



Univerza v Ljubljani
Zdravstvena fakulteta



ANTIMIKROBNO DELOVANJE IZOLATOV NARAVNIH UČINKOVIN VRTNEGA OGNJIČA *(CALENDULA OFFICINALIS)* IN NJIHOV POTENCIJAL PRI ZAVIRANJU TVORBE BIOFILMA BAKTERIJ *ESCHERICHIA COLI*

RAZISKOVALNO DELO
PODROČJE: BIOLOGIJA

Mentor:

strok. sod. Marko Jeran; Inštitut »Jožef Štefan«, Ljubljana

Somentorici:

doc. dr. Martina Oder; Univerza v Ljubljani,
Zdravstvena fakulteta

Lidija Gnidovec, prof.;
Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

Avtorja:

Luka Bonin in Jan Hafner Korošec,
dijaka 4. letnika tehniške gimnazije

Ljubljana, 2023

Mlada raziskovalca, **Luka BONIN in Jan HAFNER KOROŠEC**, izjavljava, da sva avtorja raziskovalnega dela, ki je nastalo pod **mentorstvom** strok. sod. **Marka JERANA** iz Instituta »Jožef Stefan«, Ljubljana in **so-mentorstvom** doc. dr. **Martine ODER** iz Univerze v Ljubljani, Zdravstvene fakultete ter **Lidije GNIDOVEC** iz Biotehniškega izobraževalnega centra, Ljubljani.

Literurni viri so ustrezno označeni in citirani ter so last avtorjev.

Avtorja raziskovalnega dela:

Luka BONIN, mladi raziskovalec

Jan HAFNER KOROŠEC, mladi raziskovalec

Mentor:

strok. sod. Marko JERAN, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

So-mentorici:

doc. dr. Martina ODER, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta

Lidija GNIDOVEC, prof., Biotehniški izobraževalni center, Ljubljana

Kazalo

Zahvala	6
Povzetek	7
Abstract	8
1 Teoretični del.....	9
1.1 Vrtni ognjič (<i>Calendula officinalis</i>)	9
1.1.1 Zdravilni učinki vrtnega ognjiča.....	9
1.1.2 Kemijski pogled na učinkovine vrtnega ognjiča	10
1.2 Fenolne spojine.....	12
1.2.1 Vpliv fenolnih spojin na nastanek biofilma.....	13
1.2.2 Fenolne spojine vrtnega ognjiča	14
1.3 Spektrofotometrija	14
1.4 <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.1 Zgradba <i>E. coli</i> in njen metabolizem	16
1.4.2 Mehanizem razmnoževanja	17
1.4.3 <i>E. coli</i> in človek	18
1.4.4 Odpornost na antibiotike.....	20
1.5 <i>E. coli</i> v živilski industriji	21
1.5.1 Nastanek biofilma	21
1.6 Metode izolacije naravnih učinkovin iz rastlinskih virov.....	23
1.6.1 Superkritična tekočinska ekstrakcija	23
1.6.2 Vodno etanolna ekstrakcija	24
2 Eksperimentalni del.....	26
2.1 Cilji in problem raziskovalnega dela	26
2.2 Hipotezi	27
2.3 Metode dela.....	28
2.3.1 Uvod v metode dela.....	28
2.3.2 Reagenti in raztopine.....	29
2.3.3 Aparature.....	30
2.3.4 Izolati rastlinskega materiala.....	30
2.3.5 Kvantitativno določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin	30
2.3.6 Vpliva izolatov vrtnega ognjiča na tvorbo biofilma bakterije <i>E. coli</i>	31
2.3.7 Difuzija naravnih učinkovin izolatov vrtnega ognjiča na trdo gojišče	32

2.3.8	Mikroskopiranje	33
3	Rezultati	34
3.1	Rezultati kvantitativnih določanj skupnih fenolnih spojin	34
3.2	Rezultati vpliva izolatov vrtnegog ognjiča na tvorbo biofilma bakterije <i>E. coli</i>	35
3.3	Rezultati mikroskopiranj pri proučevanju vpliva izolatov vrtnegog ognjiča na tvorbo biofilma bakterije <i>E. coli</i>	36
3.4	Rezultati difuzije naravnih učinkovin izolatov vrtnegog ognjiča na trdo gojišče	38
4	Razprava.....	40
5	Sklep	43
6	Viri	44

Kazalo slik

Slika 1: Vrtni ognjič (<i>Calendula officinalis</i>) (Endemic Herbs From Mount Athos Help Cure Illnesses, 2010)	11
Slika 2: Delitev fenolnih spojin (Ali Redha, 2021)	13
Slika 3: Struktura kvercetina	14
Slika 4: (a), (b) Spektrofotometer Nanodrop One C, (c) čitalec mikrotitrskih plošč Infinite 200 Pro in (d) shematski princip delovanja UV-Vis spektrofotometra (Tom, 2023)	15
Slika 5: <i>E. coli</i> pod presevnim elektronskim mikroskopom (Ziuzina idr., 2015)	16
Slika 6: Binarna fizija bakterije <i>E. coli</i> (Madigan idr., 2010)	18
Slika 7: Delež populacije <i>E. coli</i> , odporen na testiran antibiotik. Povzeto po (Kazemnia idr., 2014)	20
Slika 8: Prikaz nastanka biofilma bakterije <i>E. coli</i> (Zhou idr., 2022)	22
Slika 9: Delovni prostor pri pripravi mikrobioloških aplikacij	28
Slika 10: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin izolatov naravnih učinkovin	31
Slika 11: Mikrotiterske plošče z biofilmom in nanosom: (a) vodno-etanolnega izvlečka, (b) ekstrakta s sc-CO ₂ in (c) nanosom barvila kristal vijolično po predhodnem spiranju s pufrom PBS in dodajanjem barvila kristal vijolično	32
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v izolatih rastlin v analiziranih vzorcih	34
Slika 13: Rezultati določanja vpliva naravnih izolatov učinkovin vrtnega ognjiča na biofilm bakterije <i>E. coli</i>	35
Slika 14: Spremljanje vpliva delovanja učinkovin »surovega« vodno-etanolnega izvlečka na biofilm <i>E. coli</i> . Bakterijski biofilm, tretiran: (a) s 50 vol. % izvlečka, (b) s 75 vol. % izvlečka, (c) s koncentratom izvlečka in (d) z 10 % vodikovim peroksidom	36
Slika 15: Spremljanje vpliva delovanja učinkovin vodno-etanolnega izvlečka na biofilm <i>E. coli</i> . Bakterijski biofilm, tretiran: (a) s 50 vol. % izvlečka, (b) s 75 vol. % izvlečka, (c) s koncentratom izvlečka in (d) z 10 % vodikovim peroksidom	37
Slika 16: Difuzija izolatov vrtnega ognjiča na trdo gojišče z bakterijo <i>E. coli</i> . (a) »Surov« vodno-etanolni pripravek z nanosom raztopin 50, 70 vol. % in koncentrata. (b) »Surov« vodno-etanolni pripravek in (c) ekstrakt s sc-CO ₂ z nanosom raztopin s koncentracijami 150, 300 in 450 mg/mL. Kjer (1) prikazuje nanos najnižje koncentracije, (2) srednje vsebnosti in (3) najvišjo testirano koncentracijo. (4) Prikuje nanos pozitivne kontrole, t.j. 10 % raztopine vodikovega peroksidu, (5) fiziološka raztopina kot negativna kontrola in (6) celulozni disk s standardnim antibiotikom Bacitracin (10 µg/mL)	38

Kazalo tabel

Tabela 1: Vzorci, v raziskovalnem delu, uporabljenih izolatov rastlinskega materiala	30
Tabela 2: Premer inhibicijskih con pri difuziji izolatov vrtnega ognjiča na bakterijo <i>E. coli</i>	39

Zahvala

Zahvaljujeva se mentorju, strokovnemu sodelavcu **Marku Jeranu** iz Inštituta »Jožef Stefan«, za vso strokovno pomoč, gradivo, čas in namenjeno potrpežljivost. Zahvaljujeva se vam, da ste nama omogočili priložnost opravljanja raziskovalnega dela izven šole, kot tudi da ste naju pospremili in pomagali pri najini prvi raziskovalni nalogi, kjer sva pridobila veliko izkušenj ter se podrobno spoznala s procesom izdelave projekta in reševanja zapletov, ki so se pojavili na poti. Hvala za vaš nalezljiv entuziazem, s katerim ste naju prijetno uvedli v svet znanosti.

Hvaležna sva tudi doc. dr. **Martini Oder** iz Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani, za izjemno sodelovanje, s katerim ste nama omogočili izvajanje mikrobiološkega dela. Zahvaljujeva se vam za ves posvečen trud in čas ter prijazen sprejem v laboratorij.

Draga mentorja, še enkrat iz srca hvala za prijetno izkušnjo in za vse znanje, ki sva ga pridobila.

Hvala izr. prof. dr. **Roku Finku** iz Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani za pomoč pri mikroskopiranju in nastalim izvrstnim fotografijam, s katerimi smo potrjevali hipoteze.

Zahvaljujeva se mag. **Tinetu Oblaku** iz Instituta »Jožef Stefan«, za pomoč pri pripravi vzorcev in predane dragocene informacije o zdravilnih rastlinah.

Hvala tudi prof. dr. **Veroniki Kralj-Iglič** iz Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani, za omogočanje uporabe aparature nanodrop, ki je bil nepogrešljiv pripomoček pri našem delu.

Zahvaljujeva se tudi gospe **Lidiji Gnidovec** za odprtost in razumevanje.

Še enkrat hvala vsem, ki so nama na kakršen koli način pomagali pri delu. Predvsem hvala *Odseku za anorgansko kemijo in tehnologijo Instituta »Jožef Stefan«* in *Oddelku za sanitarno inženirstvo Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani*, za prijazen sprejem in omogočeno uporabo vrhunske opreme in profesionalnih laboratorijskih.

Na vse zadnje hvala najinima družinama, ki sta naju motivirali in, ne glede na leta, pustila, da sva šla svojo pot.

I grow plants for many reasons: to please my eye or to please my soul, to challenge the elements or to challenge my patience, for novelty or for nostalgia, but mostly for the joy in seeing them grow.
— David Hobson

Povzetek

Raziskovalno delo preučuje antimikrobnlo delovanje izolatov vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) in njegov potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*). Bakterija poleg tega, da lahko povzroči okužbe pri ljudeh, predstavlja tudi indikator fekalnega onesnaženja, zato lahko predstavlja velika tveganja v živilskih obratih. Zaradi njene vsesplošne pojavnosti se je tako povečalo raziskovanje uporabe naravnih in t.i. »zelenih« učinkovin, ki bi potencialno nadomestila protibakterijske učinkovine kemijskega izvora.

Ob pomoči reagenta Folin-Ciocalteu je bila, v vodno-etanolnem izvlečku in ekstraktu s superkritičnim ogljikovim dioksidom, kvantitativno določena vsebnost skupnih fenolnih spojin. Zaradi polarnosti aktivnih učinkovin, v primerjavi z ekstrakti s superkritičnim ogljikovim dioksidom, so vodno-etanolni izvlečki vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolov. Ker fenolne spojine omejijo in ošibijo interakcijo med bakterijami in površino, lahko njihova povečana koncentracija inhibira rast biofilma bakterije *E. coli*. Na primeru vodno-etanolnega koncentrata, z visoko vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, je bilo z analizo pod mikroskopom in merjenjem optične gostote, na celice vezanega barvila kristal vijolično, opaženo delovanje tovrstnih učinkovin. Razgradnja biofilma je bila, glede na kontrolo, kar 42 %. Tudi ekstrakt s superkritičnim ogljikovim dioksidom je pokazal delovanje lipofilnih učinkovin z naraščajočo koncentracijo. Metoda difuzije učinkovin vodno-etanolnega koncentrata na trdo gojišče modelne kulture tako še dodatno potrjuje tudi njihovo antimikrobnlo delovanje in prisotnost aktivnih učinkovin.

Rezultati raziskave vodno-etanolnega pripravka navadnega ognjiča so tako razkrili potencialni primer prenosa znanja na področju dezinfekcije površin, kontaminiranih z bakterijo *E. coli*. Ciljno v različnih obratih živilske industrije in drugih higienско občutljivih področij.

Ključne besede: Vrtni ognjič, *Calendula officinalis*, *Escherichia coli*, vodno-etanolni ekstrakti, ekstrakcija s superkritičnim ogljikovim dioksidom, biofilm, inhibicijska cona, skupne fenolne spojine

Abstract

This research investigates the antimicrobial activity of Pot marigold (*Calendula officinalis*) isolates and its potential at inhibiting *Escherichia coli* (*E. coli*) biofilm formation. In addition to infections, the bacterium is also an indicator of faecal contamination and therefore poses a significant risk in the food industry. Its widespread appearance has sparked and led to increased research into the use of so-called “green” active substances, potentially replacing antibacterial agents of chemical origin.

The content of total phenolic compounds was quantified with the help of Folin-Ciocalteu reagent in aqueous-ethanol and supercritical carbon dioxide extracts. Due to the polarity of the active substances, the aqueous-ethanol extracts contained a higher content of the active substances in contrast to their supercritical carbon dioxide counterparts. As phenolic compounds limit and weaken the interaction between bacteria and the surface, their increased concentration may inhibit the growth of *E. coli* biofilm. In the case of aqueous-ethanol extract, bearing higher total phenols levels the activity of such substances was observed by analysis under a microscope and by measuring the optical density of the cell-bound crystal violet. The decomposition of biofilm growth was high as 42 % compared to control. The supercritical carbon dioxide extract has also shown lipophilic activity with increasing concentrations. The diffusion disk method of aqueous-ethanol extracts applied to the solid medium overgrown with the model organism further proves their antimicrobial activity and the presence of active substances.

The results of the study of aqueous-ethanol extracts of pot marigold have revealed a potential example of transfer of knowledge in the field of disinfection of surfaces, contaminated with *E. coli*. Targeted in different food industries, establishments and other hygienically sensitive areas.

Key words: Pot marigold, *Calendula officinalis*, *Escherichia coli*, aqueous-ethanol extracts, supercritical carbon dioxide extracts, biofilm, inhibition zone, total phenolic content

1 Teoretični del

1.1 Vrtni ognjič (*Calendula officinalis*)

Vrtni ognjič, lat. *Calendula officinalis*, spada v družino nebinovk. Poznamo ga tudi kot vrtni ognjič, primožek ali mesečnik. Rastlina, ki naj bi izvirala iz južne in jugovzhodne Evrope, cveti od meseca junija do meseca oktobra. Ognjič je enoletna rastlina z oglatim stebлом in zraste tudi do 60 cm. Cvetovi ognjiča imajo svetlo rumene ali oranžne cvetne koške, ki se zjutraj odprejo in zvečer zaprejo. Rastlina glede na izbiro prsti, na kateri uspeva, ni zahtevna, nadvse ji najbolj ustrezata sončna lega (Kothe, 2009).

Ognjiču pripisujejo mnoge izjemne učinke, kot so blaženje vnetij, lajšanje bolečin in razstrupljanje. V domačem okolju lahko ognjičeva stebla pripravimo kot solato in dele cvetov kot naravna barvila v živilih. Dragocen je tudi kot sestavina mnogih domačih zdravil s protivnetnimi delovanjem, kot sestavini obkladkov, pripravi zdravilnih čajev in mazil (Kothe, 2009).

1.1.1 Zdravilni učinki vrtne ognjiča

Dokazano je bilo, da vodno-etanolni pripravki ognjiča in njegovi ekstrakti s superkritičnim ogljikovim dioksidom (sc-CO₂) preprečujejo vodenico in vnetja mišij modelov. Največji učinek protivnetnega delovanja je bil opažen pri vzorcu, pripravljenem z uporabo sc-CO₂. Dejstvo potrebujejo tudi kemijske lastnosti tovrstnega izolata, saj so učinkovine, ki sodelujejo pri protivnetnem delovanju lipofilne narave, katere sc-CO₂ iz rastlin tudi v večji meri izluži (Della Loggia idr., 1990). Ekstrakti vrtne ognjiča lahko delujejo proti virusu družine HIV, saj upočasnijo HIV-1 reverzno transkripcijo (Kalvatchev idr., 1997). Učinkovine se ponašajo tudi s svojim protiglivičnim delovanjem. Z metodo difuzije na trdno gojišče, 23 vrst gliv rodu *Candida*, je bila cena inhibicije na diskih z eteričnimi olji vrtne ognjiča večja od 20 mm. Nobena izmed uporabljenih vrst gliv tako ni zajemala nastanka cone inhibicije pod 10 mm (Gazim idr., 2008).

Z uporabo laserske aktivacije vzorca, je bilo dokazano tudi protitumorsko delovanje vodnega izvlečka vrtne ognjiča. Ko je bil izvleček (ekstrakt) lasersko obdelan, komponente vzorca spremenijo svojo strukturo (fotoaktivne molekule), kar skupno privede do bolj efektivnega protitumorskega delovanja. Učinkovitost omenjenega ekstrakta je bila testirana tudi na različnih vrstah raka; med njimi na raku dojk, prostate, trebušne slinavke in na pljučnem raku. Ekstrakt je

tako prekinil celični cikel rakave celice in sprožil apoptozo. Prav tako je bilo ugotovljeno, da spodbuja množenje levkocitov periferne krvi (Jiménez-Medina idr., 2006).

Ekstrakti ognjiča vsebujejo tudi veliko količino antioksidantov. Propilenglikolni ekstrakt je zaradi navedenega tako preprečil poškodbe prasičje DNK, katerih celice so bile izpostavljene oksidativnemu stresu z uživanjem poli-nenasičenih maščobnih kislin. Komponente ekstrakta nudijo učinkovito zaščito molekuli DNK pred poškodbami, in so tako po učinkovitosti primerljive z vitaminom E. Za uporabljene tovrstne aplikacije je v primerjavi z ekstraktom cvetnih vrhov, večji učinek pokazal ekstrakt iz cvetnih lističev (Frankic idr., 2009).

1.1.2 Kemijski pogled na učinkovine vrtnega ognjiča

V listih, steblu in cvetovih vrtnega ognjiča je bilo dokazanih 15 prostih aminokislin, od katerih so najpogosteje arginin, prolin, glutaminska kislina, fenilalanin, lizin in levcin. Največ aminokislin so vsebovali listi, sledi steblo in najmanj cvetovi (Abasova idr., 1994). Ognjičeve seme vsebuje veliko količino lipidov, med katerimi prevladujejo nevtralni lipidi, prisotni pa so še fosfolipidi in glikolipidi. Kalendinska kislina je značilna zgolj za člane rodu *Calendula* (Ul'chenko idr., 1998).

Vzrok rumeno-oranžne barve ognjiča se skriva v veliki vsebnosti karotenoidov. Karotenoidi igrajo pomembno vlogo pri zaščiti rastline pred škodljivo svetlobo, in so prav tako potrebni za sintezo vitamina A. Iz ognjiča jih je bilo izoliranih 19 vrst karotenoidov, med katerimi so prevladovali flavoksantin (28 % vseh karotenoidov), luteoksantin (11 % vseh karotenidov) in likopen (8,7 %) (Khalid & Teixeira da Silva, 2012).

Vrtni ognjič (**Slika 1**) vsebuje tudi terpenoide, ki predstavljajo največjo vrsto sekundarnih metabolitov, sestavljenih iz petih izoprenskih enot (Perveen, 2018). Omenimo zgolj dva najpogosteja: stigmasteroli in sitosteroli (John & Jan, 2017).



Slika 1: Vrtni ognjič (*Calendula officinalis*) (Endemic Herbs From Mount Athos Help Cure Illnesses, 2010).

1.2 Fenolne spojine

Fenoli so spojine, ki jih prepoznamo po aromatskih obročih in vsaj eni hidroksilni skupini. Spadajo med bioaktivne spojine, prisotne v rastlinah, ki jih proizvajajo med rastjo ali med izpostavljenostjo biotskemu (primer: bakterijska okužba) ali pa abiotskemu stresu (primer: poškodba tkiva). Nekatere izmed fenolnih spojin lahko celo vplivajo na barvo, okus in vonj rastline (Luna-Guevara idr., 2018).

Fenolom pripisujejo mnoge pozitivne lastnosti kot so protialergijsko, protivnetno, protimikrobnno in antioksidativno delovanje. Vsakodnevni vnos fenolov zato povezujejo z nižjim tveganjem srčno-žilnih bolezni, nevroloških motenj in nekaterih vrst raka, saj fenoli preprečujejo oksidacijo makromolekul, ki se nahajajo v celici (Luna-Guevara idr., 2018).

Fenole delimo na flavonoide, ki predstavljajo najpomembnejšo skupino tovrstnih molekul, sledijo fenolne kisline, tanini, stilbeni, kumarini, lignani in lignini. Do sedaj so jih identificirali že več kot 8000. Kot antioksidanti privlačijo proste radikale, ki v celici povzročajo škodo z vezavo na druge molekule, kot je na primer DNK, kar lahko povzroči njeno oksidativno propadanje. Zaradi njihovih dobrih lastnosti velja, da količina zaužitih fenolov vpliva tudi na naše zdravje, in s tem kvaliteto samega življenja. Ob tem moramo biti zelo previdni, saj imajo nekatere fenolne spojine v prekomernih koncentracijah ravno nasproten učinek in postanejo proksidanti (Luna-Guevara idr., 2018). Fenolnim spojinam pripisujejo tudi protirakovo delovanje. Ugotovljeno je bilo, da lahko spodbudijo apoptozo celic, na način, da ustavijo celični cikel in blokirajo signalne poti ter s tem rakavim celicam preprečijo razmnoževanje (Roleira idr., 2018).

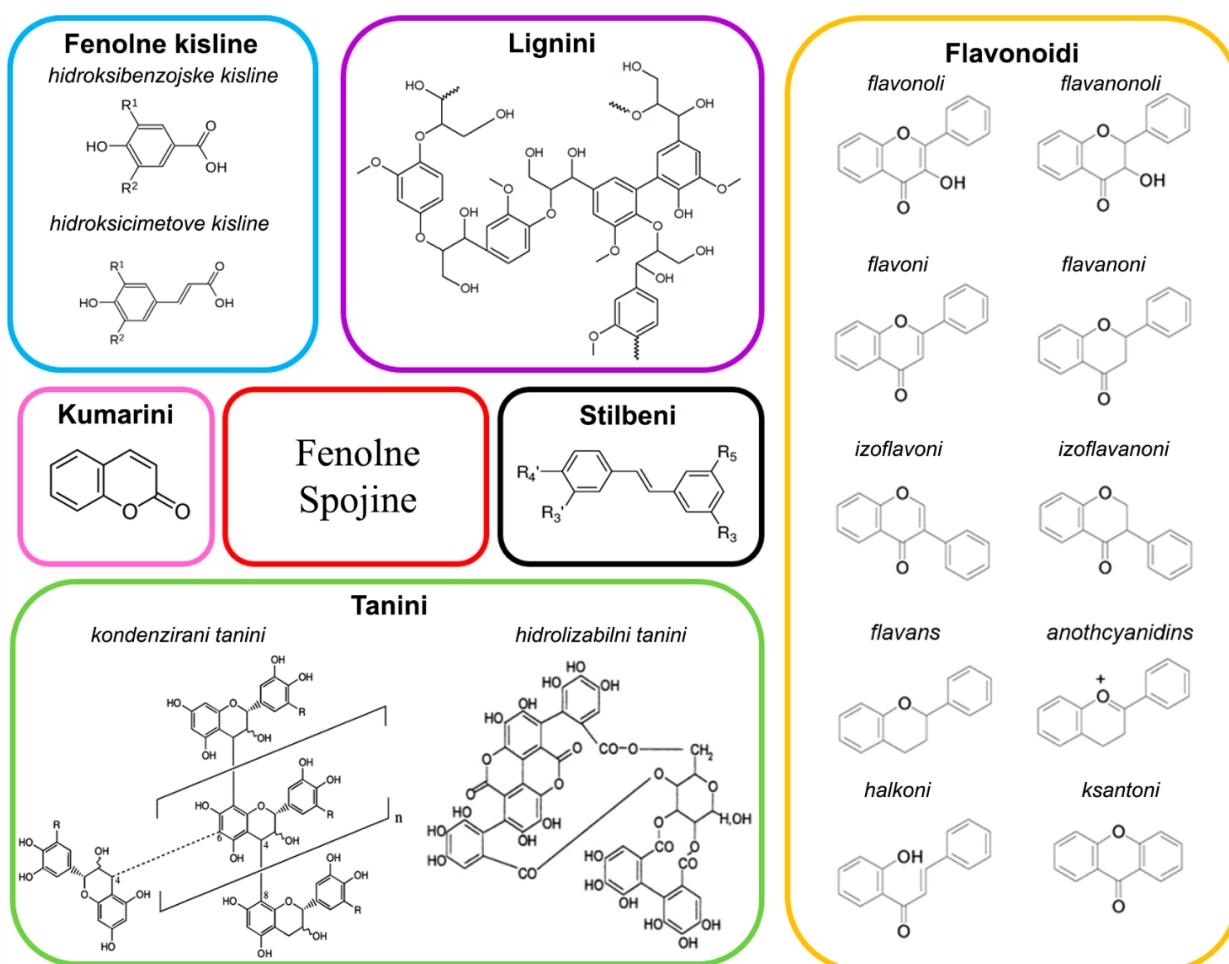
Fenolne spojine so svoje mesto uporabe našle v mnogih industrijskih panogah. Predvsem na področju živilstva, kjer jih zaradi antimikrobnih lastnosti uporablja kot konzervanse in s tem živilom podaljšajo rok trajanja brez dodatka umetnih oz. sintetičnih antioksidantov. Uporabno vrednost so našli tudi na področju tekstilne industrije (barvila), kjer med drugim njihova fotodegradacijska lastnost za sedaj ne dopušča možnosti zamenjave z aktualnimi barvili.

Vse splošno so fenolne spojine prisotne tudi v kozmetični industriji, kjer zaradi svoje antioksidativnosti pomembno pripomorejo k izgledu kože. Mehanizem njihovega delovanja temelji na tem, da prostim radikalom preprečuje nastanek poškodb na njej (Albuquerque idr., 2021).

1.2.1 Vpliv fenolnih spojin na nastanek biofilma

Jagani in sodelovci (2009) so opazili znaten vpliv fenolnih spojin (**Sika 2**) na formacijo biofilma pri *Pseudomonas aeruginosa*. Največji učinek so pri tem pokazali: fenol (80 % inhibicija biofilma), taninska kislina (78,1 % inhibicija), epigalokatehin (69,9 % inhibicija), polifenol (69,2 %), catehin (67,5 % inhibicija) in polianakadrinska kislina (63,2 %).

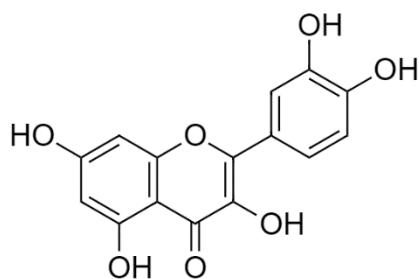
Wang (2013) je s sodelavci ugotovil, da oolong čaj vpliva na pritrjevanje bakterijskih celic na podlago, čaj pu-erh pa dobro inhibira nastanek biofilma. Na celicah, obdelanih s čajem, so na površini opazili nastanek prevleke. Z nadaljnjiimi analizami so ugotovili, da je omenjena prevleka sestavljena iz steroidov, taninov, flavonoidov in glikozidov (slednjega so našli tudi v kontrolnem vzorcu). Snovi, ki se nahajajo na površini celice, vežejo nase velike fenolne spojine, kot so tanini, ki imajo visoko afiniteto na beljakovine in ogljikove hidrate. Od flavonolov so v prevleki našli zgolj tri, in sicer vodotopna kvercetin in kaempferol ter mircetin. Prevleka je tako zmanjšala interakcijo med bakterijami in površino.



Slika 2: Delitev fenolnih spojin (Ali Redha, 2021).

1.2.2 Fenolne spojine vrtnega ognjiča

Vrtni ognjič vsebuje mnogo različnih flavonoidov, ki veljajo za podskupino fenolnih spojin. Mednje uvrščamo tudi kvercetin (**Slika 3**), lupeol, protokatehinska kislina in izorhamnetin (John & Jan, 2017). Vsebnost flavonoidov naj bi bila povezana s sorto ognjiča in krajem pridelave semen (Raal & Kirsipuu, 2011). Rall in Kirsipuu (2011) sta ugotovila, da največ flavonoidov vsebuje finska sorta Kablouna. Ravno zaradi flavonoidov in karotenoidov lahko zdravilne učinkovine iz ognjiča učinkujejo protivnetno, saj inhibirajo sintezo prostih radikalov in preprečijo delovanje oksidaz in aktivirajo antioksidativne encime (John & Jan, 2017).



Slika 3: Struktura kvercetina.

1.3 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je zelo uporabna metoda, ki jo lahko uporabljam za ugotavljanje čistosti vzorcev RNK in DNK, v farmaciji za določanje učinkovin in v živilski industriji, na primer pri določanju koncentracije kofeina v kavi (Tom, 2023). Temelji na dejstvu, da lahko preko intenzitete skozi vzorec, prepuščene svetlobe (I_t), in intenzitete svetlobe, s katero vzorec osvetljujemo (I_0), zračunamo prepustnost ali transmitanco (T) (**Enačba 1**).

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (\text{Enačba 1})$$

Preko transmitance lahko izračunamo tudi absorbanco (A) (**Enačba 2**), ki podaja količino absorbirane svetlobe v vzorcu. Definirana je kot negativni desetiški logaritem transmitance.

$$A = -\log(T) \quad (\text{Enačba 2})$$

Ker se snovi razlikujejo po valovni dolžini svetlobe, ki jo najbolje absorbirajo, lahko z merjenjem absorbance določamo opazovano snov (analit) (Vo, 2013).

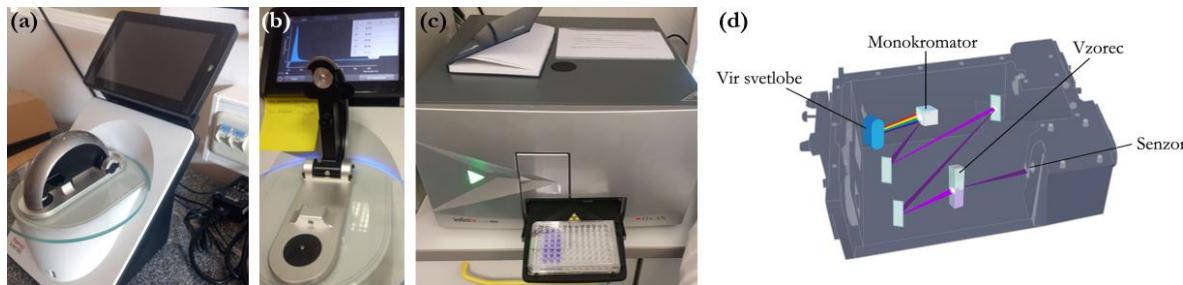
Preko Beer-Lambertovega zakona (**Enačba 3**) lahko s pomočjo absorbance izračunamo tudi koncentracijo snovi, ki absorbira svetlobo. Zakon namreč pravi, da je absorbirana svetloba odvisna

od koncentracije snovi (c) in absorpcijskega koeficienta (ε) ter dolžine poti svetlobe skozi absorpcijsko sredstvo (b). Absorpcijski koeficient raztopine iste snovi je običajno enak (Švent, 2012).

$$A = \varepsilon \times c \times b \quad (\text{Enačba 3})$$

Za meritve absorbance poznamo več tipov spektrofotometrov (**Slika 4**). Najpogostejsi so zagotovo tisti, ki uporabljajo UV (185–400 nm) in vidno svetlobo (400–700 nm) ter spektrofotometer, ki uporablja infrardečo svetlobo (700–15000 nm) (Vo, 2013).

UV-Vis spektrofotometer (**Slika 4 (a)-(c)**) je sestavljen iz vira svetlobe, to so lahko ksenonske, tungstenske ali halogenske žarnice. Svetloba, ki jo oddaja svetlobni vir pride do monokromatorja (**Slika 4 (c)**), ki loči svetlobo želene valovne dolžine od drugih (pri vidni svetlobi je to svetloba barve, ki je komplementarna barvi vzorca, in pri UV svetloba z valovno dolžino, ki jo vzorec najbolje absorbira). V nadaljevanju, potuje izbrana svetloba iz monokromatorja skozi vzorec, kjer se je en del absorbiran, en pa odpotuje naprej do senzorja – fotocelice, ki svetobo zazna in spusti tok. Nastali tok je odvisen od intenzivnosti prepuščene svetlobe. Pot tako nadaljuje do računalnika, ki izpiše transmitanco ali absorbanco, če jo je sposoben izračunati (Tom, 2023).

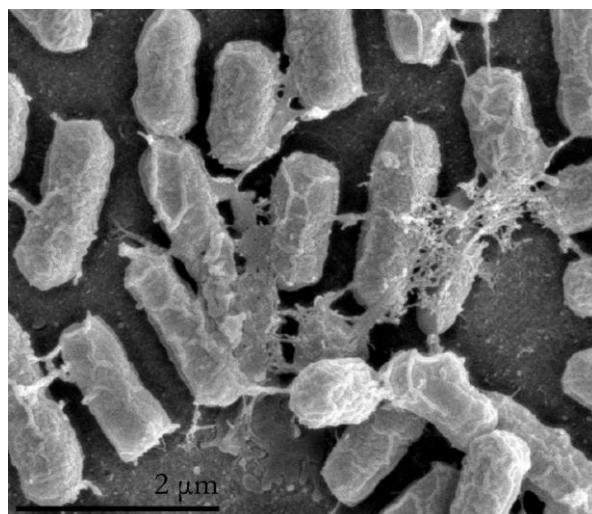


Slika 4: (a), (b) Spektrofotometer Nanodrop One C, (c) čitalci mikrotitrskih plošč Infinite 200 Pro in (d) shematski princip delovanja UV-Vis spektrofotometra (Tom, 2023).

1.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) pripada družini *Enterobakterij*, in predstavlja eno izmed najbolj proučevanih modelnih organizmov (**Slika 5**). Najbolj poznan in najtemeljitejše raziskan sev *E. coli* je K-12, ki je bil ključen pri napredku genetike, molekularne biologije, fiziologije in biokemije (Doyle, 2011). *E. coli* ni samo laboratorijsko gojen organizem, temveč bakterija, ki jo najdemo skoraj povsod. Njen glavni habitat so črevesja vretenčarjev, kjer prebiva kot pretežno aeroben organizem, in živi v simbiozi z njegovim gostiteljem. Tvorba biofilma *E. coli* omogoča, da prezivi in tudi uspeva v

okolju, kjer je rast v odsotnosti biofilma onemogočena. Bakterija tvori biofilme praktično povsod: v mehurju med infekcijo urinalnega trakta, na medicinskih pripomočkih, v prsti ali celo izven gostitelja (Hufnagel idr., 2015). Do zdaj je bilo identificiranih in okarakteriziranih že več kot 700 njenih sevov. V splošnem, večina sevov ni patogenih, vendar obstajajo tudi taki, ki se končajo s smrtnim izidom. *E. coli*, kot povzročiteljica intra- in ekstračrevesnih bolezni, je na leto odgovorna za približno 2 milijona smrti (Russo & Johnson, 2003). Zaradi omenjenega so patogeni sevi *E. coli* dobro raziskani, medtem ko so priskledniški sevi *E. coli* za medicinsko stroko in posledično raziskovalce manj zanimivi, kar v današnjem času predstavlja vedno večji problem. Vse več sevov namreč izraža vedno večjo odpornost na antibiotike. Šele z dobrim poznavanjem celotne populacije bomo lahko razumeli virulentnost in odpornost na antibiotike patogenih sevov, saj imamo zgolj omejeno število antibiotikov, na katero populacija patogenih sevov še ni popolnoma imuna (Kazemnia idr., 2014).



Slika 5: *E. coli* pod presevnim elektronskim mikroskopom (Ziuzina idr., 2015).

1.4.1 Zgradba *E. coli* in njen metabolizem

Gram negativna bakterija *E. coli* je velika $0,5 \times 1\text{-}3 \mu\text{m}$, ki ima peritrikhe bičke in je paličaste oblike ter ni sposobna tvorbe spor (Friedmann, 2006). Po rabi kisika je fakultativni anaerob, kar pomeni, da lahko uspeva tudi ob pomanjkanju kisika. Njen osrednji metabolizem sestavlja: Embden-Meyerhof-Parnas glikolizna pot (EMP), pentoza-fosfatna pot (PP), Entner-Doudoroffova pot (ED), in cikel trikarboksilne kisline (TCA) ter različne fermentacije. Najbolje uspeva na sladkorjih, kot so mono- in disaharidi, razgradnje polisaharidov pa ni zmožna, saj ne vsebuje encimov za

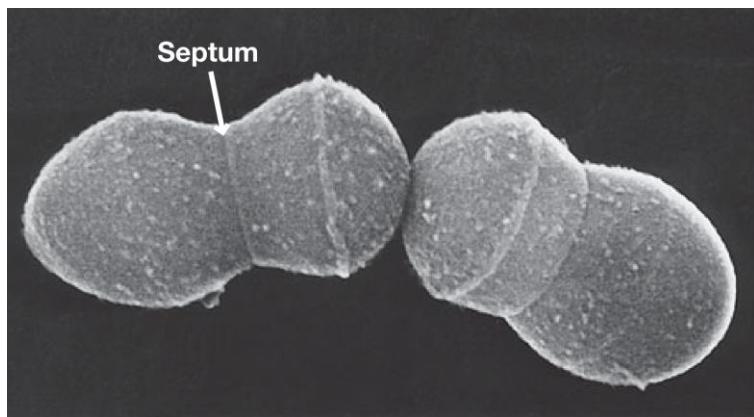
njihovo razgradnjo. Zmožna je rasti tudi na aminokislinah, katere v procesu glukoneogeneze, ob pomoči pomočjo TCA cikla pretvori v sladkorje (Conway & Cohen, 2015).

Bakterijo najdemo v zelo raznolikih okoljih, kar med drugim nakazuje na njen širok spekter metabolnih poti. V anaerobnem okolju vrši potek mešane kisle fermentacije, kjer iz heksoze ustvari etanol, butan-2,3-diol, sukcinat, laktat, acetat, format, vodik in ogljikov dioksid. Pri takšni fermentaciji *E. coli* sodeluje z metanogeni, acetogeni in sulfat-reducirajočimi bakterijami, katere uporabljajo H₂, ki ga *E. coli* lahko proizvede. Najpogosteje so striktno anaerobne metanogene bakterije, katere v procesu metanogeneze za tvorbo metana porabijo H₂ in CO₂ (Madigan idr., 2010).

E. coli ima zelo prilagodljiv metabolizem, kar dokazuje raziskava, pri kateri so s pomočjo vodene evolucije spremenili njen metabolizem tako, da je za vir ogljika uporabljala CO₂. Preko sodobnih molekularnih metod so tako v roku 200 dni heterotrofa pretvorili v avtotrofa. *E. coli* je posledično postala zmožna fiksacije in redukcije CO₂ za nastanek biomase, za delovanje omenjene metabolne poti pa je še vedno potrebovala kisik in metanojsko kislino (Gleizer idr., 2019).

1.4.2 Mehanizem razmnoževanja

Proces razmnoževanja prokariontov, kamor uvrščamo tudi *E. coli*, imenujemo binarna fizija (**Slika 6**). Gre za nespolno obliko razmnoževanja, kjer sta, z izjemo mutacij, hčerinski celici klona materinske celice. Prvi korak delitve je elongacija, kjer se celica podaljša za približno njeno dvakratno dolžino. V temu času se podvoji tudi bakterijski kromosom, ki se začne odmikati od središča, nato vsaka izmed polovic zaide na svojo stran podaljšane celice. Kot posledica rasti celične membrane in stene dveh različnih strani, se prične tvoriti pregrada, imenovana septum (**Slika 6**). Ko se pri obeh celicah dokončno oblikujeta membrana in stenam, se celici ločita. *E. coli* ima v najboljših okoliščinah generacijski čas približno 20 minut, kar pa pomeni, da se vsakih 20 minut podvoji število celic v populaciji. (Madigan idr., 2010).



Slika 6: Binarna fizija bakterije *E. coli* (Madigan idr., 2010).

1.4.3 *E. coli* in človek

E. coli je ena izmed prvih bakterij, ki kolonizira novorojenega otroka in je v njem prisotna vse do njegove smrti. Večina njenih sevov živi priskledniško v črevesju ljudi in živali, kjer opravlja vlogo razgradnje snovi, katerih želodec ni ustrezno razgradil. Slednje nato v nadaljevanju pretvori v organizmu uporabne, kot sta na primer vitamin K (Bentley & Meganathan, 1982) in vitamin B₁₂ (Lawrence & Roth, 1996).

Kot že omenjeno, je *E. coli* fakultativen anaerob, ki lahko, za razliko od preostalih mikroorganizmov v črevesju, uspeva tudi ob prisotnosti kisika. S porabljanjem kisika tako ustvarja primerne pogoje preostalim, za zdravo črevesno floro, nujno potrebnim mikroorganizmom (ASM, 2011). Identificirani so bili tudi patogeni sevi, ki zmotijo normalno delovanje črevesja. Razlikujemo med tremi tipi sevov *E. coli* glede na odnos s človekom: (a) priskledniški, (b) črevesni patogeni in (c) zunaj črevesni patogeni sev (Russo & Johnson, 2003).

Patogeni črevesni sevi

Črevesne seve *E. coli* delimo na 6 dobro poznanih patotipov, ki so razvili sposobnost povzročanja bolezni prebavil kot so enteritis, enterokolitis in kolitis. Najpogosteje se pojavljajo v državah v razvoju (Russo & Johnson, 2003) in predstavljajo enega izmed glavnih vzrokov smrti otrok pred petim letom starosti. Vse več patogenih črevesnih sevov kaže očitno odpornost na antibiotike, kar predstavlja vedno večji problem (Rojas-Lopez idr., 2018). So visoko infektivni, a zgolj v redkih primerih odgovorni za infekcije zunaj črevesnega trakta (Russo & Johnson, 2003).

Patogeni zunaj črevesni sevi

E. coli je najpogostejsa po Gramu negativna bakterija, ki povzroča zunajčrevesne infekcije. Največkrat se zgodijo zaradi več različnih razlogov (kot je na primer vdor patogenih zunaj črevesnih sevov v navadno sterilne dele telesa, kot je urinalni trakt) in jih v večini primerov zdravimo z antibiotiki (Russo & Johnson, 2003).

Infekcija urinalnega trakta

Infekcija urinalnega trakta je najpogostejsa izvenčrevesna infekcija, ki jo lahko povzroči *E. coli*. Infekcija se lahko pojavi v ledvicah, sečevodu, mehurju ali sečnici. Največ infekcij prizadene spodnji del urinalnega trakta, kot sta mehur in sečevod. Velja, da je zaradi krajše dolžine sečnice, ženska populacija bolj izpostavljana tveganju za nastanek tovrstnih infekcij. Zdravljenje poteka z antibiotiki (Mayo Clinic, 2022b). Infekcija na sečilih prizadene med 130 in 175 milijoni ljudi svetovne populacije (Russo & Johnson, 2003).

Infekcija trebuha in medenice.

Je druga najbolj pogosta izvenčrevesna infekcija z *E. coli* (Russo & Johnson, 2003), ki se pojavi na ženskih spolovilih. Če infekcije ne odpravimo pravočasno ima lahko trajne posledice za reproduktivne organe (Mayo Clinic, 2022a).

Pljučnica

E. coli povadi ne smatramo kot povzročiteljico pljučnice. Sama bakterija je ogovorna zgolj le za 2-5 % vseh pljučnic. Pogostejsa je naselitev bakterije v ustni votlini, ker okužba ni odpravljena v celoti, se razširi. To velja predvsem za paciente po operacijah in tiste v enotah intenzivne terapije. Ocenjeno je bilo, da je med 60 in 70 % takšnih pljučnic pridobljenih znotraj bolnišnic. Z modernimi medicinskimi metodami *E. coli* še vedno težko zaustavimo, zato ostaja smrtnost med 10 in 20 % (Russo & Johnson, 2003).

Operacijska infekcija

Na svetovni ravni letno bolnice opravijo približno 310 milijonov večjih operacij oz. posegov. Posledično se tako, med ali po posegu, od 2 do 4 % operiranih posameznikov okuži z bakterijami.

Čeprav so infekcije ozdravljljive z antibiotiki, so po operacijah glavni razlog za ponovni obisk bolnišnice. Okvirno so tragične za 3 % posameznikov (Russo & Johnson, 2003).

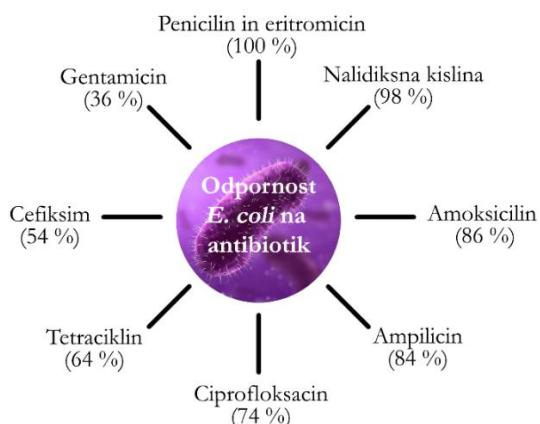
Meningitis

Poleg bakterije *Streptococcus B* ostaja *E. coli* eden izmed vodilnih vzrokov za meningitis novorojenčkov. Bakterija, ki letno povzroča med 20 in 40 % vseh okužb, se zdravi z antibiotično terapijo (Russo & Johnson, 2003).

1.4.4 Odpornost na antibiotike

Antibiotiki so ključnega pomena za zdravljenje in preprečevanje bakterijskih okužb. Skozi čas so bakterije, ob pomoči izmenjave genov preko plazmidov ali transpozonov, na njih razvile odpornost. Odpornost na antibiotike novejšega tipa postaja iz leta v leto večji problem, predvsem zaradi njihove prekomerne rabe v zdravstvu, ter v kombinaciji slabih higieniskih in življenjskih razmer v živilski industriji (Erb idr., 2007). Antimikrobnna rezistenca patogenih bakterij predstavlja, z visoko smrtnostjo, tesno povezan svetovni problem. Rezistence na več antibiotikov po Gramu pozitivnih in negativnih bakterijah, se ob pomoči standardnih antibiotikov izrazijo kot težko ozdravljljive ali celo neozdravljljive infekcije. Zaradi omenjenega mora biti raba antibiotikov bolj strateško naravnana, sicer bo privedlo do njihovega pomanjkanja. Patogeni sevi pa nanj ne bodo imuni (Fričer idr., 2017).

Na antibiotike odporne bakterije, predstavljajo večji del mikroflore človekovega prebavnega trakta (Reinthaler idr., 2003). Kazemnia in sodelavci (2014) so študirali odpornost antibiotikov na *E. coli* urinalnega trakta človeka. Rezultate odpornosti bakterije na različne testirane antibiotike predstavlja Slika 7.



Slika 7: Delež populacije *E. coli*, odporen na testiran antibiotik. Povzeto po (Kazemnia idr., 2014).

1.5 *E. coli* v živilski industriji

E. coli ima nevirulentne in virulentne oz. patogene seve. Nevirulentne seve najdemo v naši običajni črevesni flori, medtem ko virulentni sevi povzročajo okužbe prebavil in zunajčrevesne okužbe. Prenašanje okužbe z virulentnim sevom *E. coli* poteka najpogosteje z zauživanjem onesnaženih živil ali vode. Bakterija se lahko v naših živilih pojavi zaradi neustrezne čistoče površin in tudi zaradi nezadostne higiene zaposlenih. Živila, ki so najpogosteje okužena z *E. coli* so običajno premalo toplotno obdelano meso, nepasterizirani mlečni izdelki, nepasterizirani sadni sokovi in slabo oprana surova zelenjava (*Escherichia coli* (*E. coli*) v živilih, 2013).

Leta 2011 je v Nemčiji prišlo do množičnih okužb z bakterijo *E. coli*. Velika večina obolelih naj bi se okužila s kontaminiranimi sojinimi kalčki, le redki so oboli po stiku z že okuženo osebo. Sev, odgovoren za nastal izbruhs, je sev *E. coli* O104:H4, ki je sposoben proizvajati toksin šiga in je odporen na večino dostopnih antibiotikov. Omenjen toksin lahko poškoduje črevesje, kar povzroča krvavo drisko, lahko napade ledvice, ki lahko odpovedo, prav tako pa ogroža živčni sistem in povzroča nastanek strdkov (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

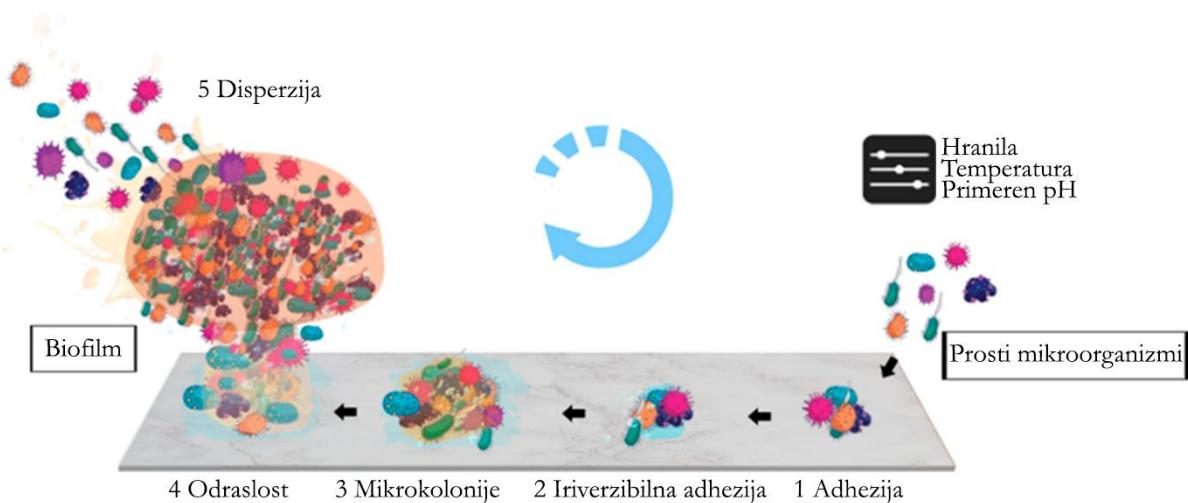
Enterotoksični sevi *E. coli* predstavljajo veliko težavo v državah v razvoju. V teh državah zaradi slabega dostopa do čiste pitne vode se namreč mnogo otrok z njo okuži, kar privede do driske, zaradi katere lahko mlajši otroci tudi pogosto umrejo. Enterotoksini, ki jih sprošča *E. coli*, povzročijo porušenje ravnovesja tekočin v tankem črevesu, kar povzroči drisko, ki tako ob nezadostnem pitju čiste vode vodi v dehidracijo (Ekici & Dümen, 2019).

E. coli velja tudi kot pokazatev fekalnega onesnaženja in v živilih predstavlja resno grožnjo zdravju človeka. Posebej problematična je tvorba biofilma, saj ji le-ta znatno poviša odpornost. Zaradi navedenega morajo, zaradi zagotavljanja varnosti izdelkov, v industrijskih panogah, skladno z dejstvom, povečati koncentracijo dezinfekcijskih sredstev od 10- do 100-krat. V ta namen so v rabi kemijske metode dezinfekcije, fizikalne metode z uporabo segrete pare (angl. superheated steam) in biološke, ki temeljijo na uporabi bakteriofagov in rastlinskih ekstraktov (Zhou idr., 2022).

1.5.1 Nastanek biofilma

Do formiranja biofilma *E. coli* pogosto prihaja ob neugodnih razmerah, kot sta pH vrednost okolja ali koncentracija hrani, ki bakterijo privedeta do točke, da se ob pomoči zunajceličnih organelov (bički in fimbriji) oprime podlage (Slika 8). Slednjo fazo v nastanku biofilma imenujemo reverzibilna adhezija. Sledi faza ireverzibilne adhezije, v kateri začne *E. coli* izločati zunajcelične

polimerne snovi (EPS) (Zhou idr., 2022). Snovi EPS so sestavljene iz beljakovin, glikoproteinov, glikolipidov in pogosto tudi iz zunajcelične DNK. Molekule EPS v biofilmu zadržujejo vodo in ohranjajo bakterijske celice tesno skupaj, zaradi česar lahko prihaja tudi do horizontalnega prenosa dednine. Prav tako lahko slednje vpliva na lastnosti samega biofilma, kot so poroznost, gostota in naboj (Flemming idr., 2007). Zaradi molekul EPS se bakterija tako še bolj pritrdi na podlago, in pogosto, zaradi deformacije celične stene, zagotavlja boljšo adhezijo. Tretjo fazo spremišča nastanek kolonij. Ker se število celic veča in v omejenem prostoru zmanjkuje hrani, se začno sproščati kvorum zaznavajočih (angl. quorum sensing) signalov (QS), s katerimi celice komunicirajo in uravnavajo sintezo snovi, potrebnih za biofilm. Slednja faza s QS-signali povzroči povečan nastanek molekul EPS. Sledi faza »zorenja« biofilma, med katero število kolonij še naprej raste, zaradi česar biofilm prevzame 3-D obliko, ki spominja na gobo ali stolpič. Zadnjo fazo imenujemo disperzija. Slednja je lahko aktivna ali pasivna. Ob aktivni disperziji začnejo bakterije same proizvajati encime, odgovorne za razgradnjo matrike biofilma. S tem povzročajo njegovo razpadanje ter uhajanje mikroorganizmov nazaj v okolje. Ob pasivni disperziji pa je, kot zunanj dejavnik, za razpad biofilma potrebna mehanska sila. V vsakem primeru disperzija pripomore k širjenju mikroorganizmov in nadaljnji rasti biofilma (Zhou idr., 2022).



Slika 8: Prikaz nastanka biofilma bakterije *E. coli* (Zhou idr., 2022).

Zhi Ma je s sodelavci (2019) ugotovil, da na formacijo biofilmov *E. coli*, nastalih s toksinom šiga, na ploščicah iz nerjavečega jekla, pomembno vpliva temperatura. Tako so pri 22 °C opazili intenzivnejše nastajanje močnih biofilmov. V primerjavi z navedeno temperaturo, se je njihova sposobnost tvorbe pri temperaturi 13 °C ustrezno znižala. Prispevek Kanga in sodelavcev (2021)

je z 2 % raztopino citronske kislinske v vroči vodi dosegal subletalne poškodbe celic, ki so na ploščicah iz nerjavečega jekla, uspevale v biofilmu. Vroča voda je iz molekul EPS odstranila eksopolisaharide, kar je v nadaljevanju omogočilo lažji vdor citronske kislinske v celico, ki je nato povzročila razpad membrane.

1.6 Metode izolacije naravnih učinkovin iz rastlinskih virov

Skozi razvoj metod izolacije naravnih spojin iz rastlinskih virov je bilo optimiziranih in uporabljenih veliko metod in tehnik. V pričujočem raziskovalnem delu se bomo podrobnejše dotaknili dveh, superkritične tekočinske ekstrakcije in priprave vodno-etanolnih izvlečkov.

1.6.1 Superkritična tekočinska ekstrakcija

Superkritična tekočinska ekstrakcija (SCFE, *angl.* supercritical fluid extraction) je vrsta ekstrakcije, pri kateri z delovno tekočino ekstrahiramo material pri zelo visokih tlakih in temperaturah. V tem območju topilo doseže superkritično točko. V primerjavi s komercialnimi topili imajo superkritične tekočine nižjo gostoto, viskoznost, površinsko napetost in višjo difuzivnost. Tudi superkritičnim tekočinam lahko, s spremjanjem operacijskih pogojev, ustrezno spremiščamo njihove lastnosti (Díaz-Reinoso idr., 2006).

Kot topilo je na tem področju pogosto v rabi ogljikov dioksid (CO_2), ki postane superkritičen pri tlaku 7,28 MPa in temperaturi 304,1 K. kot topilo ima CO_2 mnogo prednosti, saj ni toksičen, ni vnetljiv, iz okoljevarstvenega vidika lahko dostopen, poceni in zelo primeren za raztapljanje toplotno labilnih naravnih snovi z nizko hlapnostjo in polarnostjo. Pri ločevanju topila od produkta ga je mogoče, zaradi njegove visoke hlapnosti, zlahka odstraniti. Superkritični CO_2 (sc- CO_2) velja za nepolarno lipofilno topilo, kateremu je bila zaradi želene topnosti spojin predlagana tudi uporaba so-topil (Díaz-Reinoso idr., 2006). SCFE elegantno, v primerjavi s klasičnimi tehnikami ekstrakcije, omogoča ekstrakcijo rastlinskih in zeliščnih aktivnih učinkovin z boljšim donosom. V veliki meri se zaradi znižane temperature, zmanjšajo razpadi termično labilnih snovi, odsotnost svetlobe in kisika pa preprečita oksidacijo aktivnih spojin (Díaz-Reinoso idr., 2006).

Tovrstna ekstrakcija je uporabljanja za cel spekter spojin, še posebej tiste, ki težko hlapijo in so še posebej dovetne za termično razgradnjo (Díaz-Reinoso idr., 2006). Tradicionalni postopki izolacije učinkovin iz rastlin uporabljajo veliko toplotne in toksičnih topil, ki največkrat končajo kot odpadek. Prednost ekstrakcije s sc- CO_2 sta tako manjša poraba energije, saj je temperatura nižja (31,1 °C) in »zeleno« topilo, ki ga lahko ponovno uporabimo. Ekstrakcijo s superkritičnimi

tekočinami so najprej uporabljali zgolj za pridobivanje brezkofeinske kave, sedaj pa se je razširila tudi na področji farmacije, kjer z njenom pomočjo odstranjujejo nečistoče iz pomožnih snovi. Tovrstna ekstrakcija je svoje mesto uporabe našla tudi na področju kozmetike, predvsem na področju aromatičnih spojin za rabo v parfumih in dišavah. Uporabnost SCFE posega tudi na področje živilske industrije, kjer običajno iz mleka odstranjujejo holesterol (Kramberger & Kočevar, 2019).

Postopek superkritične ekstrakcije se začne s črpanjem tekočega CO₂ skozi topotni izmenjevalec, kjer zaradi temperature in pritiska plin postane superkritični. V nadaljevanju ga sledi črpanje skozi ekstrakcijsko komoro, kjer prehaja skozi rastlinski material (osrednji del ekstrakcije). Sc-CO₂ od tu črpajo v odstavne posode, kjer postopoma znižujejo tlak. S slednjim dosežejo postopno izločanje topljenca iz sc-CO₂, ki se počasi spet vrača v plinasto stanje. Uporabljen plin hladimo, da preide v tekočino in ga ponovno uporabimo (Kramberger & Kočevar, 2019).

Danielski je s sodelavci (2007) so v ekstraktu oljne smole vrtnega ognjiča s superkritičnim CO₂ odkril več vrst kozanov, med katerimi je prevladoval heksakozan, guiaol, cedrol, oktadekan, tetradekanojsko kislino, nonadekan in taraksaterol.

1.6.2 Vodno etanolna ekstrakcija

Pri ekstrakciji je izbira pravega topila, za dober izkupiček produkta, ključni dejavnik. Da izberemo pravo topilo moramo dobro poznati molekule, ki jih ekstrahiramo. Gledano kemijsko, zanima nas njihova polarnost. Kako dobro topilo razaplja topljenec je povezano s tvorbo močnih medmolekulskih vezi. Polarno topilo, zaradi medmolekulskih vezi, bolj privlači polarne molekule, medtem ko enako pravilo velja za nepolarne molekule – nepolarno topilo bo tvorilo medmolekulske vezi z nepolarnimi molekulami. Polarno topilo tako odbija nepolarne molekule in obratno enako. Pri vodno-etanolni ekstrakciji sta kot topilo uporabljeni etanol in voda. Razmerje vode in etanola ni preveč enakovredno, kajti delež etanola v mešanici se običajno giblje med 70 in 90 %. S tem zagotovimo širok spekter topljencev, ki se bodo v tem topilu topili (Jacotet-Navarro idr., 2018). Vodno-etanolni ekstrakti (pripravki) so običajno priporočeni za ekstrakcijo rastlinskega materiala, uporabnega v prehranske namene (Waszkowiak & Gliszczynska-Świgło, 2016).

Etanol predstavlja najpogosteje uporabljeni topilo za ekstrakcije. Vodo se mu dodaja, ker le-ta povzroči nabrekanje rastlinskega materiala, kar posledično poveča poroznost celičnih sten in pospeši difuzijo aktivne snovi v topilo. Izvlečke iz trdih delov rastline, kot so korenine, lubje, les

in semena pridobivamo s 70–80 % vodno raztopino etanola, iz listov pa s 50 % etanolno raztopino (Kočevar, 2018).

Etanolni ekstrakt ognjiča vsebuje triterpenoide, steroide, glikozide, saponine, alkaloide, flavonoide in tanine (Rajan idr., 2021).

2 Eksperimentalni del

2.1 Cilji in problem raziskovalnega dela

Raziskovalno delo bo v prvem delu, z metodo Folin-Ciocalteu, zajemalo kvantitativno določanje skupnih fenolnih spojin predhodno pripravljenih izolatov ingverja, vrtnega ognjiča, timijana in rožmarina, pripravljenih po dveh različnih metodah (vodno-etanolna ekstrakcija in ekstrakcija s sc-CO₂). Ker je naše kasnejše delo obravnavalo zgolj vrtni ognjič, smo želeli podati ugotovitve o skupnih fenolnih spojinah primerjalno še na drugih rastlinskih vzorcih. Le tako bomo lahko z gotovostjo trdili, katera tehnika izolacije, izkazuje večji donos glede na kvantitativno določene skupne fenolne spojine.

Vzorci posameznega rastlinskega dela, pripravljeni z vodno-etanolno ekstrakcijo in ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom, so zadostili smernicam farmacevtske in kozmetične industrije. Po pregledu literature s področja aplikativne uporabe obravnavanih rastlinskih vzorcev in njihovih izvlečkov, smo v drugem delu raziskovanja večji poudarek namenili antimikrobnemu in antibiofilmskemu delovanju naravnih učinkovin vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) na bakterijo *E. coli*. Predvsem nas je zanimala metodologija testiranja ekstraktov s sc-CO₂, o katerem po temeljitem pregledu nismo zasledili ustreznih znanstvenih objav. Za določanje antibiofilmskega delovanja smo prilagodili protokol Santoye in sodelavcev (2005), ki so za izboljšanje topnosti lipofilnega superkritičnega ekstrakta rožmarina uporabili 0,5 % surfaktanta tween-20. Vodno-etanolnim izvlečkom smo pred začetkom aplikacije, z odparevanjem, odstranili etanol, saj bi le-ta na testirano kulturo deloval protibakterijsko. Testi difuzije učinkovin na trdno gojišče so potekali po že uveljavljenih protokoli za tovrstne aplikacije (Hudzicki, 2009).

Skozi raziskovanje želimo proučiti, katera od omenjenih tehnik ekstrakcije kaže večji učinek pri izluževanju skupnih fenolnih spojin in biološki aktivnosti na primeru vrtnega ognjiča in modelnem organizmu *E. coli*.

V živilski industriji predstavlja prisotnost bakterij velik problem, saj jih je s površin težko odstraniti. Bakterije se namreč pritrди na materiale, ki prihajajo v stik z živili, se sčasoma razvijejo v biofilme, in s tem pomembno vplivajo na kakovost in varnost živil. Povzročijo lahko izbruhe bolezni, kvarjenje živil in kontaminacijo izdelkov. Bakterija ni le kvarljivec živil temveč je lahko tudi nevaren patogen, odgovoren za več usodnih infekcij, ki se lahko končajo s smrtnim izidom. Proti njim se ljudje borimo z različnimi sredstvi kemijoškega izvora, ki poleg škodljivim mikrobom škodujejo naravi in tudi zdravju ljudi. Slednje pa je deloma v navzkrižju z našimi interesi, saj naj bi človeška

rasa vedno bolj strmela k ohranjanju narave, zato se raziskovalci posvečajo iskanju biološkoaktivnih učinkovin, ki bi lahko nadomestila aktualna sredstva kemijskega izvora in bila obenem tako bolj "zelena".

Na kratko povzemimo, cilje raziskovanega dela.

- (1) Kvantitativno določiti skupne fenolne spojine vodno-etanolnih izvlečkov in sc-CO₂ ekstraktov ingverja, ognjiča, timijana in rožmarina.
- (2) Na primeru vrtnegog ognjiča proučiti antimikrobnlo delovanje vodno-etanolnega izvlečka in ekstrakta sc-CO₂ ter ovrednotiti njun potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterije *E. coli*.
- (3) Ugotoviti možnost povezave med količino skupnih fenolnih spojin izolata in njegovim antimikrobnim delovanjem.
- (4) Glede na pridobljene rezultate, ovrednotiti potencial zaviranja tvorbe biofilma bakterije *E. coli* na primeru prakse iz področja sanitarnega inženirstva.

2.2 Hipotezi

- (1) Predvidevamo, da bodo vodno-etanolni izvlečki vrtnegog ognjiča in preostalih obravnavanih vzorcev, v primerjavi z ekstrakti s superkritičnim ogljikovim dioksidom, vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolnih spojin.
- (2) Domnevamo, da bosta izolata naravnih učinkovin vrtnegog ognjiča (*Calendula officinalis*) na bakterijo *Escherichia coli* učinkovala antimikrobnlo in zavirala tvorbo biofilma.

2.3 Metode dela

2.3.1 Uvod v metode dela

Pri opravljanju eksperimentalnega smo sledili smernicam dobre laboratorijske prakse na področju analizne kemije in mikrobiologije. Pred delom smo se ustrezno izobrazili o kulturi s področja varnostnega inženirstva, po slednjih načelih smo tako smo vseskozi pazili na lastno varnost in varnost sodelavcev laboratorija. V laboratoriju smo vseskozi nosili osebna zaščitna sredstva: laboratorijska halja, zaščitna očala, rokavice. Pri delu s potencialno patogeno bakterijo (zapisano v uvodnem delu), smo potencialne kontaminacije kulture in okužbo preprečili z rednim razkuževanjem rok. Posebno pozornost smo usmerili tudi čistosti prostora, delovnih površin, aparatur in uporabljenih reagentov. Tovrstna praksa nam je še posebej koristila pri mikrobiološkem delu (**Slika 9**), in sicer med gojenjem bakterijske kulture, pripravi biofilmov in proučevanjem difuzije na trdo gojišče. Da bi na kakršen koli način preprečili morebitno kontaminacijo gojišč, smo pred delom razkužili delovno površino in delo opravljali pod aseptičnimi pogoji, kar pomeni, da smo vse analize opravljali z uporabo Bunsenovega gorilnika.



Slika 9: Delovni prostor pri pripravi mikrobioloških aplikacij.

Ker je vodno-etanolni pripravek po izolaciji vseboval še 20 % etanola, smo le-tega iz celotne mešanice odstranili s črpanjem pod znižanim tlakom. Tak vzorec je bil nato primeren za nadaljnje aplikacije na modelni bakterijski kulturi. Na način, kot smo postopali pred aplikacijo vzorca na bakterijsko kulturo, je tako zagotavljal zgolj študij vpliva učinkovin uporabljenega vzorca in izničil vpliv etanola, ki se je kot pomožno topilo uporabljalo v samem procesu izolacije. Vzorec, kateremu

smo na opisan način odstranili etanolno komponento, bomo v nadaljevanju označili kot »surov« (angl. crude) izvleček.

Antimikrobne učinke izolatov smo ugotavljali z metodo difuzije na trdno gojišče oz. z merjenjem inhibicijske cone. Gre za metodo, pri kateri z učinkovinami (izolati) prepojene diske položimo na gojišče, v katerega smo predhodno nacepili modelni organizem. Če se v okolini diska pojavi nekolonizirana površina, ima snov, s katero je prepojen disk antibakterijske učinke. Nastalo področje v okolini diska pa imenujemo inhibicijska cona. Večje območje inhibicijske cone tako označuje večje antibakterijske učinke preučevane snovi (Hudzicki, 2009).

Vpliv izolatov vrtnegog ognjiča na biofilm prekonočne kulture *E. coli* smo izvajali z uporabo metode barvanja z barvilm kristal vijolično. Barvilo, ki je obarvalo bakterijske celice smo v nadaljevanju ekstrahirali z uporabo 96 % etanola. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč smo odčitali optično gostoto (OD, angl. Optical Density) pri 620 nm. Na ta način smo ovrednotili količino pritrjenih celic. Za slednje velja korelacija, kjer večja koncentracija barvila in s tem tudi OD ekstrahiranega barvila, nakazujeta na večjo prisotnost še pritrjenih celic analiziranega vzorca (Oder & Fink, 2019).

2.3.2 Reagenti in raztopine

- Destilirana voda (Institut »Jožef Stefan in Zdravstvena fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana)
- Tween-20 (za mikrobiologijo, VWR International bv, Belgija)
- *Escherichia coli* ATCC 35218, pridobljena iz banke "Czech Collection of Microorganisms" Brno, Češka
- Nutrient agar gojišče (Biolife, Italija)
- Etanol ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 10× redčen reagent Folin-Ciocalteu (pripravljen iz 2 M reagenta, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 7,5 % Vodna raztopina natrijevega karbonata (pripravljena iz ACS reagenta $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Fosfatni pufer (PBS, $pH = 7,4$), pripravljen iz: 137 mM NaCl (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), 2,68 mM KCl (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), 10,14 mM Na₂HPO₄ (Na₂HPO₄ \times 2 H₂O, BioUltra Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), 1,84 mM KH₂PO₄ (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 10 % Vodna raztopina vodikovega peroksida (pripravljena iz 30 %, Merck, Nemčija)
- Fiziološka raztopina (0,9 % vodna raztopina natrijevega klorida, pripravljenega iz reagenta ACS, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 2 % Vodna raztopina barvila kristal vijolično (ACS reagent, Merck, Nemčija)
- Celulozni disk s standardnim antibiotikom Bacitracin (10 µg/mL) (Mast Group, Liverpool, UK)

- Filtri s prepustnostjo do 0,20 µm (Chromafil RC-20/25, Macherey-Nagel, Nemčija) in filtri s prepustnostjo do 0,45 µm (Sterlitech, Auburn, USA)

2.3.3 Aparature

- Analizna tehntica PBJ 620-3M (Kern, Nemčija)
- Laboratorijska tehntica TCP224S (Sartorius, Nemčija)
- Vakumska črpalka Integra Vacusafe, model 158310 (Vucasafe, Švica)
- Čitalec mikrotiterskih plošč Infinite 200 Pro (Tecan, Austria)
- Spektrofotometer Nanodrop One C (Thermo Scientific, ZDA)
- Svetlobni mikroskop z vgrajeno barvno kamero, Motic AE31E (Motic, Kitajska)
- Namizno mešalo Vibramix 10 (Domel, Slovenija)

2.3.4 Izolati rastlinskega materiala

Izolati s superkritičnim ogljikovim dioksidom so bili pripravljeni v podjetju Flavex Naturextrakte GmbH (Nemčija) in vodno-etanolni izvlečki v podjetju Epo S.r.l. (Italija).

Tabela 1: Vzorci, v raziskovalnem delu, uporabljenih izolatov rastlinskega materiala.

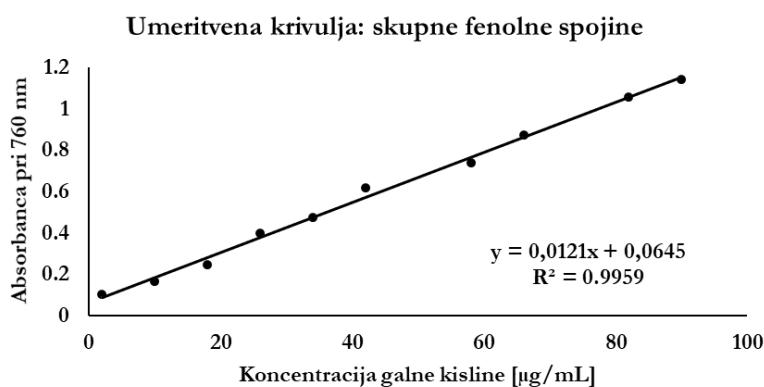
Rastlina	Vzorec izolata/izvlečka	Rastlinski del	Država
Ingver	Superkritični ogljikov dioksid	Korenika	Nigerija
	Vodno-etanolni izvleček	Korenika	Italija
Ognjič	Superkritični ogljikov dioksid	Cvetovi	Egipt
	Vodno-etanolni izvleček	Cvetovi	Egipt
Timijan	Superkritični ogljikov dioksid	Listi	Španija
	Vodno-etanolni izvleček	Listi	Italija
Rožmarin	Superkritični ogljikov dioksid	Listi	Španija
	Vodno-etanolni izvleček	Listi	Italija

2.3.5 Kvantitativno določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila določena po postopku Zhanga sodelavcev (2010) in pritejenem postopku Jerana in sodelavcev (2023). Postopek kvantitativne določitve je zajemal uporabo reagenta Folin-Ciocalteu in merjenje absorbance s pomočjo UV/Vis spektroskopije.

Alikvot vzorca (2,5 µL), t.j. izolata naravnih učinkovin rastlinskega vira, smo kvantitativno prenesli v mikrotitersko ploščo s 96 odprtinami, v katerih je bilo že predhodno dodanih 12,5 µL 10× redčenega reagenta Folin-Ciocalteu (pripravljen iz izhodnega s koncentracijo 2 mol/L). Vsebini smo dodali še 10,5 µL 7,5 % raztopine natrijevega karbonata. Nastalo kombinacijo komponent

smo nato s pipeto dobro premešali in ploščo ovili v aluminijast papir ter pri sobni temperaturi postavili v temen prostor za 30 minut. Po pretečenem času smo na spektrofotometru Nanodrop One C pri 760 nm izmerili absorbanco. Meritev posameznega vzorca smo opravili trikrat in izračunali povprečno vrednost ter v stolpčnih diagramih podali napako. Za meritev "slepega" oz. ničelnega vzorca smo uporabili destilirano vodo oz. 70 % raztopino etanola ter reagente brez dodanega vzorca. Umeritvena oz. kalibracijska krivulja (**Slika 10**) je bila pripravljena iz standardnih raztopin galne kisline s koncentracijami 2, 10, 18, 26, 34, 42, 58, 66, 82 in 90 µg/mL. Krivulja je bila obravnavana kot linearna funkcija z enačbo: $y = 0,0129x + 0,0586$, R^2 premice je znašal 0,9959. Rezultat skupnih fenolnih spojin vzorca je bil podan v količini (masi) galne kisline na količino (maso) suhe rastlinske mase.



Slika 10: Umeritvena krivulja za določitev skupnih fenolnih spojin izolatov naravnih učinkovin.

2.3.6 Vpliva izolatov vrtnega ognjiča na tvorbo biofilma bakterije *E. coli*

Bakterije *E. coli* (ATCC 35218) smo pripravili v hranielnem agarju (Biolife, Italija). 2 mL Suspenzijo pripravljene kulture smo prenesli v mikrotitrsko ploščo s 6 odprtinami ter inkubirali 24 h pri 37 °C.

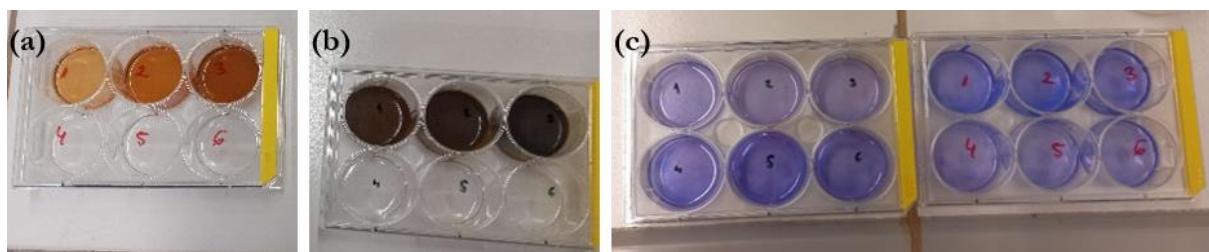
S pomočjo vakumske črpalke (Integra Vacusafe) smo v nadaljevanju odstranili gojišče z bakterijami in odprtino sprali z 2 mL fosfatno-citratnega pufra (PBS). Na omenjen način smo tako odstranili, na površino nepritrjene ali slabu pritrjene celice. Celice, pritrjene na površino, smo nato fiksirali z vročim zrakom in v odprtine prenesli 1 mL izolatov (**Slika 11 (a) in 11 (b)**). V prvi seriji testiranj smo za nanos obeh tipov vzorcev (vodno-etanolni izvleček in sc-CO₂ ekstrakt) uporabili koncentracije: 150, 300 in 450 mg/mL.

V nadaljevanju sta sledili še dve seriji testiranj vodno-etanolnega izvlečka, in sicer za 50 in 75 vol. % ter koncentrat. V prvem delu smo uporabili za pripravo raztopin izhajali iz t.i. »surovega« izolata,

v drugem delu pa smo raztopine filtrirali dvostopenjsko; najprej skozi filter s porami 0,45 µm (Stereolitech, Auburn, USA) in nato še skozi pore 0,20 µm (Chromafil RC-20/25, Macherey-Nagel, Nemčija). Tako smo odstranili morebitne delce, ki jih je vseboval izhoden, »surov«, izolat.

Poleg vzorcev smo v eno odprtino mikrotitrsko plošče dodali 1 mL 10 % vodikovega peroksida, ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Za negativno kontrolo smo v eni odprtini uporabili 1 mL fiziološke raztopine. Pri testiranjih ekstraktov s sc-CO₂, smo poleg omenjenih kontrol v dodatno kontrolno spremenljivko vključili še 0,5 % vodno raztopino surfaktanta tween-20, ki je bil kot dodatek uporabljen kot sredstvo izboljšanja topnosti.

Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo vsebine iz odprtinic previdno odstranili in površino sprali z 2 mL puferne raztopine PBS. V vsako izmed odprtinic smo v nadaljevanju dodali 1 mL 2 % raztopine barvila kristal vijolično (Merck, Nemčija) in inkubirali 5 minut. Po odstranitvi barvila, smo dodali 1 mL 96 % etanola v vsako odprtino titrske plošče, s čimer smo povzročili ekstrakcijo barvila iz celic (**Slika 11 (c)**). 200 µL 96 % Etanola z barvilom iz celic smo prenesli v mikrotitersko ploščo s 96 odprtinami in pri valovni dolžini 620 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč (Tecan Infinite 200 Pro) pomerili optično gostoto.



Slika 11: Mikrotiterske plošče z biofilmom in nanosom: (a) vodno-etanolnega izvlečka, (b) ekstrakta s sc-CO₂ in (c) nanosom barvila kristal vijolično po predhodnem spiranju s puferom PBS in dodajanjem barvila kristal vijolično.

2.3.7 Difuzija naravnih učinkovin izolatov vrtnegog ognjiča na trdo gojišče

Na petrijeve plošče s hranilnim agarjem (NA, Italija) smo, iz tekočega gojišča bakterije *E. coli*, opravili konfluentni razmaz. Za izvedbo antimikrobne aktivnosti smo pripravili 6 sterilnih celuloznih diskov (s polmerom 6 mm) in jih impregnirali z 20 µL testnih raztopin, obeh tipov izolatov, s koncentracijami 150, 300 in 450 mg/mL. Za serijo poskusov z vodno-etanolnim pripravkom smo uporabili še raztopine s 50 in 75 vol. % in »surov« koncentriran vzorec. Pozitivno kontrolo je predstavljal disk z antibiotikom Bacitracin in še disk, na katerega smo nanesli 20 µL 10 % raztopine H₂O₂. Impregnacijo diskov smo izvedli z enako količino fiziološke raztopine, ki je predstavljala negativno kontrolo. Vzporedno smo v gojišče dodali tudi disk z nanosom 0,5 %

raztopine surfaktanta tween-20. Petrijevke z nanosi diskov in bakterijsko kulturo smo pri 37 °C inkubirali 24 ur. Antimikrobnna aktivnost je bila ocenjena na podlagi velikosti premera inhibicijske cone.

2.3.8 Mikroskopiranje

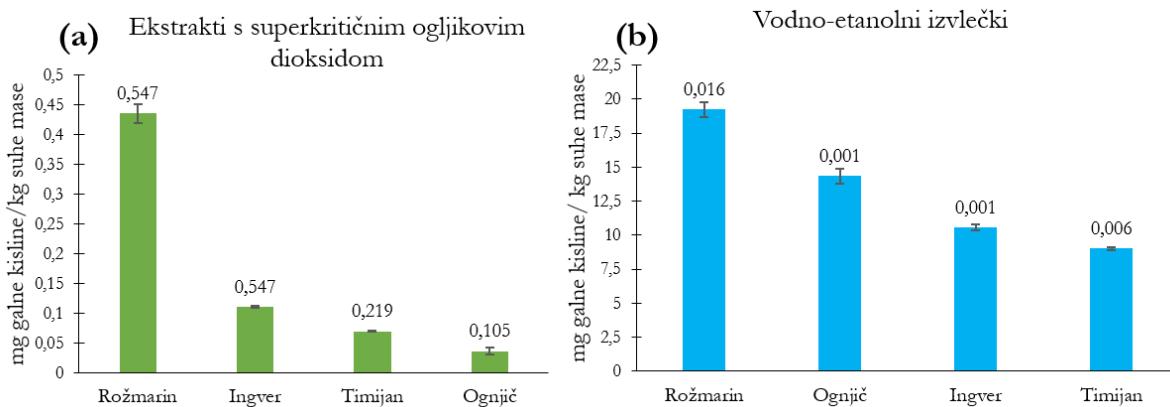
Po obdelavi biofilmov bakterije *E. coli* smo vzorce pregledali še s 40× povečavo, pod svetlobnim mikroskopom Motic AE31E (Kitajska). Pri analizi rezultatov smo nastale fotografije ustrezno opremili z merilom.

3 Rezultati

3.1 Rezultati kvantitativnih določanj skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo preučevali z uporabo reagenta Folin-Ciocalteu in merjenjem absorbance pri 760 nm.

Rezultati kvantitativnih določanj kažejo, da so vodno-etanolni izvlečki, v primerjavi z ekstrakti s sc-CO₂, vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolnih spojin (**Slika 12**).



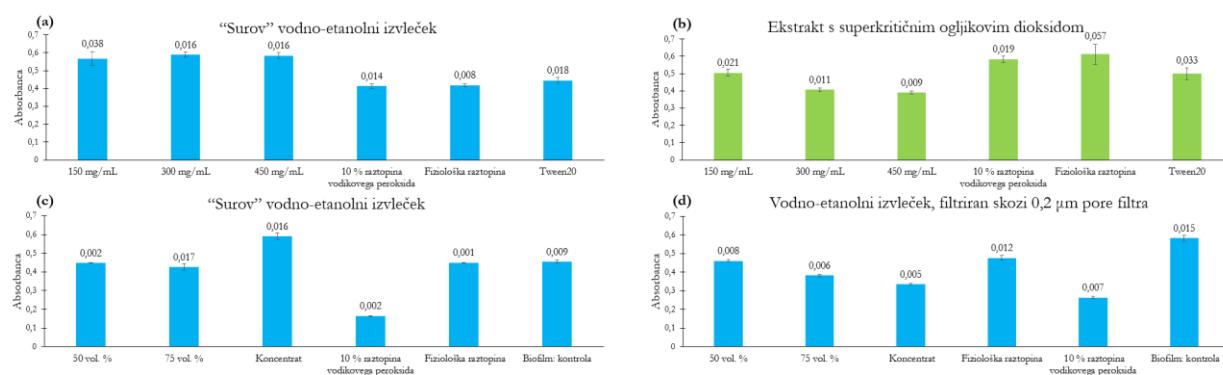
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v izolatih rastlin v analiziranih vzorcih.

Izmed vseh obravnavanih vzorcev, je najvišjo vsebnost skupnih fenolnih spojin dosegal vodno-etanolni izvleček rožmarina in najmanj pripravek timijana (primerjalno glede na isto tehniko izolacije). Glede na pripravo vzorca s pomočjo sc-CO₂ je ekstrakt ognjiča vseboval najmanj skupnih fenolnih spojin, nekoliko višjo vsebnost smo zaznali pri ekstraktu timijana in ingverja ter najvišjo pri rožmarinu.

Vodno-etanolni pripravek ognjiča je vseboval 14,34 in njegov ekstrakt s sc-CO₂ 0,036 mg galne kisline/kg suhe snovi. Opazimo, da je skozi vse analizirane vzorce veljal trend, da je vodno-etanolna tehnika ekstrakcije (maceracija), v primerjavi s tehniko sc-CO₂, iz istega rastlinskega vira omogočala večji donos skupnih fenolnih spojin. Razlog za takšno nihanje rezultatov se skriva v kemijski sestavi vzorca in polarnosti njegovih komponent, kot tudi tipu vzorca (ingver: *korenika*, ognjič: *cvetovi* ter timijan in rožmarin: *listi*), sezoni nabiranja, podnebju, sestavi tal, in podobno.

3.2 Rezultati vpliva izolatov vrtnegog ognjiča na tvorbo biofilma bakterije *E. coli*

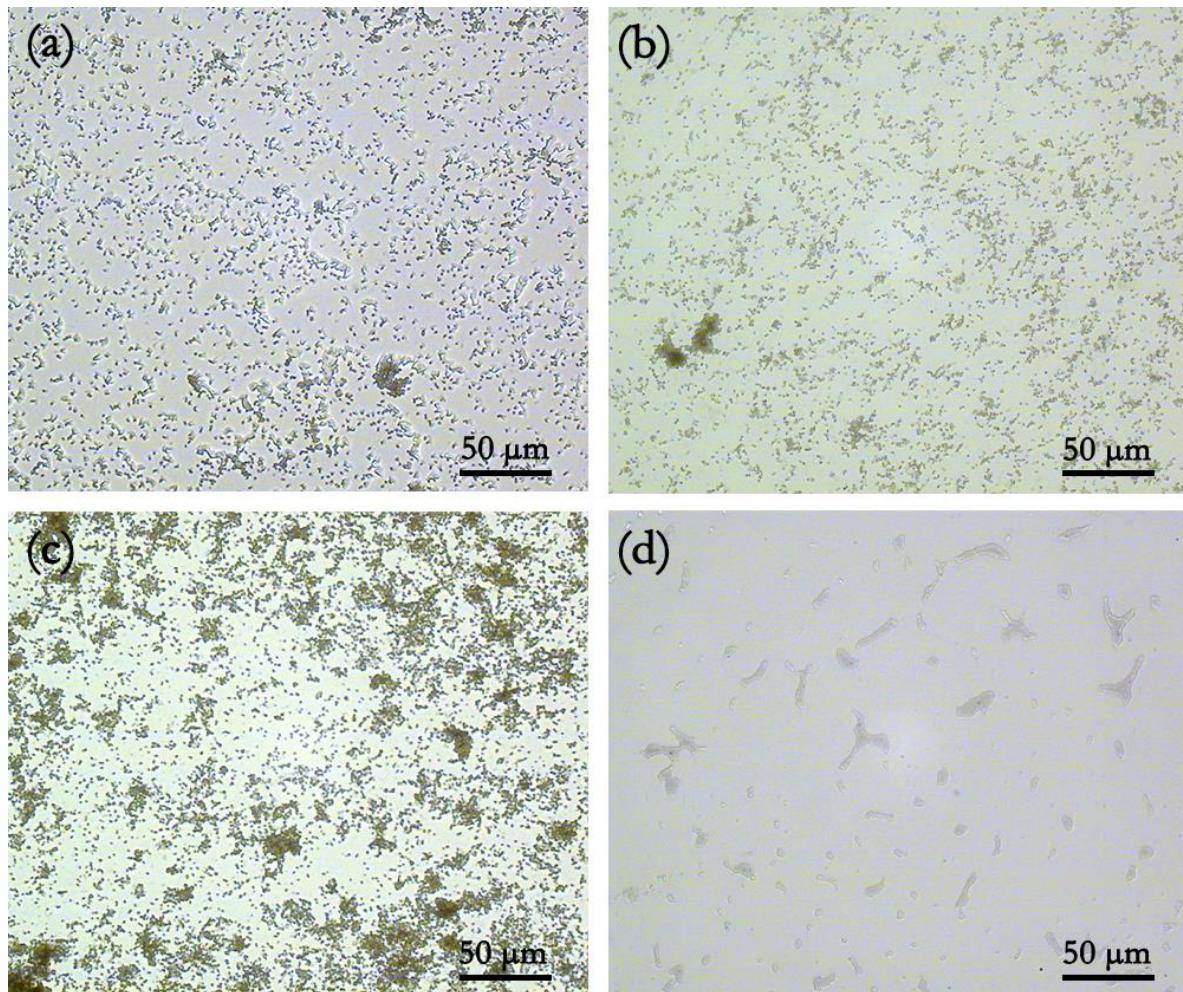
Rezultate vpliva izolatov vrtnegog ognjiča na biofilm bakterije *E. coli* smo podali kot OD etanolnih ekstraktov barvila kristal vijolično, po barvanju pritrjenih celic (**Slika 13**). Na podlagi izmerjene OD lahko tako sklepamo na količino pritrjenih celic, na katere se je vezalo barvilo. Velja sorazmernost; večja kot je izmerjena OD, večja je količina vezanega barvila. Iz slednjega lahko zaključimo, da je tako bila v vzorcu prisotna večja koncentracija celic, ki so tvorile biofilm.



Slika 13: Rezultati določanja vpliva naravnih izolatov učinkovin vrtnegog ognjiča na biofilm bakterije *E. coli*.

Prva serija poskusov z apliciranim »surovim« vodno-etanolnim izvlečkom (**Slika 13 (a)**) ni izkazovala učinka delovanja na biofilm *E. coli*. Količina ekstrahiranega barvila je bila, v primerjavi s kontrolno fiziološko raztopino, celo višja. Ekstrakt s sc-CO₂, s koncentracijo 450 mg/mL, je izkazoval nekoliko boljšo aktivnost, v primerjavi s fiziološko raztopino se je biofilm zmanjšal za 36 %. Opazimo lahko, da delovanje učinkovin ekstrakta narašča s koncentracijo (**Slika 13 (b)**). Druga serija poskusov s »surovim« vodno-etanolnim izvlečkom (**Slika 13 (c)**) prikazuje, da je največjo aktivnost pri zaviranju tvorbe biofilma modelne bakterije izkazoval vzorec s 75 vol. %. V slednjem primeru se je tvorba biofilma, glede na kontrolni vzorec, zmanjšala za 7 %. Po tretji aplikaciji z uporabo, skozi 0,20 µm pore filtra, filtriranega vodno-etanolnega izvlečka, je mogoče spremljati kako s povečevanjem koncentracije vzorca učinkujemo na zaviranje rasti biofilma bakterije *E. coli* (**Slika 13 (d)**). Koncentrat izvlečka je, glede na kontrolo, uspešno razgradil 42 % biofilma.

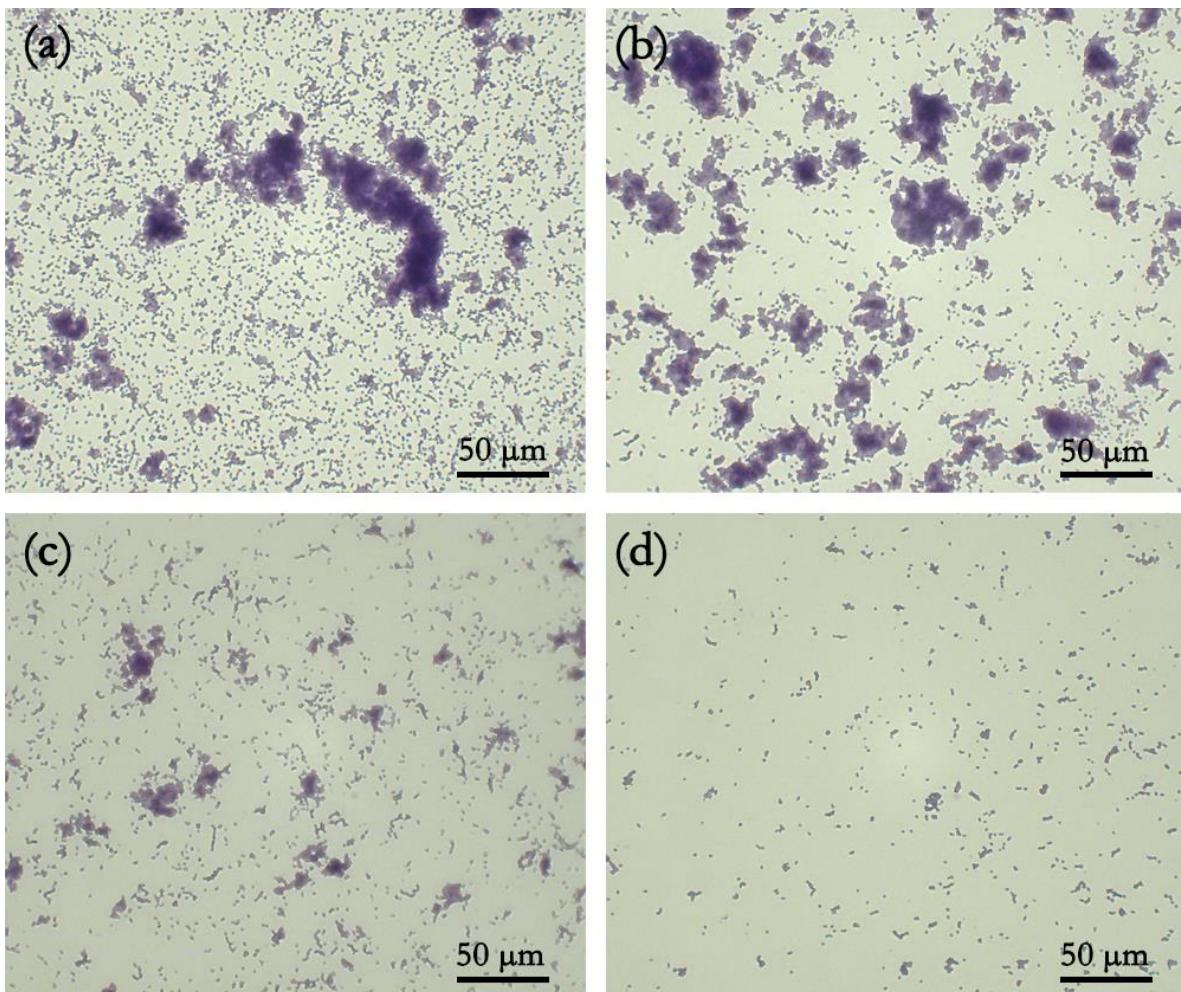
3.3 Rezultati mikroskopiranj pri proučevanju vpliva izolatov vrtnega ognjiča na tvorbo biofilma bakterije *E. coli*



Slika 14: Spremljanje vpliva delovanja učinkovin »surovega« vodno-etanolnega izvlečka na biofilm *E. coli*. Bakterijski biofilm, tretiran: (a) s 50 vol. % izvlečka, (b) s 75 vol. % izvlečka, (c) s koncentratom izvlečka in (d) z 10 % vodikovim peroksidom.

»Surovi« oz. nefiltrirani vzorci vodno-etanolnega izvlečka so glede na morfologijo vsebovali zdrobljene dele rastlinskega materiala, kar najverjetneje lahko kažejo potencialno oviro pri uporabi metode barvanja s kristal vijoličnim, saj se obarvajo tudi delci rastlin. Raztopina z vsebnostjo aktivnih učinkovin izolata 50 vol. % (Slika 14 (a)), je poleg bakterijskih struktur vsebovala veliko, prej omenjenih, zelenih struktur delcev, spominjajoč na dele rastlinskega materiala. Količina slednjih delcev narašča skupaj s koncentracijo izolata v končni raztopini. V vzorcu s 75 vol. % izvlečka (Slika 14 (b)) jih je nekoliko več, glede na predhodni vol. %, lahko tu zaznamo nekaj večjih skupkov delcev. Največja koncentracija opisanih delcev je opazna pri vzorcu koncentrata (Slika 14 (c)), kjer so poleg skupkov opazni že večji aglomerati delcev. Pozitivna kontrola, 10 %

raztopina H_2O_2 (**Slika 14 (d)**), je izkazala učinkovito preprečevanje rasti bakterij in biofilma testiranega modelnega organizma.



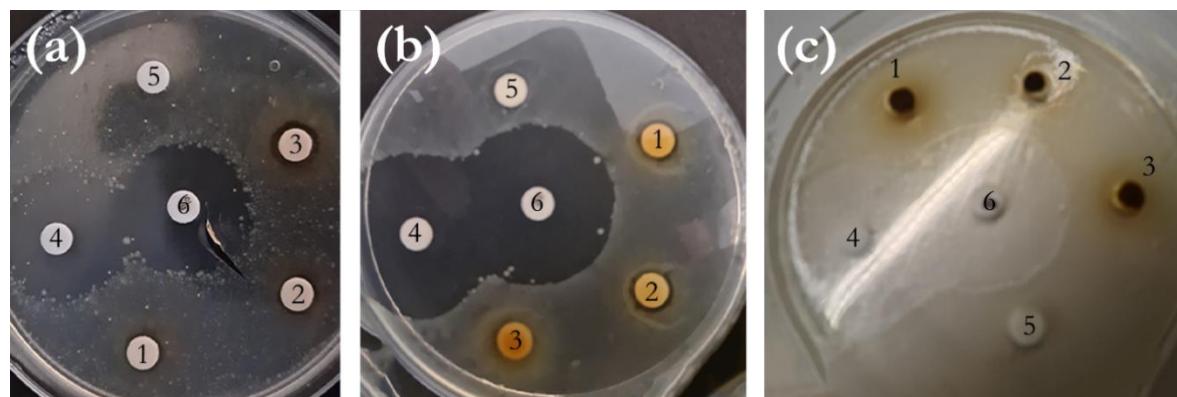
Slika 15: Spremljanje vpliva delovanja učinkovin vodno-etanolnega izvlečka na biofilm *E. coli*. Bakterijski biofilm, tretiran: (a) s 50 vol. % izvlečka, (b) s 75 vol. % izvlečka, (c) s koncentratom izvlečka in (d) z 10 % vodikovim peroksidom.

Rezultati filtriranih vzorcev raztopin izkazujejo popolnoma drugačno sestavo. Raztopina z vsebnostjo aktivnih učinkovin izolata 50 vol. % (**Slika 15 (a)**) je še vsebovala veliko število, v večje skupke združenih, bakterij *E. coli*. V raztopini s povečanim deležem izolata, 75 vol. % (**Slika 15 (b)**), se skupki bakterijskih delcev že nekoliko razredčijo, manj je tudi posameznih bakterijskih celic. Filtriran koncentrat (**Slika 15 (c)**) izkazuje več manjših skupkov bakterij. Vidimo lahko, da večja kot je koncentracija, manj je biofilma in prisotnih je več posamičnih bakterij *E. coli*. Glede na rezultate pozitivne kontrole v prejšnjem primeru (**Slika 14 (d)**), smo tudi v tem poskusu dokazali, da ima 10 % raztopina vodikovega peroksida (**Slika 15 (c)**) antibiofilmsko delovanje. Zaznamo manj bakterijskih skupkov in tudi zmanjšano število posameznih bakterij.

3.4 Rezultati difuzije naravnih učinkovin izolatov vrtnega ognjiča na trdo gojišče

Skozi spremljanje difuzije izolatov vrtnega ognjiča na trdo gojišče (**Slika 16**) smo z nanosi različnih koncentracij izolatov izmerili inhibičjske cone (**Tabela 2**). Antimikrobnlo delovanje vodno-etanolnega pripravka (**Slika 16 (a)** in **(b)**) se je pojavilo v seriji poskusov, z nanosom 50 in 75 vol. % ter koncentrata, in raztopin s koncentracijami 150, 300 in 450 mg/mL. Med vsemi obravnavanimi raztopinami je koncentrat vodno-etanolnega pripravka izkazoval najvišjo cono inhibicije (11 mm). **Slika 16 (b)**, na diskih z nanosom izolata s koncentracijo 150 (1) in 300 mg/mL (2), prikazuje nastanek inhibičjske cone, vendar je le-ta glede na prej omenjen koncentrat in pozitivne kontrole zanemarljivih velikosti. Najvišja koncentracija redčenih vodno-etanolnih pripravkov, t.j. 450 mg/mL, na gojišče kulture ni izkazovala učinka. Cona inhibicije ni bila opažena. Kot antimikrobnlo nedelujoči so med vsemi testiranimi vzorci izkazovali prav ekstrakti s sc-CO₂ (**Slika 16 (c)**). Noben izmed diskov ni pokazal vidne inhibičjske cone. Tudi surfaktant tween-20 v 0,5 % raztopini ni pokazal ustreznega delovanja. Po pričakovanjih se cona inhibicije ni pojavila tudi pri fiziološki raztopini.

Pozitivni kontroli, 10 % raztopina vodikovega peroksida in antibiotik Bacitracin, sta bili po pričakovanjih učinkoviti, saj je bila njuna inhibičjska cona 25 mm (**Tabela 2**).



Slika 16: Difuzija izolatov vrtnega ognjiča na trdo gojišče z bakterijo *E. coli*. **(a)** »Surov« vodno-etanolni pripravek z nanosom raztopin 50, 70 vol. % in koncentrata. **(b)** »Surov« vodno-etanolni pripravek in **(c)** ekstrakt s sc-CO₂ z nanosom raztopin s koncentracijami 150, 300 in 450 mg/mL. Kjer (1) prikazuje nanos najnižje koncentracije, (2) srednje vsebnosti in (3) najvišje testirano koncentracijo. (4) Prikazuje nanos pozitivne kontrole, t.j. 10 % raztopine vodikovega peroksida, (5) fiziološka raztopina kot negativna kontrola in (6) celulozni disk s standardnim antibiotikom Bacitracin (10 µg/mL).

Tabela 2: Premer inhibicijskih konc pri difuziji izolatov vrtnegog ognjiča na bakterijo *E. coli*.

<i>Testirana snov</i>	<i>Premer inhibicijske cone [mm] (± 1 mm)</i>
10 % H ₂ O ₂	25
Antibiotik Bacitracin (10 µg/mL).	25
Vodno-etanolni pripravek, 75 vol.%	7,3
Vodno-etanolni pripravek, 50 vol. %	7,8
Vodno-etanolni pripravek, koncentrat	11
Vodno-etanolni pripravek, 150 mg/mL	6,4
Vodno-etanolni pripravek, 300 mg/mL	6,7
Vodno-etanolni pripravek, 450 mg/mL	/
Ekstrakt s sc-CO ₂ , 150 mg/mL	/
Ekstrakt s sc-CO ₂ , 300 mg/mL	/
Ekstrakt s sc-CO ₂ , 450 mg/mL	/
Fiziološka raztopina	/
Tween-20	/

4 Razprava

Človek se v svojem iskanju za okolju prijaznejše in bolj »zelene« metode, tehnike in različne materiale, vedno pogosteje zateka v kraljestvo rastlin. Slednje so skozi čas, s procesom evolucije, razvile mnoge zanimive mehanizme, s katerimi so si izboljšale življenje in povečale možnosti za preživetje. Omenjeno vključuje tudi načine obrambe pred napadalci in paraziti oz. načine privabljanja oprševalcev. V svoj krog življenja so rastline vključile tudi zanimive molekule, ki jih skladno z okoljem, v katerih uspevajo, tudi sintetizirajo. Mnoge od njih so zavite še v skrivnosti in čakajo, da znanstveniki v njih prepozna veljavo. Od epidemije koronavirusa in vse do danes, smo pripadniki naravoslovnih znanosti splošni javnosti razlagali mnoge zapletene izraze. Zdi se nam, da smo kot družba, v sebi že ponotranjili izraze kot so: sterilizacija, razkuževanje, protivirusno in antibakterijsko delovanje. Prav slednje, antibakterijsko delovanje, je zajemalo pričajoče raziskovalno delo. Ko smo med prijatelji in starši razširili vest o raziskovalnem delu na področju proučevanja antibakterijskega in antibiofilmskega delovanja bakterij s pomočjo naravnih učinkovin, smo poželi navdušenje nad znanostjo in poglobljene debate v naši okolici, ki so nas motivirale, da z delom po začrtani poti tudi nadaljujemo.

Raziskovalno delo naravnih učinkovin vrtnega ognjiča zajema interdisciplinarno povezovanje bioloških, mikrobioloških in kemijskih pristopov. Vse z namenom razumeti relacijo med učinkovino in njen aktivnostjo ter strmenju skupnemu cilju – delati dobro za planet ter racionalno in spoštljivo koristiti vire, ki jih ponuja narava.

V prvem delu raziskovanja smo z merjenjem optične gostote, ob pomoči reagenta Folin-Ciocalteu, poleg vodno-etanolnega pripravka in s sc-CO₂ pripravljenega ekstrakta vrtnega ognjiča, kvantitativno določili vsebnost skupnih fenolnih spojin še v izolatih ingverja timijana in rožmarina. Zaradi pomanjkanja literurnih podatkov o mikrobioloških testiranjih učinkovin vrtnega ognjiča, smo v nadaljevanju svojo pozornost usmerili prav ognjiču. V veliko zadovoljstvo nam bo prispevati svoj pristop raziskovanja v mozaik tovrstnih raziskav. Rezultati meritev skupnih fenolnih spojin so pokazali, da je njihova vsebnost v vodno-etanolnih izvlečkih bistveno višja od tistih pripravljenih z ekstrakcijo s sc-CO₂. Razlog vidimo prav v kemijski sestavi izolata, predvsem polarnosti komponent. Kombinacija polarne vode in etanola je iz suhe mešanice izlužila večji odstotek snovi s polarnim značajem. Ker so fenolne spojine polarnega značaja ni bilo presenečenje za omenjeno nihanje rezultatov. Superkritični plin (CO₂) je iz mešanice rastlinskega materiala ekstrahiral veliko količino nizkopolarnih komponent vzorca, zato je tehnika s superkritičnim plinom primerna za separacijo večjega donosa lipofilnih molekul. Glede na količino določenih

skupnih fenolnih spojin, smo v nadaljevanju večjo pozornost namenili vodno-etanolnim pripravkom.

Pri študiju delovanja naravnih učinkovin vrtnega ognjiča na biofilm bakterije *E. coli* smo se soočili s tehniko razapljanja superkritičnega ekstrakta v destilirani vodi. Vzrok težave je že prej omenjena njegova nizka polarnost, kar se izraža v očitni hidrofobnosti do vode. Santoyo in sodelavci (2005) so pri aplikaciji rožmarinovega superkritičnega ekstrakta uporabili surfaktant tween-20, zato smo sledili njihovem protokolu. Ker ima na področju mikrobiologije tween-20 mnoge znane učinke na bakterije, smo vzporedno z naravnimi učinkovinami ter pozitivno in negativno kontrolo izvajali še dodatno kontrolno paralelko z njim. Ker je vodno-etanolni izvleček po izolaciji vseboval še 20 % topila etanola, je bilo potrebno njegovo vsebnost pred aplikacijo najprej odstraniti, sicer bi že sam lahko deloval antibakterijsko. Prva serija poskusov z vodno-etanolnim izvlečkom je po tretiranju z nizkimi koncentracijami izolata (150, 300 in 450 mg/mL), glede na fiziološko raztopino, pokazala večje vrednosti izmerjene OD (že pri 150 mg/mL je bila OD vzorca, v primerjavi s fiziološko raztopino, višja za 36 %). Serijo smo nato ponovili s povišanimi vsebnostmi izolata (50, 75 vol. % in koncentrat). Z izjemo »surovega« koncentrata (31 % povečanje), rezultati meritve OD niso presegli kontrole s fiziološko raztopino. Po pregledu vzorcev s svetlobnim mikroskopom, smo ugotovili, da vzorci vsebujejo delce, na katere se je absorbiralo barvilo kristal vijolično. Skupki delcev, ki so v raztopini ostali po pripravi izolata, so nanje vezana barvila predstavljala razlog povečanja vrednosti izmerjene OD v vzorcih. Iste vzorce smo nato filtrirali skozi mikronske filtre; najprej skozi 0,45 in nato še skozi 0,20 µm. Pokazalo smo linearni trend in ugotovili, da je koncentrat vodno-etanolnega izvlečka, glede na kontrolo, uspešno razgradil 42 % biofilma. Ekstrakt s sc-CO₂, s koncentracijo 450 mg/mL, je izkazoval nekoliko manjšo aktivnost, v primerjavi s fiziološko raztopino. Glede na izmerjeno OD se je količina biofilma zmanjšal za 36 %. Opazimo lahko, da delovanje učinkovin ekstrakta narašča s koncentracijo.

Pokazali smo, da je za antimikrobnl vpliv učinkovin vrtnega ognjiča na *E. coli* potrebna sorazmerno visoka koncentracija ekstrakta. Med drugim smo prav tako pokazali, da je vodno-etanolna ekstrakcija bolj učinkovita pri izluževanju antimikrobnih komponent ognjiča. Ker na trdnem gojišču z ekstrakti sc-CO₂ na kulturo mikroorganizma, nismo zaznali inhibicijske cone, celostno gledano, vzorec ni primeren za nadaljnje aplikacije. Prav tako slednje potreujejo meritve skupnih fenolnih spojin, saj vzorec ni bil bogat z njimi. Najvišjo cono inhibicije rasti *E. coli* je izkazoval koncentriran vzorec. Za nadaljnje aplikacije bi bilo na stopnji industrijske izolacije smiselno uporabiti nižje odmerke vode ali le-to naknadno izločiti iz vzorca po ekstrakciji, tako bo koncentriran vzorec bolj bogat z učinkovinami in bo verjetno deloval učinkoviteje.

Ob umestitvi rezultatov našega dela v prostor, ki ga zasedajo uveljavljeni raziskovalci, smo prišli do zanimivih ugotovitev. Inhibičjske cone na trdih gojiščih, ki jih je dosegel Efstratiou sodelavci (2012), so za nekatere izmed sevov *E. coli*, presegale premer 11 mm. V našem primeru je rezultat dokaj primerljiv z njihovo, na antibiotik ampicilin odporno *E. coli*, kjer je ob uporabi vodno-etanolnega izvlečka nastala okoli 10 mm (10 ± 1 mm) inhibičjska cona. Tudi sev, uporabljen v naši raziskavi, ATCC 35218, ima izraženo odpornost na ampicilin (Gulás idr., 2020). Glede na izkušnje in študirano literaturo sumimo, da verjetno obstaja povezava med odpornostjo bakterije *E. coli* na ampicilin, in odpornostjo na vodo-etanolni ekstrakt vrtnegog ognjiča. Slednje bi bil tudi izziv preizkusiti. Efstratiou je sodelavci (2012) cono inhibicije 10 mm dosegel že z uporabo raztopine s koncentracijo 300 mg/mL. V našem primeru smo za 11 mm cono inhibicije morali poseči po koncentratu vodno-etanolnega izvlečka. Zanimivost odražajo tudi rezultati prve serije difuzijskih testov vodno-etanolnih izvlečkov (koncentracije 150, 300 in 450 mg/mL). Visok učinek je proti pričakovanjem pokazala koncentracija 300 mg/mL, t.j. identična koncentracija ki jo je pri delu uporabil Efstratiou sodelavci (2012). Z gotovostjo ne moremo trditi, da ima vodno-etanolni pripravek pri višjih koncentracijah slabše delovanje, saj je v nadalnjem testiranju koncentrat pokazal najvišje delovanje. Razlogov za odstopanja bi bilo lahko več, v prvi vrsti pripisujemo največ razlogov samemu postopku ekstrakcije (primer: metodologija, uporaba topil, in podobno). Na tem mestu je pomembno omeniti še okoliške parametre, dele uporabljeni rastline, vpliv letnega časa nabiranja delov rastline, kontinentalne razlike, in podobno.

5 Sklep

Po prebrani literaturi in zasnovi eksperimentalnega dela, smo si zastavili dve glavni hipotezi, ki sta nas kot rdeča nit vodili skozi celotno raziskovanje.

Predvidevali smo, da bodo vodno-etanolni izvlečki navadnega ognjiča in preostalih obravnavanih vzorcev, v primerjavi z ekstrakti s superkritičnim ogljikovim dioksidom, vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Takšen trend smo v veliki meri pripisali kemijski sestavi vzorca in izluženim komponentam, ki jih le-ta vsebuje.

Hipotezo, vezano na kvantitativno določanje skupni fenolnih spojin, lahko v celoti potrdimo. Pokazali smo, da so vodno-etanolni izvlečki vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolov. Razlog, kot omenjeno, se skriva v polarnosti izluženih komponent. Z uporabo superkritičnega ogljikovega dioksida smo opazili nastanek lipofilnih komponent vzorca in posledično določili nizko vsebnost skupnih fenolnih spojin. Za nadaljnje aplikacije, kjer potrebujemo vzorec bogat z antioksidanti oz. skupnimi fenolnimi spojinami, je, glede na rezultate smiselno poseči po vodno-etanolnih maceratih.

*Domnevali smo, da bosta izolata naravnih učinkovin vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) na bakterijo *Escherichia coli* učinkovala antimikrobnno in zavirala tvorbo biofilma. Rezultati učinkovitosti delovanja bi bili tako primerni za prenos znanja na področju razkuževanja površin, kjer je lahko prisotna *E. coli* (primer: obrati v živilski industriji, kuhinjski pulti, sanitarije).*

Tudi drugo hipotezo lahko potrdimo. Pokazali smo, da vodno-etanolni izvleček vsebuje zadostno količino biološko aktivnih učinkovin, ki delujejo pri antimikrobnem delovanju in inhibirajo rast biofilma bakterijske kulture. Ker fenolne spojine omejijo in ošibijo interakcijo med bakterijami in površino, razumemo, da povečana koncentracija le-teh lahko inhibira rast biofilma. Prav na primeru vodno-etanolnega koncentrata, z visoko vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, je bilo z analizo pod mikroskopom in merjenjem optične gostote, na celice vezanega barvila kristal vijolično, opaženo delovanje tovrstnih učinkovin. Odstranitev biofilma s površine je bila, glede na kontrolo, kar 42 %. Tudi ekstrakt s sc-CO₂ je pokazal delovanje lipofilnih učinkovin z naraščajočo koncentracijo. V nadaljevanju smo z difuzijo učinkovin vodno-etanolnega koncentrata na trdo gojišče modelne kulture še dodatno potrdili njihovo antimikrobnlo delovanje in prisotnost aktivnih učinkovin.

Rezultati učinkovitosti delovanja vodno-etanolnega koncentrata bi bili tako primerni za nadaljnje raziskovanje. Pri čemer slednji kaže potencialni primer prenosa znanja na področju odstranjevanja bakterij *E. coli* iz površin, v različnih obratih živilske industrije in drugih higienско tveganjih okoljih.

6 Viri

- Abasova, R. L., Aslanov, S. M., & Mamedova, M. É. (1994). Amino acids of *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(5), 641–641. <https://doi.org/10.1007/BF00629888>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>
- Ali Redha, A. (2021). Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(3), 878–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06641>
- Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46(3), 241–280.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2012). *Questions about the 2011 E. Coli Outbreak in Germany*. <https://www.cdc.gov/ecoli/general/germany.html>
- Conway, T., & Cohen, P. S. (2015). Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiology spectrum*, 3(3), 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014>
- Danielski, L., Campos, L. M. A. S., Bresciani, L. F. V., Hense, H., Yunes, R. A., & Ferreira, S. R. S. (2007). Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.004>
- Della Loggia, R., Becker, H., Issac, O., & Tubaro, A. (1990). Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Extracts. *Planta Medica*, 56(06), 658–658. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961314>
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2441–2469. <https://doi.org/10.1021/jf052858j>
- Doyle, M. P. (2011). *FAQ: E. Coli: Good, Bad, & Deadly: “What is true for E. coli is true for the elephant”*. American Society for Microbiology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562895/>
- Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. A., & Rao, J. R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(3), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>
- Ekici, G., & Dümen, E. (2019). *Escherichia coli* and Food Safety. V *The Universe of Escherichia coli [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82375>
- Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., & Brenner, H. (2007). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: Overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(2), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0248-2>
- Escherichia coli* (*E. coli*) v živilih. (2013). NIJZ-center za zdravstveno ekologijo. https://nijz.si/wp-content/uploads/2022/10/e.coli_v_zivilih_5.9.2022.pdf
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>

- Frankic, T., Salobir, K., & Salobir, J. (2009). The comparison of in vivo antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(6), 688–694. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00855.x>
- Friedmann, H. C. (2006). Escherich and Escherichia. *Advances in Applied Microbiology*, 60, 133–196. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)60005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)60005-1)
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Svidzinski, T. I. E., & Cortez, D. A. G. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 39(1), 61–63. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000015>
- Gleizer, S., Ben-Nissan, R., & Bar-On, Y. M. (2019). Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO₂: Cell. *Cell*, 179(6), 1255–1263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.009>
- Gulás, Ó., McKenzie, G., Bayó, M., Agut, M., & Nonell, S. (2020). Effective Photodynamic Inactivation of 26 *Escherichia coli* Strains with Different Antibiotic Susceptibility Profiles: A Planktonic and Biofilm Study. *Antibiotics*, 9(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030098>
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
- Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 3.3.23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014>
- Jacotet-Navarro, M., Laguerre, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Tenon, M., Feuillère, N., Bily, A., & Chemat, F. (2018). What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.201700397>
- Jagani, S., Chelikani, R., & Kim, D.-S. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 25(4), 321–324. <https://doi.org/10.1080/08927010802660854>
- Jeran, M., Romolo, A., Spasovski, V., Hočevar, M., Novak, U., Štukelj, R., Šuštar, V., Kisovec, M., Bedina Zavec, A., Kogej, K., Iglič, A., Trebše, P., & Kralj-Iglič, V. (2023). Small Cellular Particles from European Spruce Needle Homogenate. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/ijms24054349>
- Jiménez-Medina, E., Garcia-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., & Garrido, F. (2006). A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual in vitroeffect: Cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, 6(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-119>
- John, R., & Jan, D. (2017). Calendula Officinalis-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 93. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/49126>
- Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D. (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 51(4), 176–180. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(97\)85587-4](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(97)85587-4)

- Kang, J.-W., Lee, H.-Y., & Kang, D.-H. (2021). Synergistic bactericidal effect of hot water with citric acid against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formed on stainless steel. *Food Microbiology*, 95, 103676. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103676>
- Kazemnia, A., Ahmadi, M., & Dilmaghani, M. (2014). Antibiotic Resistance Pattern of Different *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Isolated from Human Urinary Tract Infection and Avian Colibacillosis. *Iranian Biomedical Journal*, 18(4), 219–224. <https://doi.org/10.6091/ibj.1394.2014>
- Khalid, K., & Teixeira da Silva, J. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn.: Focus on Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6, 12–27.
- Kočevar, G. N. (2018). Pridobivanje in vrednotenje rastlinskih izvlčkov. *Farmacevtski vestnik*, 69.
- Kothe, H. (2009). *Zelišča* (str. 74–75). Učila International.
- Kramberger, K., & Kočevar, G. N. (2019). Rastlinski izvlečki ekstrakcije s superkritičnimi tekocinami in njihova uporaba. *Farmacevtski vestnik*, 70.
- Lawrence, J. G., & Roth, J. R. (1996). Evolution of Coenzyme B(12) Synthesis among Enteric Bacteria: Evidence for Loss and Reacquisition of a Multigene Complex. *Genetics*, 142(1), 11–24.
- Luna-Guevara, Ma. L., Luna-Guevara, J. J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., & Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. V *Studies in Natural Products Chemistry* (Let. 59, str. 79–108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>
- Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm Formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Stainless Steel Coupons as Affected by Temperature and Incubation Time. *Microorganisms*, 7(4), 95. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040095>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D., & Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of Microorganisms* (13th izd.). Benjamin Cummings.
- Mayo Clinic. (2022a). *Pelvic inflammatory disease (PID)—Symptoms and causes*. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pelvic-inflammatory-disease/symptoms-causes/syc-20352594>
- Mayo Clinic. (2022b). *Urinary tract infection (UTI)—Symptoms and causes*. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/urinary-tract-infection/symptoms-causes/syc-20353447>
- Oder, M., & Fink, R. (2019). Biofilm formation capacity of *Bacillus cereus* on silicone, polyethylene terephthalate, Teflon, and aluminium food contact materials. *Sanitarno Inženirstvo International Journal of Sanitary Engineering Research*, 13(1), 4–11. <https://doi.org/10.2478/ijser-2019-0002>
- Perveen, S. (2018). Introductory Chapter. V *Terpenes and Terpenoids*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>
- Raal, A., & Kirsipuu, K. (2011). Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research*, 25(6), 658–662. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.528417>
- Rajan, N., Tiwari, S., Baath, R., & Dwivedi, U. (2021). Phytochemical Screening of Ethanolic extract of *Calendula Officinalis*. *The International journal of analytical and experimental modal analysis*, 1206–1216.

- Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., & Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37(8), 1685–1690. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00569-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00569-9)
- Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., & Rosini, R. (2018). Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Frontiers in Microbiology*, 9, 440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>
- Roleira, F. M. F., Varela, C. L., Costa, S. C., & Tavares-da-Silva, E. J. (2018). Chapter 4 - Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. V Atta-ur-Rahman (Ur.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Let. 57, str. 115–156). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449–456. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2)
- Santoyo, S., Caverio, S., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4), 790–795. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.790>
- Švent, T. (2012). *Spektrofotometrično merjenje fluorescence, fosforence in sisanja* [Diplomsko delo]. Univerza v Mariboru, fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Tom, J. (2023). UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications. *Analysis & Separations from Technology Networks*. <http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>
- Ul'chenko, N. T., Glushenkova, A. I., & Mukhamedova, Kh. S. (1998). Lipids of *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 34(3), 272–274. <https://doi.org/10.1007/BF02282400>
- Vo, K. (2013, oktober 2). *Spectrophotometry*. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)
- Wang, Y., Lee, S. M., & Dykes, G. A. (2013). Potential mechanisms for the effects of tea extracts on the attachment, biofilm formation and cell size of *Streptococcus mutans*. *Biofouling*, 29(3), 307–318. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.774377>
- Waszkowiak, K., & Gliszczynska-Świglo, A. (2016). Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. *European Food Research and Technology*, 242. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2585-9>
- Zhang, L., Chen, J., Wang, Y., Wu, D., & Xu, M. (2010). Phenolic Extracts from *Acacia mangium* Bark and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 15(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/molecules15053567>
- Zhou, F., Wang, D., Hu, J., Zhang, Y., Tan, B. K., & Lin, S. (2022). Control Measurements of *Escherichia coli* Biofilm: A Review. *Foods*, 11(16), Art. 16. <https://doi.org/10.3390/foods11162469>
- Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2015). Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. *PLoS ONE*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138209>