viri o *A. mellea* so bili v tistem času zelo zavajajoči. Različni raziskovalci so glivo obravnavali bodisi kot virulentni patogen ali kot oportunistični patogen. Tako se je z leti v rodu *Armillaria* pojavilo kar 274 vrst in varietet, vendar jih danes v rod *Armillaria sensu stricto* uvrščamo le okrog 40 (Burdshall in Volk, 1993).

2.10 GLIVA RODU *Fusarium* sp.



Slika 6: *Fusarium verticillioides* (<http://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium>)

Rod *Fusarium* spada v skupino zaprtotrosovnic (*Ascomycetes*). Je velik rod filamentoznih gliv, ki so zelo razširjene v prsti in povezane z rastlinami. Beseda »fusarium«, ki označuje ta rod, izhaja iz latinske besede »fusus«, kar pomeni vreteno.

Večina predstavnikov tega rodu je neškodljivih saprofitov, nekatere vrste pa proizvajajo mikotoksine, ki so škodljivi ljudem, živalim in rastlinam. Glavni toksini, ki jih ta rod proizvaja, so fumonizini in trihoteceni. Glive iz rodu *Fusarium* uvrščamo tudi v tako imenovane poljske plesni (*Fusarium verticillioides* ... , 2011).

Rod *Fusarium* vključuje nekatere ekonomsko pomembne patogene. Eden takih je *F. graminearum*, ki prizadene različne sorte žit (pšenica, koruza, ječmen, oves, rž) in izdelke iz teh žit (pivo, kruh, slad). Ta vrsta je prav tako odgovorna za bolezen krompirja, imenovana bela trohnoba krompirja. Med ekonomsko pomemben patogen uvrščamo tudi vrsto *F. oxysporum*. Ta vrsta povzroča pri nas hrastovo koreninsko trohnobo (Varstvo gozdov ... , 2011), v svetu pa je bolj poznana po škodi, ki jo dela na bananah (*Fusarium verticillioides* ... , 2011).

Nekatere vrste povzročajo tudi okužbe pri ljudeh. Pri ljudeh z normalnim imunskim sistemom, lahko vrste iz tega rodu povzročajo okužbe nohtov in roženice. Pri ljudeh, katerih imunski sistem je oslabiljen, pa lahko povzroča okužbe celotnega telesa. Mikoprotein iz vrste *F. venenatum* se uporablja tudi konvencionalno kot sestavina pri kuhanju.

3 MATERIALI IN METODE

V nalogi smo ekstrahirali EO vrtno materine dušice in ugotavljali njegovo protimikrobno učinkovitost. Izmerili smo tudi vsebnost vode v materini dušici.

Delo je potekalo na kolekcijskem vrtu Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani in sicer v obdobju med marcem in oktobrom 2010. EO smo pridobili z vodno destilacijo s prirejenim destilatorjem ter z aparaturom Clevenger. Protiglivno in protibakterijsko učinkovitost smo testirali v laboratoriju Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, v obdobju med marcem in majem 2011.

3.1 RASTLINSKI VZORCI

Semena vrtno materine dušice (*Thymus vulgaris* (L.)) sorte Deutscher Winter smo posejali marca 2010 na kolekcijski vrt Biotehniške fakultete v Ljubljani (Ljubljana, Jamnikarjeva 101).

Geografska širina (S): 46°2'53.7"

Geografska dolžina (V): 14°28'30.47"

Nadmorska višina: 292 m.

Na prostem so rastline rastle do oktobra, ko smo poželi nadzemne dele necvetočih rastlin vrtno materine dušice, jih stehali in še sveže prenesli v prirejen destilator. Z njim smo iz rastlinskega materiala ekstrahirali EO in vodo. Vse skupaj smo prenesli v laboratorij, kjer smo z aparaturom Clevenger skoncentrirali EO ga ulovili v vialo iz temnega stekla in te shranili v hladilnik za nadaljnje analize.

Obenem smo iz požetih rastlin vzeli naključen vzorec (od 46-54 g), ki smo ga v označenih papirnatih vrečkah 3-4 dni sušili do stalne mase v ventilacijskem sušilniku pri 40 °C. Po

opravljenem sušenju smo rastline spet stekali (od 21-26 g) ter jih uskladiščili do nadaljnjih analiz.

Po nabranem naključnem vzorcu smo s trsnimi škarjami poželi še preostale nadzemne dele rastlin in jih dali v posodo destilatorja, ki smo jo predhodno stekali (3,96 kg). Posodo z rastlinami smo ponovno stekali, si zapisali maso (7,65 kg) in vse skupaj prenesli v prirejen destilator.

Ob tem je treba omeniti, da so bile rastline med poplavami, ki so trajale od 16.-20. septembra 2010, približno 4 dni poplavljene. Po treh tednih so začele kazati znake stresa zaradi poplavljenosti (odpadanje listov, rumenenje poganjkov). Zato smo jih poželi še pred cvetenjem. Zato dopuščamo možnost, da so ti dogodki vplivali na kakovost in količino EO v drogi, kot tudi na njegovo protiglivno in protibakterijsko učinkovitost.

Uporabljeno orodje in aparature:

- trsne škarje,
- tehtnica,
- beležka in svinčnik,
- posoda destilatorja,
- papirnate vrečke (za sušenje zelišča pri 40 °C v ventilacijskem sušilniku),
- sušilnik s krožno ventilacijo.

3.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE

Za določanje vsebnosti vode smo morali posušeno drogo najprej zmleti.

Uporabljen material:

- posušen rastlinski material (glej: 3.1 Rastlinski vzorci)

Uporabljene aparature:

- vodno hlajen analitski mlinček,

- steklene posodice z navijalnimi pokrovčki za shranjevanje zmletih vzorcev,
- tehtiči za določanje izgube vode pri sušenju,
- eksikator,
- sušilnik,
- tehtnica,
- spatula.

Mletje vzorcev

Posušen rastlinski material smo nadrobili in stresli v vodno hlajen analitski mlinček. V mlinček smo dali vsaj 5-10 g vzorca. Mleli smo toliko časa, da se je ves rastlinski material uprašil.

Uprašen material smo s pomočjo spatule prenesli v steklene posodice z navijalnimi pokrovčki.

Določanje vsebnosti vode

Vsebnost vode smo določali z metodo izgube vode pri sušenju na 105 °C. Tehtiče smo pred uporabo očistili, osušili in stehtali. Vanje smo dodali po 1 g uprašenega rastlinskega materiala in jih ponovno stehtali. Odprte smo čez noč sušili v sušilniku na 105 °C do stalne mase. Po sušenju smo tehtiče začepili, jih ohladili v eksikatorju ter ponovno stehtali.

Izračun vsebnosti vode, podane kot masni delež [%]:

$$(m_1 - m_2) / (m_1 - m_t) * 100 \quad \dots(1)$$

kjer je:

m_1 – masa tehtiča in vzorca pred sušenjem [g],

m_2 – masa tehtiča in zračno osušenega vzorca [g],

m_t – masa tehtiča [g].

3.3 DESTILACIJA ZMESI OLJA IN VODE S PRIREJENIM DESTILATORJEM

Uporabljeni materiali:

- droga vrtne materine dušice (*Thymi herba*),
- vodovodna voda,
- čaše,
- erlenmajerice (1000 ml),
- parafilm.

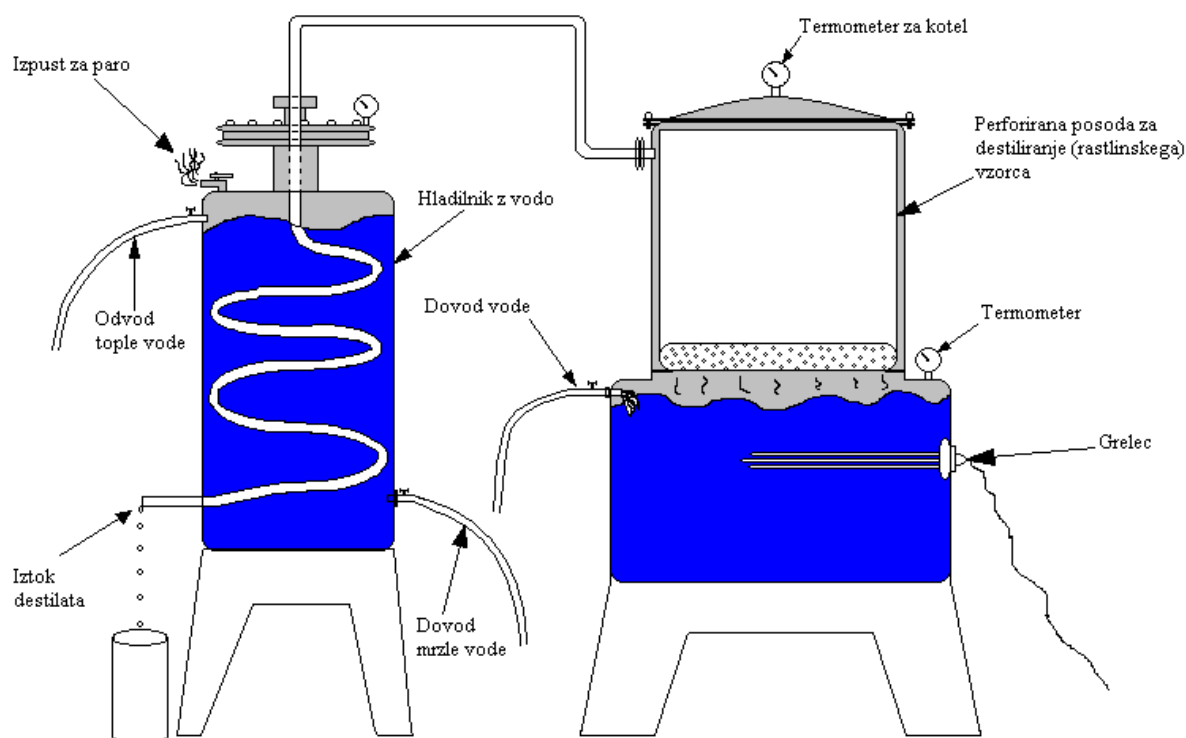
Uporabljene aparature:

- prirejen parni destilator in hladilnik (kondenzator)

Postopek:

V kotel prirejenega parnega destilatorja (slika 7) smo nalili toliko vode, da je bil grelec približno 5 cm pod vodno gladino. Nad vodo smo dali posodo s perforiranim dnom, da je para potovala čez sveže požet timijan. Kotel smo tesno zaprli, zatem pa napolnili še hladilnik z mrzlo vodo.

Parni kotel deluje po principu vodne destilacije. Zaradi visokih temperatur se začne vsebina oljnih celic raztezati. Poveča se tlak znotraj celic, ki zaradi tega popokajo. Olje izpari s tokom vodne pare ter se začne v prehodu skozi hladilnik kondenzirati. Destilat, ki priteče iz hladilnika, ujamemo v bučo, čašo ali drugo posodo.



Slika 7: Prirejen destilator s hladilnikom (kondenzatorjem)

Prižgali smo grelec in počakali, da je temperatura vode v kotlu narasla na 90 °C. Nato smo zmanjšali temperaturo grelca in le zmerno segrevali, da je destilacija potekala počasi. Destilat, ki je iztekal iz hladilnika, smo ujeli v čašo. Obenem smo vodo v hladilniku še dodatno hladili, tako da smo dovajali svežo mrzlo vodo v hladilnik, odvajali pa toplo iz hladilnika. S tem smo izboljšali kondenzacijo destilata. Destilacija je potekala približno 1,5 ure oz. vse dokler smo na vrhu tekočine še videli tanek film EO. Po končani destilaciji smo čaše z destilatom nemudoma odnesli v laboratorij, kjer smo ga prelili v 1000 ml erlenmajerice po 500 – 700 ml in jih pokrili s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje. Erlenmajerice z destilatom smo shranili na sobni temperaturi in v temi za nadaljnjo obdelavo.

3.4 KONCENTRIRANJE IN DOLOČANJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA Z APARATURO CLEVINGER

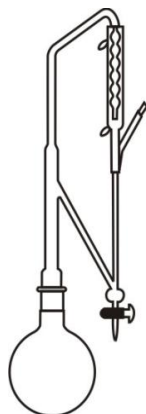
Uporabljen material:

- destilat,

- destilirana voda,
- detergent,
- buča (1000 ml),
- stojalo,
- čaše,
- grelec,
- vialo iz temnega stekla,
- beležka in svinčnik.

Uporabljene aparature:

- aparatura Clevenger (slika 8)



Slika 8: Aparatura Clevenger (http://medilabexports.com/lab-instruments_10_1.htm)

Postopek:

EO smo zgostili v aparaturi Clevenger. Bučko z destilatом smo postavili na grelec, jo povezali s aparaturo Clevenger in segrevali na maksimalni stopnji (10) dokler vsebina ni zavrela. Ob vrenju smo temperaturo znižali na stopnjo 5-6 in s tem preprečili nastajanje mehurčkov. Destilacija je potekala najmanj 30 min, oz. dokler nismo ocenili, da so kondenzirane oljne kapljice v hladilniku manjše od 1 mm. Na koncu destilacije smo odčitali volumen EO v aparaturi in ga odlili v vialo iz temnega stekla. Le-te smo do nadaljnjih poskusov shranili v hladilnik pri 4 °C.

Izračun vsebnosti EO v drogi [ml/kg]:

$$V_E / m_0 * 1000 \quad \dots(2)$$

kjer je:

V_E – odčitani končni volumen EO [ml],

m_0 – masa celotnega svežega vzorca [g].

Ker droge, iz katere smo ekstrahirali olje, nismo sušili, ampak smo uporabili svežo, in ker smo priredili tudi postopek destilacije (z destilatorjem), pri čemer je lahko prišlo tudi do precejšnje izgube EO, je izračun vsebnosti EO zgolj informativen.

3.5 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testne seve smo uporabili tako po Gramu pozitivne bakterijske vrste (*B. cereus* in *S. aureus*) ter po Gramu negativne vrste (*Buttiauxella*, *K. pneumoniae* in različne seve *E. coli*) (preglednica 4).

Zgoraj naštete bakterije smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale po 10 ml avtoklaviranega tekočega LB-gojišča. Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2,5 g gojišča Luria Broth (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v tri erlenmajerice. Erlenmajerice z nacepljenim gojiščem smo preko noči stresali pri 200 obratih/min in pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo pripravili agar, ki smo ga naredili z raztapljanjem 25 g gojišča Luria Broth in 15 g agarja v 1 l deionizirane vode. Raztopino smo prelili v tri enolitrske erlenmajerice, ki smo jih pokrili z aluminijasto folijo in avtoklavirali. Vroče gojišče smo pustili, da se ohladi na primerno temperaturo (približno 42 °C). Prekonočne bakterijske kulture smo sterilno prenesli v ohlajeno gojišče ter dobro premešali. Sledilo je razlivanje gojišča, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili v deset Petrijevih plošč. Tako smo pripravili po 10 plošč z bakterijskim sevom za vrste *Escherichia coli*-K12, *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST

131, *E. coli* 1138, *Bacillus cereus*, *Buttiauxella* sp., *Klebsiella pneumoniae* in *Staphylococcus aureus* (preglednica 4). Skupaj smo pripravili 80 plošč z osmimi različnimi bakterijskimi kulturami. Le-te smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Pred začetkom poskusa, s katerim smo ugotavljali protibakterijsko učinkovitost EO, smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsaki plošči izvrtali štiri jamice premera 7 mm. V vsako od njih smo za poskus dodali 30 µl vzorca EO, ki smo predhodno redčili s 96 % etanolom v različnih razmerjih, da smo pripravili koncentracijsko vrsto.

Za preliminarne poskuse, ki smo jih naredili z bakterijami *S. aureus*, *E. coli*-K12 in *B. cereus*, smo uporabili različne volumne in koncentracije, ki so nam služile kot orientacija kako postopati naprej. Z njimi smo ugotovili faktor redčenja eteričnega olja s 96 % etanolom in volumen raztopine, ki je bil primeren za izvajanje poskusa z difuzijskim testom na agarju. V prvih dveh preliminarnih poskusih smo redčili EO z etanolom v razmerju 1:1. To razmerje ni bilo ustrezno saj je prihajalo do prekrivanj inhibicijskih con. Zato smo v tretjem preliminarnem poskusu naredili koncentracijsko vrsto redčitev EO od 33 - 4 % (Priloge: preglednice 19-21). S tem smo ugotovili okvirno inhibitorno koncentracijo EO, pri kateri ni prihajalo do prekrivanj inhibicijskih con.

Preglednica 4: Uporabljene bakterijske vrste in sevi v poskusu

uporabljene vrste	fenotip	vir
<i>Bacillus cereus</i>	-	Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>Buttiauxella</i> sp.	-	Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
sevi <i>E. coli</i>	fenotip	vir
<i>E. coli</i> -K12	-	Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>E. coli</i> -Z	AmpC	Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>E. coli</i> -KM; ST 131	ESBL	Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>E. coli</i> 1138	ESBL	Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

V prvih dveh preliminarnih poskusih smo v jamice nanegli 100 µl vzorca, vendar je pri prenosu zaradi prevelike količine vzorca prihajalo do razlivanja raztopine, zato smo volumen zmanjšali s 100 µl na 30 µl (preglednice 19-21).

V zadnjem, četrtem preliminarnem poskusu smo pripravili koncentracijsko vrsto rečitev od $10 \cdot 10^{-4}$ EO v etanolu. Te koncentracije so se izkazale za najbolj primerne, saj so bile cone inhibicij primerno velike in ni prihajalo do njihovih prekrivanj, kar bi onemogočalo meritve. Kot kontrolo smo v vseh poskusih uporabili 96 % etanol (preglednica 5).

Preglednica 5: Koncentracije EO v protibakterijskih poskusih

Št. jamice	Redčitev (EO : etanol)	Koncentracija EO (%)
1	1:10	10
2	1:100	1
3	1:1000	0,1
4	etanol	0 (kontrola)

Tako smo določili okvirno minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), oz. najnižjo koncentracijo, pri kateri EO še vedno zavira rast bakterij. Rezultati so predstavljeni v prilogah.

V raziskavi smo uporabili določene bakterijske seve, ki so bili odporni proti najbolj pogosto uporabljenim antibiotikom *E. coli*-Z, *E. coli*-KM; ST131 in sev *E. coli* 1138. Odporen sev je bili tudi sev *K. pneumoniae* (opisi rezistenc so v Pregledu objav in preglednici 4). Rod *Buttiauxella* sp. pa spada med problematične seve, ker je njena patogenost slabo raziskana, saj prihaja do zelo pogostih zamenjav z *E. coli*, je pa verjetno pogosto prisotna v živilih (Ambrožič, 2012).

Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo plošče z bakterijskimi kulturami pregledali, poslikali s fotoaparatom (Canon EOS 1000D, Canon, Japonska), avtoklavirali in zavrgli. Fotografije smo pozneje obdelali z računalniškim programom ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Za vsako bakterijo smo naredili tri ponovitve.

3.6 DOLOČANJE PROTIGLIVNE AKTIVNOSTI Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU

Protiglivno aktivnost vzorcev smo testirali z difuzijskim testom na gojišču PDA. Kot testna seva smo uporabili seva gliv *Fusarium* sp. in *Armillaria mellea*. Oba seva sta v zbirki Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Obe glivi smo sterilno prenesli iz trdega krompirjevega gojišča (PDA). S spatulo smo izrezali kvadratke z dolžino stranice 5 mm, te kocke gojišča PDA in glive smo sterilno prenesli na sredino predhodno pripravljenih gojišč PDA. Gojišča PDA smo pripravili tako, da smo v enolitrsko erlenmajerico nalili 500 ml deionizirane vode in v njej raztopili 21 g gojišča PDA. Raztopino smo pokrili z aluminijasto folijo in 20 minut avtoklavirali pri 121 °C. Vroče gojišče smo pustili, da se ohladi do temperature približno 42 °C, potem pa ga razlili v 20 Petrijevih plošč po 20 ml. Plošče s preneseno glivo smo pokrili, ovili z aluminijasto folijo in dali v omaro, kjer so rastle pri sobni temperaturi in v temi. Rasti smo jih pustili, dokler ni bila cona rasti približno 3-4 cm od roba petrijevke. Takrat smo s steriliziranim plutovrtom naredili 4 jamice s premerom 7 mm. V vsako od njih smo za poskus dodali 30 µl vzorca EO, ki smo ga predhodno redčili s 96 % etanolom do različnih končnih koncentracij (preglednica 6).

Preglednica 6: Koncentracije EO v protiglivnih poskusih

Št. jamice	Redčitev (EO : etanol)	Koncentracija EO (%)
1	1:10	10
2	1:100	1
3	1:1000	0,1
4	etanol	0 (kontrola)

Plošče smo ponovno zavili v aluminijasto folijo in jih dali v omaro, kjer so na sobni temperaturi in v temi rastle, dokler ni cona rasti dosegla katere od luknjic.

3.7 STATISTIČNE METODE

Statistično značilne razlike med bakterijami in glivami pri 1 in 10 % koncentraciji EO, smo izračunali s programom Microsoft Excel (Microsoft Office Enterprise, 2007) s pomočjo Student t-testa. Kot statistično značilne razlike štejemo tiste rezultate, za katere velja vrednost $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

V nalogi smo iz vrtno materine dušice ekstrahirali EO. Po ekstrakciji smo ocenili njegovo kvaliteto in protibakterijsko ter protiglivno učinkovitost.

4.1 KVALITETA RASTLINSKEGA MATERIALA

Vsebnost vode smo določili v osušeni vrtni materini dušici. Droga vrtno materine dušice je v povprečju vsebovala 8,64 % vode (preglednica 7).

Vsi štirje rastlinski vzorci se skladajo s farmakopejskimi predpisi, ki narekujejo, da količina vode v absolutno suhih vzorcih (sušenih pri 105 °C) ne sme presežati vrednosti 100 ml vode na 1 kilogram droge, kar predstavlja 10 % (European Pharmacopoeia, 2004).

Preglednica 7: Vsebnost vode v osušeni drogi vrtno materine dušice

Oznaka vzorca	Vsebnost vode (%)
A	8,69
B	8,73
C	8,65
D	8,49
povprečje	8,64
standardni odklon	0,11

Sveže rastline vrtno materine dušice so vsebovale 2,7 % EO, kar je skoraj četrtnina minimalne farmakopejske vrednosti, ki znaša 12 % (European Pharmacopoeia, 2004).

4.2 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST

Protibakterijsko učinkovitost EO vrtno materine dušice smo ocenili kot zaviranje rasti izbranih bakterijskih kultur zaradi prisotnosti EO v gojišču.

Preglednice 8-15 prikazujejo polmere velikosti inhibicijskih con v testih, s katerimi smo ugotavljali protibakterijsko učinkovitost EO vrtno materine dušice proti različnim vrstam bakterij in sevom. EO je imelo protibakterijsko učinkovitost proti vsem bakterijskim vrstam pri 1 in 10 % raztopini EO.

Rast bakterijske vrste *E. coli*-K12 je bila zavirana, če je bilo v gojišču prisotno EO v koncentracijah večjih od 1 % (preglednica 8). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 3,0 mm, pri 10 % pa 8,1 mm.

Preglednica 8: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *E. coli*-K12.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	2,9	7,7
plošča 2	0,0	0,0	2,7	8,7
plošča 3	0,0	0,0	3,4	7,9
povprečje	0,0	0,0	3,0	8,1
standardni odklon	0,0	0,0	0,4	0,5

Rast bakterijske vrste *E. coli-Z* je bila zavrta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 9). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 2,8 mm, pri 10 % pa 7,6 mm.

Preglednica 9: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *E. coli-Z*.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	3,3	7,3
plošča 2	0,0	0,0	2,9	7,2
plošča 3	0,0	0,0	2,4	8,3
povprečje	0,0	0,0	2,8	7,6
standardni odklon	0,0	0,0	0,5	0,6

Rast seva *E. coli-KM* iz sekvenčne skupine ST 131 je bila zavrta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 10). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 3,1 mm, pri 10 % pa 10,6 mm.

Preglednica 10: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti sevu *E. coli-KM* iz sekvenčne skupine ST 131.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	3,5	9,5
plošča 2	0,0	0,0	3,1	11,4
plošča 3	0,0	0,0	2,6	11,0
povprečje	0,0	0,0	3,1	10,6
standardni odklon	0,0	0,0	0,5	1,0

Rast bakterijske vrste *E. coli* 1138 je bila zavrta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 11). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 2,5 mm, pri 10 % pa 10,3 mm.

Preglednica 11: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *E. coli* 1138.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	2,4	11,8
plošča 2	0,0	0,0	2,5	10,2
plošča 3	0,0	0,0	2,6	8,9
povprečje	0,0	0,0	2,5	10,3
standardni odklon	0,0	0,0	0,1	1,5

Rast bakterijske vrste *S. aureus* je bila zavrta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 12). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 1,9 mm, pri 10 % pa 7,0 mm.

Preglednica 12: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *S. aureus*.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	2,2	7,6
plošča 2	0,0	0,0	1,8	7,9
plošča 3	0,0	0,0	1,6	5,6
povprečje	0,0	0,0	1,9	7,0
standardni odklon	0,0	0,0	0,3	1,3

Rast bakterijske vrste *B. cereus* je bila zavrtta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 13). Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 3,2 mm, pri 10 % pa 9,5 mm.

Preglednica 13: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *B. cereus*.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	2,7	10,4
plošča 2	0,0	0,0	3,4	8,9
plošča 3	0,0	0,0	3,4	9,2
povprečje	0,0	0,0	3,2	9,5
standardni odklon	0,0	0,0	0,4	0,8

Rast bakterijske vrste *Buttiauxella* sp. je bila zavrtta, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 14). Pri 0,1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske velik 0,3 mm, vendar je do inhibicije (1mm) prišlo le v enem primeru. Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 3,8 mm, pri 10 % pa 9,4 mm.

Preglednica 14: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *Buttiauxella* sp.

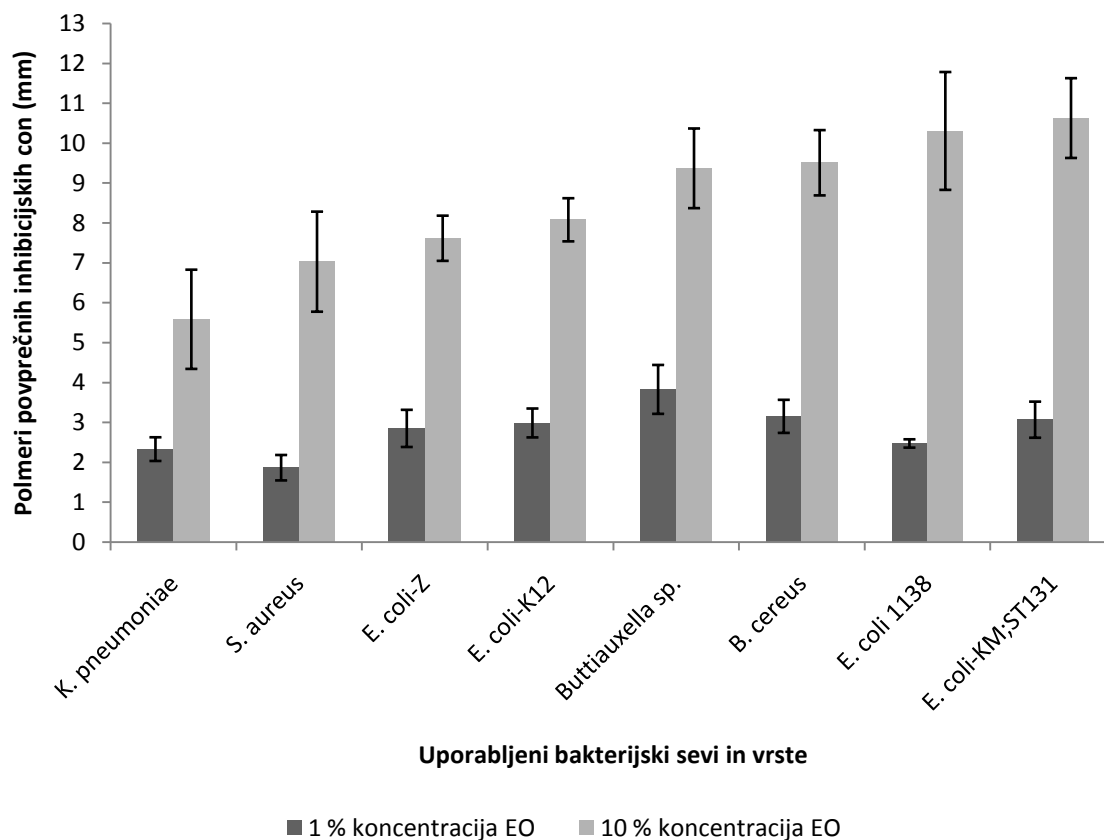
	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	4,5	10,1
plošča 2	0,0	0,0	3,6	9,8
plošča 3	0,0	1,0	3,4	8,2
povprečje	0,0	0,3	3,8	9,4
standardni odklon	0,0	0,6	0,6	1,0

Rast bakterijske vrste *K. pneumoniae* je bila zavirana, če je bilo v gojišču prisotno več kot 1 % EO (preglednica 15). Pri 0,1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 0,3 mm, vendar je do inhibicije (1mm) prišlo le v enem primeru. Pri 1 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 2,3 mm, pri 10 % pa 5,6 mm.

Preglednica 15: Protibakterijska učinkovitost raztopin EO proti bakteriji *K. pneumoniae*.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	2,3	4,2
plošča 2	0,0	0,0	2,0	6,7
plošča 3	0,0	1,0	2,6	5,8
povprečje	0,0	0,3	2,3	5,6
standardni odklon	0,0	0,6	0,3	1,2

Če strnemo rezultate poskusov, v katerih smo določali protibakterijsko učinkovitost, ugotovimo, da so bile vse izbrane bakterijske vrste in vsi sevi občutljivi na EO vrtno materine dušice v koncentracijah večjih od 1 %. Nižje koncentracije EO niso zavirale rasti bakterij (slika 9).



Slika 9: Povprečni polmeri inhibicijskih con EO vrtno materine dušice proti izbranim bakterijam (N=3).

Razlike v velikosti povprečnih inhibicijskih con med bakterijskimi vrstami, ki so rastle v prisotnosti 1 in 10 % EO, smo analizirali s Studentovim t-testom (preglednica 16).

Preglednica 16: Studentov t-test za testiranje statističnih razlik v velikosti inhibicijske cone pri sevih bakterije *E. coli*, ki so rastle pri 1 in 10 % EO.

Prikazane so vrednosti p. Razlika je statistično značilna, če je vrednost $p \leq 0,05$ (označeno z zvezdico *).

	1 % EO			10 % EO		
	<i>E. coli-K12</i>	<i>E. coli-Z</i>	<i>E. coli-KM; ST 131</i>	<i>E. coli-K12</i>	<i>E. coli-Z</i>	<i>E. coli-KM; ST 131</i>
<i>E. coli-Z</i>	0,35			0,18		
<i>E. coli-KM; ST 131</i>	0,41	0,3		0,01*	0,01*	
<i>E. coli 1138</i>	0,04*	0,12	0,04*	0,04*	0,02*	0,38

4.3 PROTIGLIVNA UČINKOVITOST

Protiglivno učinkovitost EO vrtno materine dušice smo testirali z glivama *Fusarium* sp. in *Armillaria mellea*. EO je zaviralo rast obeh gliv, ko je bilo v raztopini več kot 10 % EO (preglednica 17 in 18). Nižje koncentracije EO niso vplivale na rast gliv ali pa je bila protiglivna učinkovitost tako nizka, da so bili polmeri inhibicijskih con manjši od 1 mm in zato težko zaznavni. Pri 10 % EO je bil povprečni polmer inhibicijske cone velik 4,1 mm za *Fusarium* sp. in 4,9 mm za *A. mellea*. Razlika v velikosti inhibicijske cone med obema vrstama ni bila statistično značilna ($p = 0,22$).

Preglednica 17: Protiglivna učinkovitost raztopin EO proti glivi *Fusarium* sp.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,0	0,0	0,0	3,0
plošča 2	0,0	0,0	0,0	3,4
plošča 3	0,0	0,0	0,0	6,0
povprečje	0,0	0,0	0,0	4,1
standardni odklon	0,0	0,0	0,0	1,6

Preglednica 18: Protiglivna učinkovitost raztopin EO proti glivi *A. mellea*.

	Polmer inhibicijske cone (mm)			
	Koncentracija EO (%)			
	0	0,1	1	10
plošča 1	0,2	0,1	0,1	4,7
plošča 2	0,1	0,1	0,2	5,0
plošča 3	0,1	0,1	0,1	5,2
povprečje	0,1	0,1	0,1	4,9
standardni odklon	0,0	0,0	0,0	0,2

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bila izolacija EO iz vrtno materine dušice in ugotavljanje protimikrobnega delovanja zaradi možnosti uporabe le-tega pri konzerviranju živil in zdravljenju okužb. Uporabljene so bile naslednje bakterije in glivi; po Gramu pozitivni bakterijski vrsti *B. cereus* in *S. aureus* ter po Gramu negativne vrste *Buttiauxella* sp., *K. pneumoniae* in sevi *E. coli* ter glivi *Fusarium* sp. in *Armillaria mellea*. Med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami nismo opazili statistično značilne razlike.

Po ekstrakciji rastlinskega materiala smo dobili 2,7 % EO glede na svežo maso rastlin. Minimalna farmakopejska vrednost znaša 12 % EO na maso suhe droge (European Pharmacopoeia, 2004). Majhna vsebnost EO v naši raziskavi je posledica ekstrakcije EO iz svežih rastlin, saj se minimalna farmakopejska vrednost EO nanaša na vsebnost EO v suhi drogi. Tak postopek smo uporabili zaradi hitrejše in lažje ekstrakcije.

Do izgube EO lahko pride tudi zaradi različnih postopkov, ki smo jih uporabili za pridobivanje EO (destilacija z destilatorjem, ekstrakcija in koncentriranje z aparaturo Clevenger), saj pri vsakem postopku del EO ostane na stenah aparatov in posod, v katerih postopek poteka. Tako del izgube EO pripisujemo tudi prirejenemu postopku destilacije. Z njim predvsem skrajšamo čas ekstrakcije, kajti v prirejenem destilatorju lahko naenkrat ekstrahiramo večjo količino droge.

Majhna vsebnost EO za našo nalogo ni bila bistvena, saj namen naše naloge ni bil ovrednotenje količine EO v vrtni materini dušici, temveč ugotavljanje protiglivne in protibakterijske učinkovitosti, zato je ta izračun le informativen.

Vsi protibakterijski poskusi so kazali zaviralno učinkovitost pri 1 in 10 % koncentraciji EO (slika 9). Pri koncentraciji nižji od 1 % EO rast bakterij ni bila zavrtta. Slika 9 tudi pove, da je protibakterijska učinkovitost EO vrtno materine dušice koncentracijsko odvisna, saj so

bile cone inhibicij večje, če smo povečali količino EO v raztopini. Te trditve lahko podkrepimo z raziskavami Solomakos in sod. (2008), ki se sklicujejo na raziskave, v katerih so dokazali koncentracijsko odvisnost protibakterijske učinkovitosti EO vrtno materine dušice (Burt, 2004; Sagdic, 2003; cit. po Solomakos in sod., 2008). Vendar protibakterijska učinkovitost ne narašča sorazmerno z vsebnostjo EO v raztopini. Tudi to je razvidno iz slike 9, kjer se velikost inhibicijske cone ne poveča za faktor deset, za kolikor smo povečali količino EO (ampak le za 3). Delno je to razvidno tudi iz prilog (preglednice 19-21), saj se z dvakratnim povečanjem EO v raztopini, velikost inhibicijske cone ne poveča za dvakrat. Inhibicijska cona se povečuje linearno z vsebnostjo EO le od 0 - 8,3 % koncentracije. Preliminarni poskusi nam kažejo, da je protibakterijska učinkovitost omejena z difuzijo, saj se cona inhibicije do neke točke povečuje potem pa ostaja več ali manj enaka (preglednica 20). Kontrolni poskusi s 96 % etanolom kažejo, da etanol sam ni imel protimikrobnega ali protiglivnega učinka.

Naslednji cilj naše naloge je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike v odpornosti med različnimi sevi iste bakterijske vrste. Za dokazovanje tega smo v nalogo vključili različne seve *E. coli*; laboratorijski tip *E. coli*-K12, *E. coli*-Z (AmpC), *E. coli*-KM; ST 131 (ESBL) in *E. coli* 1138 (ESBL). EO je najbolj zaviralo rast seva KM; ST 131, nato *E. coli* 1138, najmanj pa laboratorijski tip *E. coli*-K12 in *E. coli*-Z (preglednice 8 - 15, in slika 9). Razlika med največjo in najmanjšo inhibicijsko cono pri 10 % raztopini EO je bila 3 mm, kar predstavlja 28 % variabilnost. Ugotovili smo, da obstajajo precejšnje razlike v odpornosti med različnimi sevi iste bakterije. To kaže na pomembnost izbire sevov za testiranje protimikrobnih snovi, še posebej pri sevih, ki imajo razvito odpornost na antibiotike.

S Studentovim t-testom smo dokazali, da sta bakterijska seva *E. coli*-K12 in *E. coli*-Z statistično značilno različna v odpornosti na EO od *E. coli*-KM; ST131 in *E. coli* 1138. Med bakterijskimi sevi *E. coli*-K12 in *E. coli*-Z ni statistično značilne razlike v velikosti inhibicijske cone, ravno tako kot ne med sevoma *E. coli*-KM; ST131 in *E. coli* 1138 (preglednica 16).

E. coli-Z, -KM; ST 131, *E. coli* 1138 in *K. pneumoniae* so vrste in sevi, ki so bili genotipizirani na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka

za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani za gen z zapisom za AmpC in ESBL iz skupine CTX-M. Z vključitvijo le-teh smo potrdili hipotezo naše naloge, da ima EO vrtna materine dušice protibakterijsko učinkovitost tudi proti odpornim vrstam in sevom. Na nekatere vrste odpornih bakterij je imelo EO vrtna materine dušice večji, na druge manjši učinek. Največji protibakterijski učinek je imelo EO na *E. coli*-KM; ST 131, najmanjši učinek pa na *K. pneumoniae*. Zanimivo je, da oba seva izločata β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL), kar jima omogoča odpornost proti širšemu spektru β -laktamskih antibiotikov. Ti dve bakteriji sta bili tudi najmanj in najbolj odporni med vsemi uporabljenimi bakterijami v nalogi (slika 9). Razlika v njunih inhibicijskih conah je bila 5 mm (47 %).

Povprečni polmer inhibicijskih con med vsemi uporabljenimi bakterijskimi vrstami in sevi pri 10 % koncentraciji EO je bil 8,5 mm, pod to vrednostjo so bakterije *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*-Z in *E. coli*-K12, nad tem povprečjem pa so *Buttiauxella* sp., *B. cereus*, *E. coli* 1138 in *E. coli*-KM; ST 131.

Razlike v polmerih pri 1 % koncentraciji EO so bile tako majhne, da težko komentiramo, katera bakterijska vrsta je najbolj in katera najmanj občutljiva.

Na podlagi znanega dejstva, da se vrtna materina dušica uporablja kot začimbno sredstvo v živilski industriji, smo s pričujočo nalogo hoteli preveriti njeno protibakterijsko delovanje proti bakterijam, ki se pojavljajo v živilski industriji. V ta namen smo uporabili bakteriji *E. coli* 1138 in *Buttiauxella* sp.

E. coli 1138 je bila izolirana iz poltrajne mesnine. Izbrana bakterija ima razvito ESBL aktivnost, kar pomeni, da je odporna proti številnim protibakterijskim sredstvom. Kot smo ugotovili je imelo EO proti temu sevu drugo najmočnejše učinkovanje (preglednica 11, slika 9). Rezultat nakazuje možnost uporabe EO vrtna materine dušice kot konzervans in dodatek prehranskim izdelkom. Vendar bi bile za določitev protibakterijskega učinka EO v živilih potrebne nadaljnje raziskave. V našem primeru gre za protibakterijski poskus na agarju. Po nekaterih raziskavah so protibakterijski učinki v živilih znatno manjši in se tudi razlikujejo od živila do živila (Burt, 2004).

Tudi uporabljen bakterijski sev *Buttiauxella* sp., ki je bil izoliran iz mletega mesa, predstavlja problem v živilski industriji. Gre za bakterijo, ki je sposobna rasti pri temperaturi 4 °C (hladilnik). Pri nekaterih sevih iz tega rodu so Fihman in sod. (2002) našli tudi beta laktamaze iz skupine AmpC. Vse to predstavlja potencialno grožnjo za ljudi in živali. O prevalenci te bakterije v živilih skoraj ni podatkov, saj jo s hitrimi identifikacijskimi metodami verjetno pogosto zamenjajo z *E. coli* (Ambrožič, 2012). Zaradi tega je o njenih lastnostih malo znanega. Kot so pokazali poskusi iz naše naloge ima EO vrtno materine dušice srednje močen protimikroben učinek tudi proti tej bakterijski vrsti. Kot pri *E. coli* 1138 bi bile tudi v tem primeru za določitev protibakterijskega učinka v živilih potrebne nadaljnje raziskave. Iz rezultatov naše in drugih raziskav (Burt, 2004; Dorman in Deans, 2000; Nedorostova in sod., 2009) lahko sklepamo, da kaže EO vrtno materine dušice dober protibakterijski potencial v živilstvu, saj deluje proti širokemu spektru bakterij, ob tem pa se že sedaj uporablja kot začimba v živilstvu.

Protibakterijski poskus smo opravili tudi z bakterijo *K. pneumoniae*, ki povzroča pljučnico. S testiranjem te bakterije smo želeli preveriti protibakterijsko učinkovitost EO na medicinsko pomembne vrste. Pri 10 % koncentraciji EO je bilo protibakterijsko učinkovanje ravno na to bakterijo najslabše. Pri 1 % koncentraciji EO se po učinkovitosti uvršča na predzadnje mesto. Prav tako kot pri *E. coli* 1138 in *Buttiauxella* sp. bi bile tudi pri *K. pneumoniae* potrebne nadaljnje analize za določitev protibakterijskega učinka na to bakterijo v organizmu.

Bakterijski vrsti *Buttiauxella* sp. in *K. pneumoniae* (ESBL+) pri zadnjem vzorcu (preglednica 14, 15, plošča 3) izkazujeta rahlo inhibicijsko cono, a ker se inhibicija kaže le pri enem vzorcu izmed treh in ker oblika inhibicijske cone ni pravilna, predvidevamo, da gre za razlitje vzorca ob prenosu v rastno komoro ali za kapilarni vlek. Med luknjanjem nastanejo v agarju drobne razpoke, kjer prihaja do kapilarnega vleka, ki vpliva na razlitje vzorca po površini.

Protiglivni poskusi proti vrstama *Armillaria mellea* in *Fusarium* sp. so pokazali, da EO vrtno materine dušice učinkuje protiglivno tako proti prostotroscopicam kot tudi proti

zaprtotrošnicam, vendar le v desetkrat višjih koncentracijah (preglednica 17, 18) kot proti bakterijam. Minimalna inhibitorna koncentracija je tako pri *A. mellea* kot pri *Fusarium* sp. znašala 10 % EO.

Pri *A. mellea* smo pri 1 % koncentraciji EO izmerili inhibicijsko cono manjšo od 1 mm, zato ne moremo zagotovo trditi, da gre za inhibicijo. Pri *Fusarium* sp. smo opazili velik standardni odklon, kar lahko pripišemo predvsem metodološki napaki. Zelo počasna rast glive in dejstvo, da smo vsako od treh ponovitev delali zaporedno, lahko povzročita različne rastne pogoje, kar lahko vpliva na večji standardni odklon.

Med pregledovanjem literature smo ugotovili, da se rezultati pri testiranju protimikrobnega učinka med različnimi raziskavami precej razlikujejo med seboj (Al-Bayati, 2008; Burt in Reinders, 2003; Burt, 2004; Dorman in Deans, 2000; Nedorostova in sod., 2009; Rota in sod., 2008; Tohidpour in sod., 2010). Ugotovili smo tudi, da za testiranje protibakterijske in protiglivne učinkovitosti raziskovalci uporabljajo različne metode, kar predstavlja težavo pri primerjanju izsledkov med različnimi raziskavami (Pozzatti, 2008). Opazili smo tudi opazili, da je pri primerjanju in ugotavljanju protibakterijske učinkovitosti smiselno narediti plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo, saj s tem dobimo podatke o sestavi EO. To nam pri nadaljnjem delu omogoča boljše primerjavo učinkov EO ter s tem pripomore k pravilnemu sklepanju, katera komponenta EO ima glavni protimikrobni učinek, katera deluje sinergistično, katera antagonistično in katera nima vpliva.

EO vrtna materina dušica je obetajoče protimikrobno sredstvo, saj deluje protiglivno in protibakterijsko. Pomembno je, da zavira rast tudi problematičnih, odpornih sevov. Ker se materina dušica že uporablja v živilski industriji kot začimba, bi bilo smotrno opraviti več raziskav o njenem protimikrobnem učinku pri različnih vrstah živil (Burt, 2004). Al-Bayati (2008) je dokazal sinergistični učinek vrtna materine dušice in vrtnega janeža, zato bi bilo smotrno opraviti tudi več raziskav, ki vključujejo vrtno materino dušico v kombinaciji z različnimi začimbami oz. zdravilnimi rastlinami.

5.2 SKLEPI

- EO vrtno materine dušice učinkuje protibakterijsko in protiglivno.
- Rast bakterij je zavrta pri 1 in 10 % EO vrtno materine dušice, 0,1 % EO ne zavira bakterijske rasti.
- Med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami ni statistično značilnih razlik.
- Različne bakterijske vrste so različno občutljive za EO vrtno materine dušice.
- Eterično olje vrtno materine dušice zavira rast različnih sevov *E. coli*.
- Med sevi *E. coli* obstajajo statistično značilne razlike v odpornosti proti EO vrtno materine dušice.
- EO ima pri 10 % koncentraciji najboljše protimikrobno delovanje proti bakteriji *E. coli*-KM-ESBL; ST131.
- EO ima pri 10 % koncentraciji najslabše protimikrobno delovanje na bakterijo *K. pneumoniae*-ESBL.
- EO zavira rast bakterijskih vrst *E. coli* 1138-ESBL in *Buttiauxella* sp., ki se pojavljata v živilski industriji.
- Glivi *Armillaria mellea* in *Fusarium* sp. sta bolj odporni na učinkovanje EO vrtno materine dušice kot bakterije, saj je njuna rast zavrta šele pri 10 % koncentraciji EO.
- EO vrtno materine dušice predstavlja dober potencial za nadaljnje raziskave, saj učinkuje na širok spekter bakterij.

6 POVZETEK

Bakterije in glive so znani povzročitelji različnih bolezni in kvarljivci prehranskih izdelkov. Zaradi množične in nekontrolirane uporabe protimikrobnih sredstev se pojavlja vedno več bakterij z razvito odpornostjo proti tem snovem. Kljub množici sintetičnih konzervansov in sredstev, ki imajo protimikrobne učinke (antibiotiki), se pojavlja vedno večje zanimanje za protimikrobna sredstva naravnega izvora, s tem pa narašča število tovrstnih raziskav.

Vrtna materina dušica se v ljudski medicini in kot začimba uporablja že dolgo. Kot začimbo jo uporabljamo predvsem za izboljšanje senzoričnih lastnosti živil. V ljudski medicini se uporablja pri prehladnih obolenjih ter pri težavah želodca in črevesja kot tudi pri različnih glivičnih okužbah.

Spomladi smo na kolekcijskem vrtu posejali vrtno materino dušico in jo v septembru zaradi poplav porezali. S prirejenim destilatorjem smo iz svežih rastlin ekstrahirali EO in vodo. EO smo z aparaturom Clevenger skoncentrirali in ga uporabili v poskusih, s katerimi smo ugotavljali protibakterijsko in protiglivno delovanje.

Protibakterijske poskuse smo opravljali z difuzijskim testom na agarju. S plutovrtom smo naredili luknjice v gojišče z agarjem in nacepljeno določeno bakterijsko kulturo. V luknjice smo dodali raztopine različnih koncentracij EO vrtno materine dušice, razredčene z etanolom. Po 24-urni inkubaciji smo bakterijske kulture pregledali, fotografirali in fotografije pozneje računalniško obdelali.

Namen naše naloge je bil določiti protimikrobno učinkovitost EO vrtno materine dušice. Ugotovili smo, da je EO zavrlo rast vseh uporabljenih bakterij pri koncentracijah višjih od 1 %.

V raziskavo smo vključili različne seve *E. coli*. S tem smo ugotovili, da obstajajo razlike v protimikrobnem delovanju med različnimi sevi iste bakterijske vrste. Razlika med uporabljenimi sevi je bila pri 10 % EO statistično značilna.

Namen diplome je bil tudi ugotoviti ali EO deluje protibakterijsko proti bakterijam, ki se pojavljajo v živilski industriji. Z uporabo vrst *E. coli* 1138 in *Buttiauxella* sp. smo dokazali protibakterijski učinek tudi na te vrste bakterij.

V nalogi smo testirali tudi bakterije *K. pneumoniae* in različne seve *E. coli*, ki imajo predhodno dokazane različne odpornosti. Zato smo z našo raziskavo preverjali tudi hipotezo, da EO učinkuje proti odpornim sevom in jo potrdili.

Tudi protiglivno učinkovitost smo ugotavljali z difuzijskim testom na agarju. Kocke gojišča z glivo smo prenesli na novo sterilno gojišče v petrijevkah in vse skupaj v temi in na sobni temperaturi inkubirali tako dolgo, da je gliva zrasla približno 3-4 cm od roba. Potem smo s plutovrtom naredili luknjice v gojišče in vanje dodali različne koncentracije EO vrtna materine dušice. Vse skupaj smo pustili rasti, dokler gliva ni dosegla katere od luknjic.

S testom smo potrdili hipotezo, da ima EO vrtna materine dušice protiglivno učinkovitost. Koncentracija, ki je zavrla rast gliv, je bila višja kot pri bakterijah. Le-te so nehale rasti pri 10 % EO.

Rezultati, ki smo jih dobili, nakazujejo potencialno uporabo EO za zaviranje rasti proti odpornim bakterijam, kot tudi uporabo proti drugim vrstam bakterij in gliv ter s tem za zaščito pred boleznimi in posledicami, ki jih te povzročajo.

Vrtna materina dušica predstavlja tudi obetajoče sredstvo v živilski industriji, saj s svojim širokim spektrom delovanja vpliva na zmanjšanje uporabe sintetičnih konzervansov.

7 VIRI

- Ahačič M. 1998. Vrednotenje galenskih izdelkov s timijanom (*Thymus vulgaris* (L.)): diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 45 str.
- Al-Bayati F. A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* (L.) and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 403–406
- Ambrožič A. J. 2012. Buttiauxella, jermeja.ambrozic@bf.uni-lj.si (osebni vir, 20. jan. 2012)
- Bacillus cereus (Bacillus cereus - B. cereus) v živilih.
<http://www.zzv-ce.si/uploads/bacilus%20cereus.pdf> (9. jul. 2011)
- Baquero F., Nombela C., Cassel G. H., Gutierrez J. A. 2008. *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. Washington D. C., ASM Press: 124 str.
- Baričević D. 1996a. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 81 str.
- Baričević D. 1996b. Priročnik za ciklus predavanj pridelovanje zdravilnih rastlin. I. del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 42 str.
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1-14
- Bown D. 2002. *The Royal Horticultural Society: new Encyclopedia of herbs & their uses*. London, Dorling Kindersley: 448 str.
- Brenes A., Roura E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158: 1–14
- Burdsall H. H. Jr., Volk J.T. 1993. The state of taxonomy of the genus *Armillaria*. Center for Forest Mycology Research, Forest Service, U. S. D. A., One Gifford Pinchot Drive, Madison, 11: 4-11.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253
- Burt, S. A., & Reinders, R. D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 162–167
- Clevenger apparatus. http://medilabexports.com/lab-instruments_10_1.htm (12. jul. 2011)

- Coelho A., Mora A., Mamani R., López C., González-López J. J., José J., Larrosa M. N., Quintero-Zarate J. N., Dahbi G., Herrera A., Blanco J. E., Blanco M., Alonso M. P., Prats G., Blanco J. 2011. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 517-526
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582
- Cruz, T., Cabo, M. P., Cabo, M. M., Jimenez, J., Cabo, J., Ruiz, C. 1989. In vitro antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. *Microbios*, 60: 59–61
- Dancer J. S. 2008. Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infectious Diseases*, 8: 101-113
- Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 101–109
- Dimitrijević S. I., Mihajlovski K. R., Antonovic D. G., Milanović - Stevanovic M. R., Mijin D. Ž. 2006. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub - lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* (L.), *Rosmarinus officinalis* (L.) and *Origanum vulgare* (L.). *Food Chemistry*, 204: 774-782
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308–316
- European Pharmacopoeia 5.0 2004. Strasbourg, Council of Europe: 3769 str.
- Fihman V., Rottman M., Benzerara Y., Delisle F., Labia R., Philippon A., Arlet G. 2002. BUT-1: a new member in the chromosomal inducible class C β -lactamases family from a clinical isolate of *Buttiauxella* sp.. *FEMS Microbiology Letters*, 213: 103-111
- Food Doctors. 2008. The food safety file: *Staphylococcus aureus*. London, Food Doctors. http://www.fooddoctors.com/FSF/S_aureus.pdf (16. jul. 2011)
- Fusarium verticillioides. Wikipedia. 2011, <http://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium> (11. jul. 2011)
- Grünwald J., Jänicke C. 2006. Zelena lekarna. Ljubljana, Mladinska knjiga: 414 str.

- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985–990
- Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A. M., Cavrini V. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* (L.)) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29: 691–700
- Jogan N. 2001. Navodila iz sistematske botanike. Ljubljana. <http://botanika.biologija.org/sist/skripta/sistbot-navodila-za-vaje.pdf> (4. jul. 2011)
- Jordan M. J., Martinez R. M., Goodner K. L., Baldwin E. A., Sotomayor J. A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* (L.) Lange and Spanish *Thymus vulgaris* (L.) essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24: 253–263
- Kaefer C. M., Milner J. A. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 347-361
- Karaman S., Digrak M., Ravid V., Iclim A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak. from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 183–186
- Kisko G., Roller S. 2005. Carvacrol and p - cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiology*, 5: 36-45
- Kramer J. M., Gilbert J. R. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. V: Foodborne bacterial pathogens. New York, Mercel Dekker: 21-70
- Kure S. 2006. Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran: diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 69 str.
- Leflon - Guibout V., Blanco J., Amaqdouf K., Mora A., Guize L., Nicolas - Chanoine M. H. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, ampng fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area od Paris, France. *Jounal of Clinical Microbiology*, 46: 3900-3905
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B, Vreš B., Frajman B., Strgulc-Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice-Hall international: 634 str.

- Nataro J. P., Kaper J. B. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-210
- Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20: 157-160
- Normanno G., La Salandra G., Quaglia N. C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E., Cellano G.V. 2007. Occurrence characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 290-296
- Ofentavšek A. 2009. Užitne glive v gozdnogospodarski enoti Žužemberk: diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 57 str.
- Papageorgiou V. P. 1980. GLC-MS Computer Analysis of the Essential oil of *Thymus capitatus*. *Planta Medica Supplement*, 40: 29–33.
- Perazzolli M., Bampi F., Faccin S., Moser M., De Luca F., Ciccotti A. M., Velasco R., Gessler C., Pertot I., Moser C. 2010. *Armillaria mellea* Induces a Set of Defense Genes in Grapevine Roots and One of Them Codifies a Protein with Antifungal Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 485–496
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 238 str.
- Podschun R., Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 589-603
- Pozzatti P., Scheid L.A., Spader T.B., Atayde M.L., Santurio J.M., Alves S.H. 2008. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 950-956
- Raina V. K., Srivastava S. K., Aggarwal K. K., Syamasundar K. V., Khanuja S. P. S. 2003. Essential oil composition of *Cymbopogon martinii* from different places in India. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 312-315
- Raskin I. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20: 522-531

- Rasooli I., Mirmostafa S. A. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2200–2205
- Rates S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613
- Rota M. C. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681–687
- Rota C., Carramiñana J. J., Burillo J., Herrera A. 2004. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67: 1252–1256
- Smole Možina S., Klančnik A., Raspor P. 2009. Protimikrobne snovi v živilih in živilstvu. V: Protimikrobne snovi. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 29-30 jan. 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 34-37
- Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80: 159–166
- Škrinjar M. M., Nemet N. T. 2009. Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils, 40: 195-209
- Štrlekar M. 2010. Vpliv izvlečkov rožmarina na toplotno odpornost spor vrste *Bacillus cereus* in rodu *Alicyclobacillus*: diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 58 str.
- Tartof S. Y., Solberg O. D., Manges A. R., Riley L. W. 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5860-5864.
- The lessons of Shennong. Dharmananda. <http://www.itmonline.org/arts/shennong.htm> (20. maj 2011)
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazem J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17: 142–145
- Toplak-Galle K. 2000. Zdravilne rastlina na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 214 str.

Trontelj S. 2010. Fenotipske in genotipske lastnosti sevov vrste *Escherichia coli* izoliranih iz vzorcev živil: diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 99 str.

Varstvo gozdov Slovenije. 2011. <http://www.zdravgozd.si/prirocnik/zapis.aspx?idso=28> (27. jun. 2011)

WikiAdmin. *Bacillus cereus*. 2006. MicrobeWiki (26. maj. 2006). http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_cereus (9. jul. 2011)

Willfort R. 2006. Zdravilne rastline in njih uporaba. Obzorja. Maribor: 576 str.

Zaika L. L., 1987. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Department of Agriculture, 9: 97-118

β -laktam. 2011.

<http://flashcarddb.com/cardset/140084-antibacs-i-anaerobes-oppo-infections-flashcards>,
<http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/neopharma/neopharma2.html>, (8. jul. 2011)

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Jasni Dolenc Koce za strokovno pomoč, potrpežljivost, ažurnost in seveda vzpodbudne besede. Prav takšna zahvala gre tudi somentorici asist. dr. Sabini Anžlovar. Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Dei Baričevič za strokoven pregled diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem predsednici komisije doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin.

Posebna zahvala družini, ki me je v času študija podpirala in verjela vame.

Zahvalil bi se tudi carjem, s katerimi smo užili prenekatero radost študijskih let in ki so naredili študij biologije še bolj zabaven kot sploh je, še posebej hvala za nepozabne terenske vaje in vse žure v rožni in drugje. Prav posebej bi se rad zahvalil sošolki in najboljši prijateljici Živi, za njeno dobro voljo, karizmo, unikatne komentarje in vedno pozitiven odnos. Ob tem ne smem pozabiti tudi na Moniko, ki me je vedno znala spraviti v dobro voljo s svojim sarkazmom.

Nekaj besed bi rad posvetil tudi svoji pokojni babici, ki me je že v mladih letih navdušila nad zdravilnimi zelišči, bila je moja največja učiteljica in najboljša sogovornica.

Težko se je zahvaliti vsakemu posebej, ampak hvala vsem ki ste mi stali ob stani in ki ste me spremljali na tej prečudoviti študijski poti.

PRILOGE

Priloga A: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *S. aureus*

Št. poskusa/št. jamice	Testirana snov	Koncentracija EO (%)	Cona (mm)	inhibicije
1/1	50 µl 96 % EtOH + 50 µl EO	50	15,8	
1/2	50 µl 96 % EtOH + 50 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
1/3	100 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
2/1	25 µl 96 % EtOH + 25 µl EO	50	9,8	
2/2	25 µl 96 % EtOH + 25 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
2/3	25 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
3/1	10 µl EO + 20 µl 96 % EtOH	33,3	12,6	
3/2	5 µl EO + 25 µl 96 % EtOH	16,7	7,4	
3/3	2,5 µl EO + 27,5 µl 96 % EtOH	8,3	5,9	
3/4	1,25 µl EO + 28,75 µl 96 % EtOH	4,17	2,6	
3/5	30 µl 96 % EtOH	0	0,0	
4/1	15 µl EO + 135 µl 96 % EtOH	10	7,6	
4/2	1,5 µl EO + 148,5 µl 96 % EtOH	1	2,2	
4/3	0,15 µl EO + 149,85 µl 96 % EtOH	0,1	0,0	
4/4*	0,015 µl EO + 149,985 µl 96 % EtOH	0,01	0,0	

Priloga B: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *E. coli*-K12

Št. poskusa/št. jamice	Testirana snov	Koncentracija EO (%)	Cona (mm)	inhibicije
1/1	50 µl 96 % EtOH + 50 µl EO	50	9,0	
1/2	50 µl 96 % EtOH + 50 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
1/3	100 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
2/1	25 µl 96 % EtOH + 25 µl EO	50	6,7	
2/2	25 µl 96 % EtOH + 25 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
2/3	25 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
3/1	10 µl EO + 20 µl 96 % EtOH	33,3	7,9	
3/2	5 µl EO + 25 µl 96 % EtOH	16,7	8,9	
3/3	2,5 µl EO + 27,5 µl 96 % EtOH	8,3	9,1	
3/4	1,25 µl EO + 28,75 µl 96 % EtOH	4,17	5,0	
3/5	30 µl 96 % EtOH	0	0,0	
4/1	15 µl EO + 135 µl 96 % EtOH	10	7,7	
4/2	1,5 µl EO + 148,5 µl 96 % EtOH	1	2,9	
4/3	0,15 µl EO + 149,85 µl 96 % EtOH	0,1	0,0	
4/4*	0,015 µl EO + 149,985 µl 96 % EtOH	0,01	0,0	

Priloga C: Delovni vzorci v preliminarnih poskusih za bakterijo *B. cereus*

Št. poskusa/št. jamice	Testirana snov	Koncentracija EO (%)	Cona (mm)	inhibicije
1/1	50 µl 96 % EtOH + 50 µl EO	0	25,3	
1/2	50 µl 96 % EtOH + 50 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
1/3	100 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
2/1	25 µl 96 % EtOH + 25 µl EO	0	18,0	
2/2	25 µl 96 % EtOH + 25 µl H ₂ O	0 (kontrola)	0,0	
2/3	25 µl 96 % EtOH	0 (kontrola)	0,0	
3/1	10 µl EO + 20 µl 96 % EtOH	33,3	P	
3/2	5 µl EO + 25 µl 96 % EtOH	16,7	P	
3/3	2,5 µl EO + 27,5 µl 96 % EtOH	8,3	14,5	
3/4	1,25 µl EO + 28,75 µl 96 % EtOH	4,2	6,9	
3/5	30 µl 96 % EtOH	0	0,0	
4/1	15 µl EO + 135 µl 96 % EtOH	10	10,4	
4/2	1,5 µl EO + 148,5 µl 96 % EtOH	1	2,7	
4/3	0,15 µl EO + 149,85 µl 96 % EtOH	0,1	0,0	
4/4*	0,015 µl EO + 149,985 µl 96 % EtOH	0,01	0,0	