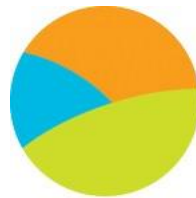




**TECH**



**van hall  
larenstein**  
university of applied sciences

## Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie Biotechnologie – Voedingsmiddelentechnologie



### ONDERZOEK NAAR DE ANTIMICROBIËLE ACTIVITEIT VAN LAURIER OLIE

Elise Vermeiren

Promotoren:

Eric de Bruin,  
stagebegeleider & opdrachtgever  
Anneke Vaartjes,  
praktische begeleider  
Charl Goossens,  
opdrachtgever

Hogeschool Van Hall Larenstein

Hogeschool Van Hall Larenstein

Gova





## Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie Biotechnologie – Voedingsmiddelentechnologie



### ONDERZOEK NAAR DE ANTIMICROBIËLE ACTIVITEIT VAN LAURIER OLIE

Elise Vermeiren

Promotoren:

Eric de Bruin,  
stagebegeleider & opdrachtgever  
Anneke Vaartjes,  
praktische begeleider  
Charl Goossens,  
opdrachtgever

Hogeschool Van Hall Larenstein  
Hogeschool Van Hall Larenstein  
Gova



## Voorwoord

Het bedrijf Gova, een laurierkwekerij, heeft het onderzoeksteam Food and Dairy Applied Research Centre de opdracht gegeven om een onderzoek uit te voeren naar de antimicrobiële activiteit van laurier olie. Naar aanleiding van mijn bachelor proef in mijn derde jaar in de opleiding Agro- en Biotechnologie optie biotechnologie aan de hogeschool PXL te Hasselt in België en mijn buitenlandse stage aan de hogeschool Van Hall Larenstein te Leeuwarden in Nederland, heb ik deze opdracht gekregen.

Om te beginnen zou ik graag mijn stagebegeleider en opdrachtgever Eric de Bruin bedanken om mij deze opdracht te geven en mij te begeleiden tijdens mijn bachelor proef. Verder wil ik Charl Goossens van het bedrijf Gova bedanken voor de opdracht voor dit onderzoek. Daarnaast wil ik mijn praktische begeleidster Anneke Vaartjes bedanken om mij bij te staan in het microbiologisch labo. Vervolgens gaat mijn dank uit naar de lectoren van biotechnologie aan de PXL met in het bijzonder Nadia Reweghs voor de steun en begeleiding gedurende mijn 3-jaarse opleiding. Ook bedank ik graag mijn nicht Nele Verheyen voor het nalezen en geven van verbeterpunten van deze scriptie. Tot slot wil ik mijn ouders bedanken voor het doorlezen van deze scriptie en voor de goede zorgen die ik heb gekregen voor mijn hele studieloopbaan.

Over het algemeen is deze bachelor proef zeker goed verlopen. Niet alleen de theoretische kant, maar ook de praktische kant is vlot verlopen doorheen het onderzoek.

Elise Vermeiren, Leeuwarden te Nederland, 18 juni 2019

## Inhoudsopgave

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| Voorwoord .....                                   | 2  |
| Samenvatting .....                                | 5  |
| Verkorte samenvatting .....                       | 7  |
| Lijst van gebruikte afkortingen en symbolen ..... | 8  |
| 1 Inleiding .....                                 | 9  |
| 2 Literatuurstudie .....                          | 10 |
| 2.1 Laurier .....                                 | 10 |
| 2.1.1 Essentiële oliën .....                      | 10 |
| 2.1.1.1 Extractie methoden .....                  | 10 |
| 2.1.1.2 Mogelijke componenten .....               | 13 |
| 2.1.1.3 Toepassingen .....                        | 13 |
| 2.1.2 Hydrosol .....                              | 14 |
| 2.1.2.1 Mogelijke componenten .....               | 14 |
| 2.1.2.2 Toepassingen .....                        | 14 |
| 2.2 Micro-organismen .....                        | 15 |
| 2.2.1 Bacteriën .....                             | 15 |
| 2.2.2 Indicator .....                             | 16 |
| 3 Methodiek .....                                 | 17 |
| 3.1 MIC – bepaling .....                          | 17 |
| 3.1.1 Olie .....                                  | 17 |
| 3.1.2 Hydrosolen .....                            | 18 |
| 3.2 Antibioqram bepaling .....                    | 19 |
| 4 Resultaten .....                                | 20 |
| 4.1 Labo 1 .....                                  | 20 |
| 4.2 Labo 2 .....                                  | 23 |
| 4.3 Labo 3 .....                                  | 26 |
| 4.4 Labo 4 .....                                  | 28 |
| 4.5 Labo 5 .....                                  | 30 |
| 4.6 Labo 6 .....                                  | 32 |
| 4.7 Labo 7 .....                                  | 35 |
| 4.8 Labo 8 .....                                  | 43 |
| 4.9 Labo 9 .....                                  | 49 |
| 5 Discussie .....                                 | 52 |
| 5.1 Ontwikkeling methode laurier olie .....       | 52 |
| 5.2 Antimicrobiële werking laurier olie .....     | 53 |
| 5.3 Antimicrobiële werking hydrosolen .....       | 54 |

|     |                          |     |
|-----|--------------------------|-----|
| 5.4 | Antibiogram .....        | 56  |
| 5.5 | Extra experimenten ..... | 57  |
| 5.6 | Aanbevelingen .....      | 58  |
| 6   | Conclusie .....          | 59  |
|     | Literatuurlijst .....    | 60  |
|     | Figurenlijst .....       | 62  |
|     | Tabellenlijst.....       | 67  |
|     | Bijlagen.....            | 69  |
| 1.  | Labo 1.....              | 69  |
| 2.  | Labo 2.....              | 74  |
| 3.  | Labo 3.....              | 80  |
| 4.  | Labo 4.....              | 83  |
| 5.  | Labo 5.....              | 88  |
| 6.  | Labo 6.....              | 92  |
| 7.  | Labo 7.....              | 97  |
| 8.  | Labo 8.....              | 99  |
| 9.  | Labo 9.....              | 101 |

## Samenvatting

Naar aanleiding van de stijgende interesse en vraag naar het gebruik van natuurlijke middelen of producten in de voedingsindustrie, geneeskunde, enz. wordt meer en meer onderzoek gedaan naar essentiële oliën verkregen uit planten. Dit onderzoek spits zich toe op een bekend keukenkruid, de laurier. Het opdracht gevende bedrijf Gova, een laurierkwekerij, bekomt veel snoeiafval. Gova wil de bladeren van het snoeiafval (afvalstroom) gaan gebruiken waardoor ze niet zomaar verloren gaan.

Uit de bladeren van de laurier wordt essentiële olie gehaald. Dit gebeurt door stoomdestillatie welke wordt uitgevoerd door het bedrijf Gova. Hierbij wordt stoom door de plantenmaterialen gedreven waarbij bepaalde plantenextracten waaronder de olie mee worden gevoerd met de stoom. De stoom wordt afgekoeld en opgevangen. De essentiële olie gaat op het water met resterende plantenextracten in drijven. Dit water wordt hydrosol genoemd. Naast de laurier olie wordt het nevenproduct, het laurier hydrosol, ook gebruikt in dit onderzoek. Als uitbreiding worden er ook hydrosolen van andere planten onderzocht, meer bepaald van korenbloem, wilde tijm, pepermunt en Kalanchoë. In het begin van het onderzoek wordt een methanol extract van Kalanchoë gebruikt. Pas later wordt het hydrosol gebruikt.

In dit onderzoek is gewerkt met drie verschillende indicator bacteriën. De bacteriën zijn gekozen op basis van hun celwandstructuur en of ze sporen kunnen vormen. Voor de celwandstructuur wordt gekeken of de bacterie gram-positief of gram-negatief is. Van beide groepen wordt één bacterie gekozen. Voor de gram-positieve bacterie is gekozen voor *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en voor de gram-negatieve *Escherichia coli* (*E. coli*). Als derde bacterie is gekozen voor een sporenvormende bacterie. De sporenvormende bacterie die in dit onderzoek wordt gebruikt is *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*).

In dit onderzoek zal dus getest worden hoe goed de laurier olie en de extra hydrosolen de bacteriën kunnen remmen en waarschijnlijk doden. Dit zal getest worden aan de hand van twee methodes. Via de MIC-bepaling ("Minimal Inhibitory Concentration") wordt bepaald bij welke concentratie aan olie of hydrosol de bacterie wordt geremd en waarschijnlijk ook afgedood. In het onderzoek naar de MIC van de laurier olie zijn drie verschillende technieken gebruikt. Bij de eerste techniek wordt de laurier olie in proefbuizen gedaan en in de schudstoof gezet. Bij deze techniek blijft de olie op de broth liggen en mengt dus niet. Bij de tweede techniek wordt de laurier olie in erlenmeyers gedaan en op een magnetische roerder gezet. Hierbij wordt de olie wel goed gemengd met de broth. Na de erlenmeyers van de roerder af te halen, gaat de olie weer op de broth liggen. Nu kan de broth worden nagekeken op troebelheid (groei of geen groei). Bij de derde techniek wordt een emulgator gebruikt, Tween 80. Door Tween 80 toe te voegen aan het olie-broth mengsel wordt een witte neerslag bekomen. Echter is veel Tween 80 nodig om de olie volledig te doen mengen met de broth. De MIC is via deze techniek ook niet meer te bepalen omdat het mengsel al troebel is. De techniek met de erlenmeyers wordt dus gekozen om mee verder te werken. De tweede methode is het antibiogram. Met het antibiogram kan bepaald worden hoe groot de inhiberende werking is. Hierbij worden disks met de olie of hydrosol op geplaatst op een agarplaat waar één van de bacteriën is op uitgestreken. Nadat deze hebben kunnen groeien, kan gekeken worden naar de inhibitiezone. Hierbij wordt gekeken of de bacteriën tot aan de disks groeien (geen inhibitiezone) of dat ze een bepaalde afstand behouden van de disks (inhibitiezone). Als een disk een inhibitiezone heeft, kan deze vervolgens met een liniaal worden gemeten.

In totaal zijn in dit onderzoek 9 labo's uitgevoerd. Bij elk labo wordt steeds verder onderzocht naar de MIC van de laurier olie en de extra hydrosolen. In labo 1, 2, 7, 8 en 9 zijn antibiogrammen gemaakt. In labo 1, 2 en 3 wordt een vooronderzoek gedaan naar de laurier olie waarbij telkens een andere techniek gebruikt is. In labo 1 en 2 wordt een vooronderzoek voor het antibiogram uitgevoerd. In labo 7, 8 en 9 worden de triplo en duplo testen uitgevoerd.

Na de triplo-testen is duidelijk dat 1% laurier olie voldoende is om *E. coli* en *S. aureus* sterk af te remmen en waarschijnlijk te doden als het toevoegen van de olie op dezelfde dag gebeurt als het beënten. In dit onderzoek is niet verder gekeken dan 1%. De sporen van *B. subtilis* worden minstens tot 50% niet afgedood. Hoger dan 50% is in dit onderzoek niet onderzocht. De hydrosolen van korenbloem, pepermunt en Kalanchoë zijn verontreinigd met bacteriën. Hierdoor kan niet met zekerheid hun antimicrobiële werking worden vastgesteld voor de drie bacteriën. Het laurier hydrosol heeft met 100% een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect op *E. coli* en *B. subtilis* en een remmend effect op *S. aureus*. Het hydrosol van wilde tijm heeft een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect minstens vanaf 98% op *E. coli* en *S. aureus*. Bij 100% worden de sporen van *B. subtilis* niet afgedood. Voor het antibiogram is enkel een inhibitiezone te zien bij de laurier olie en niet bij de hydrosolen. Voor *E. coli* is dit gemiddeld 8,7 mm. Voor *S. aureus* is dit gemiddeld 8 mm en voor *B. subtilis* is dit gemiddeld 12,3 mm.

## Verkorte samenvatting

De laurier is een eeuwenoude bekende plant die je zowel in de tuin als in je keuken kan tegenkomen. Uit de laurierbladeren kan echter ook via stoomdestillatie etherische olie worden gehaald. Om een mogelijke toepassing te vinden voor de olie, moet eerst gekeken worden naar de eigenschappen ervan. In mijn bachelor proef ga ik dus onderzoeken of de laurier olie bacteriën kan afdoden en bij welke concentratie dit is.

## Lijst van gebruikte afkortingen en symbolen

| Afkorting          | Volledige benaming                |
|--------------------|-----------------------------------|
| AMP10              | Ampicilline (10 µg)               |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i>          |
| CN10               | Gentamicine (10 µg)               |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>           |
| HRMS               | high resolution mass spectrometry |
| P1                 | Penicilline (0,6 µg)              |
| rpm                | Revoluties per minuut             |
| <i>S. aureus</i>   | <i>Staphylococcus aureus</i>      |

# 1 Inleiding

De laurier is al eeuwen gekend om zijn sierlijkheid en onoverwinnelijkheid omwille van zijn altijd blijvende groene kleur. In de Klassieke Oudheid was de laurier dan ook het symbool van overwinning, denk maar aan de lauwerkrans die onder andere Julius Caesar droeg. Deze sierlijke plant heeft echter nog veel meer te bieden dan alleen zijn uitzicht. Zo kan je de laurier ook in de keuken vinden als kruid. De bladeren van de laurier worden bijvoorbeeld voor een tijd mee gestoofd om zo het gerecht meer smaak te geven.

In deze tijden zijn mensen steeds meer en meer opzoek naar zo natuurlijk mogelijke producten. Ze willen zo weinig mogelijk chemicaliën in hun gebruikte producten terugvinden. De voedingsindustrie is zelf ook op zoek naar manieren om op een mildere manier het product veilig te maken, waarbij de structuur, smaak, geur, enz. behouden blijft. Ideaal zou zijn als dit via een natuurlijk middel verkregen kan worden. In de medische sector zijn wetenschappers ook op zoek naar nieuwe bacteriedodende middelen omdat steeds meer bacteriën resistentie ontwikkelen tegen de nu gebruikte antibiotica.

Een van deze natuurlijke producten die al jaren worden gebruikt door onder andere de voedingsindustrie, zijn de essentiële oliën die uit planten worden gehaald. Er wordt steeds meer onderzoek gedaan naar de mogelijkheden voor deze natuurlijke middelen. Zo wordt er bijvoorbeeld onderzocht of de oliën een antimicrobieel effect zouden kunnen hebben en of ze als een natuurlijk conserveringsmiddel gebruikt kunnen worden. Het opdracht gevende bedrijf Gova, een laurierkwekerij, bekomt veel snoeiafval. Gova wil de bladeren van het snoeiafval (afvalstroom) gaan gebruiken waardoor ze niet zomaar verloren gaan.

In dit onderzoek wordt dus nagegaan of de essentiële olie van laurier een antimicrobieel of groei-remmend effect heeft. De antimicrobiële werking zal getest worden aan de hand van twee methodes: de MIC-bepaling en het antibiogram. Verder is het onderzoek uitgebreid met vijf hydrosolen van laurier, wilde tijm, pepermunt, korenbloem en Kalanchoë. In het bijkomende onderzoek zal eerst gewerkt worden met een methanol extract van Kalanchoë. Later zal met het hydrosol worden gewerkt.

## 2 Literatuurstudie

In deze literatuurstudie is informatie terug te vinden over essentiële oliën en hydrosolen. Verder is er ook informatie te vinden over laurier waarbij wordt toegespitst op de essentiële olie en het hydrosol hiervan. Vervolgens wordt er informatie gegeven over micro-organismen waarbij meer wordt toegespitst op bacteriën.

### 2.1 Laurier

Als er over laurier gesproken wordt, wordt er in dit rapport de gewone laurier bedoeld ofwel de *Laurus Nobilis*, de wetenschappelijke naam van deze plant. De *Laurus Nobilis*, een altijd groenblijvende plant, komt oorspronkelijk uit het Zuidelijke Middellandse Zeegebied. Ze behoort tot de laurierfamilie ook wel *Lauraceae* genoemd (Taban et al. 2018).

In dit onderzoek zal alleen worden gewerkt met de essentiële olie van laurier en het daarbij verkregen hydrosol.

#### 2.1.1 Essentiële oliën

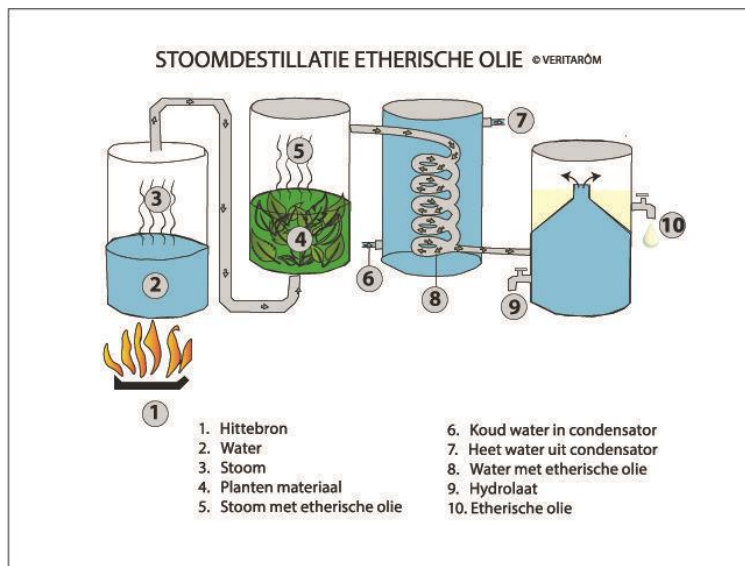
Essentiële oliën zijn aromatische olieachtige vloeistoffen die worden verkregen uit plantaardig materiaal zoals bloemen, knoppen, bladeren, zaden, enz. Essentiële oliën worden ook wel eens vluchtige of etherische oliën genoemd (Burt 2004).

##### 2.1.1.1 Extractie methoden

Essentiële oliën kunnen op verschillende manieren worden verkregen. Er zijn vier bekende methodes die hiervoor gebruikt worden:

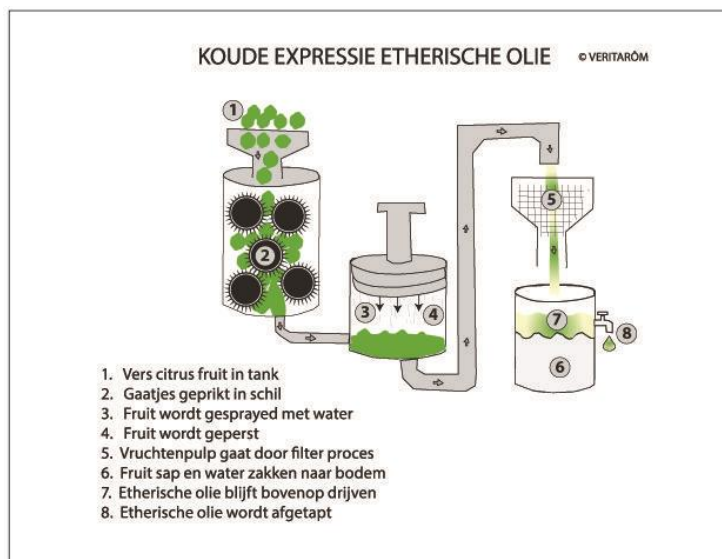
1. Stoomdestillatie
2. Koude expressie
3. Solvent extractie
4. CO<sub>2</sub> extractie

De meest gebruikte methode is stoomdestillatie (zie figuur 1). De laurier olie waarmee in dit onderzoek wordt gewerkt is ook verkregen via stoomdestillatie. Stoomdestillatie werkt als volgt: eerst wordt in een kolf of vat water verhit. Hierdoor zal stoom ontstaan. Deze stoom wordt via de onderkant doorheen het plantenmateriaal gevoerd. De stoom zal alle vluchtige stoffen in het plantenmateriaal onttrekken en meevoeren. Vervolgens wordt de stoom waarin de plantenextracten zitten, afgekoeld in een condensator om zo terug water te verkrijgen. Het water met platenextracten in zal dan naar een separatievat worden gebracht. Water en essentiële olie mengen niet. Hierdoor zal de olie op het water gaan drijven en dus vanboven worden afgetapt. Het water bevat nog steeds platenextracten. We spreken daarom over hydrosol en niet meer over water. Het hydrosol kan aan de onderkant worden afgetapt.



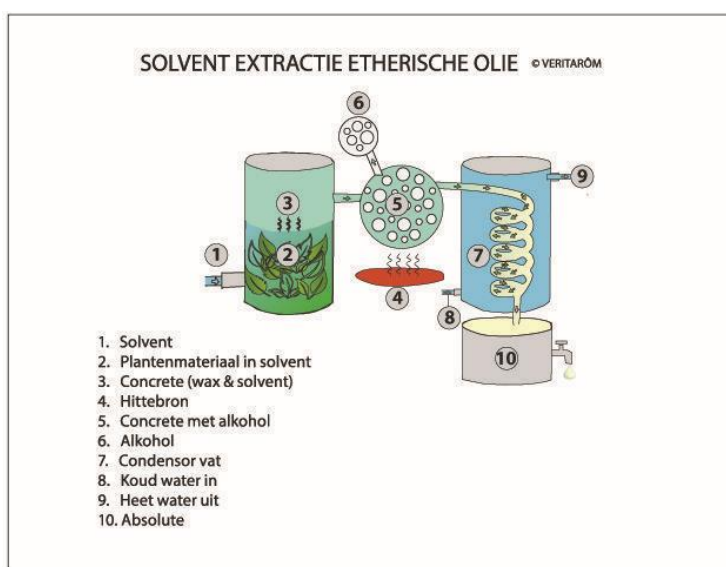
Figuur 1: Principe stoomdestillatie (Weerd 2018)

Een andere methode die gebruikt wordt om etherische olie uit citrusvruchten te halen is koude expressie (zie figuur 2). Als eerste komen de citrusvruchten in de machine terecht waar er kleine gaatjes in de schillen worden geboord. Hierdoor zullen de zakjes, waarin de essentiële oliën zitten, openscheuren. Vervolgens wordt al het plantenmateriaal via een buis naar een opvangvat gebracht. Hier zal water worden toegevoegd aan het plantenmateriaal om zo de oliën makkelijker los te weken uit de schil. Daarna zal alles geperst worden. In de volgende stap wordt het materiaal naar een ander vat gebracht om vervolgens gefilterd te worden en soms ook gecentrifugeerd. Dit wordt gedaan omwille van de aanwezigheid van veel vaste stoffen van de vruchten in het sap. Het gefilterde sap met daarin de essentiële olie wordt dan gebracht naar het separatievat. Net als bij stoomdestillatie mengt de olie niet met het sapwater en gaat het er bovenop drijven. De olie kan dus bovenaan het vat worden afgetapt.



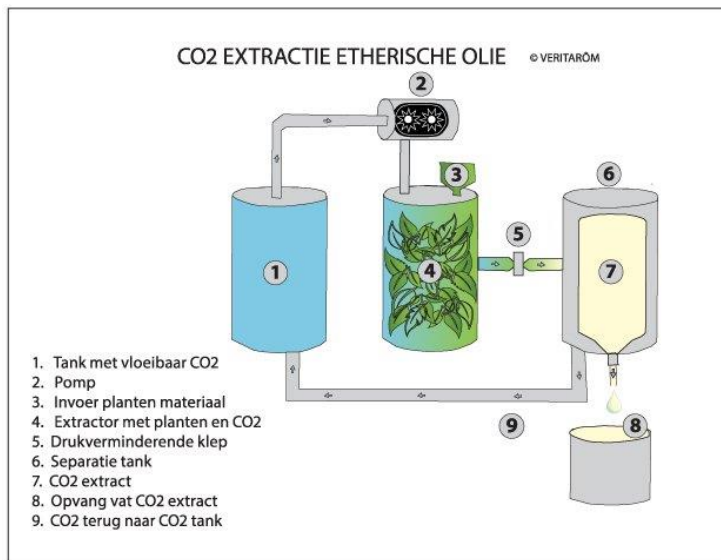
Figuur 2: Principe koude expressie (Weerd 2018)

Als het plantenmateriaal niet zo goed bestand is tegen stoomdestillatie of het een harsachtige plant is, wordt best gekozen voor solvent extractie (zie figuur 3) om de etherische olie te verkrijgen. Bij deze methode wordt het plantenmateriaal samen met hexaan of ethanol in een afgesloten vat gestopt. Het plantenmateriaal wordt dus in het solvent geweekt. Het weken is klaar wanneer er een wasachtig aromatisch materiaal verkregen is. Dit wasachtig materiaal wordt ook wel Concrete genoemd. Vervolgens wordt het materiaal naar een vacuümdestillatievat gestuurd waar onder invloed van hitte en met behulp van alcohol de essentiële oliën vrijkomen. De alcohol blijft achter doordat het ergens anders wordt opgevangen omwille van zijn zeer vluchtige karakter. De olie wordt naar de condensator gebracht waar deze afgekoeld wordt. De olie wordt tot slot opgevangen in een vat waar het kan worden afgetapt. De olie die verkregen wordt via deze methode wordt ook wel een Absolute genoemd.



*Figuur 3: Principe solvent extractie (Weerd 2018)*

Tot slot kunnen essentiële oliën ook verkregen worden via CO<sub>2</sub> extractie (zie figuur 4). De CO<sub>2</sub> extractie is vergelijkbaar met de stoomdestillatie. Het grote verschil is echter dat CO<sub>2</sub> extractie zonder hitte kan worden gedaan. De CO<sub>2</sub> ofwel koolstofdioxide wordt in een tank gedaan en onder druk gezet. Bij een zeer hoge druk kan CO<sub>2</sub> in een superkritische staat komen. Dit wil zeggen dat de CO<sub>2</sub> zowel gas als vloeibare eigenschappen heeft. Als de CO<sub>2</sub> in deze staat is wordt die naar het vat met plantenmateriaal in gepompt. Door de CO<sub>2</sub> in de superkritische staat te brengen, zal het als oplosmiddel fungeren en zo de essentiële oliën en andere stoffen zoals pigment en hars onttrekken aan het plantenmateriaal. De olie lost dus als het ware op in de CO<sub>2</sub>. Via een druk verminderende klep wordt het gas-oliemengsel terug naar de atmosferische druk gebracht. Hierbij komt de CO<sub>2</sub> terug in zijn normale gasvormige toestand terecht. De CO<sub>2</sub> wordt terug naar de druktank geleid en de olie wordt naar een opvangvat geleid waar het kan worden afgetapt (Weerd 2018).



Figuur 4: Principe CO2 extractie (Weerd 2018)

### 2.1.1.2 Mogelijke componenten

Essentiële oliën zijn heterogene mengsels. Met andere woorden ze bestaan uit verschillende, in dit geval, organisch-chemische verbindingen uit verschillende chemische families. Zo kan men terpenoïde, monoterpenen en sesquiterpenen terugvinden. Alifatische verbindingen met een laag molecuulgewicht, acyclische ester of lactonen kunnen ook aanwezig zijn in de olie. Bepaalde factoren kunnen echter de chemische samenstelling van de olie beïnvloeden. Enkele voorbeelden van deze factoren zijn platensoorten en ondersoorten, geografische locatie, oogsttijd, welk deel van de plant gebruikt wordt en welke extractiemethode wordt gebruikt ((Rivera-chavira et al. 2018), (Tural & Turhan 2017)). Het kan dus voorkomen dat de laurier die hier geteeld wordt in Nederland een andere compositie heeft dan laurier die in het zuiden wordt geteeld. De belangrijkste/meest voorkomende componenten in laurier olie zijn 1,8-cineole, Sabinine en  $\alpha$ -Terpinyl acetate ((Elizabeth et al. 2007), (Fratianni et al. 2017), (Oils 2019), (Rivera-chavira et al. 2018), (Taban et al. 2018), (Tural & Turhan 2017)).

### 2.1.1.3 Toepassingen

Essentiële oliën worden al jaren gebruikt in de voedingsindustrie voor hun specifieke geuren en smaken (Burt 2004). Essentiële oliën worden ook gebruikt in parfums, omgetoverd tot drankjes met bijvoorbeeld limoen, venkel of jeneverbes-olie en het conserveren van opgeslagen voedselgewassen. Op vlak van de mogelijke antimicrobiële werking van essentiële oliën worden ze ook gebruikt voor het bewaren van rauwe en bewerkte voedingsmiddelen. Ze worden omwille van deze reden ook gebruikt in farmaceutische producten, alternatieve geneesmiddelen en natuurlijke therapieën (Hammer et al. 1999). De olie kan gebruikt worden als een antimicrobiële, pijnstillende, kalmerende, ontstekingsremmende, spasmolytische en lokaal verdovend middel (Bakkali & Idaomar 2008). De toepassingen van essentiële oliën lijken eindeloos te zijn.

### 2.1.2 Hydrosol

Hydrosolen ofwel aromatisch water is de condens na de stoomdestillatie waarin nog een klein deel van de olie inzet en ook enkele vluchtige wateroplosbare componenten uit de plant (Paparella et al. 2018).

#### 2.1.2.1 Mogelijke componenten

Net als bij de oliën bestaat het hydrosol uit een heterogeen mengsel van organisch-chemische verbindingen uit verschillende chemische families. De samenstelling van het mengsel wordt net als bij de olie beïnvloed door bepaalde factoren. Ondanks dat de olie en het hydrosol van dezelfde plant komen, bestaan ze niet uit dezelfde componenten. Als ze toch eenzelfde component hebben, komt deze ook in een andere hoeveelheid voor. De belangrijkste componenten in het laurier hydrosol zijn: eugenol (4.02%),  $\alpha$ -curcumene (3.76%) en  $\beta$ -selinenol (3.75%) (Paparella et al. 2018).

#### 2.1.2.2 Toepassingen

Hydrosolen worden net als essentiële oliën al jaren gebruikt. Veel van de toepassingen komen dan ook overeen met die van de essentiële oliën. Rond het middellandse zeegebied wordt het gebruikt in traditionele medicatie. Ze worden in drankjes gedaan en worden ook voor hun specifieke smaak gebruikt. In de cosmetica komen de hydrosolen ook voor. Omwille van hun mogelijk antimicrobiële werking wordt er nu naar gekeken of hydrosolen ook in de voedingsindustrie kunnen worden ingezet (Paparella et al. 2018).

## 2.2 Micro-organismen

Micro-organismen zijn kleine levende organismen die individueel niet waarneembaar zijn met het blote oog. Zoals de naam het al aangeeft, zijn deze organismen microscopisch klein en kunnen ze enkel met een microscoop individueel bekeken worden. Micro-organismen is een benaming van een brede groep die uit verschillende soorten bestaat. De groep van de micro-organismen bestaat uit bacteriën (archaeabacteriën en eubacteriën), fungi (gisten en schimmels), protozoa, algen en zelfs virussen. In deze studie wordt er verder gefocust op de groep bacteriën.

### 2.2.1 Bacteriën

Bacteriën bezitten net als de meeste andere organismen zowel DNA als RNA. Enkel virussen en bacteriofagen bezitten slechts één van de twee. Verder kunnen bacteriën ingedeeld worden onder de prokaryoten. Tot de prokaryoten behoren de organismen waarbij het kernmateriaal niet is ingesloten door een membraan en waarbij er geen mitochondriën aanwezig zijn. De prokaryoten kunnen opgesplitst worden in twee domeinen: de archaea of archaeabacteriën en de eubacteriën ofwel de echte bacteriën (Reweghs, 2017). In dit onderzoek wordt gewerkt met de echte bacteriën.

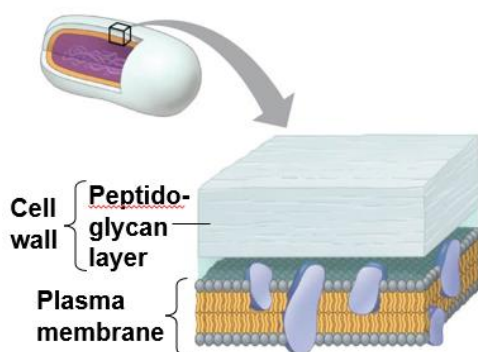
Bacteriën kunnen van elkaar onderscheiden worden op basis van:

- morfologie ofwel de vorm van de bacterie
- chemische samenstelling (Dit kan bepaald worden door middel van een kleuringsreactie.)
- nutritionele vereisten
- biochemische activiteit
- energiebron (Dit kan de zon of chemische stoffen zijn.)

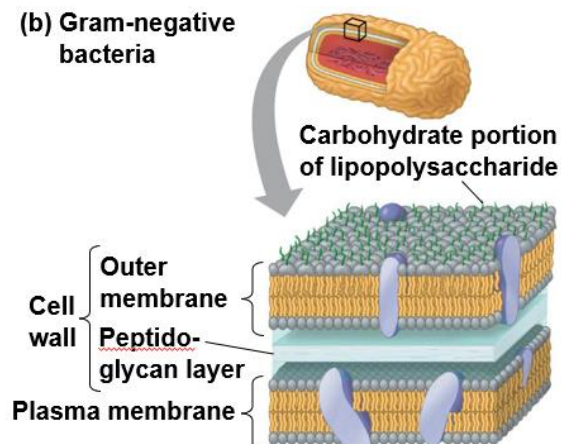
In dit rapport wordt er enkel onderscheid gemaakt op basis van twee aspecten. Als eerste wordt er gekeken naar de structuur van de celwand van de bacterie. Op deze manier kunnen bacteriën opgesplitst worden in twee groepen: de gram-positieve bacteriën en de gram-negatieve bacteriën (zie figuur 5).

Een gram-positieve bacterie heeft als celwand verschillende lagen peptidoglycaan. Hierdoor wordt een dikke, rigide structuur gevormd. Gram-negatieve bacteriën hebben een celwand die bestaat uit een dunne peptidoglycaanlaag die gelegen is tussen twee membranen: het celmembraan en een buitenste membraan. De peptidoglycaanlaag bevindt zich tussen twee membranen omdat deze dunner is en dus gevoeliger is voor mechanische beschadigingen. (Campbell N.A., 2014)(Wiersema n.d.) (Reweghs, 2017)).

**(a) Gram-positive bacteria**

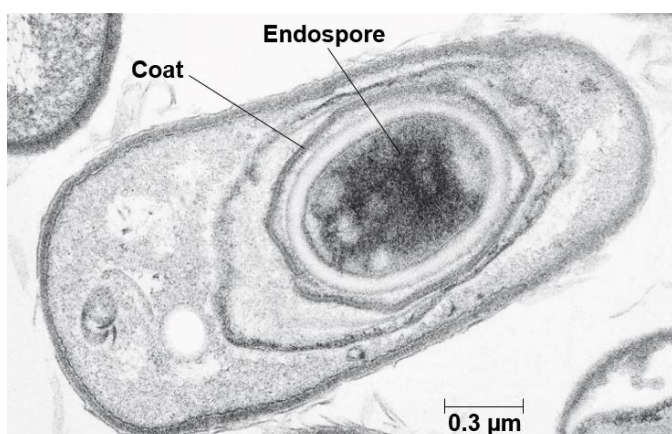


**(b) Gram-negative bacteria**



Figuur 5: Gram-positieve bacterie (a) en gram-negatieve bacterie (b) (Campbell N.A., 2014)

Voor het tweede aspect wordt er gekeken of de bacterie sporen kan vormen of niet. Sommige bacteriën kunnen namelijk resistente cellen ontwikkelen bij gebrek aan een essentiële voedingsstof of wanneer ze zich in een vijandige omgeving bevinden. Die gevormde resistente cellen worden endosporen of sporen genoemd (zie figuur 6). De originele cel produceert hierbij een kopie van zijn chromosoom. Deze wordt dan omringd met een taaie meerlaagse structuur. Vervolgens wordt water uit de spore verwijderd en stopt het metabolisme. De originele cel breekt dan open (cel lysis) en de endospore komt vrij. In minder vijandige omgevingen kunnen endosporen eeuwenlang blijven leven. Als de omgeving verbetert, start het metabolisme terug op. Door de taaie uitwendige structuur, zijn de meeste sporen zeer moeilijk om af te doden en kunnen ze zelfs overleven in kokend water of erg zure omgevingen. Om sporen af te doden is een temperatuur van 121°C onder hoge druk minstens nodig. Er kan dus worden vastgesteld dat als de sporen zijn afgedood, het vrij zeker is dat het product veilig is (Campbell N.A., 2014).



Figuur 6: Voorbeeld van een endospore (nog in de bacterie) (Campbell N.A., 2014)

### 2.2.2 Indicator

Om te bepalen of een bepaald product bacterievrij of veilig is, kunnen indicator micro-organismen worden gebruikt. Deze micro-organismen zijn zeer moeilijk om af te doden en zijn op zich makkelijk te testen. In normale omstandigheden zijn deze micro-organismen ook niet zo schadelijk voor de mens of gevaarlijk in het algemeen. Indien alle micro-organismen na afloop van de test werden vernietigd, kan worden besloten dat het product veilig is. In onderzoeken omtrent micro-organismen wordt er vaak gebruikt gemaakt van deze indicatoren. De meest bekende en meest gebruikte indicator van de bacteriën ofwel modelbacterie is de gram-negatieve bacterie *Escherichia coli* (*E. coli*). Een andere bekende bacterie is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Dit is een gram-positieve bacterie. In dit onderzoek wordt dus zowel met *E. coli* als *S. aureus* gewerkt, om een volledig beeld te krijgen van beide soorten bacteriën. Aangezien sporen moeilijk zijn af te doden, werd ook een sporenvormende bacterie, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), toegevoegd aan dit onderzoek. Net als *E. coli* is ook *B. subtilis* een veel gebruikte bacterie in verschillende onderzoeken.

## 3 Methodiek

In dit onderzoek worden twee methodes gebruikt om de antibacteriële werking van de essentiële olie en hydrosolen te bepalen: de MIC-bepaling en het antibiogram. Voor alle proefbuizen en erlenmeyers wordt Mueller-Hinton broth gebruikt. Deze worden telkens voor ongeveer 24 uur op 36°C geïncubeerd. Voor de platen wordt Mueller-Hinton agar gebruikt en deze worden telkens omgekeerd geïncubeerd voor ongeveer 24 uur op 36°C. Er wordt voor 36°C gekozen omdat voor alle drie de bacteriën de optimale groeitemperatuur rond de 36°C ligt. Mueller-Hinton agar is een vast voedingsmedium waarin nutriënten zitten, waar de meeste micro-organismen op/in kunnen groeien. Deze agar wordt vaak gebruikt bij onderzoeken omtrent antimicrobiële werking. Broth is een gelijkaardig voedingsmedium maar vloeibaar dat ook wel eens bouillon wordt genoemd. Om te voorkomen dat er invloed is door het gebruiken van verschillende agars en broths wordt er voor gekozen om in dit onderzoek altijd Mueller-Hinton te gebruiken voor zowel de agarplaten als de broth.

### 3.1 MIC – bepaling

De MIC-bepaling is een analyse waarbij gekeken wordt naar de minimale concentratie waar er nog een zeer sterk remmende werking is. MIC staat dus voor “Minimal Inhibitory Concentration” ofwel in het Nederlands minimale remmende concentratie (Wiersema n.d.). Nadat de stalen zijn beënt en ongeveer 24 uur zijn geïncubeerd bij 36°C wordt er naar de proefbuizen gekeken of deze troebel zien of niet en bij de erlenmeyers wordt naar de broth gekeken. Als de proefbuis/erlenmeyer troebel ziet, wil dit zeggen dat er hoogstwaarschijnlijk groei aanwezig is. Om hier zeker van te zijn worden de proefbuizen uitgeplaat op een agarplaat en omgekeerd geïncubeerd voor ongeveer 24 uur bij 36°C. Na de incubatie wordt gekeken of er groei te zien is of niet (bacteriekolonies of streep zichtbaar of niet). De MIC is dus de laagste concentratie waar geen troebelheid en geen groei op de plaat is te zien. Echter wil het niet direct zeggen dat als er geen groei te zien is op de plaat de bacterie is afgedood. Er kan alleen met zekerheid worden gezegd dat de bacterie niet meer kan uitgroeien tot een zichtbare kolonie op 24 uur tijd. Het kan dus zijn dat de bacterie meer tijd nodig heeft om uit te groeien (langere lagfase). De MIC-bepaling voor de hydrosolen gebeurt op een andere manier dan bij de olie.

#### 3.1.1 Olie

De MIC-bepaling bij de olie is eerst gedaan met behulp van proefbuizen. De olie bleef echter als een laag op de broth liggen. Tijdens de incubatieperiode zijn deze proefbuizen in een schudstoof, op 36°C, gezet om er zo voor te zorgen dat de olie zou mengen met de broth. De olie mengde niet met de broth, het bewoog enkel mee met de beweging van de schudstoof. Hierdoor geeft dit een vertekend beeld of de olie nu wel of niet een antibacteriële werking heeft bij die concentratie. Als eerste komt enkel het bovenste deel van de broth in contact met de olie. Ten tweede moeten de bacteriën zonder zuurstof ofwel anaeroob groeien doordat de olie boven op de broth ligt. Alle drie de bacteriën kunnen op zich anaeroob groeien maar ondervinden waarschijnlijk een gelimiteerde groei ten opzichte van de groei in een zuurstofrijke omgeving.

De olie werd voor de volgende test aan erlenmeyers toegevoegd, waarbij in de erlenmeyer een magnetisch roerstaafje lag. De erlenmeyers met de broth, olie en bacteriën in werden op een magnetische roerder gezet (zie figuur 7) in de incubator (36°C) voor ongeveer 24 uur. Hierbij werd de olie wel goed gemengd met de broth. Met deze techniek werd dus verder gewerkt om te zoeken naar de MIC van de olie.



Figuur 7: Erlenmeyers met broth, olie en bacteriën in op een magnetische roerder

Naast bovenvermelde technieken, werd ook een derde techniek uitgetest om een goede vermenging tussen olie en broth te bekomen. Bij deze techniek werd Tween 80 als hulpmiddel toegevoegd om de olie op te lossen in de waterige broth. Gezien er te veel Tween 80 nodig was om het grootste deel van de olie op te lossen, werd met deze techniek niet verder gewerkt. Het is namelijk niet echt aangewezen om veel emulgator te gaan gebruiken in producten.

Voor het uitplaten van de erlenmeyers wordt met een micropipet 20  $\mu$ l uit de erlenmeyer gehaald. Om zeker te zijn dat er zo weinig mogelijk olie wordt meegenomen wordt de pipet pas ingedrukt als deze in de broth zit (onderste gedeelte) en vervolgens daar opgezogen. De 20  $\mu$ l wordt in een lege petrischaal gedaan (zie figuur 8b). Na het afvlammen van de entoog wordt de entoog in de druppel gebracht. Om niet te veel mee te nemen wordt de entoog twee tot drie keer afgetikt rond de druppel. Vervolgens wordt de entoog via een zigzagbeweging naar beneden gebracht (tot ongeveer het midden van de petrischaal). Bij het maken van deze zigzagbeweging, verminderd de hoeveelheid vloeistof naar het midden toe. Ook is het belangrijk om in de vooraf afgebakende zone te blijven, zodat de zigzaglijn niet in aanraking komt met het naastliggende gebied. Anders is er kans dat de twee lijnen met elkaar mengen en voor een vertekend beeld zorgen (zie figuur 8a).



Figuur 8: Uitplaten stalen (a) en druppels bij uitplaten olie (b)

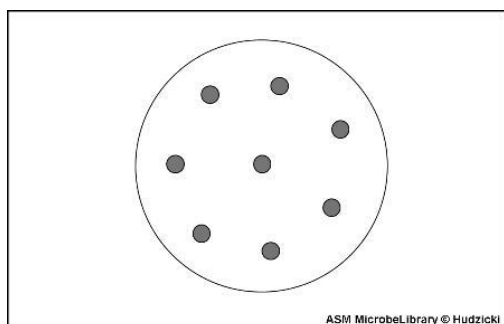
### 3.1.2 Hydrosolen

De MIC-bepaling bij de hydrosolen vond enkel in de proefbuizen plaats. De hydrosolen lossen/mengen wel goed op in/met de broth. De hydrosolen en de broth bestaan alle twee voornamelijk uit water. Hierbij was dus meestal goed zichtbaar of bacteriële groei aanwezig was. Bij twijfel werden ook deze uitgeplaat om nauwkeuriger na te gaan of er bacteriële groei aanwezig was. Voor het uitplaten wordt er een entoog uit de proefbuis gehaald en vervolgens op de schaal aangebracht (zie figuur 8a).

## 3.2 Antibiotogram bepaling

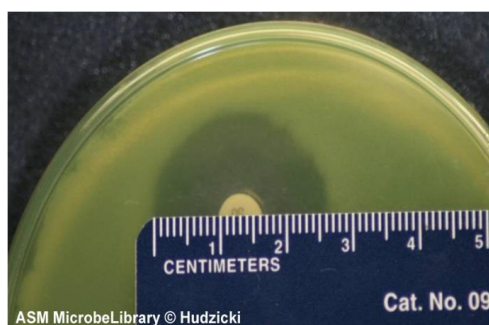
Om na te gaan of een stof een bepaalde antimicrobiële werking heeft, kan een antibiogram worden gebruikt. Bij een antibiogram wordt er gekeken of er een inhibitiezone is rond een papieren schijfje of disk genoemd (Wiersema n.d.). Dit schijfje is dan gedrenkt in een bepaalde stof of is een al klaargemaakt schijfje waar een stof met antibiotische werking opzit. In dit onderzoek worden op blanco schijfjes enkele druppels van de hydrosolen, olie en water gedaan. Het water dient in dit geval als een negatief, waarbij dus geen inhibitiezone zichtbaar mag zijn. Als positieve test, wordt voor een antibioticum gekozen dat werkt tegen die specifieke bacterie. Hierbij moet er wel een inhibitiezone te zien zijn. Voor *E. coli* wordt het antibioticum ampicilline (10 µg) (AMP10) gebruikt. Voor *S. aureus* wordt gentamicine (10 µg) (CN10) gebruikt en voor *B. subtilis* wordt penicilline (0,6 µg) (P1) gebruikt.

De platen worden eerst gemerkt met de soort bacterie en staal (olie of hydrosol) dat er op zit, de percentages, de datum, de initialen van de onderzoeker en de initialen van de gebruikte soort plaat. Vervolgens worden de bacteriën op hun eigen plaat aangebracht. Er worden geen twee verschillende bacteriën op eenzelfde plaat gezet. De blanco schijfjes krijgen dan via een pipet 2 druppels staal op zich. Dit gebeurt om de beurt. Terwijl het ene staal droogt worden ander schijfjes met een ander staal bedruppelt. Het eerste staal is gedroogd tegen dat de anders schijfjes bedruppeld zijn. De eerste schijfjes kunnen dan op hun desbetreffende plaats worden aangebracht op de plaat (zie Figuur 9).



Figuur 9: Voorbeeld patroon plaatsing schijfjes (Wirix, 2018)

Dit gebeurt zo om de beurt tot alle stalen aangebracht zijn. De antibiotica schijfjes zijn al van tevoren gemaakt en hoeven enkel op de plaat worden geplaatst. Vervolgens worden de platen omgekeerd geïncubeerd voor ongeveer 24 uur bij 36°C. Na de incubatie worden de platen afgelezen. Hierbij wordt de inhibitiezone gemeten met een liniaal (diameter in mm) (zie Figuur 9). Deze antibiogrammen hebben als doel de antibacteriële werking (en grootte hiervan) te bepalen voor elk hydrosol en olie van *E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis*.



Figuur 10: Voorbeeld meting inhibitiezone (Wirix, 2018)

## 4 Resultaten

In totaal zijn er negen verschillende deel onderzoeken (labo's) uitgevoerd. Hieronder wordt per labo de resultaten besproken. De bijhorende figuren/foto's waarnaar verwezen wordt, zijn voornamelijk te vinden in de bijlagen.

### 4.1 Labo 1

In labo 1 wordt er een vooronderzoek uitgevoerd. Hierbij wordt voor de MIC-bepaling voor een algemene verdunning reeks gekozen. Hierbij is elk vorig staal 50% meer verdund met broth dan het vorige (50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%). Voor de MIC-bepaling worden de stalen in proefbuizen gedaan. De olie is hierbij ook in proefbuizen gedaan en in de schudstoof geplaatst tijdens de incubatieperiode. Na de incubatieperiode waarbij de stalen in een stoof van 36°C of in de schudstoof van 36°C stonden, worden de proefbuizen eruit gehaald en gecontroleerd op groei.

De olie blijft ondanks in de schudstoof te zitten gewoon als een laag op de broth liggen (zie figuren 41, 42 en 43 in bijlage 1). De olie mengt dus niet met de broth. De resultaten van dit vooronderzoek zijn te vinden in tabel 1 en de fotoresultaten in bijlage 1 (figuren 41, 42 en 43).

Tabel 1: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) labo 1

| Laurier olie       | 50%                                                                                             | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>     | Heel lichte wazige schijn, hoe hoger de concentratie hoe helderder het wordt (blijft wel wazig) |     |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>   | Heel lichte wazige schijn, hoe hoger de concentratie hoe helderder het wordt (blijft wel wazig) |     |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i> | Heel lichte wazige schijn, hoe hoger de concentratie hoe helderder het wordt (blijft wel wazig) |     |       |       |        |

De hydrosolen mengen wel goed met de broth. De bacteriën kunnen in dit geval wel gewoon aeroob groeien. De foto's van de resultaten van het laurier hydrosol zijn te zien in bijlage 1 (figuren 44, 45 en 46) en de resultaten zijn te vinden in tabel 2.

Tabel 2: Vooronderzoek laurier hydrosol labo 1

| Laurier hydrosol   | 50%                                                                                            | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>     | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                             |     |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>   | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i> | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |

De resultaten van het hydrosol van wilde tijm staan in tabel 3 en de fotoresultaten zijn te zien in bijlage 1 (figuren 47, 48 en 49).

Tabel 3: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol labo 1

| Wilde tijm hydrosol | 50%                                                                                                 | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>      | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                                  |     |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>    | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; iets lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i>  | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                                  |     |       |       |        |

De foto's van de resultaten van het pepermunt hydrosol zijn te zien in bijlage 1 (figuren 50, 51 en 52) en de resultaten staan in tabel 4.

Tabel 4: Vooronderzoek pepermunt hydrosol labo 1

| Pepermunt hydrosol | 50%                                                                                            | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>     | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                             |     |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>   | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i> | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |

De resultaten van het hydrosol van korenbloem zijn te vinden in tabel 5 en de fotoresultaten zijn te zien in bijlage 1 (figuren 53, 54 en 55).

Tabel 5: Vooronderzoek korenbloem hydrosol labo 1

| Korenbloem hydrosol | 50%                                                                                            | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>      | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                             |     |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>    | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler                             |     |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i>  | Duidelijk groei (troebel), hoe lager de concentratie hoe troebeler; lichter dan <i>E. coli</i> |     |       |       |        |

Het methanol extract van Kalanchoë is groen van kleur. In het flesje zelf zijn nog planten delen aanwezig waardoor bezinskel in alle proefbuizen terecht is gekomen (zie figuren 56, 58 en 60 in bijlage 1). De concentratie aan bezinskel neemt af naarmate de concentratie aan broth groter wordt. Bij het vortexen of schudden van de proefbuizen ontstaat er een groene neerslag (zie figuren 57, 59 en 61 in bijlage 1). Dit maakte het controleren op groei (troebelheid) moeilijker. Het kan misschien lijken dat de proefbuis troebel is. Echter zou dit dan komen door de groene neerslag en niet door de bacterie zelf. Bij de 50% proefbuizen, van alle drie de bacteriën, is de proefbuis helder als deze niet geschud wordt. De andere proefbuizen zien er troebel uit. De resultaten zijn te vinden in tabel 6.

Tabel 6: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë labo 1

| Methanol extract Kalanchoë | 50%    | 25%     | 12,5% | 6,25% | 3,125% |
|----------------------------|--------|---------|-------|-------|--------|
| <i>E. coli</i>             | Helder | Troebel |       |       |        |
| <i>S. aureus</i>           | Helder | Troebel |       |       |        |
| <i>B. subtilis</i>         | Helder | Troebel |       |       |        |

### Antibiogram

Voor het antibiogram zijn blanco papiertjes gebruikt die geautoclaveerd zijn. De gebruikelijke blanco schijfjes zijn op dit moment nog niet aanwezig. Voor het vooronderzoek is dit voldoende om al eens te kijken of er een inhibitiezone is bij de hydrosolen, het methanol extract en de olie. De positieve en negatieve controles zijn nog niet mee uitgevoerd. Op de foto's (zie figuren 62 en 63 in bijlage 1) is te zien dat in beide gevallen de eerste plaat beënt is met *B. subtilis*. De tweede plaat is beënt met *E. coli* en de derde met *S. aureus*. De inhibitiezone van olie bij *S. aureus* is kleiner dan bij *E. coli* en *B. subtilis*. Tabel 7 geeft de resultaten weer.

Tabel 7: Vooronderzoek antibiogram labo 1

| Antibiogram        | Laurier olie                                                    | Wilde tijm hydrosol       | Laurier hydrosol   | Pepermunt hydrosol | Korenbloem hydrosol | Methanol extract Kalanchoë |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>E. coli</i>     | Inhibitiezone                                                   | Geen inhibitiezone        |                    |                    |                     |                            |
| <i>S. aureus</i>   | Inhibitiezone; kleiner dan <i>E. coli</i> en <i>B. subtilis</i> | Zeër kleine inhibitiezone | Geen inhibitiezone |                    |                     |                            |
| <i>B. subtilis</i> | Inhibitiezone                                                   | Zeër kleine inhibitiezone | Geen inhibitiezone |                    |                     |                            |

## 4.2 Labo 2

Labo twee is weer opgedeeld in twee delen: het uitvoeren van de MIC-bepaling en het maken van een antibiogram. In het vorige labo is duidelijk geworden dat de olie in proefbuizen doen en in de schudstoof plaatsen niet goed werkt. Tijdens dit labo is de olie in erlenmeyers gedaan waarin een magneet zit. Tijdens de incubatieperiode zijn deze op een magneetroerder gezet die een snelheid heeft van 430 revoluties per minuut (rpm). Om te testen of deze techniek zou werken is eerst enkel de olie beënt met *E. coli*. Na de resultaten te hebben bekeken, is besloten om met deze techniek verder te werken. Vervolgens zijn er dus ook erlenmeyers met *S. aureus* en *B. subtilis* gemaakt. De olie mengt bij deze techniek wel goed met de broth. Voor de MIC-bepaling van de olie is weer dezelfde verdunningsreeks gebruikt als in het vorige labo (50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%). Om na te gaan of er groei aanwezig is, worden de erlenmeyers van de magnetische roerder gehaald. De olie zal hierbij terug als een laag op de broth gaan liggen. In de olielaag zijn nog duidelijk belletjes te zien door het vooraf roeren. Vervolgens kan dan naar de broth worden gekeken of deze troebel (groei) is of niet (geen groei). De resultaten hiervan zijn te zien in tabel 8 en de fotoresultaten zijn te vinden in bijlage 2 (figuren 64, 65 en 66).

Tabel 8: Vooronderzoek laurier olie (erlenmeyers) labo 2

| Laurier olie       | 50%    | 25%           | 12,5%         | 6,25%                        | 3,125%                          | 0%           |
|--------------------|--------|---------------|---------------|------------------------------|---------------------------------|--------------|
| <i>E. coli</i>     | Helder |               | Licht troebel | Helder                       | Troebel                         | Heel troebel |
| <i>S. aureus</i>   | Helder | Licht troebel | Troebel       | Troebel; troebeler dan 12,5% | Troebel, even troebel als 12,5% | Heel troebel |
| <i>B. subtilis</i> | Helder |               | Troebel       | Helder                       | Troebel; troebeler dan 12,5%    | Heel troebel |

In dit labo zijn voor de hydrosolen proefbuizen met enkel 100%, 50% en 25% hydrosol beënt met de bacteriën. Voor het methanol extract van Kalanchoë zijn enkel de proefbuizen met 100% beënt met de bacteriën. De resultaten van het laurier hydrosol zijn te vinden in tabel 9 en de fotoresultaten staan in bijlage 2 (figuur 67).

Tabel 9: Laurier hydrosol labo 2

| Laurier hydrosol   | 100%   | 50%     | 25%                        |
|--------------------|--------|---------|----------------------------|
| <i>E. coli</i>     | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>S. aureus</i>   | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>B. subtilis</i> | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |

In tabel 10 staan de resultaten van het hydrosol van wilde tijm. De fotoresultaten staan in bijlage 2 (figuur 70).

Tabel 10: Wilde tijm hydrosol labo 2

| Wilde tijm hydrosol | 100%   | 50%     | 25%                                                     |
|---------------------|--------|---------|---------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i>      | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50%                              |
| <i>S. aureus</i>    | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50%                              |
| <i>B. subtilis</i>  | Helder | Helder  | Troebel; lichter dan <i>E. coli</i> en <i>S. aureus</i> |

De resultaten van het pepermunt hydrosol staan in tabel 11 en de fotoresultaten zijn te vinden in bijlage 2 (figuur 68).

Tabel 11: Pepermunt hydrosol labo 2

| Pepermunt hydrosol | 100%   | 50%     | 25%                        |
|--------------------|--------|---------|----------------------------|
| <i>E. coli</i>     | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>S. aureus</i>   | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>B. subtilis</i> | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |

Tabel 12 geeft de resultaten van het korenbloem hydrosol weer. De fotoresultaten zijn terug te vinden in bijlage 2 (figuur 69).

Tabel 12: Korenbloem hydrosol labo 2

| Korenbloem hydrosol | 100%   | 50%     | 25%                        |
|---------------------|--------|---------|----------------------------|
| <i>E. coli</i>      | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>S. aureus</i>    | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |
| <i>B. subtilis</i>  | Helder | Troebel | Troebel; troebeler dan 50% |

De resultaten van het methanol extract van Kalanchoë staan in tabel 13 en het fotoresultaat is te vinden in bijlage 2 (figuur 71).

Tabel 13: Methanol extract Kalanchoë labo 2

| Methanol extract Kalanchoë | 100%                         |
|----------------------------|------------------------------|
| <i>E. coli</i>             | Troebel door groen bezinksel |
| <i>S. aureus</i>           | Troebel door groen bezinksel |
| <i>B. subtilis</i>         | Troebel door groen bezinksel |

#### Uitgeplaatte resultaten

Om zeker te zien of er wel of geen groei aanwezig is en hoe veel deze is, zijn de erlenmeyers uitgeplaat. Op de plaat waar de erlenmeyers met *E. coli* zijn op uitgeplaat (zie figuur 72 in bijlage 2), is duidelijk groei te zien bij 0% en 3,125%. Op de plaat is namelijk een dikke lijn te zien (over hele de streep). Hier is dus geen spraken van een remmend effect. Bij 50% is er 1 kolonie te zien op de plaat. Dit wil niet direct zeggen dat 50% geen zeer sterk remmend effect heeft. Als 50% enkel een remmend effect heeft zou er meer groei moeten te zien zijn. Om toch zeker te zijn is de verdunningsreeks nog een keer uitgeplaat (zie figuur 73 in bijlage 2). Hierbij zijn dezelfde resultaten te zien. Op de plaat is bij 25%, 12,5% en 6,25% geen groei te zien. Hier kan dus gezegd worden dat deze percentages een zeer sterk remmend effect hebben op de *E. coli*. De MIC is hier in dit geval 6,25%.

Op de plaat met *S. aureus* en olie (zie figuur 73 in bijlage 2) is een dikke streep te zien bij 0%. Dit wijst duidelijk op groei bij 0%. Bij de percentages 12,5%, 6,25% en 3,125% zijn enkele kolonies te zien. Bij 3,125% zijn dit 19 kolonies. Bij 6,25% zijn dit 13 kolonies en bij 12,5% zijn dit 12 kolonies. Dit wijst er dus op dat er een sterke remmende werking is bij deze percentages. Bij 25% en 50% was er geen groei te zien op de plaat. Dit wil zeggen dat deze percentages een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect hebben. De MIC is hier in dit geval 25%.

Op de plaat met *B. subtilis* en olie (zie figuur 73 in bijlage 2) is overal groei te zien. Bij 0% is een dikke streep te zien. Dit willen zeggen dat er duidelijk groei is en er geen remmend effect is. Bij de andere percentages is geen dikke streep te zien maar slecht wat kolonies. Doordat veel kolonies dicht bij elkaar liggen is het moeilijk om te tellen hoeveel kolonies het nu precies zijn. Bij 50% zijn er ongeveer 39 kolonies en bij 25% ongeveer 36. Bij 12,5% zijn er ongeveer 27 kolonies, bij 6,25% zijn er 14 en bij 3,125% zijn er 6 kolonies. In eerste instantie zou gezegd worden dat deze percentages een remmende werking hebben. De bacterie hier is echter *B. subtilis* die sporen vormt. Deze resultaten kunnen er ook op wijzen dat de bacterie wel afgedood wordt maar de sporen niet. Aangezien de broth bij 50%, 25% en 6,25% helder is zou daar de bacterie zijn afgedood maar hebben de sporen het overleefd. De sporen zijn vervolgens kunnen uitgroeien doordat ze op de plaat zijn gebracht waar geen olie is.

Voor de hydrosolen is telkens de 100% uitgeplaat. Enkel voor het hydrosol van wilde tijm is ook 50% van *B. subtilis* uitgeplaat (zie figuur 72 in bijlage 2). Bij het laurier hydrosol is er geen groei te zien bij *E. coli*. Bij *S. aureus* en *B. subtilis* is er maar 1 kolonie te zien. Bij de wilde tijm is er duidelijk wel groei te zien bij 50% *B. subtilis*. Bij 100% is er geen groei te zien bij *E. coli* en *B. subtilis*. Bij *S. aureus* is er 1 kolonie te zien bij 100% wilde tijm hydrosol. Bij het pepermunt hydrosol is bij 100% bij alle drie de bacteriën duidelijk groei (heel de streep) te zien. Echter komt dit niet overeen met de normale groei van de bacteriën. Er is dus een besmetting van een ander micro-organisme. Bij het hydrosol van korenbloem 100% is er 1 kolonie te zien bij *B. subtilis*, 33 kolonies bij *S. aureus* en 11 kolonies bij *E. coli*. Bij het methanol extract van Kalanchoë is nergens groei te zien op de platen van *E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis* (zie figuur 72 in bijlage 2). Er is dus geen groei bij alle drie. Ter voorbereiding van het volgende labo is ook nog een vooronderzoek uitgevoerd naar Tween 80. Bij het uitplaten van Tween 80 is er maar 1 kolonie te zien op de plaat. De Tween 80 in de proefbuis is ook heel licht troebel. De lichte troebelheid kan ook veroorzaakt zijn door het opschudden van de Tween 80 aangezien er ook een schuimlaag bovenop is gevormd.

### Antibiogram

Voor het antibiogram zijn in dit labo nu de juiste schijfjes gebruikt. In de antibiogrammen worden nu ook de negatieve (water) en de positieve (antibiotica) voorzien. Op de antibiogrammen is te zien dat enkel het antibiotica en de laurier olie bij alle drie de bacteriën een inhibitiezone hebben. In tabel 14 zijn de inhibitiezones af te lezen van de antibiotica en de laurier olie. In bijlage 2 (figuur 74) staat het fotoresultaat.

Tabel 14: Antibiogram labo 2, inhibitiezone van antibiotica en laurier olie

| Antibiogram        | Antibiotica<br>(AMP10, CN10 en P1) | Laurier olie   |
|--------------------|------------------------------------|----------------|
| <i>E. coli</i>     | 14 mm diameter                     | 8 mm diameter  |
| <i>S. aureus</i>   | 26 mm diameter                     | 10 mm diameter |
| <i>B. subtilis</i> | 40 mm diameter                     | 12 mm diameter |

### 4.3 Labo 3

Tijdens labo drie is er een derde techniek uitgetoetst om de olie te testen op de antibacteriële werking. Hierbij is de olie weer in proefbuizen gedaan samen met de broth. Om de olie en de broth te doen mengen, is Tween 80 toegevoegd. Om zeker te zijn dat de Tween 80 geen effect zou hebben op de groei van de bacteriën zijn ook 3 proefbuizen voorzien waarin enkel broth, Tween 80 en de bacterie is ingedaan. Aangezien dit weer een nieuwe techniek is wordt weer dezelfde verdunningsreeks (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%) gebruikt. In tabel 15 worden de resultaten weergegeven en in bijlage 3 (figuren 76, 77, 78, 79, 80 en 81) staan de foto's. Door de Tween 80 hebben alle proefbuizen met olie een witte neerslag. Om zeker te zijn of er wel over groen groei is worden alle proefbuizen uitgeplaat. In de eerste proefbuis (50%) is 20% Tween 80 toegevoegd. Toch is de olie niet helemaal gemengd met de broth. Van onder in de proefbuis is nog een deel te zien dat iets minder wit ziet dan het bovenste gedeelte (zie figuur 75 in bijlage 3). Vervolgens is de verdunningsreeks gemaakt. Bij de verdunningsreeks is het onderscheid tussen de twee delen nog duidelijker te zien. Hierbij is de witte laag kleiner als de onderliggende laag.

Tabel 15: Vooronderzoek laurier olie Tween 80 labo 3

| Laurier olie       | 50%                                          | 25%                                               | 12,5% | 6,25% | 3,125% | 0%      |
|--------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|-------|--------|---------|
| <i>E. coli</i>     | Witte neerslag                               | Wit laagje vanboven en eronder een wit-geelachtig |       |       |        | Helder  |
| <i>S. aureus</i>   | Witte neerslag maar wel twee laagjes te zien | Wit laagje vanboven en eronder een wit-geelachtig |       |       |        | Troebel |
| <i>B. subtilis</i> | Witte neerslag                               | Wit laagje vanboven en eronder een wit-geelachtig |       |       |        | Helder  |

In labo 3 wordt enkel met het laurier en wilde tijm hydrosol verder gewerkt. Hierbij wordt een verdunningsreeks gemaakt van 100% tot 50% met stappen van 10. In tabel 16 zijn de resultaten voor het laurier hydrosol te zien en in bijlage 3 (figuren 82, 83 en 84) de foto's. In tabel 17 zijn deze te zien voor wilde tijm en de foto's zijn ook te zien in bijlage 3 (figuren 85, 86 en 87).

Tabel 16: Laurier hydrosol labo 3

| Laurier hydrosol   | 100%   | 90%                | 80%                                           | 70%                                           | 60% | 50% |
|--------------------|--------|--------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----|-----|
| <i>E. coli</i>     | Helder | Heel licht troebel | Licht troebel                                 | Troebel; hoe lager concentratie hoe troebeler |     |     |
| <i>S. aureus</i>   | Helder |                    | Licht troebel                                 | Troebel; hoe lager concentratie hoe troebeler |     |     |
| <i>B. subtilis</i> | Helder | Licht troebel      | Troebel; hoe lager concentratie hoe troebeler |                                               |     |     |

Tabel 17: Wilde tijm hydrosol labo 3

| Wilde tijm hydrosol | 100%   | 90% | 80%                | 70%           | 60%                | 50%                        |
|---------------------|--------|-----|--------------------|---------------|--------------------|----------------------------|
| <i>E. coli</i>      | Helder |     |                    |               |                    | Troebel                    |
| <i>S. aureus</i>    | Helder |     | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel            | Troebel, troebeler dan 60% |
| <i>B. subtilis</i>  | Helder |     |                    |               | Heel licht troebel | Troebel                    |

Voor het methanol extract van Kalanchoë wordt in labo 3 ook een verdunningsreeks van 100% tot 50% gemaakt. De resultaten zijn te zien in tabel 18. De foto's zijn te zien in bijlage 3 (figuren 88, 89, 90, 91, 92 en 93).

Tabel 18: Methanol extract Kalanchoë labo 3

| Methanol extract Kalanchoë | 100%                           | 90% | 80% | 70%                         | 60% | 50%                         |
|----------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-----|-----------------------------|
| <i>E. coli</i>             | Groene neerslag door bezinksel |     |     |                             |     | Helder + veel plantenresten |
| <i>S. aureus</i>           | Groene neerslag door bezinksel |     |     | Helder + veel plantenresten |     |                             |
| <i>B. subtilis</i>         | Groene neerslag door bezinksel |     |     | Helder + veel plantenresten |     |                             |

#### Uitgeplaatte resultaten

De olie is uitgeplaat omdat het niet met zekerheid is te zeggen of er nu groei aanwezig is in de proefbuizen of niet. Bij *E. coli* is bij 0% duidelijk groei (hele streep) te zien. Bij 25% zijn 2 kolonies te zien. Voor de andere percentages (50%, 12,5%, 6,25% en 3,125%) is er geen groei te zien. De groei die hier aanwezig is, is een besmetting en niet *E. coli*. Bij de platen van *S. aureus* is bij 0% duidelijk groei te zien (hele streep). Bij 3,125% is één kolonie te zien en bij 12,5% 3 kolonies. Bij 50%, 25% en 6,25% is geen groei te zien. Op de plaat van *B. subtilis* is bij 0% ook duidelijk groei te zien. Bij 6,25% en 3,125% is ook groei te zien maar minder dan bij 0% (licht remmend). Bij 50%, 25% en 12,5% is geen groei te zien. Het fotoresultaat hiervan staat in bijlage 3 (figuur 94).

De hydrosolen (laurier en wilde tijm) zijn ook uitgeplaat (zie figuren 95 en 96 in bijlage 3). Bij het laurier hydrosol op de plaat van *E. coli* is duidelijk groei te zien van 50% tot 90%. Bij 100% zijn 2 kolonies te zien. Bij de plaat van *S. aureus* is van 50% tot 80% duidelijk groei te zien. Bij 90% is groei te zien maar duidelijk minder als bij de andere (remmend). Bij 100% is 1 kolonie te zien. Voor *B. subtilis* is er duidelijk groei van 50% tot 80%. Bij 100% en 90% is er geen groei te zien.

Bij het hydrosol van wilde tijm is bij 100% (3 kolonies), 70% (1 kolonie) en 50% (heel de streep) besmetting te zien. Bij 50% is dus duidelijk groei te zien maar het is niet helemaal zeker of *E. coli* hier ook groeit. Bij 60% is geen groei te zien. Groei is wel te zien bij 70% en 80%. Heel kleine kolonies zijn te zien bij 90% (remmend). Bij 100% zijn 3 kolonies te zien. Op de plaat van *S. aureus* is duidelijk groei te zien van 50% tot 70%. Bij 80% en 90% is ook groei te zien maar minder (licht remmend). Bij 100% zijn 16 kolonies te zien (sterk remmend). Bij de plaat van *B. subtilis* is duidelijk groei te zien bij 50% en 60%. Bij 70% zijn 5 kolonies te zien. Geen groei is te zien van 80% tot 100%.

De verdunningsreeks bij het methanol extract van Kalanchoë is ook uitgeplaat (zie figuur 97 in bijlage 3). Op alle drie de platen van *E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis* is geen groei te zien van 50% tot 100%.

## 4.4 Labo 4

Vanaf dit labo is besloten om voor de olie verder te werken met de techniek van de erlenmeyers. De snelheid van de magneetroerder is telkens 430 rpm. Voor *E. coli* wordt er gekeken tussen 3% en 6%. Bij *S. aureus* wordt gekeken tussen 12% en 25%. Tussen 3% en 7% wordt gekeken voor *B. subtilis*. Telkens wordt ook 0% weer meegenomen. Dit wordt in alle andere labo's ook telkens gedaan voor de MIC-bepaling voor laurier olie. De resultaten van labo 4 voor laurier olie zijn te vinden in tabellen 19, 20 en 21. De fotoresultaten zijn te zien in bijlage 4 (figuren 98, 99 en 100).

Tabel 19: Laurier olie (erlenmeyers) *E. coli* labo 4

| Laurier olie | <i>E. coli</i> |
|--------------|----------------|
| 0%           | Heel troebel   |
| 3%           | Troebel        |
| 4%           | Troebel        |
| 5%           | Troebel        |
| 6%           | Troebel        |

Tabel 20: Laurier olie (erlenmeyers) *S. aureus* labo 4

| Laurier olie | <i>S. aureus</i> |
|--------------|------------------|
| 0%           | Heel troebel     |
| 12%          | Licht troebel    |
| 13%          | Licht troebel    |
| 14%          | Licht troebel    |
| 15%          | Troebel          |
| 20%          | Helder           |
| 25%          | Troebel          |

Tabel 21: Laurier olie (erlenmeyers) *B. subtilis* labo 4

| Laurier olie | <i>B. subtilis</i> |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 3%           | Licht troebel      |
| 4%           | Troebel            |
| 5%           | Licht troebel      |
| 6%           | Licht troebel      |
| 7%           | Troebel            |

Voor het laurier hydrosol is er een verdunningsreeks van 100% tot 90% met stappen van 2% gemaakt voor *E. coli* en *S. aureus*. Voor *B. subtilis* is een verdunningsreeks van 90% tot 80% gemaakt. De resultaten zijn hieronder (tabel 22) te zien. De foto's ervan staan in bijlage 4 (figuren 101, 102 en 103).

Tabel 22: Laurier hydrosol labo 4

| Laurier hydrosol   | 100%   | 98%     | 96%           | 94%           | 92%     | 90%     |
|--------------------|--------|---------|---------------|---------------|---------|---------|
| <i>E. coli</i>     | Helder | Troebel |               |               |         |         |
| <i>S. aureus</i>   | Helder |         |               | Licht troebel | Troebel |         |
|                    | 90%    | 88%     | 86%           | 84%           | 82%     | 80%     |
| <i>B. subtilis</i> | Helder |         | Licht troebel |               | Helder  | Troebel |

Voor het wilde tijm hydrosol is een verdunningsreeks van 100% tot 90% met stappen van 2 plus 60% nog eens opnieuw gemaakt voor *E. coli*. Een verdunningsreeks van 100% tot 94% is gemaakt voor *S. aureus*. Voor *B. subtilis* is een reeks gemaakt van 80% tot 70%. De resultaten zijn te zien in de tabel hieronder (tabel 23) en de foto's in bijlage 4 (figuren 104, 105 en 106).

Tabel 23: Wilde tijm hydrosol labo 4

|                     |        |     |     |     |     |     |     |
|---------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Wilde tijm hydrosol | 100%   | 98% | 96% | 94% | 92% | 90% | 60% |
| <i>E. coli</i>      | Helder |     |     |     |     |     |     |
| <i>S. aureus</i>    | Helder |     |     |     | /   | /   | /   |
|                     | 80%    | 78% | 76% | 74% | 72% | 70% |     |
| <i>B. subtilis</i>  | Helder |     |     |     |     |     | /   |

Vanaf dit labo wordt er gewerkt met het hydrosol van Kalanchoë en niet meer met het methanol extract van Kalanchoë. Voor het Kalanchoë hydrosol wordt ook een verdunningsreeks van 50% tot 100% gemaakt. De resultaten zijn te zien in tabel 24 en de foto's in bijlage 4 (figuren 107, 108 en 109).

Tabel 24: Kalanchoë hydrosol labo 4

|                    |        |               |         |     |     |     |
|--------------------|--------|---------------|---------|-----|-----|-----|
| Kalanchoë hydrosol | 100%   | 90%           | 80%     | 70% | 60% | 50% |
| <i>E. coli</i>     | Helder | Troebel       |         |     |     |     |
| <i>S. aureus</i>   | Helder | Licht troebel | Troebel |     |     |     |
| <i>B. subtilis</i> | Helder | Licht troebel | Troebel |     |     |     |

#### Uitgeplaatte resultaten

Om zeker te zijn worden de erlenmeyers uitgeplaat (zie figuur 110 in bijlage 4). Bij *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 0%. Bij 3% is 1 kolonie te zien. Van 4% tot 6% is er geen groei te zien. Bij 0% is bij *S. aureus* duidelijk groei te zien. Geen groei is te zien bij 25% - 12%. Op de plaat met *B. subtilis* is duidelijk groei te zien bij 0%. Van 7% tot 3% is overal groei te zien maar geen volledig dikke streep (remmend/bacteriedodend maar niet dodend voor de sporen).

De hydrosolen zijn ook uitgeplaat om zeker te zijn. Bij het laurier hydrosol (zie figuur 111 in bijlage 4) en *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 98% - 90%. Bij 100% is 1 kolonie te zien. Voor *S. aureus* is bij 90% groei te zien waarbij op het einde kolonies zichtbaar zijn (licht remmend). Bij 92% is ook groei te zien, net iets minder als bij 90% (licht remmend). Bij 94% en 96% is nog minder groei te zien als de voorgaande (remmend). Nog minder groei is te zien bij 98% (remmend). Bij 100% is 1 kolonie te zien. Op de plaat van *B. subtilis* is te zien dat 80%, 82% en 84% besmet zijn. Duidelijke groei is te zien bij 86% en 84%. Bij 80% en 90% is ook groei te zien maar minder dan bij 86% en 84%. De groei bij 82% is iets minder dan bij 90%. Bij 88% zijn 5 kolonies te zien.

Op de platen van het wilde tijm hydrosol (zie figuur 112 in bijlage 4) is bij *E. coli* nergens groei te zien. Op de *S. aureus* plaat is groei te zien van 94% tot 98%. Telkens wordt de groei iets minder. Bij 100% is geen groei te zien. Bij *B. subtilis* is groei te zien van 80% tot 72%. Bij 70% zijn vanboven enkele kolonies te zien (remmend). Bij 78%, 76%, 74%, 72% en 70% is er besmetting te zien.

Op de platen van het hydrosol van Kalanchoë (zie figuur 113 in bijlage 4) is bij *E. coli* overal (100% - 50%) duidelijk groei (dikke streep) te zien. Bij *S. aureus* is van 90% tot 50% duidelijk groei te zien. Bij 100% is iets minder groei te zien (licht remmend). Bij *B. subtilis* is duidelijk groei te zien van 90% tot 50%. Bij 100% zijn 3 kolonies te zien (sterk remmend).

## 4.5 Labo 5

In labo 5 wordt voor de olie verder gekeken naar de MIC voor *E. coli* en *S. aureus*. Voor *B. subtilis* wordt 50%, 12% en 3% getest. De resultaten zijn hieronder te vinden (tabel 25, 26 en 27). De foto's staan in bijlage 5 (figuren 114, 115 en 116).

Tabel 25: Laurier olie (erlenmeyers) *E. coli* labo 5

| Laurier olie | <i>E. coli</i> |
|--------------|----------------|
| 0%           | Heel troebel   |
| 1%           | Helder         |
| 2%           | Licht troebel  |
| 3%           | Troebel        |
| 4%           | Licht troebel  |
| 5%           | Licht troebel  |

Tabel 26: Laurier olie (erlenmeyers) *S. aureus* labo 5

| Laurier olie | <i>S. aureus</i>   |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 3%           | Licht troebel      |
| 4%           | Licht troebel      |
| 5%           | Heel licht troebel |
| 6%           | Helder             |

Tabel 27: Laurier olie (erlenmeyers) *B. subtilis* labo 5

| Laurier olie | <i>B. subtilis</i> |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 3%           | Troebel            |
| 12%          | Helder             |
| 50%          | Helder             |

In labo 5 wordt voor het laurier hydrosol voor *B. subtilis* gekeken tussen 100% en 90% met stappen van 2. De resultaten zijn te zien in tabel 28 en de foto in bijlage 5 (figuur 117).

Tabel 28: Laurier hydrosol *B. subtilis* labo 5

| Laurier hydrosol   | 100%   | 98% | 96% | 94% | 92% | 90%                |
|--------------------|--------|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| <i>B. subtilis</i> | Helder |     |     |     |     | Heel licht troebel |

Voor het wilde tijm hydrosol wordt in dit labo de verdunningsreeks van 100% tot 50% (in stappen van 10) voor *E. coli* opnieuw gedaan. Voor *B. subtilis* wordt gekeken tussen 100% en 80% (stappen van 2). De resultaten hiervan zijn te vinden in tabel 29 en de foto's in bijlage 5 (figuren 118, 119 en 120).

Tabel 29: Wilde tijm hydrosol *E. coli* en *B. subtilis* labo 5

| Wilde tijm hydrosol | 100%   | 90% | 80% | 70% | 60% | 50%     |
|---------------------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|
| <i>E. coli</i>      | Helder |     |     |     |     | Troebel |
| <i>B. subtilis</i>  | 100%   | 98% | 96% | 94% | 92% | 90%     |
|                     | Helder |     |     |     |     |         |
|                     | 90%    | 88% | 86% | 84% | 82% | 80%     |
|                     | Helder |     |     |     |     |         |

### Uitgeplaatte resultaten

Op de plaat van laurier olie en *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 0%. Van 5% tot 1% is geen groei te zien. Bij *S. aureus* is duidelijk groei bij 0%. Een heel klein beetje groei is te zien van 6% tot 3%. Bij 6% zijn er 9 kolonies te zien, 5% 7 kolonies, 4% 3 kolonies en 3% 8 kolonies. Groei is duidelijk te zien bij 0% bij *B. subtilis*. Bij 50%, 12% en 3% is een beetje groei te zien. Het fotoresultaat is te vinden in bijlage 5 (figuur 121).

De plaat van *S. aureus* is nog een extra dag geïncubeerd. Op de plaat is nog steeds overal groei te zien vanboven. Bij 6% zijn er nu 20 kolonies, bij 5% 8 kolonies, bij 4% 10 kolonies en bij 3% 22 kolonies. De percentages 6 en 3 zijn apart uitgeplaat. Van 0%, 6% (aparte plaat) en 3% (aparte plaat) is een antibiogram gemaakt om de testen of deze kolonies resistent zijn. Op elke plaat is een olie schijfje en CN10 (antibioticum) geplaatst. Bij alle drie is bij de olie en het antibioticum een inhibitiezone (zie tabel 30 en bijlage 5, figuren 122 en 123) te zien.

Tabel 30: Antibiogram test resistentie *S. aureus* op laurier olie labo 5

| Antibiogram <i>S. aureus</i> | 0% (diameter) | 3% (diameter) | 6% (diameter) |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Laurier olie                 | 8 mm          | 8 mm          | 8 mm          |
| Antibiotica CN10             | 17 mm         | 17 mm         | 17 mm         |

Bij het laurier hydrosol is te zien dat er overal (100% -90%) een beetje groei is voor *B. subtilis* (zie figuur 124 in bijlage 5). Op de plaat is ook besmetting te zien bij 90% (4 kolonies), 92% (2 kolonies), 94% (3 kolonies), 96% (1 kolonie), 98% (6 kolonies) en 100% (4 kolonies).

Het hydrosol van wilde tijm is ook uitgeplaat (zie figuur 125 in bijlage 5). Voor *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 50%. Bij 60% en 70% zijn kleine kolonies vanboven te zien. Om na te kijken of die kolonies effectief *E. coli* worden deze uitgeplaat (zie figuur 126 in bijlage 5). Bij 100%, 90% en 80% is geen groei te zien. De plaat is nog één extra dag geïncubeerd. Bij 80% is nu 1 kolonie te zien en bij 90% zijn 2 kolonies te zien. Bij 60% en 70% is duidelijk groei te zien. De apart uitgeplaatte platen van 60% en 70% is groei op te zien. Voor de platen van *B. subtilis* is overal (100%-80%) een beetje groei te zien. Bij 80% is besmetting te zien (2 kolonies). Het aantal kolonies bij 80% is 9, bij 82% is dit ook 9. Bij 86% en 84% zijn er 10 kolonies, bij 88% en 90% zijn er 7 kolonies en bij 92% zijn er 5 kolonies. Bij 96% zijn der 8 kolonies te zien, bij 98% 4 kolonies en bij 100% 9.

## 4.6 Labo 6

In labo 6 wordt voor de MIC van olie tussen 1% en 6% voor *E. coli* onderzocht en voor *S. aureus* tussen 6% en 12%. Voor *B. subtilis* wordt de mogelijk eerste triple test uitgevoerd. Hierbij worden 50%, 12% en 3% getest. De resultaten zijn te zien in de tabellen 31, 32 en 33 hieronder. De fotoresultaten zijn in bijlage 6 (figuren 127, 128 en 129) te vinden.

Tabel 31: Laurier olie (erlenmeyers) *E. coli* labo 6

| Laurier olie | <i>E. coli</i> |
|--------------|----------------|
| 0%           | Heel troebel   |
| 1%           | Troebel        |
| 2%           | Helder         |
| 3%           | Licht troebel  |
| 4%           | Licht troebel  |
| 5%           | Helder         |
| 6%           | Troebel        |

Tabel 32: Laurier olie (erlenmeyers) *S. aureus* labo 6

| Laurier olie | <i>S. aureus</i> |
|--------------|------------------|
| 0%           | Heel troebel     |
| 6%           | Helder           |
| 7%           | Helder           |
| 8%           | Helder           |
| 9%           | Helder           |
| 10%          | Helder           |
| 11%          | Helder           |
| 12%          | Helder           |

Tabel 33: Laurier olie (erlenmeyers) *B. subtilis* labo 6, mogelijk triplo 1

| Laurier olie | <i>B. subtilis</i> |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 3%           | Troebel            |
| 12%          | Helder             |
| 50%          | Helder             |

In labo 6 is voor het wilde tijm hydrosol voor *E. coli* gekeken tussen 80% en 70%. De resultaten zijn in tabel 34 te zien en de foto in bijlage 6 (figuur 130).

Tabel 34: Wilde tijm hydrosol *E. coli* labo 6

| Wilde tijm hydrosol | 80%    | 78% | 76%           | 74% | 72% | 70% |
|---------------------|--------|-----|---------------|-----|-----|-----|
| <i>E. coli</i>      | Helder |     | Licht troebel |     |     |     |

Het pepermunt hydrosol wordt in labo 6 voor alle drie de bacteriën al éénmaal getest voor 100%, 99%, 98%, 95% en 90%. Dit zal al dienen als de eerste van de triplotest. In tabel 35 zijn de resultaten te zien. In bijlage 6 (figuren 132, 133 en 134) staan de foto's. Voor het pepermunt hydrosol in de incubator gaat, zien 90%-99% al enigszins troebel (zie figuur 131 in bijlage 6).

Tabel 35: Pepermunt hydrosol triplo 1 labo 6

| Pepermunt hydrosol | 100%   | 99%                | 98%           | 95%     | 90% |
|--------------------|--------|--------------------|---------------|---------|-----|
| <i>E. coli</i>     | Helder | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |     |
| <i>S. aureus</i>   | Helder | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |     |
| <i>B. subtilis</i> | Helder | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |     |

Tijdens het zesde labo zijn de triplo's voor de hydrosolen van korenbloem en Kalanchoë uitgevoerd. Voor beide hydrosolen en voor alle drie de bacteriën zijn voor de triplo's 100%, 99% en 98% getest. De resultaten zijn de vinden in tabellen 36 en 37 en de foto's in bijlage 6 (figuren 135, 136, 137, 138, 139 en 140). Net als bij het pepermunt hydrosol zien 98% en 99% voor beide hydrosolen al enigszins troebel voor deze de incubator ingaan (zie figuur 131 in bijlage 6).

Tabel 36: Kalanchoë hydrosol triplo's 1,2 en 3 labo 6

| tabel 30: Kalanchoë hydrosol (pH 5,1/2 en 5,6) |   |                    |               |         |
|------------------------------------------------|---|--------------------|---------------|---------|
| Kalanchoë hydrosol                             |   | 100%               | 99%           | 98%     |
| <i>E. coli</i>                                 | 1 | Helder             | Troebel       |         |
|                                                | 2 |                    |               |         |
|                                                | 3 |                    |               |         |
| <i>S. aureus</i>                               | 1 | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |
|                                                | 2 |                    |               |         |
|                                                | 3 |                    |               |         |
| <i>B. subtilis</i>                             | 1 | Helder             | Troebel       |         |
|                                                | 2 |                    |               |         |
|                                                | 3 |                    |               |         |

Tabel 37: Korenbloem hydrosol triplo's 1,2 en 3 labo 6

| Korenbloem hydrosol |   | 100%   | 99%           | 98%     |
|---------------------|---|--------|---------------|---------|
| <i>E. coli</i>      | 1 | Helder | Licht troebel | Troebel |
|                     | 2 |        |               |         |
|                     | 3 |        |               |         |
| <i>S. aureus</i>    | 1 | Helder | Licht troebel | Troebel |
|                     | 2 |        |               |         |
|                     | 3 |        |               |         |
| <i>B. subtilis</i>  | 1 | Helder | Licht troebel | Troebel |
|                     | 2 |        |               |         |
|                     | 3 |        |               |         |

### Uitgeplaatte resultaten

Op de plaat van laurier olie en *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 0%. Van 1% tot 6% is geen groei te zien. Op de plaat van *S. aureus* is duidelijk groei te zien bij 0%. Bij 11% is 1 kolonie te zien. Geen groei is te zien van 6% tot 10% en 12%. Bij *B. subtilis* is duidelijk groei te zien bij 0% maar dit is *E. coli* en geen *B. subtilis*. Bij 50%, 12% en 3% is geen groei te zien. Het fotoresultaat is te vinden in bijlage 6 (figuur 141).

Bij de *E. coli* plaat van het wilde tijm hydrosol (zie figuur 142 in bijlage 6) is bij 70% een besmetting (2 kolonies). Overal zijn zeer kleine kolonies te zien. Naar het einde toe van de streep zijn losliggende kolonies te zien.

Op de *E. coli* plaat van het pepermunt hydrosol is overal duidelijk groei te zien. Van 90% tot 95% is over de hele lijn besmetting te zien waardoor het moeilijk is te bepalen of *E. coli* bij dit percentage ook groeit. Bij 98% is ook besmetting te zien maar hierbij zijn nog kolonies van *E. coli* ertussen te zien. Geen besmetting is te zien bij 100% en 99%. Bij *S. aureus* is van 90% tot 98% overal groei maar wel besmetting. Hier is het dus ook moeilijk te bepalen of *S. aureus* bij deze percentages kan groeien of niet. Bij 100% en 99% is wel groei van *S. aureus* te zien. Bij 99% zijn 2 besmette kolonies te zien. Een andere besmetting van kleine kolonies die ertussen liggen, zijn te zien bij 100% en 99%. Op de plaat van *B. subtilis* is te zien dat er groei is bij 100% (minder dan 99%) en 99% (minder dan 98%). Deze groei is niet *B. subtilis* maar *E. coli*. Duidelijke groei maar besmetting is te zien van 90% tot 95%. Bij 98% is een beetje minder groei (besmetting) te zien. De fotoresultaten staat in bijlage 6 (figuur 143).

Bij het Kalanchoë hydrosol (zie figuur 144 in bijlage 6) is duidelijk overal groei te zien bij alle drie de triplo's bij *E. coli*. Bij 99% en 98% (alle drie triplo's) is besmetting te zien. Bij *S. aureus* is ook overal (alle drie triplo's) duidelijk groei te zien. Bij 99% en 98% (alle drie) en 100% (derde triplo) is besmetting te zien. In dit geval is *B. subtilis* ook weer *E. coli*. Hier is ook overal (alle drie triplo's) duidelijk groei te zien. Besmetting is te zien bij 99% (alle drie) en 98% (triplo 1 en 2).

Voor de platen van het hydrosol van Korenbloem (zie figuur 145 in bijlage 6) is bij *E. coli* overal (alle triplo's) duidelijk groei te zien. Bij 98% (alle triplo's) is besmetting te zien. Bij *S. aureus* is overal duidelijk groei te zien (alle triplo's). De groei is minder bij 100% en 99% triplo 1 dan bij 99%. Alle drie de triplo's van 98% zijn besmet. Op de plaat van *B. subtilis* is te zien dat dit weer *E. coli* is. Besmetting is te zien bij 98% (alle drie), 100% (alle drie) en 99% (triplo 1).

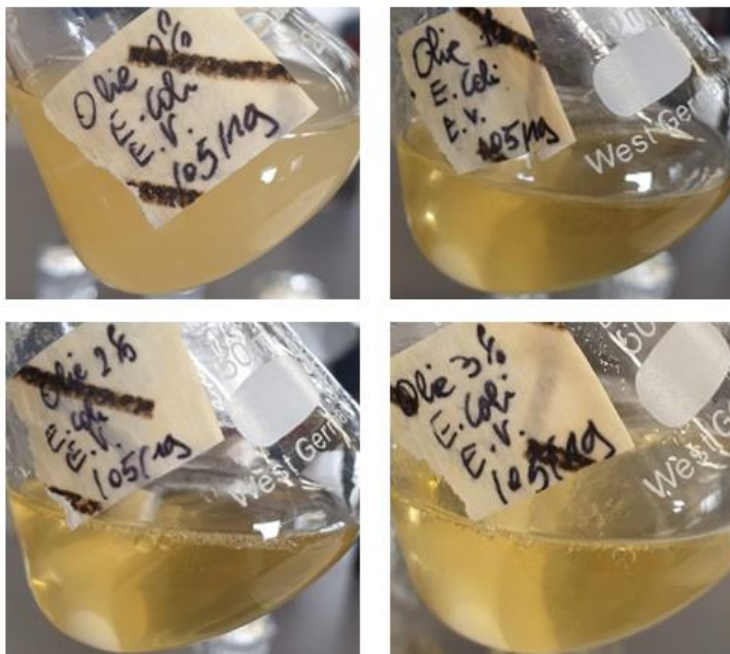
In bijlage 6 is op figuur 146 te zien dat de bacteriën zijn uitgeplaat om hun reinheid te controleren.

## 4.7 Labo 7

Vanaf labo 7 worden de definitieve triplo's en duplo's weergegeven. Vanaf dit labo worden de fotoresultaten van de laurier olie en de uitgeplaatte resultaten rechtstreeks weergegeven en niet meer in de bijlagen. De ander foto's zijn nog wel in de bijlagen te vinden. Voor de laurier olie zijn de eerste van de triplo's voor *E. coli* (0% tot 6%) en *S. aureus* (0%, 2% tot 6%) uitgevoerd. Voor *B. subtilis* (0%, 3%, 12% en 50%) zijn de eerste twee uitgevoerd. De resultaten (tabellen en foto's) zijn hieronder te vinden.

Tabel 38: Laurier olie *E. coli* triplo 1 labo 7

| Laurier olie | <i>E. coli</i>     |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 1%           | Heel licht troebel |
| 2%           | Heel licht troebel |
| 3%           | Helder             |



Figuur 11: Triplo 1 laurier olie, *E. coli* labo 7

Tabel 39: Laurier olie *S. aureus* triplo 1 labo 7

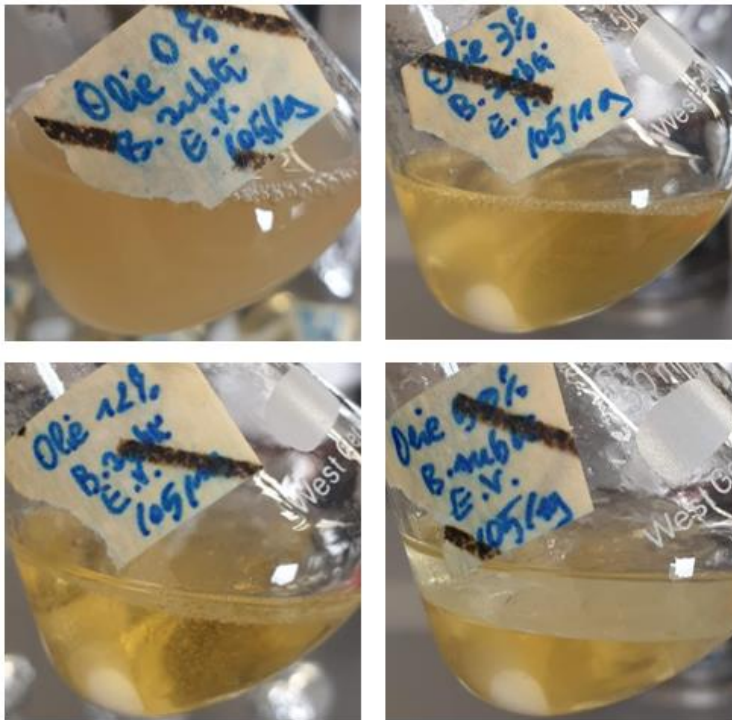
| Laurier olie | <i>S. aureus</i> |
|--------------|------------------|
| 0%           | Heel troebel     |
| 2%           | Troebel          |
| 3%           | Licht troebel    |
| 4%           | Troebel          |
| 5%           | Troebel          |
| 6%           | Troebel          |



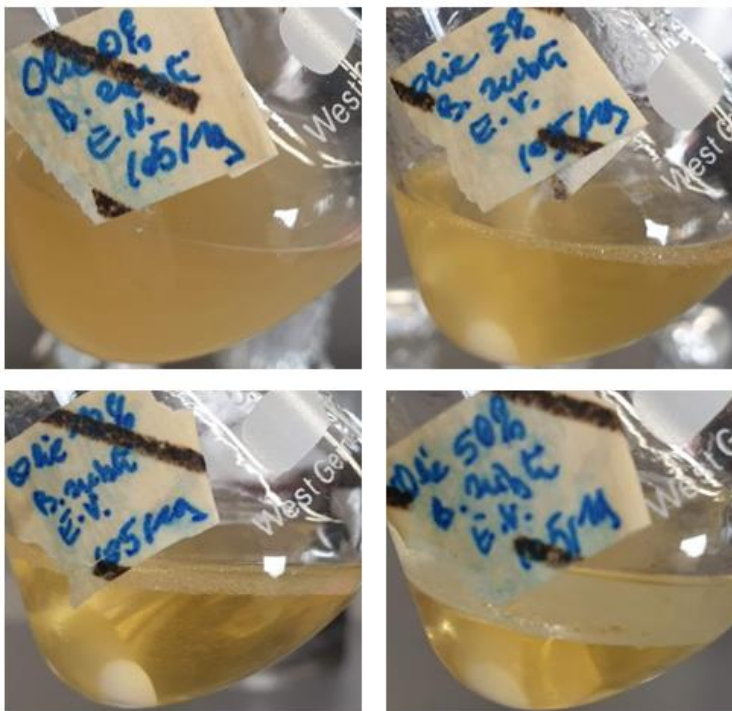
Figuur 12: Triplo 1 laurier olie, *S. aureus* labo 7

Tabel 40: Laurier olie *B. subtilis* triplo 1 en 2 labo 7

| Laurier olie |   | <i>B. subtilis</i> |
|--------------|---|--------------------|
| 0%           | 1 | Heel troebel       |
|              | 2 | Heel troebel       |
| 3%           | 1 | Licht troebel      |
|              | 2 | Troebel            |
| 12%          | 1 | Helder             |
|              | 2 | Helder             |
| 50%          | 1 | Helder             |
|              | 2 | Helder             |



Figuur 13: Triplo 1 laurier olie, *B. subtilis* labo 7



Figuur 14: Triplo 2 laurier olie, *B. subtilis* labo 7

In labo 7 zijn de triplo's van de hydrosolen van laurier en wilde tijm uitgevoerd. De duplo test van het Kalanchoë hydrosol is ook uitgevoerd. Bij alle drie de hydrosolen en bij alle drie de bacteriën zijn 100%, 99% en 98% getest. De resultaten zijn hieronder te zien in de tabellen 41, 42 en 43. De fotoresultaten zijn te vinden in bijlage 7 (figuren 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154 en 155).

Tabel 41: Laurier hydrosol triplo 1,2 en 3 labo 7

| Laurier hydrosol   |   | 100%   | 99%           | 98%           |
|--------------------|---|--------|---------------|---------------|
| <i>E. coli</i>     | 1 | Helder | Licht troebel | Troebel       |
|                    | 2 |        |               |               |
|                    | 3 |        |               |               |
| <i>S. aureus</i>   | 1 | Helder |               | Licht troebel |
|                    | 2 |        |               |               |
|                    | 3 |        |               |               |
| <i>B. subtilis</i> | 1 | Helder |               | Helder        |
|                    | 2 |        |               | Licht troebel |
|                    | 3 |        |               |               |

Tabel 42: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2 en 3 labo 7

| Wilde tijm hydrosol |   | 100%   | 99% | 98% |
|---------------------|---|--------|-----|-----|
| <i>E. coli</i>      | 1 | Helder |     |     |
|                     | 2 |        |     |     |
|                     | 3 |        |     |     |
| <i>S. aureus</i>    | 1 | Helder |     |     |
|                     | 2 |        |     |     |
|                     | 3 |        |     |     |
| <i>B. subtilis</i>  | 1 | Helder |     |     |
|                     | 2 |        |     |     |
|                     | 3 |        |     |     |

Tabel 43: Kalanchoë hydrosol duplo 1 en 2 labo 7

| Kalanchoë hydrosol |   | 100%               | 99%           | 98%     |
|--------------------|---|--------------------|---------------|---------|
| <i>E. coli</i>     | 1 | Helder             | Licht troebel | Troebel |
|                    | 2 |                    |               |         |
| <i>S. aureus</i>   | 1 | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |
|                    | 2 |                    |               |         |
| <i>B. subtilis</i> | 1 | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |
|                    | 2 |                    |               |         |

### Uitgeplaatte resultaten

Figuur 15 geeft de uitgeplaatte resultaten van laurier olie labo 7 weer. Op de plaat van *E. coli* is duidelijk groei te zien bij 0%. Bij 1%, 2% en 3% is geen groei te zien. Bij *S. aureus* is duidelijk groei te zien bij 0% maar geen groei van 2% tot 6%. Bij *B. subtilis* is duidelijk groei te zijn bij 0% op beide platen. Op beide platen is te zien dat bij 50%, 12% en 3% er enkele kolonies zijn. De kolonies zijn moeilijk te tellen omdat ze dicht tegen elkaar liggen.



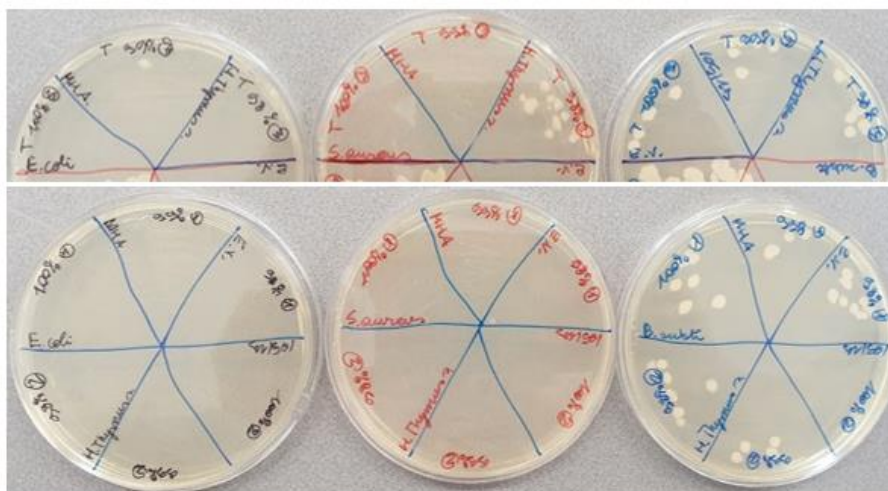
Figuur 15: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 7; links triplo 1 en 2 *B. subtilis*; rechts boven triplo 1 *E. coli*; rechts onder triplo 1 *S. aureus*

Op figuur 16 worden de uitgeplaatte resultaten van het laurier hydrosol weergegeven. Bij *E. coli* is op beide platen duidelijk groei te zien bij 98% en 99%. Bij 100% is geen groei te zien bij triplo 2 en 3. Bij triplo 1 is wel van enkel van boven groei te zien. Bij de *S. aureus* platen is duidelijk groei te zien bij 98%. Bij 99% (triplo 1 en 3) is ook duidelijk groei te zien maar wel minder als bij 98%. Bij triplo 1 van 99% is er minder groei dan bij de andere. Enkele kolonies, voornamelijk van boven, zijn te zien bij 100% op beide platen. Bij 100% triplo 3 is er wel duidelijk minder groei dan bij de andere twee. Voor *B. subtilis* is duidelijk groei te zien bij 98% triplo 2 en 3. Bij 99% triplo 2 en 3 is ook duidelijk groei te zien maar hier zijn op het einde losliggende kolonies te zien. Bij 100% triplo 2 zijn 2 kolonies te zien en bij 98% triplo 1 zijn 4 kolonies te zien. Geen groei is te zien bij 100% triplo 1 en 3 en 99% triplo 1.



Figuur 16: Uitgeplaatte resultaten triplo laurier hydrosol labo 7; links *E. coli*; midden *S. aureus*; rechts *B. subtilis*

Figuur 17 geeft de uitgeplaatte resultaten van het hydrosol van wilde tijm weer. Op de platen van *E. coli* is geen groei te zien voor *E. coli*. Bij 98% triplo 2 en 99% triplo 3 is 1 besmette kolonie te zien. Op de platen van *S. aureus* is ook geen groei te zien voor *S. aureus*. De groei bij 98% (alle drie) en 99% triplo 2 zijn besmettingen. Voor de *B. subtilis* platen zijn overal enkele kolonies te zien. Het is moeilijk om ze goed te tellen omdat sommige dicht tegen elkaar aan liggen. De meeste kolonies liggen vanboven. Bij 99% (alle drie) en 98% triplo 3 is er besmetting van heel kleine kolonies over heel de lijn.



Figuur 17: Uitgeplaatte resultaten triplo wilde tijm hydrosol labo 7; links *E. coli*; midden *S. aureus*; rechts *B. subtilis*

De uitgeplaatte resultaten van het Kalanchoë hydrosol zijn te zien op figuur 18. Bij *E. coli* is overal duidelijk groei te zien. Bij 99% en 98% (beide duplo's) is besmetting te zien. Op de plaat van *S. aureus* is overal groei te zien. Bij 100% is bij beide gevallen op het einde losliggende kolonies te zien. Bij 100% duplo 2 is 1 besmette kolonie te zien. Bij 99% en 98% (beide duplo's) is over de hele streep besmetting. Hierdoor is het moeilijk om te bepalen of *S. aureus* er ook groeit. Bij de *B. subtilis* plaat is duidelijk groei te zien bij 99%, 98% e 100% duplo 2. Losliggende kolonies zijn op het einde te zien bij 100% duplo 2 en 99% duplo 2. Bij 100% duplo 1 zijn enkele kolonies te zien.



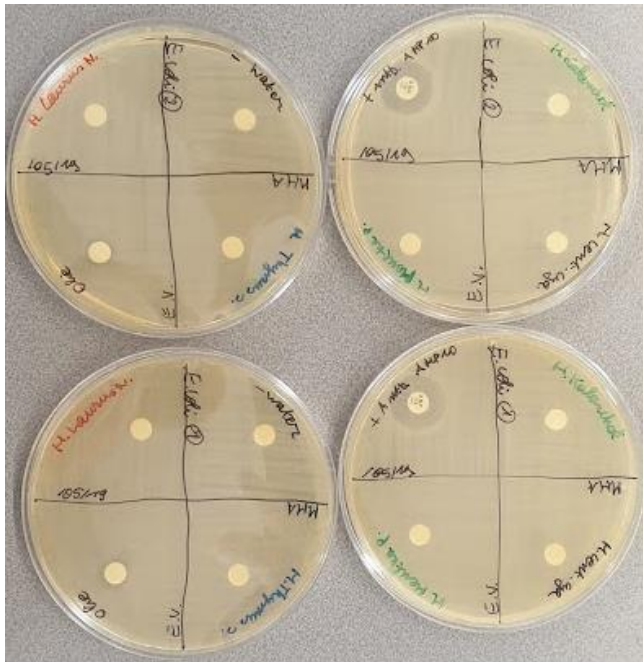
Figuur 18: Uitgeplaatte resultaten duplo Kalanchoë hydrosol labo 7; links *E. coli*; midden *S. aureus*; rechts *B. subtilis*

### Antibiogram

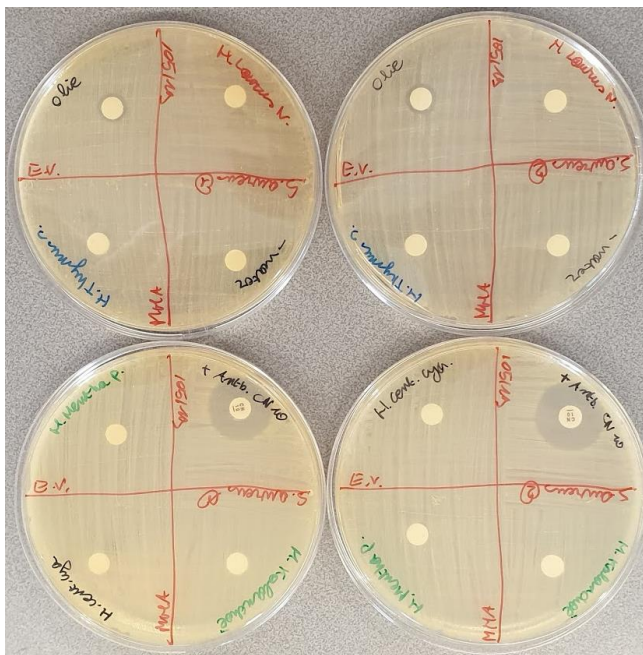
Figuren 19 en 20 geven de triplo's 1 en 2 van de antibiogrammen van *E. coli* en *S. aureus* weer. In bijlage 7 (figuur 156) zijn de antibiogrammen van *B. subtilis* te zien. Echter zit er op deze platen geen *B. subtilis* maar *E. coli*. Bij *E. coli* is enkel een inhibitiezone te zien bij laurier olie en het antibioticum. Bij *S. aureus* is ook enkel een inhibitiezone te zien bij laurier olie en het antibioticum. Bij de *B. subtilis* platen is enkel een inhibitiezone te zien bij laurier olie. Tabel 44 geeft de inhibitiezone van de antibiotica en de laurier olie weer.

Tabel 44: Antibigram inhibitiezone antibiotica en laurier olie triplo 1 en 2 *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* labo 7

| Antibiogram        |   | Antibiotica<br>(AMP10, CN10 en P1) | Laurier olie  |
|--------------------|---|------------------------------------|---------------|
| <i>E. coli</i>     | 1 | 16 mm diameter                     | 9 mm diameter |
|                    | 2 | 16 mm diameter                     | 8 mm diameter |
| <i>S. aureus</i>   | 1 | 19 mm diameter                     | 8 mm diameter |
|                    | 2 | 20 mm diameter                     | 8 mm diameter |
| <i>B. subtilis</i> | 1 | Geen inhibitiezone                 | 8 mm diameter |
|                    | 2 |                                    | 9 mm diameter |



Figuur 19: Antibiotogrammen *E. coli* triplo 1 en 2 labo 7



Figuur 20: Antibiotogrammen *S. aureus* triplo 1 en 2 labo 7

## 4.8 Labo 8

In labo 8 worden de triplo's 2 en 3 uitgevoerd voor *E. coli* en *S. aureus*. Voor *B. subtilis* wordt de derde triplo uitgevoerd. Bij *E. coli* en *S. aureus* zijn 0% tot 3% gebruikt voor de triplo's, bij *B. subtilis* zijn 0%, 3%, 12% en 50% gebruikt. Bij *S. aureus* wordt 1% drie keer gemaakt omdat deze nog niet was meegenomen in de eerste triplo. De resultaten zijn te zien in de tabellen en figuren hieronder.

Tabel 45: Laurier olie *E. coli* triplo 2 en 3 labo 8

| Laurier olie |   | <i>E. coli</i>     |
|--------------|---|--------------------|
| 0%           | 2 | Heel troebel       |
|              | 3 | Heel troebel       |
| 1%           | 2 | Troebel            |
|              | 3 | Heel licht troebel |
| 2%           | 2 | Troebel            |
|              | 3 | Heel licht troebel |
| 3%           | 2 | Heel licht troebel |
|              | 3 | Heel licht troebel |



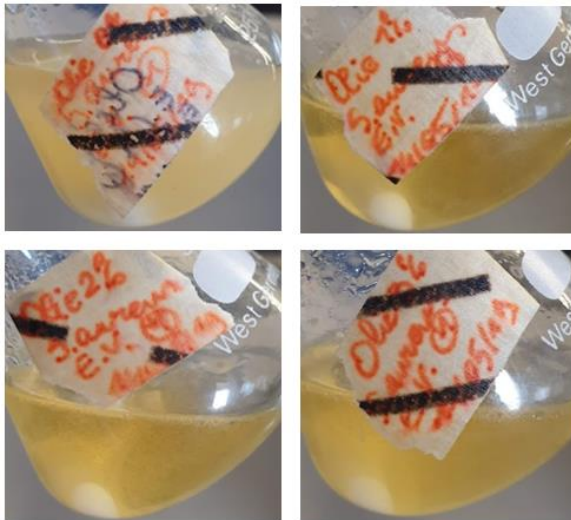
Figuur 21: Triplo 2 laurier olie, *E. coli* labo 8



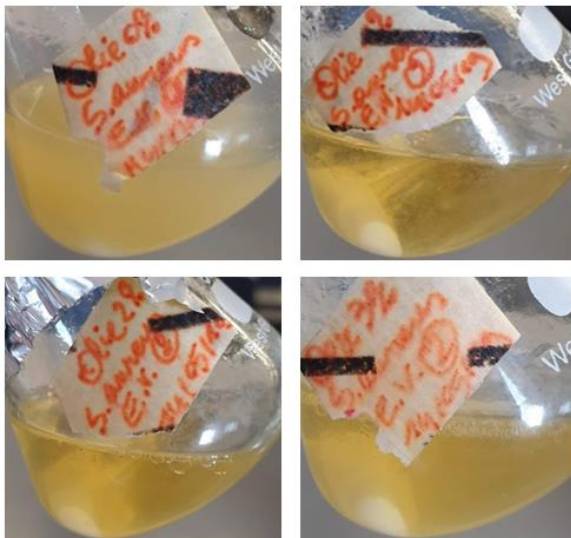
Figuur 22: Triplo 3 laurier olie, *E. coli* labo 8

Tabel 46: Laurier olie *S. aureus* triplo 2 en 3 plus triplo 1 1% labo 8

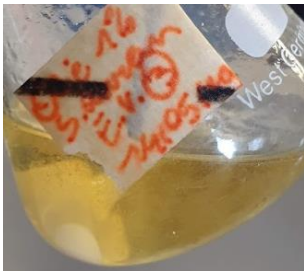
| Laurier olie |   | <i>S. aureus</i>   |
|--------------|---|--------------------|
| 0%           | 2 | Heel troebel       |
|              | 3 | Heel troebel       |
| 1%           | 1 | Helder             |
|              | 2 | Heel licht troebel |
|              | 3 | Helder             |
| 2%           | 2 | Helder             |
|              | 3 | Helder             |
| 3%           | 2 | Heel licht troebel |
|              | 3 | Helder             |



Figuur 23: Triplo 2 laurier olie, *S. aureus* labo 8



Figuur 24: Triplo 3 laurier olie, *S. aureus* labo 8



Figuur 25: Triplo 1 laurier olie 1%, *S. aureus* labo 8

Tabel 47: Laurier olie *B. subtilis* triplo 3 labo 8

| Laurier olie | <i>B. subtilis</i> |
|--------------|--------------------|
| 0%           | Heel troebel       |
| 3%           | Helder             |
| 12%          | Helder             |
| 50%          | Helder             |



Figuur 26: Triplo 3 laurier olie, *B. subtilis* labo 8

In labo 8 zijn de duplo's van het korenbloem hydrosol gemaakt en de triplo's 2 en 3 van het pepermunt hydrosol. De resultaten zijn te zien in tabellen 48 en 49 en de foto's staan in bijlage 8 (figuren 157, 158, 159, 160, 161 en 162).

Tabel 48: Korenbloem hydrosol duplo 1 en 2 labo 8

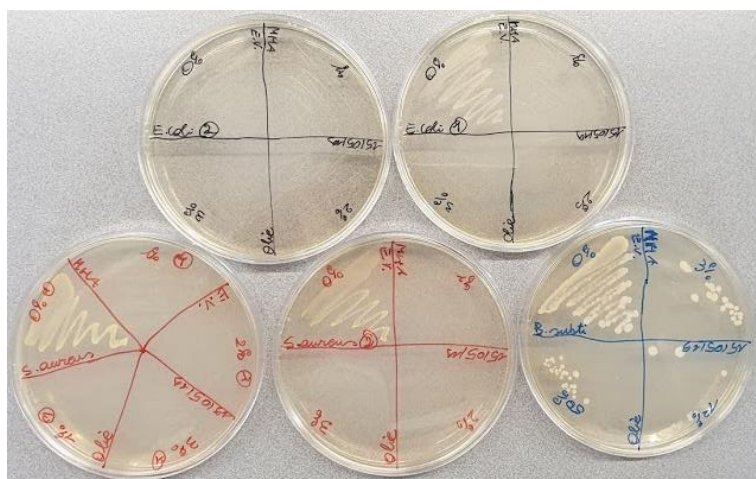
| Korenbloem hydrosol |   | 100%               | 99%           | 98%     |
|---------------------|---|--------------------|---------------|---------|
| <i>E. coli</i>      | 1 | Heel licht troebel | Troebel       |         |
|                     | 2 |                    |               |         |
| <i>S. aureus</i>    | 1 | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |
|                     | 2 |                    |               |         |
| <i>B. subtilis</i>  | 1 | Heel licht troebel | Licht troebel | Troebel |
|                     | 2 |                    |               |         |

Tabel 49: Pepermunt hydrosol triplo 2 en 3 labo 8

| Pepermunt hydrosol |   | 100%               | 99%                | 98%           |
|--------------------|---|--------------------|--------------------|---------------|
| <i>E. coli</i>     | 2 | Heel licht troebel | Heel licht troebel | Licht troebel |
|                    | 3 |                    | Licht troebel      |               |
| <i>S. aureus</i>   | 2 | Heel licht troebel | Heel licht troebel | Licht troebel |
|                    | 3 |                    |                    |               |
| <i>B. subtilis</i> | 2 | Heel licht troebel | Heel licht troebel | Licht troebel |
|                    | 3 |                    |                    |               |

### Uitgeplaatte resultaten

Op figuur 27 zijn de uitgeplaatte resultaten van de laurier olie van labo 8 te zien. Op de *E. coli* platen is geen groei te zien van 1% tot 3%. Bij 0% triplo 2 is duidelijk groei te zien. Bij 0% triplo 3 zijn maar 2 kolonies te zien. Triplo 3 is dus nogmaals uitgeplaat. Figuur 26 geeft dit resultaat weer. Bij 0% is nu wel groei te zien over heel de streep en nog steeds geen groei van 1% tot 3%. Van 1% tot 3% is geen groei te zien op beide *S. aureus* platen. Op beide platen is voor 0% wel duidelijk groei te zien. Op de plaat van *B. subtilis* is duidelijk groei te zien bij 0%. Bij 3%, 12% en 50% zijn enkele kolonies te zien. De kolonies zijn niet allemaal goed te tellen omdat ze dicht tegen elkaar liggen.



Figuur 27: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 8; boven triplo 2 en 3 *E. coli*; links triplo 1 en 2 *S. aureus*; rechts triplo 3 *B. subtilis*



Figuur 28: Uitgeplaatte resultaat laurier olie labo 8; triplo 3 *E. coli* opnieuw

Figuur 29 geeft de uitgeplaatte resultaten van het korenbloem hydrosol weer. Op de *E. coli* plaat is te zien dat er overal duidelijk groei is. Bij *S. aureus* is ook overal duidelijk groei. Over de hele streep is 98% duplo 1 en 2 besmet. Bij 99% duplo 1 is 1 besmette kolonie te zien. Duidelijke groei is overal te zien op de *B. subtilis* plaat.



Figuur 29: Uitgeplaatte resultaten duplo korenbloem hydrosol labo 8; links *E. coli*; midden *S. aureus*; rechts *B. subtilis*

In figuur 30 zijn de uitgeplaatte resultaten van het hydrosol van pepermunt weergegeven. Bij *E. coli* is overal duidelijk groei te zien. Op de plaat van *S. aureus* is overal duidelijk groei te zien. Bij 100% zijn besmettingen te zien tussen de *S. aureus*. Bij 99% en 98% is *S. aureus* te zien tussen de besmetting. Groei is duidelijk overal te zien op de *B. subtilis* plaat. Bij allemaal is besmetting. Tussen deze besmetting zijn kolonies van *B. subtilis* te zien.



Figuur 30: Uitgeplaatte resultaten duplo pepermunt hydrosol labo 8; links *E. coli*; midden *S. aureus*; rechts *B. subtilis*

Om zeker te zijn van de reinheid van de stalen zijn in labo 8 de stalen uitgeplaat zonder er bacteriën aan toe te voegen. Figuur 31 geeft het resultaat hiervan weer. De hydrosolen van korenbloem, pepermunt en Kalanchoë zijn alle drie besmet maar telkens wel met een ander micro-organisme. Bij korenbloem zijn enkel een paar kolonies vanboven te zien. Bij de twee andere hydrosolen is over de hele streep groei te zien. Het laurier en wilde tijm hydrosol zijn niet besmet. De laurier olie is ook niet besmet.



Figuur 31: Uitgeplaatte resultaat contaminatie test labo 8; 100% hydrosol/olie zonder toevoeging bacteriën

Om de reinheid te testen van de drie bacteriën zijn deze ook uitgeplaat. De foto hiervan is te zien in bijlage 8 (figuur 163).

### Antibiogram

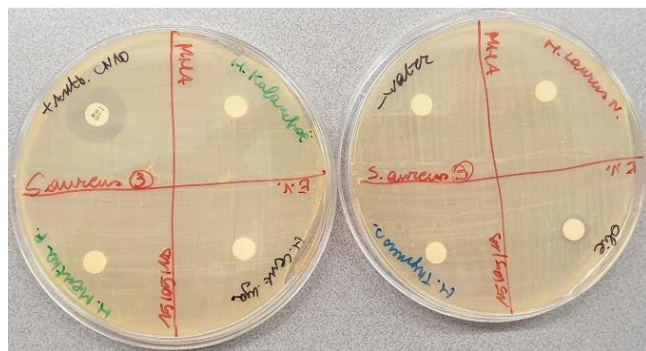
In labo 8 zijn de triplo 3 antibiogrammen van *E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis* gemaakt. Op de platen met *B. subtilis* is de *B. subtilis* niet goed uitgespreid waardoor deze best terug opnieuw worden gemaakt. Het is nu te moeilijk om deze platen goed af te lezen. De platen van *B. subtilis* zijn in bijlage 8 (figuur 164) te zien. Figuren 32 en 33 geven de antibiogrammen van *E. coli* en *S. aureus* van de triplo 3 weer. Bij beide gevallen is enkel een inhibitiezone te zien bij de laurier olie en de antibiotica. Tabel 50 geeft de inhibitiezone van de antibiotica en de laurier olie voor *E. coli* en *S. aureus* weer. Met de voorgaande triplo's (1 en 2) is de inhibitiezone voor laurier olie gemiddeld 8,7 mm voor *E. coli* en 8 mm voor *S. aureus*.

Tabel 50: Antibigram *E. coli* en *S. aureus* triplo 3 labo 8

| Antibiogram      | Antibiotica (AMP10 en CN10) | Laurier olie  |
|------------------|-----------------------------|---------------|
| <i>E. coli</i>   | 16 mm diameter              | 9 mm diameter |
| <i>S. aureus</i> | 17 mm diameter              | 8 mm diameter |



Figuur 32: Antibigrammen *E. coli* triplo 3 labo 8



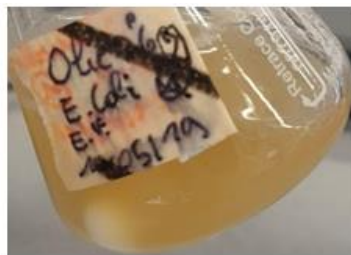
Figuur 33: Antibigrammen *S. aureus* triplo 3 labo 8

## 4.9 Labo 9

In labo 9 zijn aan de laatst gemaakte 0% erlenmeyers laurier olie toegevoegd. Bij *E. coli* en *S. aureus* is bij beide twee keer 1% toegevoegd. Bij *B. subtilis* is één keer 3% olie toegevoegd. De resultaten zijn te zien in de tabel en de foto's hieronder.

Tabel 51: Laurier olie toegevoegd aan voordien 24u opgegroeide *E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis* labo 9

| Laurier olie       |   | 1% olie later toegevoegd |
|--------------------|---|--------------------------|
| <i>E. coli</i>     | 1 | Troebel                  |
|                    | 2 | Troebel                  |
| <i>S. aureus</i>   | 1 | Troebel                  |
|                    | 2 | Troebel                  |
| <i>B. subtilis</i> |   | 3% olie later toegevoegd |
|                    | 1 | Troebel                  |



Figuur 34: Duplo 1 en 2 laurier olie 1% bij 24u eerder opgegroeide *E. coli* labo 9



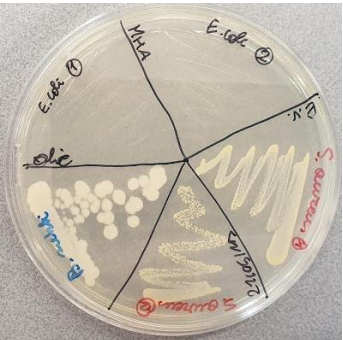
Figuur 35: Duplo 1 en 2 laurier olie 1% bij 24u eerder opgegroeide *S. aureus* labo 9



Figuur 36: Laurier olie 3% bij 24u eerder opgegroeide *B. subtilis* labo 9

Uitgeplaatte resultaten

Figuur 37 geeft het uitgeplaatte resultaat weer van labo 9 waarbij laurier olie later werd toegevoegd aan opgegroeide bacteriën. Op de plaat is te zien dat bij beide gevallen er geen groei te zien is bij *E. coli*. Bij *S. aureus* (beide) en *B. subtilis* is wel duidelijk groei te zien.



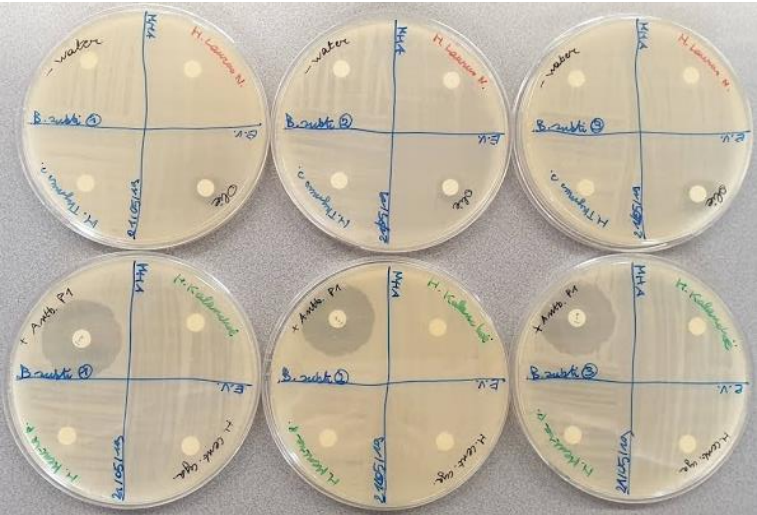
Figuur 37: Uitgeplaatte resultaat laurier olie labo 9

Antibiogram

In voorgaande labo's zijn de antibiogrammen van *B. subtilis* niet goed gelukt. In labo 9 zijn de triplo's 1, 2 en 3 voor *B. subtilis* terug opnieuw uitgevoerd. Deze zijn wel gelukt. Op figuur 38 zijn de resultaten te zien. Enkel bij de laurier olie en het antibioticum zijn een inhibitiezone te zien. Om de reinheid van *B. subtilis* te controleren is deze ook uitgeplaat (zie figuur 165 in bijlage 9). Tabel 52 geeft de inhibitiezone van de antibioticum en de laurier olie voor *B. subtilis* weer. De inhibitiezone van laurier olie voor *B. subtilis* is dus gemiddeld 12,3 mm.

Tabel 52: Antibiogram triplo 1,2 en 3 *B. subtilis* labo 9

| Antibiogram        |   | Antibioticum (P1) | Laurier olie   |
|--------------------|---|-------------------|----------------|
| <i>B. subtilis</i> | 1 | 28 mm diameter    | 12 mm diameter |
|                    | 2 | 26 mm diameter    | 11 mm diameter |
|                    | 3 | 27 mm diameter    | 14 mm diameter |



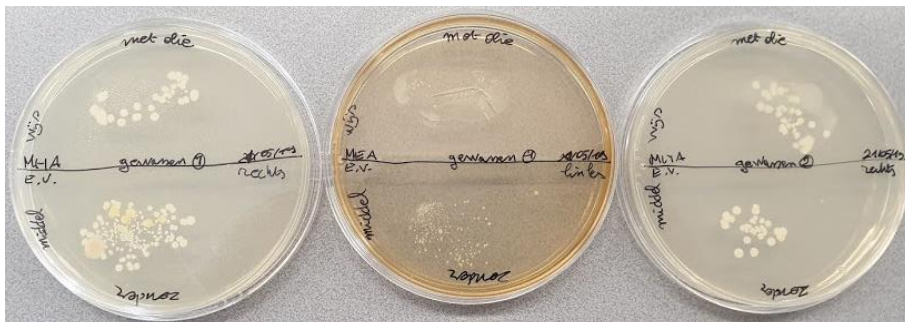
Figuur 38: Antibiogrammen *B. subtilis* triplo 1,2 en 3 labo 9

### Experiment met vingertoppen

De platen met de ongewassen vingers zijn eerst een dag omgekeerd bij 36°C geïncubeerd. Daarna zijn deze platen samen met de platen van de gewassen vingers voor ongeveer 24 uur bij 30°C omgekeerd geïncubeerd. Op de platen was na 1 dag nog niet duidelijk groei te zien. Aangezien sommige micro-organismen meer tijd nodig hebben om te groeien, worden de platen omgekeerd geïncubeerd bij 30°C voor 5 extra dagen. De resultaten hiervan zijn te zien op figuren 39 en 40. Bij de ongewassen wijsvingers ofwel met laurier olie is geen groei te zien op de eerste twee platen. Op de derde (rechtse) plaat is wel een beetje groei te zien. Bij de ongewassen middelvinger ofwel zonder laurier olie is op alle drie de platen groei te zien. Op de middelste plaat is maar een klein beetje groei te zien. Op plaat 1 en 3 is wel heel duidelijk groei te zien waarbij zelfs duidelijk verschillende micro-organismen zijn te zien. Bij de gewassen platen 1 en 3 is er groei te zien bij de wijsvinger (met olie). Bij de middelste plaat die specifiek is voor schimmels, is geen groei te zien bij de wijsvinger. Op de middelste plaat is wel een beetje groei te zien bij de middelvinger (zonder olie). Bij plaat 1 de middelvinger is heel duidelijk groei te zien. Hier zijn ook duidelijk verschillende micro-organismen te zien (verschillende kleuren). Op plaat 3 bij de middelvinger is er ongeveer hetzelfde aantal groei als bij de wijsvinger (met olie). Bij de kant van de wijsvinger is op elke plaat (ongewassen en gewassen) nog duidelijk een olievlek te zien van de vinger.



Figuur 39: Ongewassen middelvinger zonder olie en wijsvinger met olie; links persoon 1 op MHA, midden persoon 1 op MEA en rechts persoon 2 op MHA



Figuur 40: Gewassen middelvinger zonder olie en wijsvinger met olie; links persoon 1 op MHA, midden persoon 1 op MEA en rechts persoon 2 op MHA

## 5 Discussie

Deze discussie omvat de bespreking van de onderzoeksresultaten en enkele aanbevelingen.

### 5.1 Ontwikkeling methode laurier olie

Voor de olie zijn drie verschillende technieken uitgevoerd om de antimicrobiële werking te testen. Bij de eerste techniek is de olie niet volledig in contact gekomen met de hele broth in de proefbuis. De bacteriën moesten anaeroob gaan groeien omdat de olie boven op de broth lag. Deze techniek is dus niet ideaal om mee verder te werken. Bij een andere techniek is gebruikt gemaakt van een emulgator. De emulgator Tween 80 is bij de olie en de broth gedaan om ze zo te doen mengen. Als de olie, broth en Tween 80 goed gemengd zijn, is een witte neerslag te zien. Hierdoor is het moeilijk om te bepalen of er wel of geen groei is. Om de olie goed te doen mengen met de broth is veel Tween 80 nodig. Het is niet echt aangewezen om veel emulgator te gaan gebruiken in producten. Na het toevoegen van 20% Tween 80 is gestopt omdat dit al best een grote hoeveelheid is. Normaal gezien wordt maar 1% toegevoegd. Echter is alles nog steeds niet goed gemengd omdat er nog steeds twee lagen zichtbaar zijn. Bij de verdunningsreeks zijn de lagen nog beter zichtbaar. Het is ook niet zeker of de Tween 80 in combinatie met de olie geen invloed heeft op de groei van de bacteriën. Om zeker te zijn dat het (zeer) sterk remmend effect alleen vanuit de olie komt, is besloten om niet met deze techniek verder te werken. Bij de derde techniek is gebruikt gemaakt van erlenmeyers die op een magnetische roerder zijn gezet. Hierbij is de olie wel goed in contact gekomen met de broth. Bij deze techniek is ook geen extra middel toegevoegd en is nog steeds duidelijk te bepalen of een staal troebel (groeit) is of niet. Om zeker te zijn dat de bacteriën geen invloed ondervinden van de magnetische roerder is een blanco staal ingezet. Het blanco staal bestaat alleen uit broth en bacteriën. Hier is dus geen laurier olie aan toegevoegd. Bij elke blanco van alle drie de bacteriën is telkens duidelijk troebelheid of groei te zien. De bacteriën ondervinden dus geen invloed van het rond roeren. De lichte troebelheid bij de erlenmeyers met laurier olie in kan ook veroorzaakt worden doordat er nog kleine deeltjes olie in de broth gemengd zitten. Voor het uitplaten is eerst rechtstreeks de entoog in de erlenmeyers gedaan. Hierdoor gaat de entoog eerst door de olie om in de broth te komen. Vervolgens gaat de entoog weer door de olie omdat de olie weer als laag op de broth gaat liggen nadat het van de magnetische roerder is gehaald. Dit kan voor een vertekend beeld zorgen of er nu wel of geen groei is omdat de bacteriën weer met 100% olie in contact komen. Via een steriele pasteurpipet en later via een micropipet is een deel broth uit de erlenmeyer gehaald en in een lege petrischaal gebracht. Vervolgens wordt de entoog in de druppel gebracht en uitgeplaat. Bij deze techniek is er minder kans dat de bacteriën met 100% olie in contact komen. Hierdoor is het zekerder om te bepalen of er wel of geen groei is.

## 5.2 Antimicrobiële werking laurier olie

Bij alle drie de bacteriën is vanuit een algemene verdunningsreeks gestart om zo al een eerste zicht te krijgen op de werking van de olie. Met deze reeks kan ook al een idee worden gegeven van waar de MIC zich ongeveer bevindt. Bij de algemene reeks voor *E. coli* is te zien dat de MIC tussen ongeveer 3% en 6% ligt. Na hiertussen te kijken, blijkt dat er nu geen groei meer is bij 3%. Om de MIC te bepalen moet dus lager worden gekeken. Uiteindelijk ligt de MIC op 1%. Om hiervan zeker te zijn is een triplo-test uitgevoerd. De MIC bleef hier op 1%. Lager dan 1% is niet gekeken in dit onderzoek. Bij *S. aureus* is in eerste instantie (na de algemene reeks) te zien dat er van ongeveer 3% tot 12,5% een sterk remmende werking is. Echter ligt de MIC wel tussen 12,5% en 25%. Bij latere testen is de MIC steeds lager geworden van tussen 25% en 12% naar tussen 12% en 6% dat naar tussen 6% en 3% ging. Uiteindelijk is de MIC gegaan tot 1%. Om zeker te zijn dat de MIC nu definitief 1% is, is een triplo-test uitgevoerd. Bij alle drie de testen is er geen groei te zien bij 1%. Net als bij *E. coli* is in dit onderzoek niet verder gekeken dan 1%. Na de algemene verdunningsreeks is al duidelijk dat de sporen van *B. subtilis* niet worden afgedood of dat de bacterie wordt geremd. Aangezien ongeveer 6% helder is en 3% troebel, is tussen deze twee verder gekeken voor de MIC. Bij de percentages van 7% tot 3% is ook groei te zien maar slechts enkele kolonies. Voor de triplo-testen is dan ook gekozen voor 50%, 12% en 3% om zo aan te tonen dat de sporen niet worden afgedood omdat er ongeveer hetzelfde aantal groei is bij de verschillende percentages buiten de blanco waarbij duidelijk groei zichtbaar is. Tijdens het uitvoeren van de triplo's is bij de eerste keer (triplo 1 en 2) *E. coli* in de erlenmeyers gedaan in plaats van *B. subtilis*. Dit is bij labo 6 gebeurd. De triplo's moesten dus terug opnieuw worden uitgevoerd. Na de triplo's is duidelijk dat de broth in de erlenmeyers bij 50% en 12% helder is en troebel bij 3%. Toch is op de platen bij alle drie groei te zien. Dit wil dus zeggen dat *B. subtilis* wordt afgedood maar de sporen niet bij 50% en 12%. Bij 3% kan het nog zijn dat de bacterie wordt afgeremd en dat de sporen natuurlijk ook niet worden afgedood. In dit onderzoek is niet hoger gekeken dan 50%.

### 5.3 Antimicrobiële werking hydrosolen

Voor de hydrosolen is één techniek voldoende om de antimicrobiële werking te testen. Deze stalen mengen namelijk wel goed met de broth omdat deze allebei op waterbasis zijn. Na het vooronderzoek is duidelijk dat voor alle hydrosolen de MIC hoger ligt dan 50%. Om zeker te zijn, zijn 50% en 25% opnieuw getest bij de hydrosolen. Hier is weer troebelheid ofwel groei te zien. Tegelijk is 100% hydrosol getest. De proefbuizen met 100% hydrosol zijn helder. Dit zou betekenen dat er geen groei is. Het kan echter ook zijn dat omdat er geen broth aanwezig is in de proefbuis de bacterie niet kan uitgroeien. Om zeker te zijn dat er echt geen groei is, worden de proefbuizen met 100% uitgeplaat. Voor de hydrosolen van pepermunt en korenbloem is bij 100% op de plaat groei te zien. Met deze hydrosolen wordt niet meer verder gewerkt, enkel de triplo-testen worden nog uitgevoerd omdat bij de hoogste concentratie nog steeds duidelijk groei is te zien. De laurier en wilde tijm hydrosolen worden nog wel verder onderzocht omdat bij 100% geen groei op de plaat is te zien. Bij het methanol extract van Kalanchoë is het moeilijk om te bepalen of er nu wel of geen groei is door al het groene bezinsel (plantendelen) die nog in het extract zitten. Na het uitplaten van 100% is duidelijk dat er geen groei is. Tussen de 100% en 50% is voor het methanol extract geen groei te zien. De MIC zou dus lager liggen. Echter kunnen er geen verdere proeven meer uitgevoerd worden omdat het extract op is. Om toch verder te werken met de plant Kalanchoë zijn de testen op het hydrosol uitgevoerd. Bij het hydrosol is van 100% tot 50% overal groei te zien. De methanol heeft dus duidelijk invloed gehad op de antimicrobiële werking van de Kalanchoë. Bij de hydrosolen van korenbloem en Kalanchoë zijn de triplo's van 100%, 99% en 98% uitgevoerd voor alle drie de bacteriën. Hierbij is telkens overal groei te zien maar ook besmetting. Om deze reden zijn deze hydrosolen opnieuw getest maar dan als duplo van 100%, 99% en 98% voor alle drie de bacteriën om zo tijd en staal te besparen. Hier is ook weer te zien dat er overal groei is maar voornamelijk besmetting. Bij het pepermunt hydrosol is eerst 100%, 99%, 98%, 95% en 90% één keer uitgevoerd bij elke bacterie omdat bij de vorige keer 100% is uitgeplaat er besmetting te zien was. Bij alle drie de bacteriën is overal groei te zien van 100% tot 90%. Van 98% tot 90% is duidelijk besmetting te zien. Om de triplo-test te vervullen is 100%, 99% en 98% nog twee keer getest voor alle drie de bacteriën. Bij deze test is voor alle drie de bacteriën overal duidelijk groei te zien. Bij *S. aureus* en *B. subtilis* is duidelijk besmetting te zien. De hydrosolen van korenbloem, pepermunt en Kalanchoë zouden dus besmet zijn omdat bij beide keren er besmetting te zien is op de platen. De hydrosolen zijn dus uitgeplaat om hun reinheid te controleren. Hierbij zijn dus geen andere bacteriën toegevoegd aan het hydrosol. Met deze test is duidelijk geworden dat de drie hydrosolen verontreinigd zijn met bacteriën. Telkens is het wel een andere bacterie per hydrosol. In labo 6 is er een fout opgetreden waarbij beënt is met *E. coli* in plaats van *B. subtilis*. Door de besmetting is dit echter moeilijk te zien. Voor de laurier en wilde tijm hydrosolen zijn voor alle drie de bacteriën eerst nog een algemene verdunningsreeks van 100% tot 50% met stappen van 10 gemaakt. Bij deze hydrosolen is geen meermaals voorkomende besmetting vastgesteld. Soms is er een besmetting maar die komt bij een volgende test dan niet meer voor. Ze zijn ook mee getest op reinheid. Bij deze test is te zien dat beide niet met bacteriën verontreinigd zijn.

Voor *E. coli* bij het laurier hydrosol is groei te zien tot en met 90%, bij 100% zijn slechts enkele kolonies te zien. Tussen de 100% en 90% met stappen van 2 wordt vervolgens verder gekeken. De stappen van 2 worden genomen om zo niet te veel proefbuizen in één keer te nemen en om zo niet te veel hydrosol te gebruiken dan nodig is. Overal is duidelijk groei te zien op 100% na. Hier is maar 1 kolonie te zien. Dit wil dus zeggen dat de MIC hier 100% is. Voor de triplo-test wordt dus gekozen voor 100%, 99% en 98%. Voor het wilde tijm hydrosol is duidelijk groei te zien bij 50%, 70% en 80%. Bij 90% zijn enkele kolonies van boven te zien en 3 kolonies bij 100%. Echter bij 60% is geen groei te zien. In de volgende test is tussen 100% en 90% gekeken. De 60% is ook terug opnieuw uitgevoerd om te kijken of er niks is misgegaan zoals bijvoorbeeld niks op de entoog hebben zitten bij het uitplaten. Echter is nu nergens groei te zien, ook niet bij 60%. De algemene reeks van 100% tot 50% wordt dus terug opnieuw uitgevoerd om opnieuw te bepalen waar tussen er gekeken moet worden (wel en geen groei). Bij 50% is nog steeds duidelijk groei. Van 80% tot 100% is er nu geen groei te zien. Bij 60% en 70% zijn heel kleine kolonies te zien. Om zeker te zijn of dit *E. coli* is en geen besmetting wordt een deel van de plaat gehaald en uitgeplaat. De plaat van 100% tot 50% wordt er ook terug opnieuw ingezet voor 1 extra dag. Op de extra uitgeplaatte platen is duidelijk groei te zien maar de geur wijkt wel af van de normale geur van *E. coli*. Na één dag extra in de incubator is bij 80% 1 kolonie te zien en bij 90% 2. Dit wil dus zeggen dat de MIC tussen 70% en 80% zit. In het volgende onderzoek wordt gekozen om te kijken tussen 70% en 80%. Hierbij is weer overal groei te zien maar enkel van de heel kleine kolonies. Het is moeilijk te verklaren waarom er de ene keer wel groei is en de andere keer niet of andersom. Op zich zijn er weinig besmettingen en als er groei is, is dit normaal ook *E. coli*. Aangezien het wel of niet groeien telkens veranderde, is ervoor gekozen om voor de triplo-test 100%, 99% en 98% te gebruiken net als bij alle andere. Bij *S. aureus* is duidelijk groei te zien van 50% tot 90% en 1 kolonie bij 100% voor het laurier hydrosol. De MIC zou dus tussen 100% en 90% liggen. Voor de volgende test wordt dus gekozen om te kijken tussen 100% en 90% met stappen van 2. Hierbij is weer duidelijk groei te zien overal op 100% na (1 kolonie). De MIC is hier dus 100%. Voor de triplo-test wordt dus gekozen voor 100%, 99% en 98%. Voor het hydrosol van wilde tijm is overal groei te zien van 100% tot 50%. Aangezien bij 100% maar 16 kolonies zijn te zien (sterk remmend), wordt gekozen om tussen 100% en 90% verder te kijken. Enkel bij 100% is geen groei te zien (MIC). Bij de andere is wel duidelijk groei te zien. Voor de triplo-test wordt dus gekozen voor 100%, 99% en 98%. Voor het laurier hydrosol is bij *B. subtilis* duidelijk groei te zien van 50% tot 80%. Bij 90% en 100% is geen groei te zien. De MIC zou dus tussen 80% en 90% zitten. In de volgende test is dus gekeken tussen 80% en 90%. Echter is hier nu overal groei te zien. Er wordt dus opnieuw een test gedaan maar dan tussen 90% en 100%. Hierbij is te zien dat er overal enkele kolonies zijn. De bacterie *B. subtilis* wordt wel afgedood maar zijn sporen niet. Voor de triplo-test wordt gekozen om 100%, 99% en 98% te gebruiken. Bij het wilde tijm hydrosol is duidelijk groei te zien bij 50% en 60%. Bij 70% zijn er maar 5 kolonies en er is geen groei van 80% tot 100%. De MIC zou dus tussen 70% en 80% zitten. Voor de volgende test wordt dan ook gekeken tussen 70% en 80%. Hierbij is overal groei te zien. In de volgende test zal dus hoger moeten gekeken worden. Normaal zou dan tussen 80% en 90% enkel worden gekeken echter om tijd te besparen is tussen 100% en 90% ook gekeken voor het geval de MIC toch nog hoger ligt. Hier is overal een beetje groei te zien. Dit wil zeggen dat *B. subtilis* op zich wel wordt afgedood maar de sporen niet. Als triplo-test wordt, net als bij alle andere, gekozen voor 100%, 99% en 98%.

## 5.4 Antibigram

Voor het antibiogram zijn in het vooronderzoek geautoclaveerde papiertjes gebruikt. Normaal gezien worden blanco of voorbereide disks gebruikt. Aangezien dit enkel een vooronderzoek is om al eens te kijken of er überhaupt een inhibitiezone is bij de hydrosolen en/of olie is dit voldoende. Bij alle andere antibiogrammen worden wel de disks gebruikt en worden de negatieve (water) en positieve (antibioticum) meegenomen. Op alle antibiogrammen van elke bacterie (*E. coli*, *S. aureus* en *B. subtilis*) is geen inhibitiezone te zien bij de hydrosolen van laurier, korenbloem, pepermint en Kalanchoë. Bij het methanol extract van Kalanchoë is ook geen inhibitiezone te zien. Dit is wel raar aangezien hier methanol inzet en deze normaal gezien bacteriën zou afdoden. De concentratie aan methanol kan zeer laag zijn waardoor het geen groot effect heeft en die methanol kan ook verdampt zijn terwijl het extract in de disks intrekt. Bij het hydrosol van wilde tijm is enkel bij het vooronderzoek een kleine inhibitiezone te zien bij *S. aureus* en *B. subtilis*. Bij *E. coli* is geen inhibitiezone te zien. Vanaf dat de disks worden gebruikt is geen inhibitiezone meer te zien bij alle drie de bacteriën. Enkel bij de laurier olie en de positieve is telkens een inhibitiezone te zien. Echter kan het zijn dat de inhibitiezone van laurier olie eigenlijk groter is dan deze nu te zien is omdat de olie waarschijnlijk niet goed diffundeert in de agarplaat. Dit wil zeggen dat de olie zich niet goed kan verspreiden doorheen de agarplaat omdat de agarplaat opgebouwd is uit onder andere water. Olie en water mengen namelijk niet goed samen. In labo 7 is een fout gebeurd bij het uitstrijken van *B. subtilis* over de plaat. Op de plaat is *E. coli* uitgespreid en niet *B. subtilis*. Dit is ten eerste te zien aan de glanzende schijn die de bacterie heeft, net als bij *E. coli*, want *B. subtilis* heeft een dof schijn. Ten tweede is dit te zien aan het antibioticum. Hierbij is geen inhibitiezone meer te zien. In labo 8 zijn de platen van *B. subtilis* ook niet goed gelukt omdat er niet veel voedingsbodem of agar in de plaat zit. Hierdoor is *B. subtilis* niet goed kunnen uitgroeien en is deze ook niet goed verspreid over de plaat. In labo 9 zijn dus de triplo's van *B. subtilis* gemaakt. Deze zijn wel goed verspreid en de juiste bacterie is ook gebruikt.

## 5.5 Extra experimenten

In labo 9 is ook getest of de bacteriën zeer sterk worden afgeremd of niet als deze eerst volledig zijn uitgroeit (na 24 uur) en daarna pas olie wordt toegevoegd. Hierbij is overal nog steeds troebelheid te zien bij de erlenmeyers. Dit wil niet direct zeggen dat er overal nog steeds groei is. Zelfs al zijn de bacteriën (zeer sterk) geremd of afgedood dan nog blijft de troebelheid behouden omdat de bacteriën nog steeds aanwezig zijn in de broth. Om zeker te zijn of er nog steeds groei is of niet worden de erlenmeyers uitgeplaat. Hierbij is twee keer geen groei te zien bij *E. coli*. De laurier olie heeft dus een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect op *E. coli*. Bij *B. subtilis* is duidelijk groei te zien. Nu zijn er veel bacteriën aanwezig die sporen kunnen vormen, die dan later op de plaat gaan uitgroeien. Bij *S. aureus* is twee keer duidelijk groei te zien. Het kan zijn dat er nu zo veel van deze bacterie aanwezig is dat ze niet allemaal kunnen worden afgedood met de hoeveelheid laurier olie die nu is toegevoegd.

Bij het experiment met de vingertoppen is bij de kant van de wijsvinger telkens (gewassen en ongewassen) nog een laurier olievlek te zien. Dit wil dus zeggen dat de micro-organismen in de laurier olie moeten kunnen groeien. Het kan dus niet met zekerheid worden gezegd of de laurier olie de micro-organismen afdoodt of dat deze gewoon niet in de olie kunnen uitgroeien en dus geremd worden.

## 5.6 Aanbevelingen

Voor verdere projecten zou aanbevolen worden om de triplo-testen nog een keer opnieuw te doen op een ander batch om zo zeker te zijn dat er geen verschillen tussen batches kunnen zijn. Verder zou ook nog gekeken moeten worden of de bacteriën effectief gedood zijn of slechts zeer sterk geremd waardoor ze meer tijd nodig hebben om uit de groeien (langere lagfase). Daarnaast zou verder kunnen getest worden met het omgekeerde principe voor de olie. Hierbij worden de bacteriën eerst opgegroeid in de erlenmeyer en vervolgens wordt een percentage aan laurier olie toegevoegd. In een volgend project zou ook best gekeken worden naar de samenstelling van de laurier olie. De samenstelling kan bepaald worden aan de hand van “high resolution mass spectrometry” (HRMS). Om een vergelijking te maken tussen de olie en het hydrosol kunnen de componenten van het hydrosol ook worden bepaald via HRMS. Via de HRMS kan dan de actieve stof die voor de antimicrobiële werking zorgt, bepaald worden. Vervolgens kan de laurier olie ook op pathogenen worden getest om na te gaan of het deze kan afremmen of afdoden. Een mogelijk extra experiment zou zijn om te gaan kijken of het laurierblad zelf een antimicrobiële werking heeft. Hierbij kan ook gekeken worden naar verschillende soorten laurierbladeren. Voor de laurier olie kan ook gewerkt worden met de verschillende soorten laurierbladeren om zo na te gaan of er verschil is in de samenstelling en antimicrobiële werking.

Als mogelijke toepassingen voor de laurier olie zou kunnen gekeken worden naar de voedingsindustrie. Hier zou het als desinfectie- en/of conserveringsmiddel gebruikt kunnen worden. In verpakkingen zou het ook kunnen verwerkt worden om zo het product bacterievrij te houden of om de bacteriën niet te laten uitgroeien. Daarbij kan het ook voor een extra smaak en geur zorgen in het product. Een andere mogelijkheid zou zijn om de laurier olie in medicatie of zalven te verwerken.

## 6 Conclusie

Voor de olie kan besloten worden dat met de techniek van de erlenmeyers op de magnetische roerder 1% olie voldoende is om *E. coli* en *S. aureus* sterk af te remmen en waarschijnlijk af te doden als de olie op dezelfde dag wordt toegevoegd als de erlenmeyers worden beënt. De sporen van *B. subtilis* worden minstens tot 50% niet afgedood.

Verder kan besloten worden dat het laurier hydrosol met 100% een remmend effect heeft op *S. aureus* en een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect heeft op *E. coli* en *B. subtilis*. Het hydrosol van wilde tijm heeft een zeer sterk remmend en waarschijnlijk dodend effect minstens vanaf 98% op *E. coli* en *S. aureus*. Bij 100% worden de sporen van *B. subtilis* niet afgedood.

Daarnaast kan besloten worden dat de hydrosolen van korenbloem, pepermunt en Kalanchoë verontreinigd zijn met bacteriën. Hierdoor kan niet met zekerheid hun antimicrobiële werking worden vastgesteld voor de drie bacteriën.

Tot slot kan besloten worden voor het antibiogram dat er enkel een inhibitiezone te zien is bij de laurier olie en niet bij de hydrosolen. Voor *E. coli* is dit gemiddeld 8,7 mm. Voor *S. aureus* is dit gemiddeld 8 mm en voor *B. subtilis* is dit gemiddeld 12,3 mm.

## Literatuurlijst

- Bakkali, F. & Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. , 46, pp.446–475.
- Burt, S., 2004. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. , 94, pp.223–253.
- Campbell N.A., R. J., 2014. The diversity of life: 27 Prokaryotes. In: Biology: A global approach. sl:Pearson Education Limited, pp. 630-632.
- Elizabeth, C. et al., 2007. Characterization of the leaf essential oil from laurel ( *Laurus nobilis* L .) grown in Colombia. , 38(3), pp.371–375.
- Fратиани, F., Coppola, R. & Feo, V. De, 2017. *Laurus nobilis* : Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. , pp.1–12.
- Guenther, E. & Ph, D., 1948. BY HISTORY — ORIGIN IN PLANTS. , 1, pp.1–427.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T. V, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. , 9071, pp.985–990.
- Oils, L.E., 2019. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. , pp.1–11.
- Paparella, A. et al., 2018. Hydrosols : Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. , 86, pp.126–137.
- Reweghs, N., 2017. Thema 2.1 : Grootte, vorm en structuur van bacteriën . In: Studieboek van algemene microbiologie. sl:sn
- Rivera-chavira, B.E., Id, L.E.S. & Camacho, A.D., 2018. Activity of Seven Essential Oils and their Major ( *Diptera* : *Culicidae* ): Synergism – antagonism Effects. , p.17.
- Taban, A., Jamal, M. & Niakousari, M., 2018. Sweet bay ( *Laurus nobilis* L .) essential oil and its chemical composition , antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9(April), pp.12–18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.05.001>.
- Tural, S. & Turhan, S., 2017. ( *Thymus vulgaris* L .), ROSEMARY ( *Rosmarinus officinalis* L .) AND LAUREL ( *Lauris nobilis* L .) ESSENTIAL OILS AND THEIR MIXTURES. , 42, pp.588–596.
- Weerd, V. Uit de, 2018. De 4 gebruikte methodes voor het verkrijgen van etherische oliën @ [www.veritarom.nl](http://www.veritarom.nl). Available at: <https://www.veritarom.nl/extractie-methodes-etherische-olien/>.
- Wiersema, I., Antibiotica op het lab @ [www.microbiologie.info](http://www.microbiologie.info). Available at: [http://www.microbiologie.info/Antibiotica op het lab.html](http://www.microbiologie.info/Antibiotica%20op%20het%20lab.html).

Wiersema, I., bacteriecelwand @ www.microbiologie.info. Available at:  
<http://www.microbiologie.info/bacteriecelwand.html>.

Wirix, E., 2018. Protocol antibiogram Kirby-Bauer. sl:sn

## Figurenlijst

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 1: Principe stoomdestillatie (Weerd 2018) .....                                                                                                        | 11 |
| Figuur 2: Principe koude expressie (Weerd 2018) .....                                                                                                         | 11 |
| Figuur 3: Principe solvent extractie (Weerd 2018) .....                                                                                                       | 12 |
| Figuur 4: Principe CO2 extractie (Weerd 2018) .....                                                                                                           | 13 |
| Figuur 5: Gram-positieve bacterie (a) en gram-negatieve bacterie (b) (Campbell N.A., 2014) .....                                                              | 15 |
| Figuur 6: Voorbeeld van een endospore (nog in de bacterie) (Campbell N.A., 2014) .....                                                                        | 16 |
| Figuur 7: Erlenmeyers met broth, olie en bacteriën in op een magnetische roerder .....                                                                        | 18 |
| Figuur 8: Uitplaten stalen (a) en druppels bij uitplaten olie (b) .....                                                                                       | 18 |
| Figuur 9: Voorbeeld patroon plaatsing schijfjes (Wirix, 2018) .....                                                                                           | 19 |
| Figuur 10: Voorbeeld meting inhibitiezone (Wirix, 2018) .....                                                                                                 | 19 |
| Figuur 11: Triplo 1 laurier olie, E. coli labo 7 .....                                                                                                        | 35 |
| Figuur 12: Triplo 1 laurier olie, S. aureus labo 7 .....                                                                                                      | 36 |
| Figuur 13: Triplo 1 laurier olie, B. subtilis labo 7 .....                                                                                                    | 37 |
| Figuur 14: Triplo 2 laurier olie, B. subtilis labo 7 .....                                                                                                    | 37 |
| Figuur 15: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 7; links triplo 1 en 2 B. subtilis; rechts boven triplo 1 E. coli; rechts onder triplo 1 S. aureus ..... | 39 |
| Figuur 16: Uitgeplaatte resultaten triplo laurier hydrosol labo 7; links E. coli; midden S. aureus; rechts B. subtilis .....                                  | 39 |
| Figuur 17: Uitgeplaatte resultaten triplo wilde tijm hydrosol labo 7; links E. coli; midden S. aureus; rechts B. subtilis .....                               | 40 |
| Figuur 18: Uitgeplaatte resultaten duplo Kalanchoë hydrosol labo 7; links E. coli; midden S. aureus; rechts B. subtilis .....                                 | 40 |
| Figuur 19: Antibiotogrammen E. coli triplo 1 en 2 labo 7 .....                                                                                                | 42 |
| Figuur 20: Antibiotogrammen S. aureus triplo 1 en 2 labo 7 .....                                                                                              | 42 |
| Figuur 21: Triplo 2 laurier olie, E. coli labo 8 .....                                                                                                        | 43 |
| Figuur 22: Triplo 3 laurier olie, E. coli labo 8 .....                                                                                                        | 43 |
| Figuur 23: Triplo 2 laurier olie, S. aureus labo 8 .....                                                                                                      | 44 |
| Figuur 24: Triplo 3 laurier olie, S. aureus labo 8 .....                                                                                                      | 44 |
| Figuur 25: Triplo 1 laurier olie 1%, S. aureus labo 8 .....                                                                                                   | 45 |
| Figuur 26: Triplo 3 laurier olie, B. subtilis labo 8 .....                                                                                                    | 45 |
| Figuur 27: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 8; boven triplo 2 en 3 E. coli; links triplo 1 en 2 S. aureus; rechts triplo 3 B. subtilis .....         | 46 |
| Figuur 28: Uitgeplaatte resultaat laurier olie labo 8; triplo 3 E. coli opnieuw .....                                                                         | 46 |
| Figuur 29: Uitgeplaatte resultaten duplo korenbloem hydrosol labo 8; links E. coli; midden S. aureus; rechts B. subtilis .....                                | 47 |
| Figuur 30: Uitgeplaatte resultaten duplo pepermunt hydrosol labo 8; links E. coli; midden S. aureus; rechts B. subtilis .....                                 | 47 |
| Figuur 31: Uitgeplaatte resultaat contaminatie test labo 8; 100% hydrosol/olie zonder toevoeging bacteriën .....                                              | 47 |
| Figuur 32: Antibiotogrammen E. coli triplo 3 labo 8 .....                                                                                                     | 48 |
| Figuur 33: Antibiotogrammen S. aureus triplo 3 labo 8 .....                                                                                                   | 48 |
| Figuur 34: Duplo 1 en 2 laurier olie 1% bij 24u eerder opgegroeide E. coli labo 9 .....                                                                       | 49 |
| Figuur 35: Duplo 1 en 2 laurier olie 1% bij 24u eerder opgegroeide S. aureus labo 9 .....                                                                     | 49 |
| Figuur 36: Laurier olie 3% bij 24u eerder opgegroeide B. subtilis labo 9 .....                                                                                | 49 |
| Figuur 37: Uitgeplaatte resultaat laurier olie labo 9 .....                                                                                                   | 50 |
| Figuur 38: Antibiotogrammen B. subtilis triplo 1,2 en 3 labo 9 .....                                                                                          | 50 |
| Figuur 39: Ongewassen middelvinger zonder olie en wijsvinger met olie; links persoon 1 op MHA, midden persoon 1 op MEA en rechts persoon 2 op MHA .....       | 51 |
| Figuur 40: Gewassen middelvinger zonder olie en wijsvinger met olie; links persoon 1 op MHA, midden persoon 1 op MEA en rechts persoon 2 op MHA .....         | 51 |

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 41: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal rechts heldere broth .....                         | 69 |
| Figuur 42: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                        | 69 |
| Figuur 43: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                      | 69 |
| Figuur 44: Vooronderzoek laurier hydrosol <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth.....                                     | 69 |
| Figuur 45: Vooronderzoek laurier hydrosol <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth.....                                   | 69 |
| Figuur 46: Vooronderzoek laurier hydrosol <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal rechts heldere broth .....                               | 70 |
| Figuur 47: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth.....                                  | 70 |
| Figuur 48: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                               | 70 |
| Figuur 49: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                             | 70 |
| Figuur 50: Vooronderzoek pepermunt hydrosol <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                                  | 70 |
| Figuur 51: Vooronderzoek pepermunt hydrosol <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                                | 70 |
| Figuur 52: Vooronderzoek pepermunt hydrosol <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                              | 71 |
| Figuur 53: Vooronderzoek korenbloem hydrosol <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                                 | 71 |
| Figuur 54: Vooronderzoek korenbloem hydrosol <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                               | 71 |
| Figuur 55: Vooronderzoek korenbloem hydrosol <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                             | 71 |
| Figuur 56: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> voor vortexen <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....     | 71 |
| Figuur 57: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> na vortexen <i>E. coli</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....       | 71 |
| Figuur 58: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> voor vortexen <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....   | 72 |
| Figuur 59: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> na vortexen <i>S. aureus</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....     | 72 |
| Figuur 60: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> voor vortexen <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth ..... | 72 |
| Figuur 61: Vooronderzoek methanol extract <i>Kalanchoë</i> na vortexen <i>B. subtilis</i> labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....   | 72 |
| Figuur 62: Vooronderzoek antibiogrammen deel 1; links <i>B. subtilis</i> , midden <i>E. coli</i> en rechts <i>S. aureus</i> .....                       | 73 |
| Figuur 63: Vooronderzoek antibiogrammen deel 2; links <i>B. subtilis</i> , midden <i>E. coli</i> en rechts <i>S. aureus</i> .....                       | 73 |
| Figuur 64: Laurier olie (erlenmeyers) <i>E. coli</i> labo 2.....                                                                                        | 74 |
| Figuur 65: Laurier olie (erlenmeyers) <i>S. aureus</i> labo 2 .....                                                                                     | 75 |
| Figuur 66: Laurier olie (erlenmeyers) <i>B. subtilis</i> labo 2.....                                                                                    | 76 |
| Figuur 67: Laurier hydrosol labo 2, boven <i>E. coli</i> , midden <i>S. aureus</i> en onder <i>B. subtilis</i> .....                                    | 77 |
| Figuur 68: Pepermunt hydrosol labo 2, boven <i>E. coli</i> , midden <i>S. aureus</i> en onder <i>B. subtilis</i> .....                                  | 77 |
| Figuur 69: Korenbloem hydrosol labo 2, boven <i>E. coli</i> , midden <i>S. aureus</i> en onder <i>B. subtilis</i> .....                                 | 78 |

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 70: Wilde tijm hydrosol labo 2, boven E. coli, midden S. aureus en onder B. subtilis .....                                                                                                                               | 78 |
| Figuur 71: Methanol extract Kalanchoë, links B. subtilis, midden S. aureus en rechts E. coli, ter vergelijking helemaal links heldere broth .....                                                                               | 78 |
| Figuur 72: Uitgeplaatte resultaten labo 2 100% hydrosolen, links boven pepermunt en laurier, links onder korenbloem en Kalanchoë, rechts boven laurier olie E. coli, rechts onder 100% wilde tijm hydrosol en 50% E. coli ..... | 79 |
| Figuur 73: Uitgeplaatte resultaten labo 2 laurier olie, links boven B. subtilis, rechts boven E. coli (opnieuw), midden onder S. aureus.....                                                                                    | 79 |
| Figuur 74: Vooronderzoek antibiogram labo 2, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis ..                                                                                                                             | 79 |
| Figuur 75: Witte neerslag door toevoeging Tween 80 waarbij nog twee delen te onderscheiden labo 3.....                                                                                                                          | 80 |
| Figuur 76: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, E. coli .....                                                                                                                                                          | 80 |
| Figuur 77: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, E. coli .....                                                                                                                                                            | 80 |
| Figuur 78: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, S. aureus .....                                                                                                                                                        | 80 |
| Figuur 79: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, S. aureus.....                                                                                                                                                           | 80 |
| Figuur 80: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, B. subtilis.....                                                                                                                                                       | 80 |
| Figuur 81: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, B. subtilis .....                                                                                                                                                        | 80 |
| Figuur 82: Laurier hydrosol labo 3, E. coli .....                                                                                                                                                                               | 81 |
| Figuur 83: Laurier hydrosol labo 3, S. aureus.....                                                                                                                                                                              | 81 |
| Figuur 84: Laurier hydrosol labo 3, B. subtilis .....                                                                                                                                                                           | 81 |
| Figuur 85: Wilde tijm hydrosol labo 3, E. coli.....                                                                                                                                                                             | 81 |
| Figuur 86: Wilde tijm hydrosol labo 3, S. aureus .....                                                                                                                                                                          | 81 |
| Figuur 87: Wilde tijm hydrosol labo 3, B. subtilis.....                                                                                                                                                                         | 81 |
| Figuur 88: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, E. coli .....                                                                                                                                                       | 81 |
| Figuur 89: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, E. coli .....                                                                                                                                                         | 81 |
| Figuur 90: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, S. aureus.....                                                                                                                                                      | 81 |
| Figuur 91: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, S. aureus .....                                                                                                                                                       | 81 |
| Figuur 92: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, B. subtilis .....                                                                                                                                                   | 82 |
| Figuur 93: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, B. subtilis .....                                                                                                                                                     | 82 |
| Figuur 94: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 3, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                                                                                               | 82 |
| Figuur 95: Uitgeplaatte resultaten laurier hydrosol labo 3, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                                                                                           | 82 |
| Figuur 96: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 3, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                                                                                        | 82 |
| Figuur 97: Uitgeplaatte resultaten methanol extract Kalanchoë labo 3, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                                                                                 | 82 |
| Figuur 98: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, E. coli.....                                                                                                                                                                      | 83 |
| Figuur 99: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, S. aureus .....                                                                                                                                                                   | 84 |
| Figuur 100: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, B. subtilis.....                                                                                                                                                                 | 85 |
| Figuur 101: Laurier hydrosol labo 4, E. coli .....                                                                                                                                                                              | 85 |
| Figuur 102: Laurier hydrosol labo 4, S. aureus.....                                                                                                                                                                             | 85 |
| Figuur 103: Laurier hydrosol labo 4, B. subtilis .....                                                                                                                                                                          | 86 |
| Figuur 104: Wilde tijm hydrosol labo 4, E. coli.....                                                                                                                                                                            | 86 |
| Figuur 105: Wilde tijm hydrosol labo 4, S. aureus .....                                                                                                                                                                         | 86 |
| Figuur 106: Wilde tijm hydrosol labo 4, B. subtilis.....                                                                                                                                                                        | 86 |
| Figuur 107: Kalanchoë hydrosol labo 4, E. coli.....                                                                                                                                                                             | 86 |
| Figuur 108: Kalanchoë hydrosol labo 4, S. aureus .....                                                                                                                                                                          | 86 |
| Figuur 109: Kalanchoë hydrosol labo 4, B. subtilis.....                                                                                                                                                                         | 86 |
| Figuur 110: Uitgeplaatte resultaten laurier olie, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis.                                                                                                                          | 87 |
| Figuur 111: Uitgeplaatte resultaten laurier hydrosol, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                                                                                                 | 87 |

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 112: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                  | 87 |
| Figuur 113: Uitgeplaatte resultaten Kalanchoë hydrosol, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                   | 87 |
| Figuur 114: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, E. coli.....                                                                                         | 88 |
| Figuur 115: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, S. aureus .....                                                                                      | 89 |
| Figuur 116: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, B. subtilis.....                                                                                     | 89 |
| Figuur 117: Laurier hydrosol labo 5, B. subtilis .....                                                                                              | 90 |
| Figuur 118: Wilde tijm hydrosol labo 5, E. coli.....                                                                                                | 90 |
| Figuur 119: Wilde tijm hydrosol labo 5, B. subtilis (80% - 90%).....                                                                                | 90 |
| Figuur 120: Wilde tijm hydrosol labo 5, B. subtilis (90% - 100%).....                                                                               | 90 |
| Figuur 121: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 5, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                  | 90 |
| Figuur 122: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 5, links S. aureus afgehaald van 6%, midden S. aureus, rechts S. aureus afgehaald van 3%..... | 90 |
| Figuur 123: Antibioogrammen van S. aureus met laurier olie en CN10 labo 5, links van 0%, midden van 3%, rechts van 6%.....                          | 91 |
| Figuur 124: Uitgeplaatte resultaat laurier hydrosol labo 5, B. subtilis .....                                                                       | 91 |
| Figuur 125: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 5, links E. coli, midden en rechts B. subtilis .....                                   | 91 |
| Figuur 126: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 5, links E. coli 60%, midden E. coli, rechts E. coli 70% .....                         | 91 |
| Figuur 127: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, E. coli.....                                                                                         | 92 |
| Figuur 128: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, S. aureus .....                                                                                      | 93 |
| Figuur 129: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, B. subtilis.....                                                                                     | 94 |
| Figuur 130: Wilde tijm hydrosol labo 6, E. coli.....                                                                                                | 94 |
| Figuur 131: Hydrosol voor incubatie, al troebelheid te zien.....                                                                                    | 94 |
| Figuur 132: Pepermunt hydrosol labo 6, E. coli triplo 1.....                                                                                        | 94 |
| Figuur 133: Pepermunt hydrosol labo 6, S. aureus triplo 1 .....                                                                                     | 94 |
| Figuur 134: Pepermunt hydrosol labo 6, B. subtilis triplo 1.....                                                                                    | 94 |
| Figuur 135: Kalanchoë hydrosol labo 6, E. coli triplo 1, 2 en 3 .....                                                                               | 95 |
| Figuur 136: Kalanchoë hydrosol labo 6, S. aureus triplo 1, 2 en 3 .....                                                                             | 95 |
| Figuur 137: Kalanchoë hydrosol labo 6, B. subtilis triplo 1, 2 en 3 .....                                                                           | 95 |
| Figuur 138: Korenbloem hydrosol labo 6, E. coli triplo 1, 2 en 3 .....                                                                              | 95 |
| Figuur 139: Korenbloem hydrosol labo 6, S. aureus triplo 1, 2 en 3.....                                                                             | 95 |
| Figuur 140: Korenbloem hydrosol labo 6, B. subtilis triplo 1, 2 en 3 .....                                                                          | 95 |
| Figuur 141: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 6, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                  | 95 |
| Figuur 142: Uitgeplaatte resultaat wilde tijm hydrosol labo 6, E. coli .....                                                                        | 95 |
| Figuur 143: Uitgeplaatte resultaten triplo 1 pepermunt hydrosol labo 6, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                   | 96 |
| Figuur 144: Uitgeplaatte resultaten triplo's Kalanchoë hydrosol labo 6, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                   | 96 |
| Figuur 145: Uitgeplaatte resultaten triplo's korenbloem hydrosol labo 6, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                  | 96 |
| Figuur 146: Uitgeplaatte bacteriën ter controle reinheid, links E. coli, midden S. aureus, rechts B. subtilis .....                                 | 96 |
| Figuur 147: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, E. coli .....                                                                                     | 97 |
| Figuur 148: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, S. aureus .....                                                                                   | 97 |
| Figuur 149: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, B. subtilis .....                                                                                 | 97 |
| Figuur 150: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, E. coli .....                                                                                  | 97 |
| Figuur 151: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, S. aureus.....                                                                                 | 97 |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figuur 152: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, <i>B. subtilis</i> .....                                                              | 97  |
| Figuur 153: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, <i>E. coli</i> .....                                                                      | 97  |
| Figuur 154: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, <i>S. aureus</i> .....                                                                    | 97  |
| Figuur 155: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, <i>B. subtilis</i> .....                                                                  | 97  |
| Figuur 156: Antibioogrammen triplo 1,2 labo 7, <i>B. subtilis</i> .....                                                                    | 98  |
| Figuur 157: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>E. coli</i> .....                                                                     | 99  |
| Figuur 158: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>S. aureus</i> .....                                                                   | 99  |
| Figuur 159: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>B. subtilis</i> .....                                                                 | 99  |
| Figuur 160: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>E. coli</i> .....                                                                      | 99  |
| Figuur 161: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>S. aureus</i> .....                                                                    | 99  |
| Figuur 162: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, <i>B. subtilis</i> .....                                                                  | 99  |
| Figuur 163: Uitgeplaatte bacteriën ter controle reinheid, links <i>E. coli</i> , midden <i>S. aureus</i> , rechts <i>B. subtilis</i> ..... | 99  |
| Figuur 164: Antibioogrammen triplo 3 labo 7, <i>B. subtilis</i> .....                                                                      | 100 |
| Figuur 165: Uitgeplaatte <i>B. subtilis</i> ter controle reinheid.....                                                                     | 101 |

## Tabellenlijst

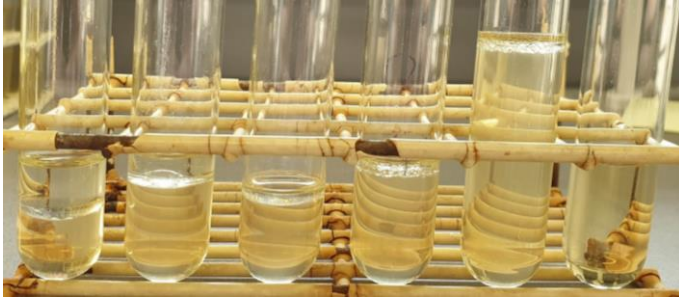
|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) labo 1 .....                                                             | 20 |
| Tabel 2: Vooronderzoek laurier hydrosol labo 1.....                                                                        | 20 |
| Tabel 3: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol labo 1 .....                                                                    | 20 |
| Tabel 4: Vooronderzoek pepermunt hydrosol labo 1 .....                                                                     | 21 |
| Tabel 5: Vooronderzoek korenbloem hydrosol labo 1.....                                                                     | 21 |
| Tabel 6: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë labo 1.....                                                              | 21 |
| Tabel 7: Vooronderzoek antibiogram labo 1.....                                                                             | 22 |
| Tabel 8: Vooronderzoek laurier olie (erlenmeyers) labo 2 .....                                                             | 23 |
| Tabel 9: Laurier hydrosol labo 2.....                                                                                      | 23 |
| Tabel 10: Wilde tijm hydrosol labo 2 .....                                                                                 | 23 |
| Tabel 11: Pepermunt hydrosol labo 2.....                                                                                   | 24 |
| Tabel 12: Korenbloem hydrosol labo 2 .....                                                                                 | 24 |
| Tabel 13: Methanol extract Kalanchoë labo 2 .....                                                                          | 24 |
| Tabel 14: Antibiogram labo 2, inhibitiezone van antibiotica en laurier olie .....                                          | 25 |
| Tabel 15: Vooronderzoek laurier olie Tween 80 labo 3 .....                                                                 | 26 |
| Tabel 16: Laurier hydrosol labo 3.....                                                                                     | 26 |
| Tabel 17: Wilde tijm hydrosol labo 3 .....                                                                                 | 26 |
| Tabel 18: Methanol extract Kalanchoë labo 3 .....                                                                          | 27 |
| Tabel 19: Laurier olie (erlenmeyers) E. coli labo 4.....                                                                   | 28 |
| Tabel 20: Laurier olie (erlenmeyers) S. aureus labo 4.....                                                                 | 28 |
| Tabel 21: Laurier olie (erlenmeyers) B. subtilis labo 4 .....                                                              | 28 |
| Tabel 22: Laurier hydrosol labo 4.....                                                                                     | 28 |
| Tabel 23: Wilde tijm hydrosol labo 4 .....                                                                                 | 29 |
| Tabel 24: Kalanchoë hydrosol labo 4 .....                                                                                  | 29 |
| Tabel 25: Laurier olie (erlenmeyers) E. coli labo 5 .....                                                                  | 30 |
| Tabel 26: Laurier olie (erlenmeyers) S. aureus labo 5.....                                                                 | 30 |
| Tabel 27: Laurier olie (erlenmeyers) B. subtilis labo 5 .....                                                              | 30 |
| Tabel 28: Laurier hydrosol B. subtilis labo 5 .....                                                                        | 30 |
| Tabel 29: Wilde tijm hydrosol E. coli en B. subtilis labo 5.....                                                           | 30 |
| Tabel 30: Antibiogram test resistentie S. aureus op laurier olie labo 5.....                                               | 31 |
| Tabel 31: Laurier olie (erlenmeyers) E. coli labo 6 .....                                                                  | 32 |
| Tabel 32: Laurier olie (erlenmeyers) S. aureus labo 6.....                                                                 | 32 |
| Tabel 33: Laurier olie (erlenmeyers) B. subtilis labo 6, mogelijk triplo 1.....                                            | 32 |
| Tabel 34: Wilde tijm hydrosol E. coli labo 6 .....                                                                         | 32 |
| Tabel 35: Pepermunt hydrosol triplo 1 labo 6 .....                                                                         | 33 |
| Tabel 36: Kalanchoë hydrosol triplo's 1,2 en 3 labo 6 .....                                                                | 33 |
| Tabel 37: Korenbloem hydrosol triplo's 1,2 en 3 labo 6 .....                                                               | 33 |
| Tabel 38: Laurier olie E. coli triplo 1 labo 7 .....                                                                       | 35 |
| Tabel 39: Laurier olie S. aureus triplo 1 labo 7.....                                                                      | 36 |
| Tabel 40: Laurier olie B. subtilis triplo 1 en 2 labo 7 .....                                                              | 36 |
| Tabel 41: Laurier hydrosol triplo 1,2 en 3 labo 7 .....                                                                    | 38 |
| Tabel 42: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2 en 3 labo 7 .....                                                                 | 38 |
| Tabel 43: Kalanchoë hydrosol duplo 1 en 2 labo 7 .....                                                                     | 38 |
| Tabel 44: Antibiogram inhibitiezone antibiotica en laurier olie triplo 1 en 2 E. coli, S. aureus, B. subtilis labo 7 ..... | 41 |
| Tabel 45: Laurier olie E. coli triplo 2 en 3 labo 8.....                                                                   | 43 |
| Tabel 46: Laurier olie S. aureus triplo 2 en 3 plus triplo 1 1% labo 8.....                                                | 44 |
| Tabel 47: Laurier olie B. subtilis triplo 3 labo 8.....                                                                    | 45 |
| Tabel 48: Korenbloem hydrosol duplo 1 en 2 labo 8 .....                                                                    | 45 |
| Tabel 49: Pepermunt hydrosol triplo 2 en 3 labo 8 .....                                                                    | 46 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 50: Antibioqram E. coli en S. aureus triplo 3 labo 8 .....                                             | 48 |
| Tabel 51: Laurier olie toegevoegd aan voordien 24u opgegroeide E. coli, S. aureus en B. subtilis labo 9..... | 49 |
| Tabel 52: Antibioqram triplo 1,2 en 3 B. subtilis labo 9 .....                                               | 50 |

## Bijlagen

### 1. Labo 1

In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 1 te vinden.



*Figuur 41: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) E. coli labo 1, ter vergelijking helemaal rechts heldere broth*



*Figuur 42: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) S. aureus labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*



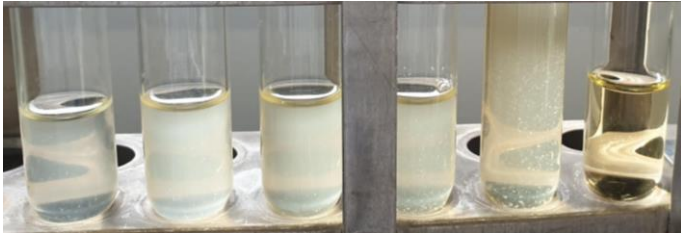
*Figuur 43: Vooronderzoek laurier olie (proefbuizen) B. subtilis labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*



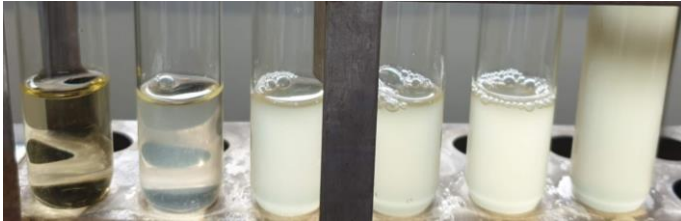
*Figuur 44: Vooronderzoek laurier hydrosol E. coli labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*



*Figuur 45: Vooronderzoek laurier hydrosol S. aureus labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*



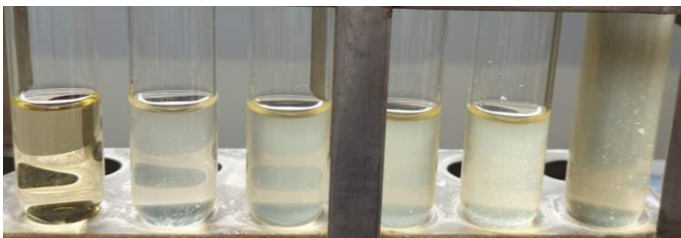
Figuur 46: Vooronderzoek laurier hydrosol *B. subtilis* labo 1, ter vergelijking helemaal rechts heldere broth



Figuur 47: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol *E. coli* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



Figuur 48: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol *S. aureus* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



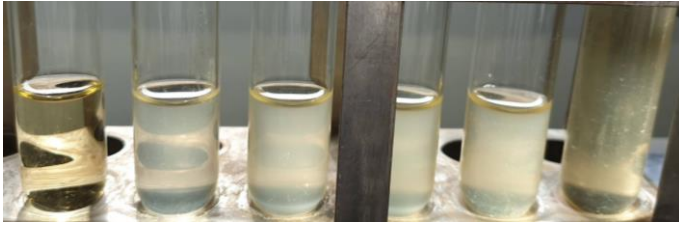
Figuur 49: Vooronderzoek wilde tijm hydrosol *B. subtilis* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



Figuur 50: Vooronderzoek pepermunt hydrosol *E. coli* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



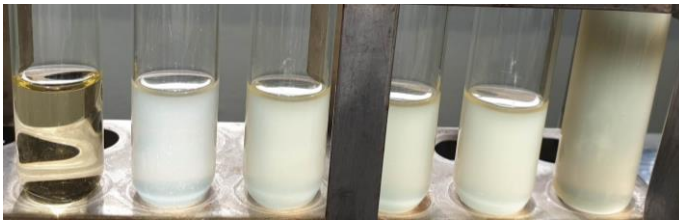
Figuur 51: Vooronderzoek pepermunt hydrosol *S. aureus* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



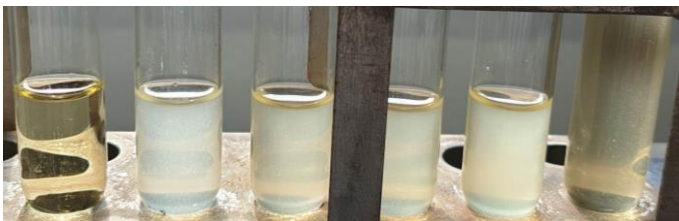
Figuur 52: Vooronderzoek peppermint hydrosol *B. subtilis* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



Figuur 53: Vooronderzoek korenbloem hydrosol *E. coli* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



Figuur 54: Vooronderzoek korenbloem hydrosol *S. aureus* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



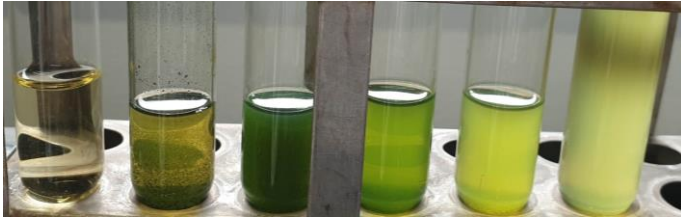
Figuur 55: Vooronderzoek korenbloem hydrosol *B. subtilis* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



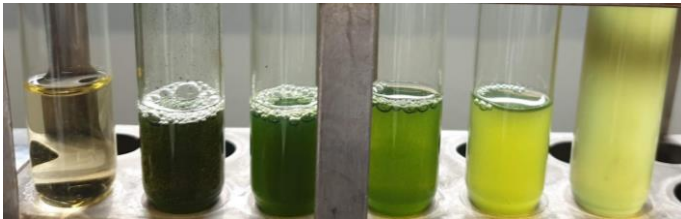
Figuur 56: Vooronderzoek methanol extract *Kalanchoë* voor vortexen *E. coli* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



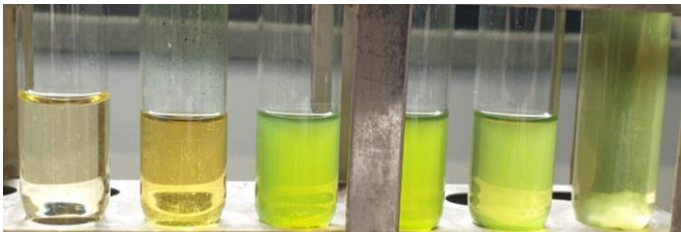
Figuur 57: Vooronderzoek methanol extract *Kalanchoë* na vortexen *E. coli* labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth



*Figuur 58: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë voor vortexen S. aureus labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*



*Figuur 59: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë na vortexen S. aureus labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*

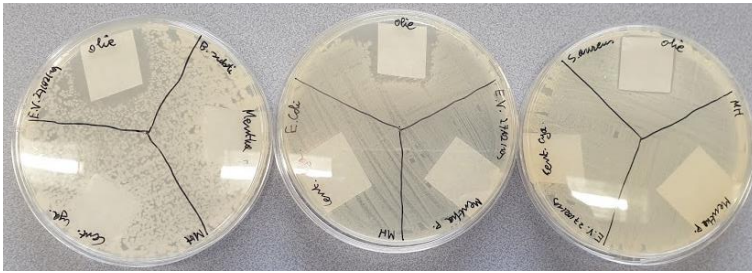


*Figuur 60: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë voor vortexen B. subtilis labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*

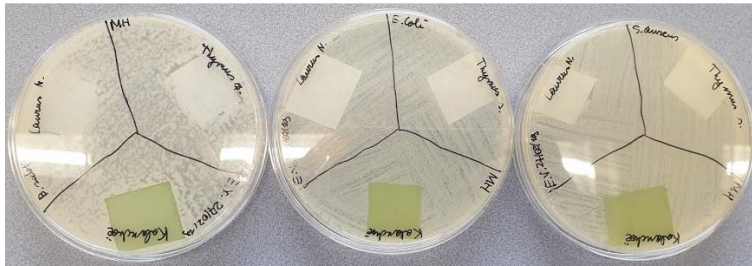


*Figuur 61: Vooronderzoek methanol extract Kalanchoë na vortexen B. subtilis labo 1, ter vergelijking helemaal links heldere broth*

## Antibiogram



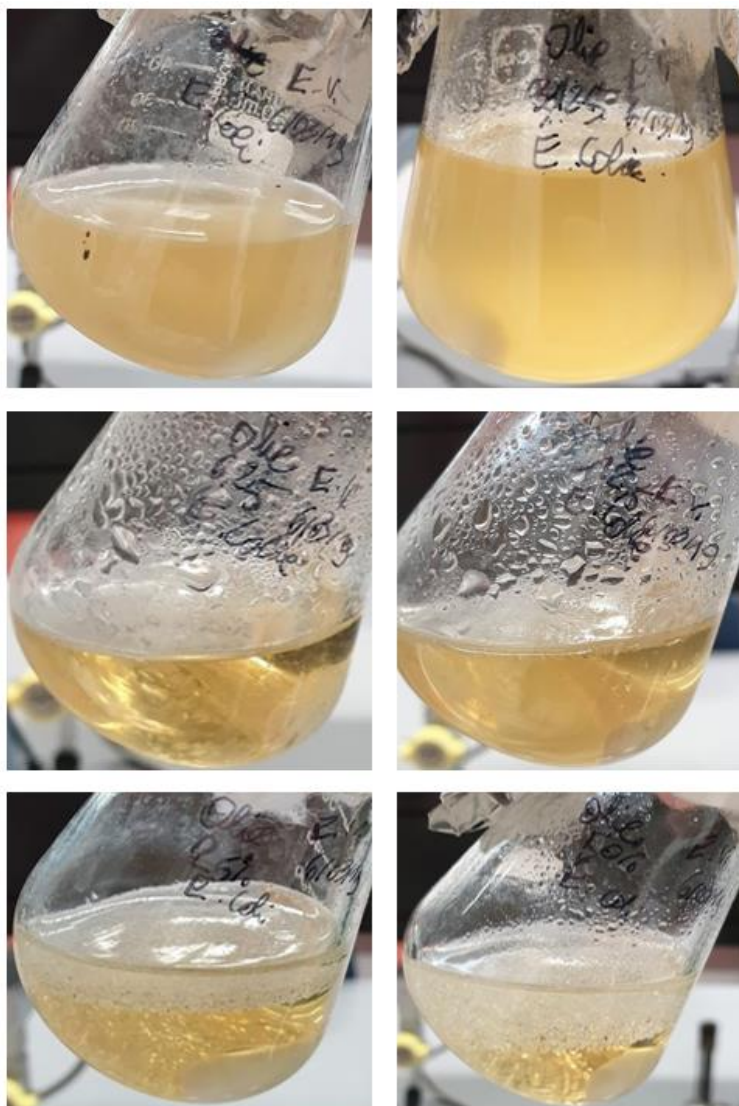
Figuur 62: Vooronderzoek antibiogrammen deel 1; links *B. subtilis*, midden *E. coli* en rechts *S. aureus*



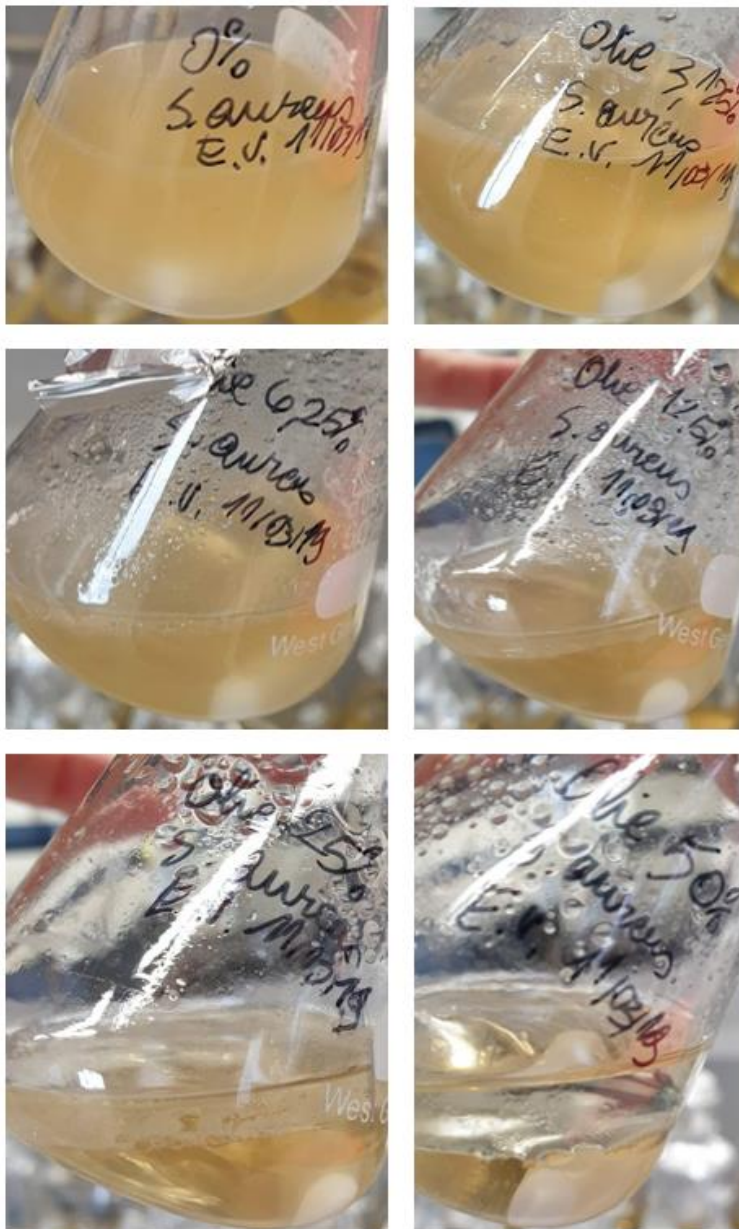
Figuur 63: Vooronderzoek antibiogrammen deel 2; links *B. subtilis*, midden *E. coli* en rechts *S. aureus*

## 2. Labo 2

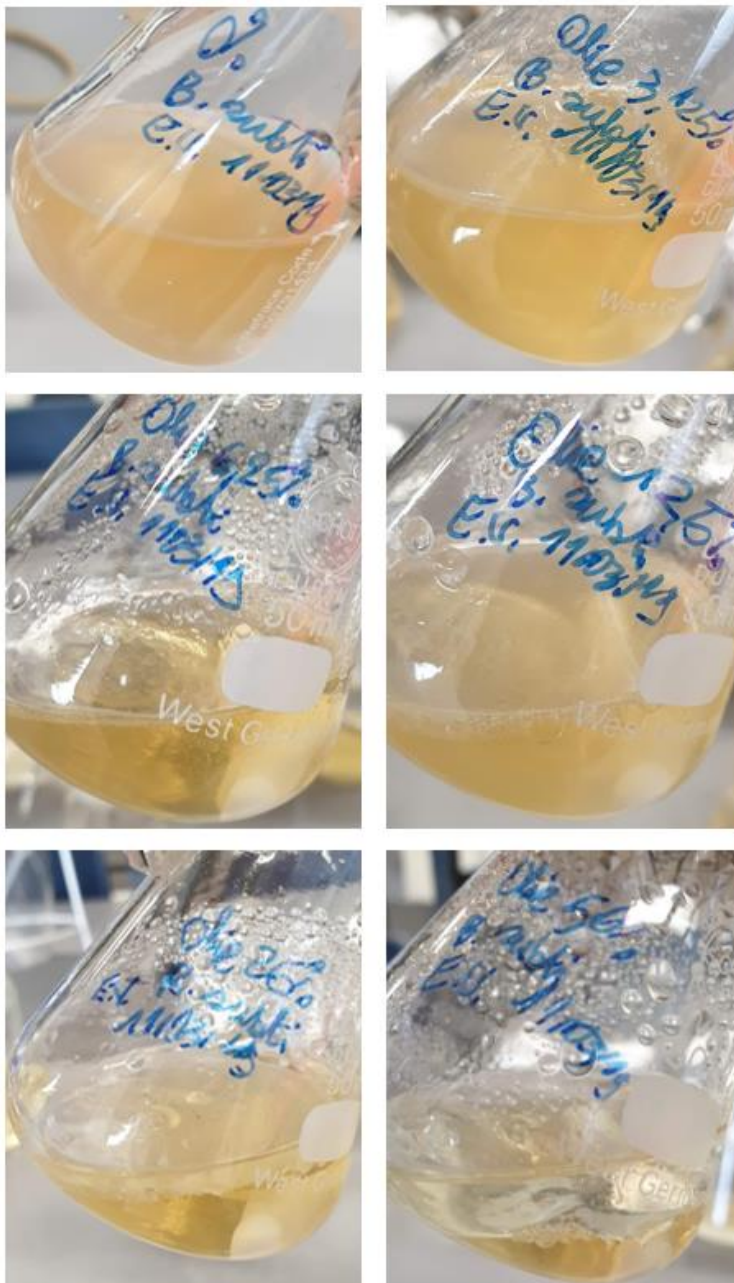
In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 2 te vinden.



Figuur 64: Laurier olie (erlenmeyers) E. coli labo 2



Figuur 65: Laurier olie (erlenmeyers) *S. aureus* labo 2



Figuur 66: Laurier olie (erlenmeyers) *B. subtilis* labo 2



Figuur 67: Laurier hydrosol labo 2, boven *E. coli*, midden *S. aureus* en onder *B. subtilis*



Figuur 68: Pepermunt hydrosol labo 2, boven *E. coli*, midden *S. aureus* en onder *B. subtilis*



Figuur 69: Korenbloem hydrosol labo 2, boven *E. coli*, midden *S. aureus* en onder *B. subtilis*

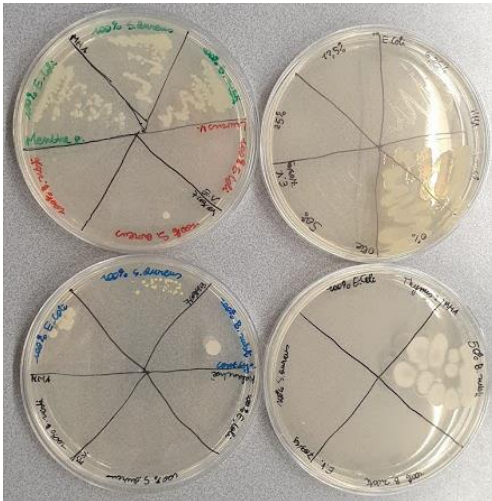


Figuur 70: Wilde tijm hydrosol labo 2, boven *E. coli*, midden *S. aureus* en onder *B. subtilis*

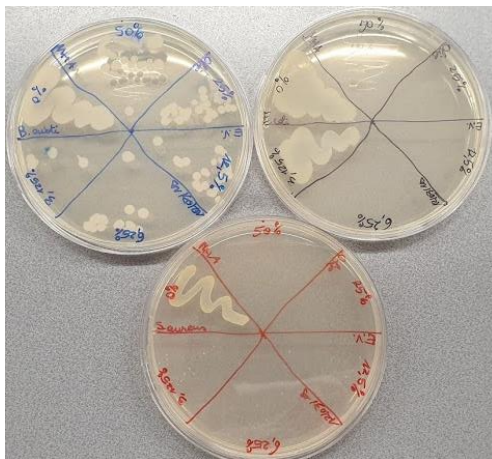


Figuur 71: Methanol extract *Kalanchoë*, links *B. subtilis*, midden *S. aureus* en rechts *E. coli*, ter vergelijking helemaal links heldere broth

## Uitgeplaatte resultaten

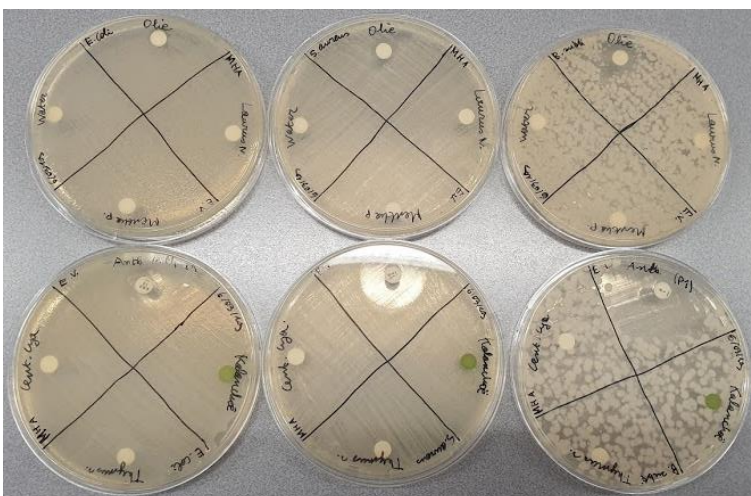


Figuur 72: Uitgeplaatte resultaten labo 2 100% hydrosolen, links boven peppermint en laurier, links onder korenbloem en Kalanchoë, rechts boven laurier olie E. coli, rechts onder 100% wilde tijm hydrosol en 50% E. coli



Figuur 73: Uitgeplaatte resultaten labo 2 laurier olie, links boven *B. subtilis*, rechts boven *E. coli* (opnieuw), midden onder *S. aureus*

## Antibiogram



Figuur 74: Vooronderzoek antibiogram labo 2, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*

### 3. Labo 3

In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 3 te vinden.



*Figuur 75: Witte neerslag door toevoeging Tween 80 waarbij nog twee delen te onderscheiden labo 3*



*Figuur 76: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, E. coli*



*Figuur 77: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, E. coli*



*Figuur 78: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, S. aureus*



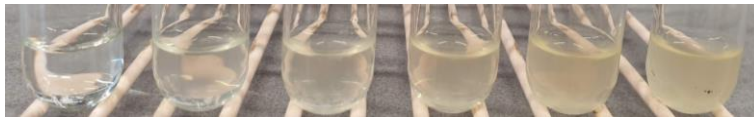
*Figuur 79: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, S. aureus*



*Figuur 80: Laurier olie labo 3 (Tween 80) voor vortexen, B. subtilis*



*Figuur 81: Laurier olie labo 3 (Tween 80) na vortexen, B. subtilis*



Figuur 82: Laurier hydrosol labo 3, *E. coli*



Figuur 83: Laurier hydrosol labo 3, *S. aureus*



Figuur 84: Laurier hydrosol labo 3, *B. subtilis*



Figuur 85: Wilde tijm hydrosol labo 3, *E. coli*



Figuur 86: Wilde tijm hydrosol labo 3, *S. aureus*



Figuur 87: Wilde tijm hydrosol labo 3, *B. subtilis*



Figuur 88: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, *E. coli*



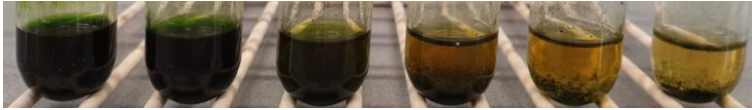
Figuur 89: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, *E. coli*



Figuur 90: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, *S. aureus*



Figuur 91: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, *S. aureus*

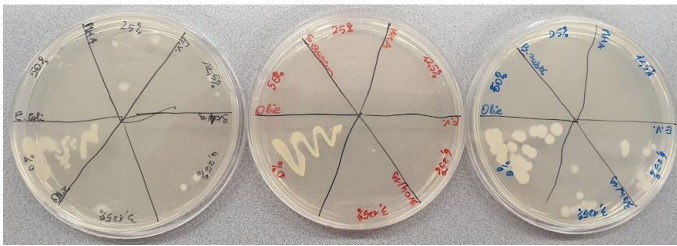


Figuur 92: Methanol extract Kalanchoë labo 3 voor vortexen, *B. subtilis*



Figuur 93: Methanol extract Kalanchoë labo 3 na vortexen, *B. subtilis*

### Uitgeplaatte resultaten



Figuur 94: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 3, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 95: Uitgeplaatte resultaten laurier hydrosol labo 3, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 96: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 3, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



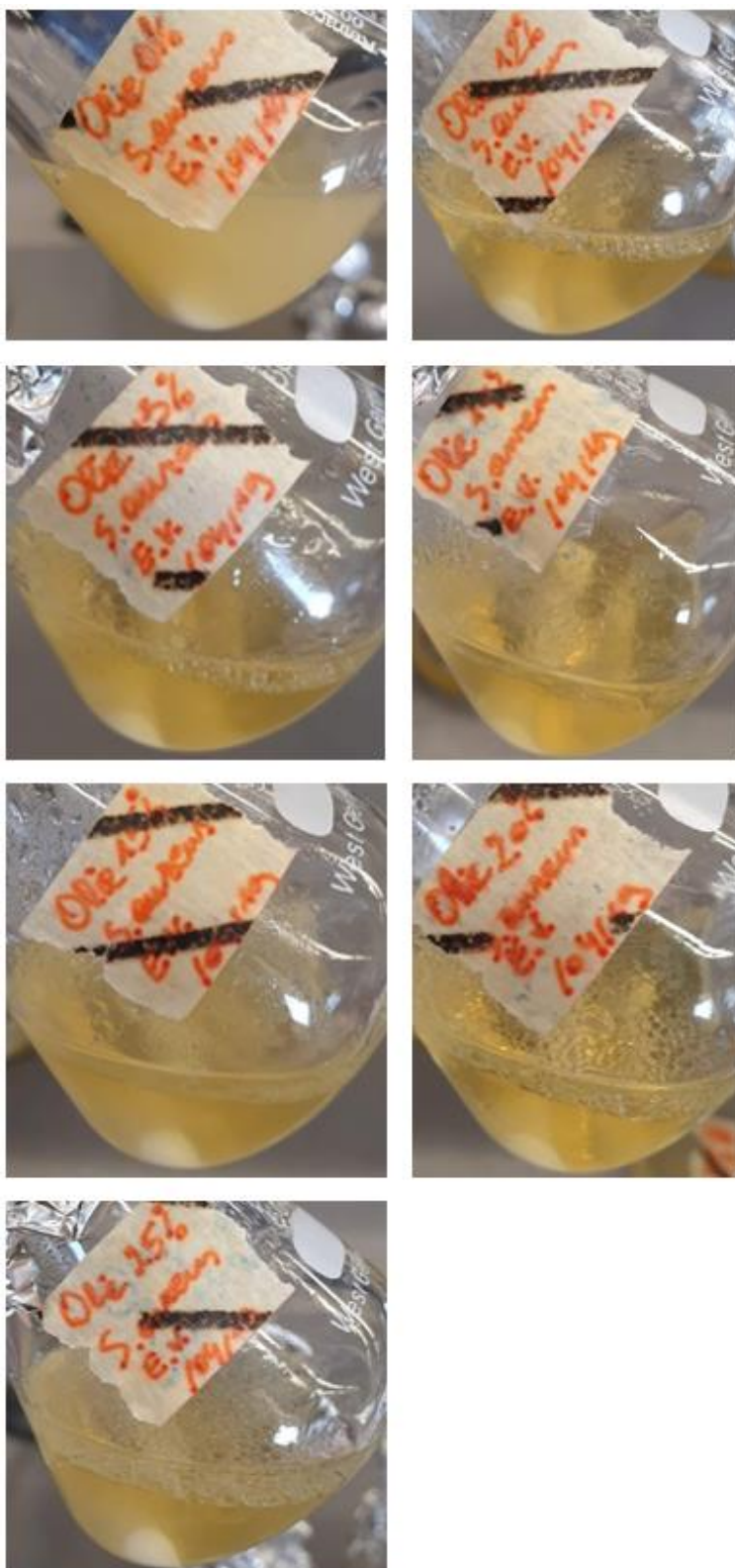
Figuur 97: Uitgeplaatte resultaten methanol extract Kalanchoë labo 3, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*

## 4. Labo 4

In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 4 te vinden.



Figuur 98: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, E. coli



Figuur 99: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, *S. aureus*



Figuur 100: Laurier olie (erlenmeyers) labo 4, *B. subtilis*



Figuur 101: Laurier hydrosol labo 4, *E. coli*



Figuur 102: Laurier hydrosol labo 4, *S. aureus*



*Figuur 103: Laurier hydrosol labo 4, B. subtilis*



*Figuur 104: Wilde tijm hydrosol labo 4, E. coli*



*Figuur 105: Wilde tijm hydrosol labo 4, S. aureus*



*Figuur 106: Wilde tijm hydrosol labo 4, B. subtilis*



*Figuur 107: Kalanchoë hydrosol labo 4, E. coli*

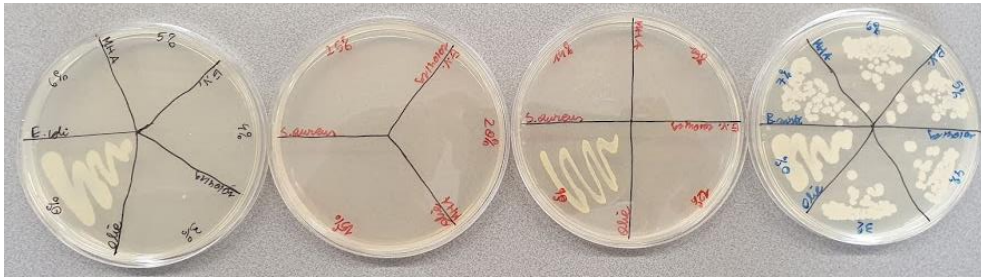


*Figuur 108: Kalanchoë hydrosol labo 4, S. aureus*



*Figuur 109: Kalanchoë hydrosol labo 4, B. subtilis*

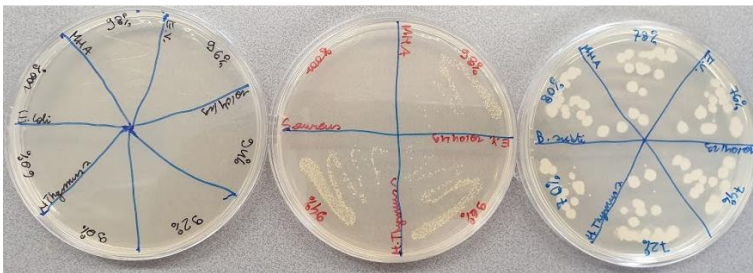
## Uitgeplaatte resultaten



Figuur 110: Uitgeplaatte resultaten laurier olie, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 111: Uitgeplaatte resultaten laurier hydrosol, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



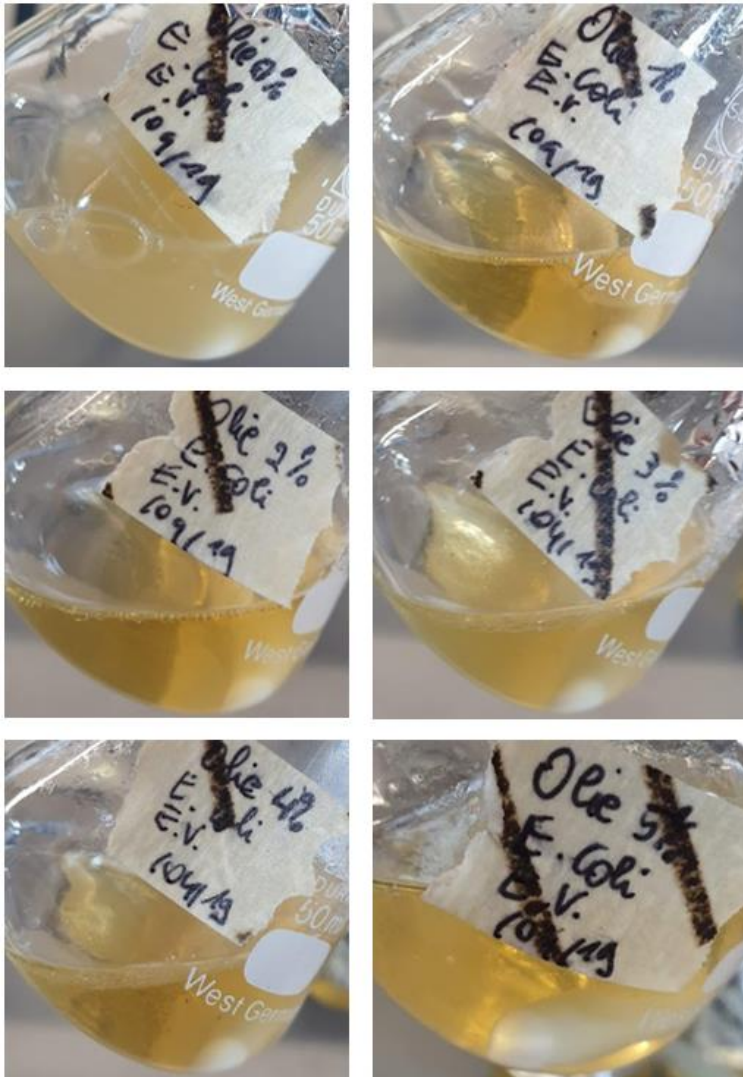
Figuur 112: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 113: Uitgeplaatte resultaten Kalanchoë hydrosol, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*

## 5. Labo 5

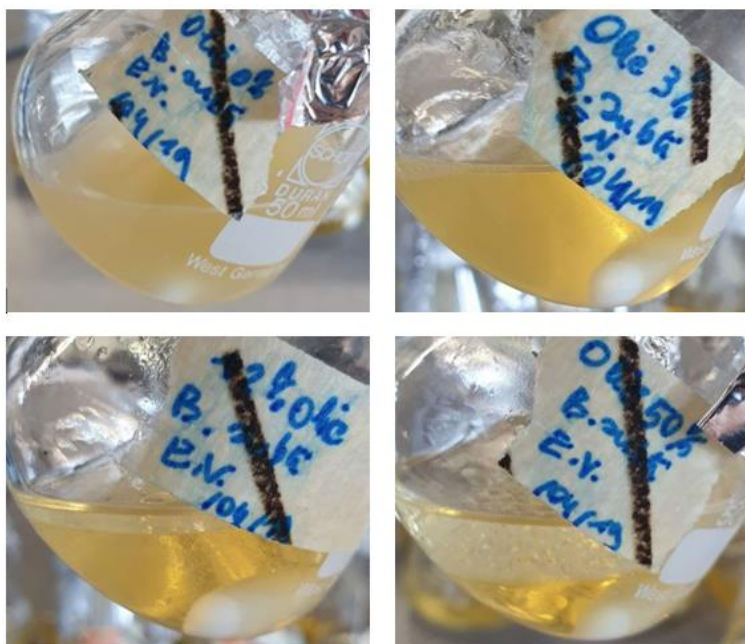
In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 5 te vinden.



Figuur 114: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, E. coli



Figuur 115: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, *S. aureus*



Figuur 116: Laurier olie (erlenmeyers) labo 5, *B. subtilis*



Figuur 117: Laurier hydrosol labo 5, *B. subtilis*



Figuur 118: Wilde tijm hydrosol labo 5, *E. coli*



Figuur 119: Wilde tijm hydrosol labo 5, *B. subtilis* (80% - 90%)



Figuur 120: Wilde tijm hydrosol labo 5, *B. subtilis* (90% - 100%)

### Uitgeplaatte resultaten



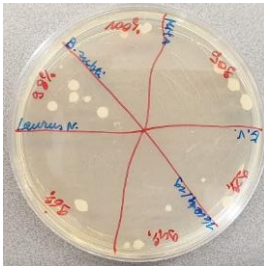
Figuur 121: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 5, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



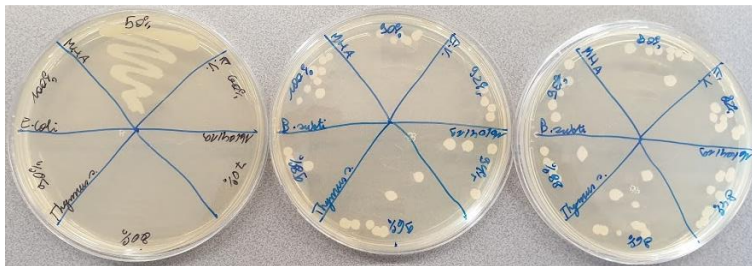
Figuur 122: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 5, links *S. aureus* afgehaald van 6%, midden *S. aureus*, rechts *S. aureus* afgehaald van 3%



Figuur 123: Antibiogrammen van *S. aureus* met laurier olie en CN10 labo 5, links van 0%, midden van 3%, rechts van 6%



Figuur 124: Uitgeplaatte resultaat laurier hydrosol labo 5, *B. subtilis*



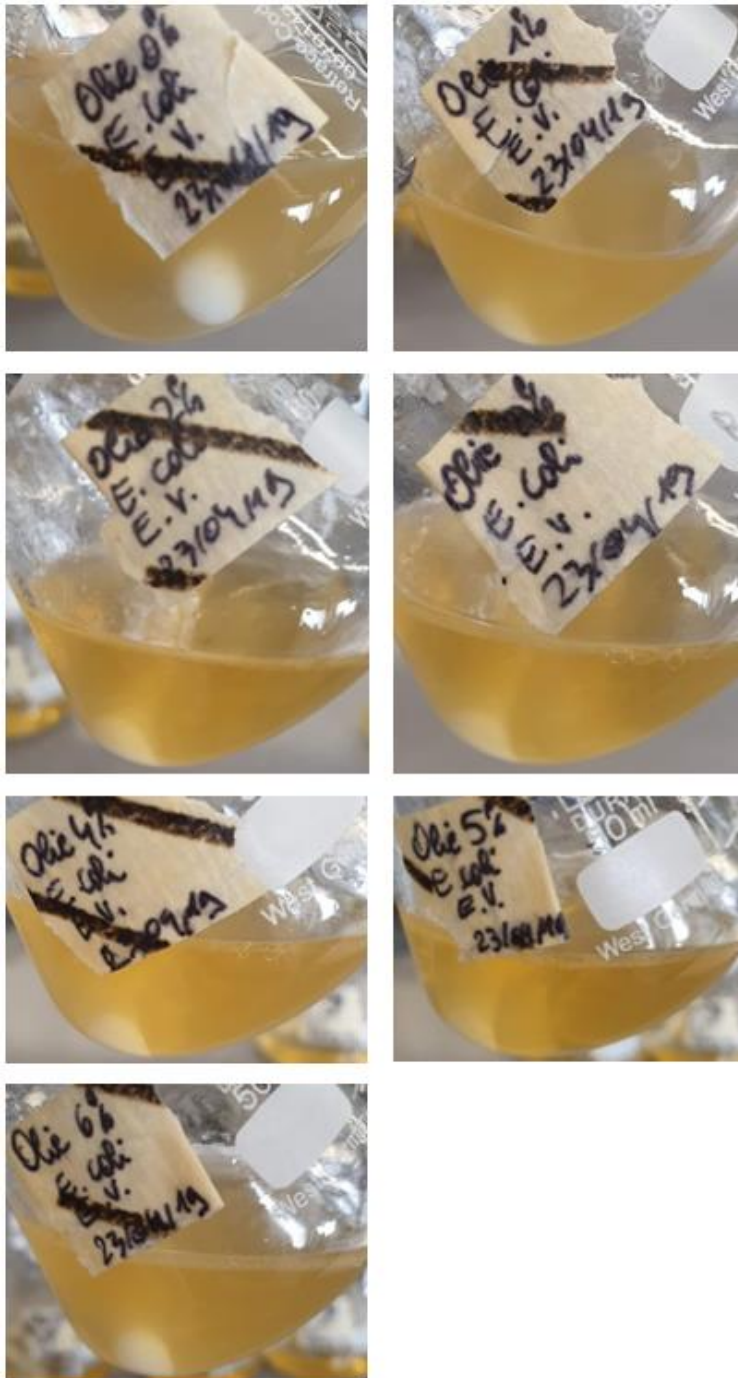
Figuur 125: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 5, links *E. coli*, midden en rechts *B. subtilis*



Figuur 126: Uitgeplaatte resultaten wilde tijm hydrosol labo 5, links *E. coli* 60%, midden *E. coli*, rechts *E. coli* 70%

## 6. Labo 6

In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van labo 6 te vinden.



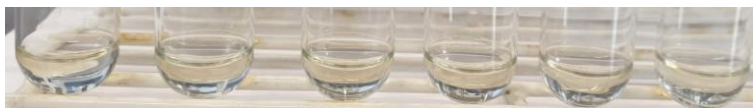
Figuur 127: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, *E. coli*



Figuur 128: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, *S. aureus*



Figuur 129: Laurier olie (erlenmeyers) labo 6, *B. subtilis*



Figuur 130: Wilde tijm hydrosol labo 6, *E. coli*



Figuur 131: Hydrosol voor incubatie, al troebelheid te zien



Figuur 132: Pepermunt hydrosol labo 6, *E. coli triplio 1*



Figuur 133: Pepermunt hydrosol labo 6, *S. aureus triplio 1*



Figuur 134: Pepermunt hydrosol labo 6, *B. subtilis triplio 1*



Figuur 135: Kalanchoë hydrosol labo 6, *E. coli* triplo 1, 2 en 3



Figuur 136: Kalanchoë hydrosol labo 6, *S. aureus* triplo 1, 2 en 3



Figuur 137: Kalanchoë hydrosol labo 6, *B. subtilis* triplo 1, 2 en 3



Figuur 138: Korenbloem hydrosol labo 6, *E. coli* triplo 1, 2 en 3

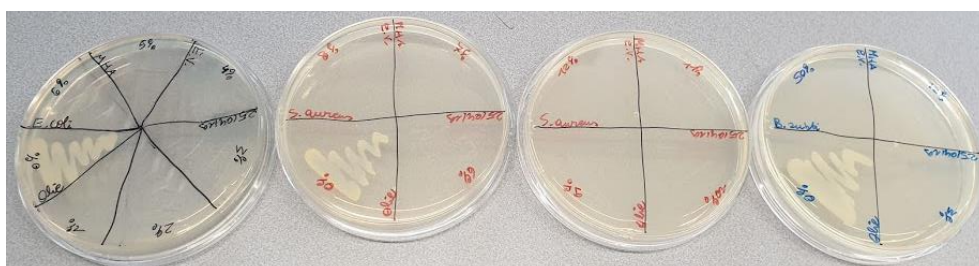


Figuur 139: Korenbloem hydrosol labo 6, *S. aureus* triplo 1, 2 en 3

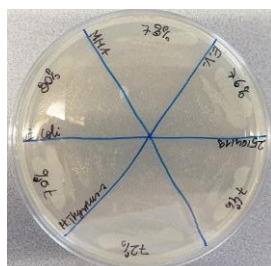


Figuur 140: Korenbloem hydrosol labo 6, *B. subtilis* triplo 1, 2 en 3

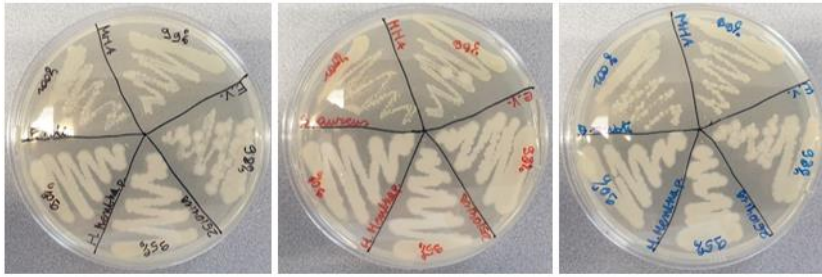
### Uitgeplaatte resultaten



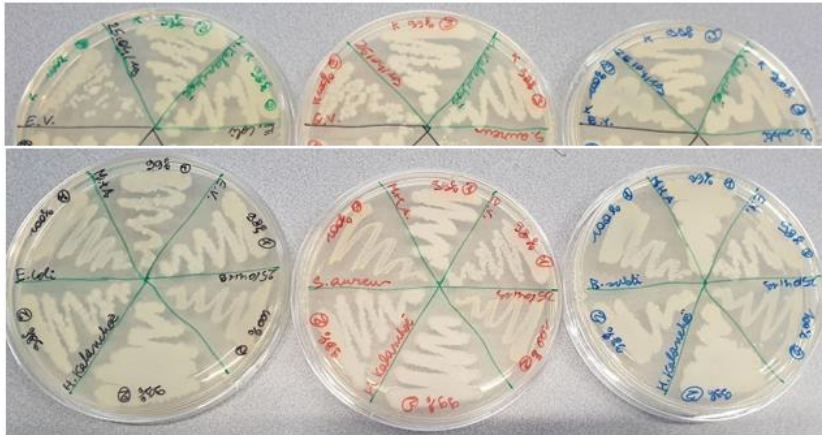
Figuur 141: Uitgeplaatte resultaten laurier olie labo 6, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



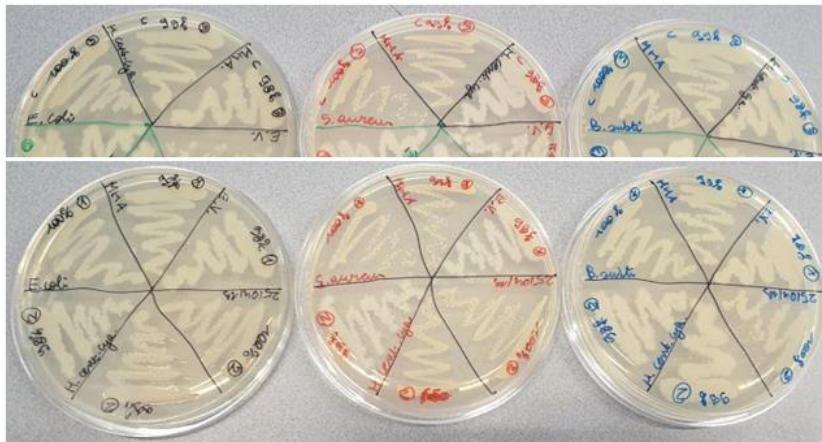
Figuur 142: Uitgeplaatte resultaat wilde tijm hydrosol labo 6, *E. coli*



Figuur 143: Uitgeplaatte resultaten triplo 1 pepermint hydrosol labo 6, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 144: Uitgeplaatte resultaten triplo's Kalanchoë hydrosol labo 6, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 145: Uitgeplaatte resultaten triplo's korenbloem hydrosol labo 6, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*



Figuur 146: Uitgeplaatte bacteriën ter controle reinheid, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*

## 7. Labo 7

In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van de hydrosolen in de proefbuizen en het antibiogram van *B. subtilis* van labo 7 te vinden.



Figuur 147: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *E. coli*



Figuur 148: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *S. aureus*



Figuur 149: Laurier hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *B. subtilis*



Figuur 150: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *E. coli*



Figuur 151: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *S. aureus*



Figuur 152: Wilde tijm hydrosol triplo 1,2,3 labo 7, *B. subtilis*



Figuur 153: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, *E. coli*

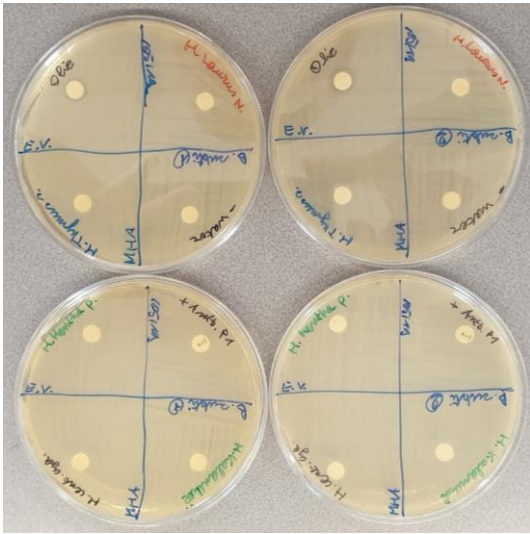


Figuur 154: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, *S. aureus*



Figuur 155: Kalanchoë hydrosol dublo 1,2 labo 7, *B. subtilis*

## Antibiogram



Figuur 156: Antibiogrammen triplo 1,2 labo 7, *B. subtilis*

## 8. Labo 8

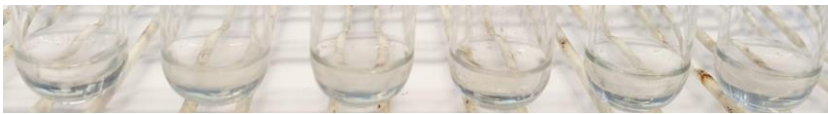
In deze bijlage zijn alle fotoresultaten van de hydrosolen in proefbuizen, de uitgeplaatte bacteriën ter controle op reinheid en het antibiogram van *B. subtilis* van labo 8 te vinden.



Figuur 157: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, *E. coli*



Figuur 158: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, *S. aureus*



Figuur 159: Korenbloem hydrosol dublo 1,2 labo 8, *B. subtilis*



Figuur 160: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, *E. coli*



Figuur 161: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, *S. aureus*



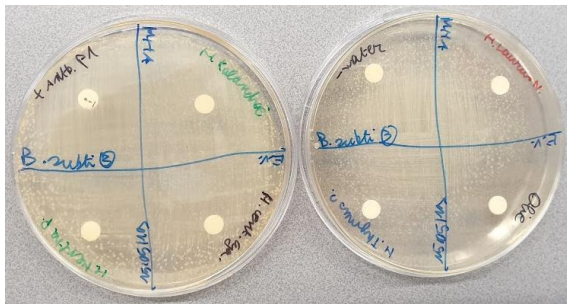
Figuur 162: Pepermunt hydrosol dublo 1,2 labo 8, *B. subtilis*

### Uitgeplaatte resultaten



Figuur 163: Uitgeplaatte bacteriën ter controle reinheid, links *E. coli*, midden *S. aureus*, rechts *B. subtilis*

## Antibiogram



Figuur 164: Antibiogrammen triplo 3 labo 7, *B. subtilis*

## 9. Labo 9

In deze bijlage is het fotoresultaat van de uitgeplaatte *B. subtilis* ter controle op reinheid van labo 9 te vinden.



*Figuur 165: Uitgeplaatte B. subtilis ter controle reinheid*



