



**OŠ SPODNJA ŠIŠKA
LJUBLJANA**

Protibakterijski učinek travniških rastlin
RAZISKOVALNA NALOGA

BIOLOGIJA

MENTORICA:

prof. Lota Gasser Vončina

AVTORICA:

Manica Kužner, 8. c

SOMENTORICA:

doc. dr. Sabina Berne

LJUBLJANA, MAREC 2024

Biologija

Naslov naloge: Protibakterijski učinek travniških rastlin

Avtorica: Manica Kužner

Mentorica: prof. Lota Gasser Vončina

Somentorica: doc. dr. Sabina Berne

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorici prof. Loti Gasser Vončina, ki mi je omogočila raziskovanje.

Hvala tudi doc. dr. Sabini Berne, ki me je spremljala in usmerjala skozi celotno delo ter me usmerjala pri delu v laboratoriju.

Seveda pa ne smemo spregledati vodje Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin ULBF, prof. dr. Jerneja Jakšeta, ki nam je omogočil delo v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Barbari Jeršek s Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ULBF, ki nam je prijazno odstopila sev *Staphylococcus aureus*.

Zahvalila bi se tudi mojima staršema, ki sta mi pomagala razumeti tujo literaturo, poiskati prave besede in me spremljala skozi celotno raziskovanje.

Hvala tudi lektorici, dr. Savi Smerkolj, ki je izpopolnila nalogo in odpravila še zadnje slovnične napake.

Zahvaljujem se tudi zeleni čarovnici dr. Tini Mele, ki mi je svetovala pri izbiri zelišč.

Delo v laboratoriju mi je bilo zelo zanimivo. Naučila sem se veliko tudi o tem, kako antibiotiki delujejo na bakterijsko celico ter o zdravilnih učinkih rastlin, ki jih je veliko več, kot sem sprva mislila. Ugotovila sem, da do pomembnih odkritij vodijo številni poskusi, saj na rezultate vplivajo številni dejavniki, ki jih z enim poskusom ne moreš zajeti.

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	3
KAZALO VSEBINE	4
KAZALO SLIK	6
KAZALO TABEL	9
1. POVZETEK	10
2. PREDGOVOR	11
4. TEORETIČNI DEL	12
4.1 Travniki	12
4.2 Zelišča	12
4.2.1 Navadna smetlika	13
4.2.2 Navadni rman	13
4.2.3 Širokolistni trpotec	14
4.2.4 Navadna črnoglavka	15
4.2.5 Travniška kadulja	16
4.2.6 Poljski timijan	17
4.2.7 Navadni pelin	18
4.2.8 Prava kamilica	19
4.2.9 Šentjanževka	19
4.2.10 Divji origano	20
4.3 Protibakterijski učinek	21
4.3.1 Protibakterijske učinkovine naravnega izvora	23
	4

4.4	Bakterije	23
4.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
4.4.2	<i>Escherichia coli</i>	26
5.	EMPIRIČNI DEL	28
5.1	Namen	28
5.2	Hipoteze	28
5.3	Materiali in metode	28
5.3.1.	Materiali	28
5.3.2	Nabiranje rastlin	30
5.3.3	Priprava etanolnih izvlečkov	32
5.3.4	Priprava vodnih izvlečkov	33
5.3.5	Oživitev kulture seva <i>S. aureus</i> (ŽM72, vir ATCC 25923)	33
6.	MOJE UGOTOVITVE IN RAZPRAVA	35
7.	ZAKLJUČEK	42
8.	LITERATURA	43

KAZALO SLIK

Slika 1. Cvetovi navadne smetlike (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2030>)

Slika 2. Navadni rman (<https://www.mojaobcina.si/litija/novice/achillea-millefolium-rman.html>)

Slika 3. Širokolistni trpotec (<https://www.urbanatura.si/vsebina/1385#gallery->)

Slika 4. Navadna črnoglavka (https://www.hribi.net/slika_rastlina/navadna_crnoglavka_prunella_vulgaris/5137)

Slika 5. Travniška kadulja (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2098#gallery-12>)

Slika 6. Poljski timijan (<https://www.semina.si/katalog/posebne-linije/herbal-line/rs-herbal-line-divji-timijan-polajeva-materina-dusica-thymus-pulegoides/>)

Slika 7. Navadni pelin (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2390#gallery-2>)

Slika 8. Prava kamilica (<https://herbessa.si/blogs/blog-zelisc/kamilica-matricaria-recutita>)

Slika 9. Šentjanževka (<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet/krcnicevke/sentjanzevka>)

Slika 10. Divji origano (https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&sca_esv=601107417&hl=sl&q=divji+origano&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiCq6Ces_aDAxVPg_0HHSxBUAQ0pQJegQICxAB&biw=1680&bih=922&dpr=1.4 - imgsrc=m-I6Bu6nhkbIBM)
(<https://www.oaza-zelisc.si/eo-divji-origano>)

Slika 11: Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin na bakterijsko celico (prirejeno po Eyler in Shvets, 2019)

Slika 12. Celična stena po Gramu negativnih (levo) in po Gramu pozitivnih bakterij (desno) (Mesec, 2014).

Slika 13. *S. aureus* – barvanje po Gramu

(<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-cocci/staphylococci/catalase-positive/staphaurex-positive/staphylococcus-aureus.html>)

Slika 14. *E. coli* – barvanje po Gramu

(<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/catalase-negative-7/colistin-susceptible-2/escherichia-coli-o157-h7.html>)

Slika 15. Sveže nabrani deli rastlin, ki sem jih uporabila za poskus protibakterijskega učinka: levo divji origano, desno šentjanževka

Slika 16. Trenje rastlinskega materiala v terilnici

Slika 17. Redčenje rastlinskih izvlečkov na delovno koncentracijo 50 mg/ml

Slika 18. Oživitev kulture

Slika 19. Plošče z Mueller-Hintonovim gojiščem, pripravljene za testiranje po metodi difuzije z diski (Kirby-Bauerjev test).

Slika 20. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka poljskega timijana v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov oziroma 30-% etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+)

Slika 21. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka travniške kadulje v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov oziroma 30-% etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+)

Slika 22. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka travniške kadulje v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov oziroma 30-% etanol v primeru

etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+)

Slika 23. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka šentjanževke v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov oziroma 30-% etanolom v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+)

KAZALO TABEL

Tabela 1: Testirane travniške rastline

Tabela 2: Premer zaviralnega pasu pri vodnem izvlečku iz travniške kadulje

Tabela 3: Premer zaviralnega pasu pri etanolnem izvlečku iz šentjanževke

1. POVZETEK

Zelišča so rastline, ki vsebujejo različne učinkovine kot so eterična olja, grenčine in mineralne snovi. Poleg uporabe v prehrani in kozmetični industriji, se uporabljajo tudi v farmaciji, za zdravljenje različnih bolezni. V raziskovalni nalogi sem se osredotočila na zelišča, ki jih najdemo na travnikih.

O rastlinah sem najprej pridobila nekaj informacij iz literature, nato pa sem se odpravila raziskati njihov protibakterijski učinek. Zanimalo me je, ali bodo imele izbrane rastline protimikrobni učinek in v katerem izvlečku se bodo nahajale spojine z protimikrobnim izvlečkom.

Rastline sem nabrala na bližnjih travnikih. Poskuse sem opravila na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za agronomijo. Iz nabranih rastlin sem pripravila vodne in etanolne izvlečke ter jih testirala na ploščah z Mueller Hintonovim gojiščem, z uporabo difuzijske metode z diski. Za poskuse sem uporabila bakterijo *Staphylococcus aureus*, ki jo standardno uporabljajo za preskušanje protimikrobnega učinka.

Po podrobnem pregledu plošč na različnih podlagah, sem protimikrobni učinek opazila pri neredčenem vodnem izvlečku travniške kadulje in neredčenem etanolnem izvlečku šentjanževke. Ker sem bila nad rezultati kar malo razočarana, sem s pomočjo literature ugotovila, da na izolacijo in protimikrobno delovanje vplivajo številni dejavniki, od časa nabiranja, padavin, zrelosti rastline, delov rastlin, ki jih uporabimo, do načina priprave izvlečkov.

KLJUČNE BESEDE: zdravilne rastline, travniške rastline, protibakterijski učinek, metoda difuzije z diski

2. PREDGOVOR

Nekaj let nazaj mi je babica kupila knjigo z naslovom Zgodbe za otroke, ki si drznejo biti drugačni avtorja Bena Brooksa. V knjigi sem prebrala tudi o Tu Juju. V Vietnamu, kjer je živel, je v šestdesetih letih dvajsetega stoletja divjala vojna. Velik problem so predstavljale različne bolezni, med drugim tudi malarija. Bolezen so poskušali ozdraviti z vsemi mogočimi zdravili, vendar nobeno ni pomagalo. Tu Juju je s pomočjo tradicionalne kitajske medicine in z zdravilnimi zelišči poskusila najti zdravilo. Z rastlino sladki pelin ji je uspelo pozdraviti tako malarijo kot tudi tuberkulozo. Tudi mene je zanimalo, kakšne zdravilne učinke imajo različne rastline, ki jih pogosto srečujemo na naših travnikih. O rastlinah sem najprej skušala pridobiti nekaj podatkov iz literature, nato pa sem se še sama odpravila raziskat njihov zdravilni učinek. Ker sem v literaturi prebrala, da imajo rastline več zdravilnih učinkov, sem se osredotočila na protibakterijski učinek. Za svojo nalogo sem izbrala zelišča, ki jih najdemo na naših travnikih. To so navadna smetlika, navadni rman, širokolistni trpotec, navadna črnoglavka, travniška kadulja, poljski timijan ali materina dušica, prava kamilica in šentjanževka ter divji origano. Odpravila sem se na travnik in nabrala rastline. Nato sem jih odnesla v laboratorij na Biotehniški fakulteti in začela s poskusi.

4. TEORETIČNI DEL

4.1 TRAVNIKI

Travniki so rastlinske združbe, kjer prevladujejo predvsem trave, ki oblikujejo travno rušo. Skupaj z njimi pa glede na okoljske dejavnike uspevajo značilne zelnate trajnice in enoletnice ter nekatere, zlasti grmovne lesne vrste. Travišča delimo na naravna in polnaravna. Naravna travišča najdemo tam, kjer ni prisotnega človeškega delovanja in gozdne vegetacije, ki bi jih prerasla, polnaravna pa so posledica človeškega delovanja. Za travišča je značilna velika biotska pestrost (<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/zivljenjskiprostori>, <https://www.proteus.si/wpcontent/uploads/2023/08/Predstavitev-Vla%C5%BEni-travniki.pdf>).

4.2 ZELIŠČA

Zelišča so rastline, ki vsebujejo aromatične snovi in se uporabljajo v prehrani, farmaciji in kozmetični industriji. Vsebujejo različne učinkovine, kot so eterična olja, grenčine in mineralne snovi. Aromatična zelišča se običajno uporabljajo v kulinariki kot začimbe. S svojimi aromami lahko izboljšujejo ali pa celo spreminjajo okus hrane (Ody, 1994).

Zelišča, ki vsebujejo različne zdravilne učinkovine, se uporabljajo v medicini in farmaciji za izdelavo zdravil in drugih zdravilnih pripravkov. Veliko teh zelišč vsebuje tudi strupene spojine, zato moramo z njimi previdno ravnati (Ody, 1994). Zelišča in njihovo uporabo so sistematično popisali že v rimskih časih, npr. Pedanius Dioscorides: *De Materia Medica*, njihova uporaba pa se je ohranila do danes (Tsioutsiou s sod., 2022). V kozmetični industriji se za izdelavo dišav uporabljajo zelišča, ki vsebujejo veliko eteričnih olj. Zelišča kopičijo uporabne učinkovine v različnih delih rastlin, v cvetovih, nadzemnih delih rastlin, semenih in tudi v koreninah. Nekatera zelišča človek goji v svojih vrtovih, številna pa najdemo v naravi. Najprimernejši čas za nabiranje rastlin so suhi dnevi. Rastline nabiramo takrat, ko je koncentracija učinkovin največja, najpogostejše je to takrat, ko je rastlina zrela. Uporabimo lahko sveže ali posušene rastline, iz katerih pripravimo bodisi vodne, etanolne ali oljne izvlečke ter izvlečke v mešanici vode in etanola (tinkture) (Ody, 1994).

4.2.1 NAVADNA SMETLIKA

Navadna smetlika je enoletna rastlina, ki spada v družino črnobinovk. Rastlina zraste do 30 cm visoko. Listi so dolgi 3–17 mm, travnato zelene barve, jajčasto podolgovati in na robovih nazobčani. Cvetovi so beli, modri ali rdečkasto vijoličasti (Slika 1). Cvetijo od junija do septembra, odvisno od rastišča in vremenskih vplivov. Najdemo jo na pašnikih in travnikih po celotni Sloveniji (<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet/crnobinovke/navadna-smetlika>).



Slika 1. Cvetovi navadne smetlike (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2030>)

Za zdravilne namene so uporabni vsi nadzemni deli, ki jih nabiramo v času cvetenja. Zelišče deluje protivnetno tako pri prebavnem traktu kot tudi pri vnetjih dihal in oči. Najboljša je zunanja uporaba v obliki grgranja in izpiranja pri nahodu, vnetju dlesni, žrela ter pri vnetju oči. Notranja uporaba je primerna pri prebavnih in želodčnih težavah ter driski. Prevelike količine smetlike lahko dražijo sluznice in povzročajo zastrupitve, zato se moramo držati navedenih količin in uporabljati gotove pripravke (<https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek/smetlika-navadna>).

4.2.2 NAVADNI RMAN

Rman je trajnica iz družine nebinovk, ki zraste do višine 50 cm. Rastlino pogosto srečamo na travnikih po vsej Sloveniji. Listi so izmenično nameščeni in podolgovati, večkrat

pernati s kratkimi, koničastimi konci. Cvetovi so beli do rožnati in razvrščeni v kobulih (Slika 2).

Zdravilne učinkovine so prisotne v vseh delih rastline. Njegove zdravilne učinkovine so: hlapna olja, kisline, npr. izolerianska in salicilna, asparagin, sterol, flavon, grenčice, tanini in tumorini. Rman pri odraslih uporabljamo za lajšanje prebavnih težav, kot so prebavni krči, pomanjkanje apetita, napihnjenost in napenjanje ter pri menstruacijskih težavah in krvavitvah. Rman se lahko uporablja le pri odraslih in otrocih, ki so stari nad dvanajst let. V literaturi ni zapisov o neželenih učinkih (<https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek>).



Slika 2. Navadni rman

(<https://www.mojaobcina.si/litija/novice/achillea-millefolium-rman.html>)

4.2.3 ŠIROKOLISTNI TRPOTEC

Širokolistni ali veliki trpotec raste na suhih in gnojenih travnikih, pašnikih, ob poteh, meliščih, tako v nižinah kot v višjih predelih po celi Sloveniji. Ima široke ovalne liste, na katerih lahko vidimo vzporedne žile po celotni površini lista. Listi so gladki ali nekoliko dlakavi, običajno zelene barve, ki pa ima lahko pridih vijoličnih odtenkov. V višino zraste do 30 cm, njegove korenine so tanke in nitaste. Steblo je pokončno, na vrhu ima socvetje, iz katerega štrlijo prašniki (Slika 3) (<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet>).



Slika 3. Širokolistni trpotec (<https://www.urbanatura.si/vsebina/1385#gallery->)

Nabiramo liste, cvetove in semena, in sicer od pomladi do jeseni, najbolje ob začetku cvetenja, ki traja od maja do junija. Ima protivnetno, protivirusno, nekoliko analgetično, antioksidativno, antiulcerogeno in imunostimulativno delovanje ter pospešuje strjevanje krvi. Po zdravilnih učinkih je zelo podoben ozkolistnemu trpotcu. Pomaga tudi pri izločanju sluzi iz dihal ob vnetju dihalnih poti ter pripomore k lažšanju kašlja. Poleg tega spodbuja prebavo in izločanje seča. Omogoča tudi hitrejšo celjenje ran; zaustavi krvavitev, omili srbenje in otekline ter zdravi vse zunanje poškodbe, kot so rane, udarnine, ureznine, piki žuželk in ugrizi. Uporabljamo ga lahko kot čaj, obkladek, kot sveže iztisnjen sok in posušena semena. V kulinariki so na drobno narezani in na hitro pokuhani mladi trpotčevi listi uporabni v solatah, prilogah in juhah, vendar je najbolje odstraniti vlakna (Ody, 1994).

4.2.4 NAVADNA ČRNOGLAVKA

Navadna črnoglavka je trajnica iz družine ustnatic. Najdemo jo na vlažnih travnikih, vlažnih mestih v gozdovih, obrežjih voda in na zelenicah. Listi so dolgopecljati, podolgasto jajčasti do suličasti, celorobi ali neenakomerno nazobčani, nasprotno razvrščeni, na vrhu topi. Cvetovi so somerni, ustnati, temno modrovijoličasti, zgoščeni v navidezno klasasta, ovršna socvetja, ki jih podpirajo zeleni ovršni listi, vsak cvet pa podpira rdečkasto obarvan podporni list (Slika 4). Plod razpade na štiri plodiče. (<https://www.urbanatura.si>).



Slika 4. Navadna črnoglavka

(https://www.hribi.net/slika_rastlina/navadna_crnoglavka_prunella_vulgaris/5137)

Ker je rastlina užitna, se uporablja za solate, za katere so primerni mladi listi, celotno rastlino pa lahko prekuhamo. Uporablja se tudi v tradicionalni kitajski medicini za zdravljenje različnih obolenj, npr. za zdravljenje oči, proti visokemu krvnemu tlaku in oteklina, v ljudskem zdravilstvu pa za zdravljenje pljučnih bolezni (Ody, 1994).

4.2.5 TRAVNIŠKA KADULJA

Ta krepka, pokončna, delno razrasla trajnica zraste 30–60 cm. Vrsta je v Sloveniji splošno razširjena, najdemo jo na suhih in pustih tleh, ter na svetlih površinah in suhih travnikih in pašnikih. Ima pritlično listno rozeto in močno korenino. Spodnji listi so dolgopecljati, s srčastim ali ravnim dnom, so podolgasto jajčasti, po robu pa topo nazobčani, zelo redko nacepljeni ali plitvo krpati, nagubano žilnati in dlakavi. Zgornji stebelni listi so večinoma suličasti, sedeči in mnogo manjši od pritličnih. Dlakavi listi zrastejo tudi do 35 mm. Cvetovi so somerni, ustnati, temnomodri ali modrovijoličasti, redkeje beli (Slika 5). Zgornja venčna ustna je žličasto zaobljena ter precej večja od spodnje ustne, ki je trokrpa, stranske krpe so lahko zelo široke, belkaste. Plod tudi pri tej ustnatici razpade na štiri plodiče.



Slika 5. Travniška kadulja (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2098#gallery-12>)

Lahko jo uporabljamo kot začimbo (mladi listi), uporablja pa se tudi v tradicionalni medicini, že od antičnih časov. Pogosto jo gojijo tudi kot okrasno rastlino (<https://www.urbanatura.si/vsebina/2098>, <https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet>).

4.2.6 POLJSKI TIMIJAN

Poljski timijan ali materina dušica je rod trajnih zdravilnih polgrmičkov iz družine ustnatic, ki zrastejo do približno 50 cm visoko (Slika 6). Izvira iz Sredozemlja.



Slika 6. Poljski timijan

(<https://www.semina.si/katalog/posebne-linije/herbal-line/rs-herbal-line-divji-timijan-polajeva-materina-dusica-thymus-pulegoides/>)

Najpomembnejši proizvod je njegovo eterično olje, ki mu daje značilni vonj. Rastlina se uporablja pri vnetjih dihal, ker topi sluz in pomirja kašelj. V obliki kopeli in polivov se uporablja se tudi za razkuževanje. Poljski timijan najdemo tudi v kozmetičnih sredstvih, kot so: deodoranti, mazila, zobne paste in toniki. Rastlina je uporabna tudi za zaviranje gnitja, zdravljenje kožnih bolezni in odpravljanje aken. Zdravilni deli rastline so listi in cvetovi. V tradicionalni medicini naj bi se poljski timijan uporabljal tudi za zdravljenje depresije. Poleg olja pripravljajo in uporabljajo tudi čaj. V Sloveniji raste na Krasu, saj ima rad suha in sončna rastišča (Ody, 1994).

4.2.7 NAVADNI PELIN

Navadni pelin je rastlina iz družine nebinovk, ki zraste 60–120 cm. Najdemo jo na opuščeni zemljiščih, travnikih, mejicah, na prodnih tleh ter ob vodah. To je krepka, pokončna, močno razvejana, večinoma gola, aromatična dvoletnica ali večletnica (Slika 7). Listi so pernato deljeni v ozke, črtalaste roglje, ki so neenakomerno nacepljeni in imajo uvihan rob, temnozeleni in bleščeči po zgornji strani, po spodnji strani belkasti, izrazito dvobarvni. (<https://www.urbanatura.si>).

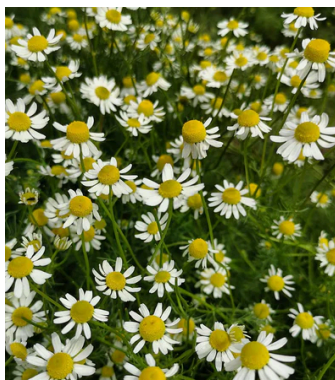
Čeprav je rastlina v večjih odmerkih strupena, se uporablja v tradicionalni medicini. Zdravilni učinek imajo nadzemni deli rastline. Uporablja se za črevesne težave, menstrualne bolečine, pri porodnih težavah. Spodbuja delovanje jeter in upočasni delovanje prebavnega trakta (Ody, 1994).



Slika 7. Navadni pelin (<https://www.urbanatura.si/vseбина/2390#gallery-2>)

4.2.8 PRAVA KAMILICA

Prava kamilica spada v družino nebinovk in je enoletna rastlina, visoka 20–50 cm, ki ima kratko korenino in pokončnim stebлом, ki je na vrhu golo in razvejano. Listi imajo zelo ozke, bodičaste vrhove in so dvojno ali trojno pernati. Na končnih delih stebelnih poganjkov zraste po eno koškasto socvetje (Slika 8). Prava kamilica cveti od maja do avgusta, najdemo pa jo ob poteh, na poljih in vrtovih. Razširjena je po vsej Evropi in velja za enega najbolj razširjenih žitnih plevelov (<https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek>).



Slika 8. Prava kamilica (<https://herbessa.si/blogs/blog-zelisc/kamilica-matricaria-recutita>)

Uporabni del rastline je cvet, ki vsebuje eterično olje. Uporablja se za lajšanje prebavnih težav, kot so blažji prebavni krči, občutek napetosti v predelu nad želodcem in napenjanje. Pomaga tudi pri prehladnih obolenjih, vnetjih sluznice ust in žrela, blažjih kožnih vnetjih, površinskih ranah ter manjših turih. Lajša tudi vnetja sluznice v predelu zadnjika in zunanjih spolovil. Uporabna pa je tudi v homeopatiji (Ody 1994).

4.2.9 ŠENTJANŽEVKA

Šentjanževka je zelnata rastlina iz družine krničevk, ki zraste približno 60 cm visoko. Rastlina uspeva predvsem na suhih tleh po vsej Sloveniji.

(<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet/krcnicevke/sentjanzevka>). Stebla te rastline so pokončna in dvoroba, v zgornjem delu olesenela in včasih rdeče obarvana. Listi so jajčasti ali eliptični, skoraj brez peclja, nasprotno nameščeni (Slika 9).



Slika 9. Šentjanževka

(<https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet/krcnicevke/sentjanzevka>)

Uporabna je celotna rastlina in velja danes za eno najboljše raziskanih zdravilnih rastlin. Vsebuje zdravilne učinkovine, kot so glikozidi, flavoni, hlapna olja, tanini in smole. Uporablja se jo pri blagih do srednje težkih depresivnih stanjih s spremljajočimi znaki, kot so potrtost, nerazpoloženje, izguba zanimanja in pomanjkanje energije (Ody, 1994). Uporablja se lahko kot čaj ali kot negovalno olje za nego suhe in razpokane kože, pri celjenju površinskih ran, še posebej za poletno nego kože, obremenjeno zaradi sonca. Šentjanževka ima tudi protivnetno, protibakterijsko in protiglivično delovanje (Ody, 1994). Uporabo rastline odsvetujejo mladoletnim osebam.

4.2.10 Divji ORIGANO

Divji origano ali dobra misel, je trajnica z drobnimi škrlatnimi cvetovi, ki zraste približno pol metra visoko (Slika 10). Rastlino običajno najdemo le na težko dostopnih gorskih predelih južnega Sredozemlja.

Njegovo olje učinkuje na številne vrste bakterij, virusov in gliv. Lajša simptome alergij, spodbuja pretok žolča in s tem izboljša prebavo, poleg tega zmanjšuje nastajanje plinov in pomaga uravnati želodčne kisline. Je tudi močno zdravilo za artritis (Gööck, 1979).



Slika 10. Divji origano

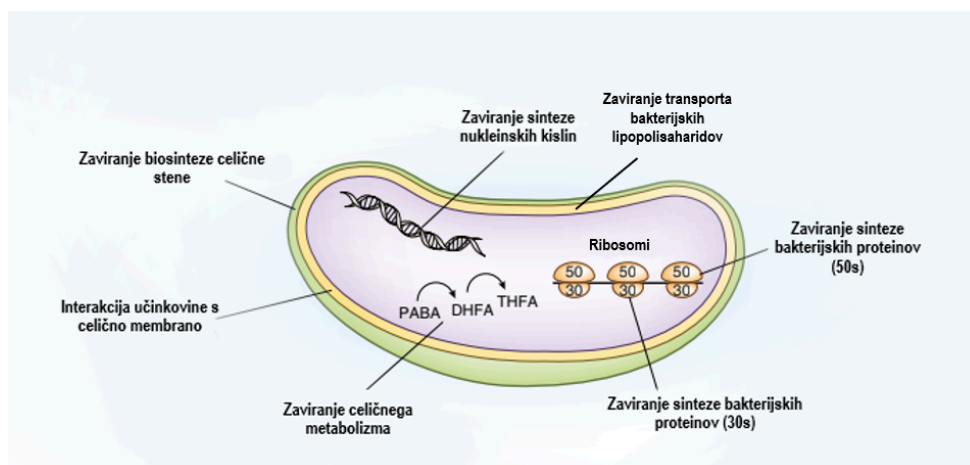
https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&sca_esv=601107417&hl=sl&q=divji+origano&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiCq6Ces_aDAxVPg_0HHSxBUAQ0pQJegOICxAB&biw=1680&bih=922&dpr=1.4 - imgsrc=m-l6Bu6nhkbIBM
(<https://www.oaza-zelisc.si/eo-divji-origano>)

4.3 PROTIBAKTERIJSKI UČINEK

Protibakterijske učinkovine ali antibiotiki se uporabljajo pri zdravljenju bakterijskih okužb, ki jih povzročajo patogene bakterije. Antibiotiki so lahko naravnega ali polsinteznega izvora. Razlikujemo jih po kemijski strukturi, učinku, mehanizmu in obsegu delovanja. Širokospektralne učinkovine hkrati delujejo na več različnih mikroorganizmov, medtem ko imajo ozkospektralne vpliv le na eno vrsto (družino) patogenih bakterij. Skupna lastnost protibakterijskih učinkovin je, da že v zelo majhnih koncentracijah vplivajo na bakterije. Z baktericidnim delovanjem bakterijo ubijejo, z bakteriostatičnim pa le reverzibilno zavrejo njeno rast in razmnoževanje. Pogosto jih uvrščamo v skupine glede na njihovo kemijsko strukturo. Na ta način dobro opredelimo njihove protibakterijske lastnosti (Gornik, 2011, Piskernik 2016).

Poznamo različne mehanizme, s katerimi protibakterijske učinkovine delujejo na bakterijsko celico (Slika 11) (Giguere, 2006; Eyler in Shvets, 2019, Zampaloni s sod., 2024):

- zaviranje biosinteze celične stene: β -laktamski antibiotiki (penicilini, cefalosporini, karbapeni, glikopeptidi);
- depolarizacija celične membrane po Gramu pozitivnih bakterij (daptomicin);
- zaviranje sinteze bakterijskih beljakovin: tetraciklini, rifampicin, aminoglikozidni antibiotiki (streptomycin in eritromicin), kloramfenikol, florfenikol, linkozamidi, gliciklini, pleuromutilini, oksazolidinoni;
- zaviranje sinteze nukleinskih kislin: učinkovina prepreči prepisovanje informacije iz DNA v mRNA z zaviranjem encima polimeraze RNA, ki vodi v celično smrt: kinoloni in fluorokinoloni;
- interakcija učinkovine s celično membrano: učinkovina vpliva na spremembo prepustnosti membrane bakterijske celice, kar povzroči izgubo pomembnih ionov in presnovkov, potrebnih za življenje bakterije. Polimiksini z vezavo na negativno nabita mesta v fosfolipidnem dvosloju destabilizirajo zunanjo membrano bakterij;
- zaviranje celične presnove: sulfonamidi, antimetaboliti z bakteriostatičnim delovanjem zavirajo sintezo vitamina B9 oziroma folne kisline, ki je potrebna za sintezo nukleinskih kislin in razmnoževanje bakterij;
- zaviranje prenosa bakterijskih lipopolisaharidov z notranje na zunanjo membrano bakterijske celice: makrociklični peptidi (zosurabalpin).



Slika 11: Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin na bakterijsko celico
(prirejeno po Eyler in Shvets, 2019)

4.3.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE NARAVNEGA IZVORA

Mikrobi, ki proizvajajo antibiotike, se uporabljajo že tisočletja. Obloge iz plesnivega kruha so za zdravljenje odprtih ran uporabljali že v stari Grčiji, Egiptu in na Kitajskem pred več kot 2000 leti. Prvi odkriti antibiotiki so bili naravni proizvodi gliv (penicilin) ali bakterij, živečih v tleh oziroma v prsti. Poleg tega so lahko učinkovine izolirane iz rastlin, saj te vsebujejo najrazličnejše sekundarne presnovke (tanin, terpen, alkaloidi, flavonoidi), za katere so z metodami *in vitro* določili protimikrobno delovanje. Zaradi napredka znanosti je naravni proces gliv in bakterij v laboratoriju mogoče ponoviti ali celo izboljšati, s čimer dobimo polysintezne antibiotike (Gornik, 2011; Piskernik, 2016). Vendar pa problem predstavlja vse večja odpornost patogenih bakterij proti antibiotikom (Piskernik 2016).

Protibakterijske snovi rastlinskega izvora

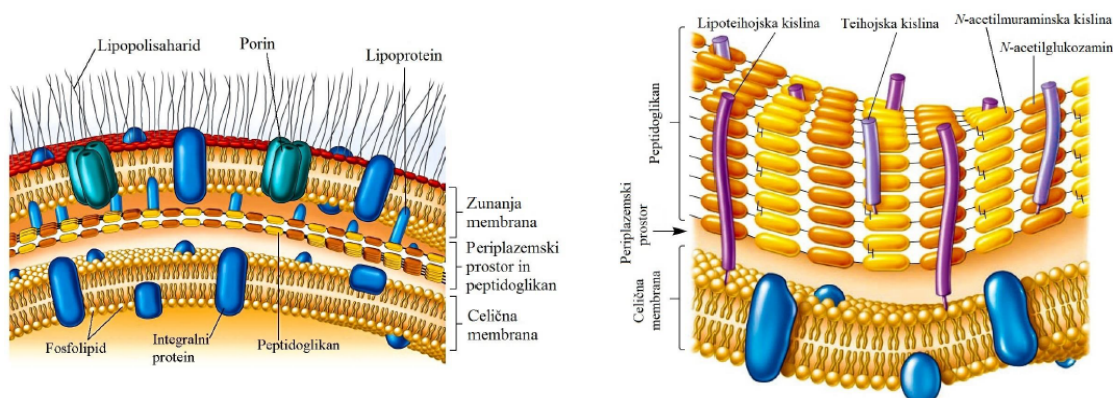
Rastline imajo neverjetno sposobnost sinteze različnih aromatičnih spojin kot so fenoli in njihovi derivati. Številne spojine so sekundarni derivati in služijo za obrambo rastlin pred insekti, mikroorganizmi in rastlinojedci (Cowan s sod., 1999). Zato rastline predstavljajo zelo obetaven vir novih protimikrobnih učinkovin s terapevtskim potencialom, kar pa je še

vedno slabo raziskano področje. Predvidevajo, da imajo rastlinski antibiotiki drugačno delovanje od do sedaj znanih antibiotikov, kar predstavlja velik potencial pri zdravljenju bolezni, povzročenih z bakterijami, odpornimi proti do sedaj znanim antibiotikom (McRea s sod., 2007). Zato se v zadnjem času vse več pozornosti usmerja v raziskave učinkovin iz rastlinskih izvlečkov (Piskernik, 2016). Za določanje protimikrobnih aktivnosti rastlinskih izvlečkov so na voljo številne metode, odvisno od načina ekstrakcije, topnost učinkovine in uporabljenega mikroorganizma (Klančnik in sod. 2010).

4.4 BAKTERIJE

Bakterije so prokariotski mikroorganizmi, ki jih lahko vidimo le pod mikroskopom. Lahko so različnih oblik: koki (okrogla oblika), bacili (palična oblika), spirohete, spirile ali vibroni (spiralne oblike). Opazimo lahko dve obliki: vegetativno (živa oblika) ali spore (speča oblika). Za rast in razvoj potrebujejo hranila, vlago, primerno temperaturo in čas. Nekatere bakterije potrebujejo kisik, druge pa rastejo celo bolje v okolju brez kisika. Patogene bakterije so bakterije, ki so škodljive za človeka, živali in rastline ter povzročijo okužbo oziroma zastrupitev. Okužbo lahko povzroči delovanje bakterije same, zastrupitev pa delovanje toksinov, ki jih izloča bakterija. Na nastanek obolenja vpliva več dejavnikov: imunsko stanje človeka gostitelja, vrsta bakterije in njihovo število, vstopno mesto v telo in podobno (<https://nijz.si/moje-okolje/varnost-zivil/bakterije-v-zivilih/>).

Celična ovojnica pri bakterijah je sestavljena iz celične membrane in celične stene ter loči citoplazmo od okolice. Glede na sestavo celične stene ločimo po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je celična stena debelejša in sestavljena pretežno iz peptidoglikanov (Slika 12 – desno). Nasprotno pa je celična stena po Gramu negativnih bakterij tanjša in kompleksnejša. Celična stena je pogosto tarča različnih protibakterijskih zdravil (Mesec, 2014). Zaradi kompleksne sestave celične stene in zunanje membrane iz lipopolisaharidov (Slika 12 – levo), ki preprečuje vdor hidrofbnih spojin, so po Gramu negativne bakterije odpornejše proti antibiotikom kot po Gramu pozitivne (Tajkarimi s sod. 2010; Breijyeh s sod. 2020).



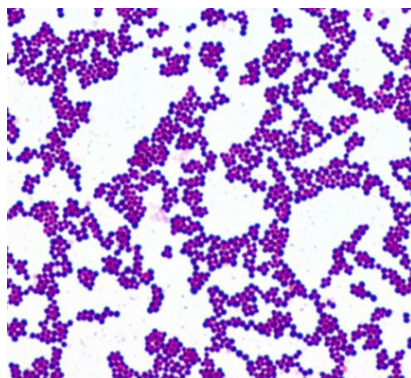
Slika 12. Celična stena po Gramu negativnih (levo) in po Gramu pozitivnih bakterij (desno) (Mesec, 2014).

Bakterije za lažje opazovanje pod mikroskopom obarvamo. Najprej jih obarvamo z metilvijoličnim barvilom, ki se zadržuje v po Gramu pozitivnih bakterijah. Po dodatku topila se po Gramu negativne bakterije razbarvajo. Te bakterije nato obarvamo rdeče s fuksinom ali safraninom. Do tega pride ravno zaradi različne sestave celične stene. Kristali metilvijoličnega ostanejo ujeti v debeli plasti peptidoglikana po Gramu pozitivnih bakterij. Na mikroskopski sliki so tako po Gramu pozitivne bakterije obarvane vijolično, po Gramu negativne pa rdeče

(https://dijaski.net/gradivo/bio_vaj_diferencialno_barvanje_po_gramu_01).

4.4.1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Stafilekoki so po Gramu pozitivni, nesporogeni, fakultativno anaerobni koki. Pojavljajo se posamezno, v parih ali v obliki grozdov (Slika 13). *Staphylococcus aureus* je široko prisoten v okolju ter je eden najodpornjših nesporogenih povzročiteljev bolezni pri človeku in živalih.



Slika 13. *Staphylococcus aureus* – barvanje po Gramu

(<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-cocci/staphylococci/catalase-positive/staphaurex-positive/staphylococcus-aureus.html>)

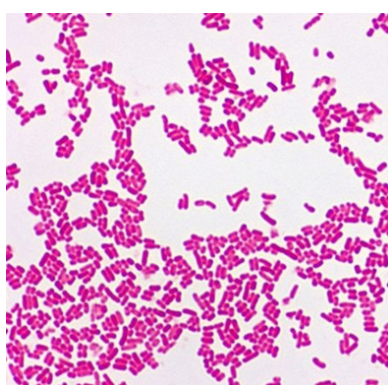
Pri človeku so primarni izvor stafilokokov nosna votlina, gnojne rane, vneto grlo, lahko so na koži, v očeh, prebavnem traktu. Od tod prehajajo v zrak, prah, na obleko in druga mesta, od koder lahko preidejo v živila. Predstavniki tega rodu sintetizirajo številne enterotoksine, ki povzročajo gastroenteritis. Najpogostejše prisotna vrsta je vrsta *S. aureus* (Jeršek, 2013). Ta bakterija, imenovana tudi zlati stafilokok, povzroča pri človeku okužbe in zastrupitve z živili. Stafilokokno zastrupitev z živili lahko povzročijo sevi bakterije *S. aureus*, ki izločajo strupe – toksine. Zastrupitev z bakterijo povzroča bruhanje in drisko, ki lahko pri starejših ljudeh in otrocih povzroči tudi dehidracijo. Bakterija pogosto povzroča okužbe kože in ran, lahko pa tudi pljučnico, okužbe na mestu operativnega posega, v krvi, srcu, kosteh in druge invazivne okužbe

(<https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/staphylococcus-aureus-mrsa-in-ca-mrsa/>).

Staphylococcus aureus je široko razširjen in pomemben povzročitelj bolezni ter zastrupitev pri ljudeh in živalih. Zato ga uporabljajo (izbrani sev) tudi za preskušanje protibakterijskega učinka biocidov – snovi ali zmesi namenjenih kemičnemu ali biološkemu uničenju, odvracanju, onemogočenju ali preprečevanju delovanja škodljivih organizmov (SIST EN 14885:2022/AC:2023).

4.4.2 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli (*E. coli*) je vrsta bakterij, ki je normalno prisotna v črevesju sesalcev, tudi človeka, in predstavlja velik del tako imenovane normalne črevesne flore. Gre za po Gramu negativno bakterijo, ki ne tvori spor (Slika 14). Le nekateri sevi te vrste bakterije so za človeka patogeni. Nekateri sevi *E. coli* lahko povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe (vnetje sečil, meningitis, peritonitis, mastitis, septikemija, pljučnica, ipd.) (https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/ecoli_05082015.pdf).



Slika 14. *E. coli* – barvanje po Gramu

(<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/catalase-negative-7/colistin-susceptible-2/escherichia-coli-o157-h7.html>)

Prav tako kot *S. aureus* je tudi *E. coli* široko razširjena in pomembna povzročiteljica bolezni in zastrupitev pri ljudeh in živalih. Zato jo tudi uporabljajo (izbrani sev) za preskušanje protibakterijskega učinka biocidov (SIST EN 14885:2022/AC:2023).

5. EMPIRIČNI DEL

5.1 NAMEN

Za raziskovanje učinka zdravilnih rastlin sem se odločila, ker v številnih knjigah lahko preberemo, da za zdravljenje ali celjenje ran uporabljajo rastline. Slišala sem že za nekaj zdravilnih rastlin, na primer kamilico, ozkolistni trpotec, materino dušico. Zanimalo me je, ali imajo te rastline res takšen zdravilni učinek, kot lahko o tem zasledimo v knjigah. Zanimalo me je, katere rastline imajo protibakterijski učinek.

Odpravila sem se na Biotehniško fakulteto, na Oddelek za agronomijo, kjer sem se srečala z doc. dr. Sabino Berne. S skupnimi močmi sva v laboratoriju raziskovali učinek zdravilnih rastlin.

5.2 HIPOTEZE

Pri poskusih sem si zastavila naslednje hipoteze:

- Nekaterе rastline bodo imele protibakterijski učinek.
- Pri neredčenem vzorcu bo protibakterijski učinek večji kot pri 10-krat redčenem vzorcu.
- Etanolni izvlečki bodo učinkovali bolje kot vodni izvlečki.
- Protibakterijski učinek bom opazila le pri enem od izvlečkov (vodni ali etanolni izvleček), nikoli pri obeh.
- Na bakteriji *E. coli* in *S. aureus* bodo delovali različni antibiotiki.
- Bakterija *E. coli* bo manj občutljiva na antibiotike kot *S. aureus*.

5.3 MATERIALI IN METODE

5.3.1. MATERIALI

Bakterije:

- *Staphylococcus aureus* (sev ŽM72, vir ATCC 25923)

Kemikalije in gojišča:

- 30-% etanol
- ddH₂O
- tekoči dušik
- triptični soja bujon (TSB gojišče)
- triptični soja agar (TSA gojišče)
- Mueller-Hintonov agar
- gentamicin (Ducheffa)

Pripomočki in oprema:

- skalpel
- dvostranska spatula
- terilnica in pestilo
- mikrocentrifugirke različnih velikosti (Brand)
- 50-ml in 15-ml centrifugirke (Golias)
- 90-mm petrijevke (Golias)
- tehtnica Vibra HJR-620CE (Shinko Denshi)
- centrifuga 5810 R (Eppendorf) z rotorji A-4-62, A-2-DWP in F45-30-11
- centrifuga Beckmann J2-HS, rotor JA14 (4 °C, 12.000 rpm)
- stresalni inkubator ThermoMixer C (Eppendorf), 24 h, 37 °C, 500 rpm – za etanolne izvlečke
- stresalnik z vertikalno rotacijo, IKA Trayster digital, 24 h, 4 °C, 30 rpm) – za vodne izvlečke
- liofilizator (GAMMA 1-16/LSC, Christ)
- vakuumski koncentrador Concentrator Plus (Eppendorf) – za etanolne izvlečke
- vrtinčnik IKA, vortex 2
- brezprašna komora Iskra Pio MC15-2
- pipete (različni volumni, Eppendorf)
- plastične Pasteurjeve pipete
- 500-ml steklene erlenmajerice

- inkubatorski stresalnik z možnostjo ohlajanja New Brunswick™ Innova® 43/43R, Eppendorf (130 rpm, 37 °C)
- spektrofotometer BioPhotometer (Eppendorf)
- pincete
- steklena spatula po Drigalskem
- 6-mm diski Whatman AA (Cytiva)
- avtoklav Panasonic PHCBI MLS-3781L-PE

5.3.2 NABIRANJE RASTLIN

Poskuse sem izvajala na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Za poskuse sem si izbrala naslednje rastline: navadna smetlika, navadni rman, širokolistni trpotec, navadna črnoglavka, travniška kadulja, poljski timijan, prava kamilica, šentjanževka in divji origano. Travniško kaduljo, navadno smetliko in poljski timijan sem nabrala v Bovcu, pravo kamilico in šentjanževko pa na meji v Šentvidu. Preostale rastline sem nabrala na travnikih v okolici Biotehniške fakultete v Ljubljani (Tabela 1). Rastline sem nabirala v avgustu 2023. Pri različnih rastlinah sem uporabila različne dele rastlin (Tabela 1). Sveže dele rastlin sem razrezala na majhne koščke (Slika 15) in jih zavite v aluminijasto folijo zamrznila v tekočem dušiku. Rastline sem shranila v zamrzovalni skrinji na Oddelku za agronomijo. Ko sem nabrala vse rastline, sem jih v terilnici s pomočjo tekočega dušika s pestilom strla v prah (Slika 16).



Slika 15. Sveže nabrani deli rastlin, ki sem jih uporabila za poskus protibakterijskega učinka: levo divji origano, desno šentjanževka (vir: osebni arhiv)

Tabela 1. Testirane travniške rastline:

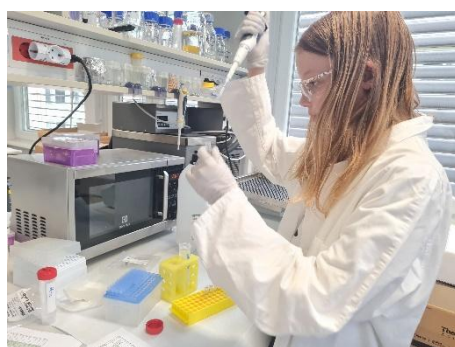
Rastlina				Nabrano	
Vzorec	Družina	Vrsta	Organ	Lokacija	Datum
1	Črnobinovke (<i>Scrophulariaceae</i>)	Navadna smetlika (<i>Euphrasia rostkoviana</i>)	Cela rastlina brez korenin	Bovec	13. 8. 2023
3	Nebinovke (<i>Asteraceae</i>)	Navadni rman (<i>Achillea millefolium</i>)	Listi in cvetoči poganjki	UL BF, Odd. za agronomijo	28. 7. 2023
7	Trpotčevke (<i>Plantaginaceae</i>)	Širokolistni trpotec (<i>Plantago major</i>)	Listi	UL BF, Odd. za agronomijo	28. 7. 2023
8	Ustnatice (<i>Lamiaceae</i>)	Navadna črnoglavka (<i>Prunella vulgaris</i>)	Cvetoči poganjki	Dvor pri Ljubljani	15. 8. 2023
9	Ustnatice (<i>Lamiaceae</i>)	Travniška kadulja (<i>Salvia pratensis</i>)	Cela rastlina brez korenin	Bovec	13. 8. 2023
10	Ustnatice (<i>Lamiaceae</i>)	Poljski timijan (<i>Thymus serpyllum</i>)	Cvet in list	Bovec	13. 8. 2023
11	Nebinovke (<i>Asteraceae</i>)	Navadni pelin (<i>Artemisia vulgaris</i>)	Cvet in list	Dvor pri Ljubljani	15. 8. 2023
12	Nebinovke (<i>Asteraceae</i>)	Prava kamilica (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Cela rastlina brez korenin	Dvor pri Ljubljani	15. 8. 2023
13	Krčničevke (<i>Hypericaceae</i>)	Šentjanževka (<i>Hypericum perforatum</i>)	Cvetoči poganjki	Dvor pri Ljubljani	15. 8. 2023
14	Ustnatice (<i>Lamiaceae</i>)	Divji origano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Cvet in list	Dvor pri Ljubljani	15. 8. 2023



Slika 16. Trenje rastlinskega materiala v terilnici (vir: osebni arhiv)

5.3.3 PRIPRAVA ETANOLNIH IZVLEČKOV

Iz dela zdrobljenih rastlin sem pripravila etanolne izvlečke. En gram vzorca zdrobljene rastline sem raztopila v 2 ml 100-odstotnega etanola ter pustila stresati na sobni temperaturi 24 ur. Po 24 urah sem mešanico centrifugirala in tako ločila rastlinske izvlečke (tekoča faza) od rastlinskega materiala (usedlina). Etanol sem izparela s pomočjo vakuumskega koncentradorja (Concentrator Plus, Eppendorf) in tako pridobila suho maso izvlečka. Izvleček smo redčili s 30-odstotnim etanolom do koncentracije 50 mg/ml (Slika 17). Rastlinske izvlečke raztopljene v 30-odstotnem etanolu sem s pomočjo vrtničnika (IKA, vortex 2) homogenizirala v homogeno raztopino.



Slika 17. Redčenje rastlinskih izvlečkov na delovno koncentracijo 50 mg/ml (vir: osebni arhiv)

5.3.4 PRIPRAVA VODNIH IZVLEČKOV

Del posušenega rastlinskega materiala smo 24 ur raztapljali v ddH₂O pri 4 °C. Po 24 urah smo mešanico centrifugirali, da smo ločili pridobljeni izvleček od rastlinskega materiala. Vodni izvleček smo zamrznili v tekočem dušiku in postavili v liofilizator za en dan. Suhi material smo raztopili ddH₂O do končne koncentracije 50 mg/ml. Izvleček smo homogenizirali s pomočjo vrtinčnika (IKA, vortex 2) v homogeno raztopino, ki smo jo kasneje uporabili pri poskusih.

5.3.5 OŽIVITEV KULTURE SEVA *S. AUREUS* (ŽM72, VIR ATCC 25923)

Posamezne kolonije bakterij, ki so bile shranjene na trdem gojišču TSA v hladilniku pri 8 °C, sem prenesla na sveže pripravljeno ploščo s hranljivim gojiščem TSA (Slika 18) in 20 ur inkubirala v aerobnih pogojih in pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji sem posamezne kolonije s cepilno zanko aseptično prenesla v tekoče gojišče TSB in jih 24 ur inkubirala v aerobnih pogojih na stresalniku pri 130 rpm in temperaturi 37 °C.



Slika 18. Oživitev kulture (vir: osebni arhiv)

Bakterijske celice smo centrifugirali in usedlino sprali s fiziološko raztopino. S pomočjo spektrofotometra BioPhotometer smo določili gostoto bakterijskih celic in jih razredčili v fiziološki raztopini na $OD_{600} = 0,2$, kar ustreza 1×10^8 cfu/ml. 200 µl tako pripravljene bakterijske suspenzije, gostote 0,5 McF smo s pomočjo steklene spatule po Drigalskem enakomerno razmazali na plošče z Mueller-Hintonovim agarjem. Plošče z Mueller-Hintonovim agarjem smo predhodno razdelili na šest delov (Slika 19). Pred polaganjem testnih diskov (6-mm diski Whatman AA, Cytiva) smo počakali 3–5 minut, da se je suspenzija absorbirala v gojišče. Na plošče, premazane z bakterijsko suspenzijo, smo

položili difuzijske diske premera 6 mm in nanje kanili 20 μ l vodnih oziroma etanolnih rastlinskih izvlečkov. Na vsako ploščo smo poleg štirih ponovitev s testnim rastlinskim izvlečkom (50 in 5 mg/ml) dodali tudi negativno kontrolo (ddH₂O ali 30-odstotni etanol) in pozitivno kontrolo – 20 μ l antibiotika gentamicina v koncentraciji 500 μ g/ml, kar je ustrezalo 10 μ g gentamicina) (CLSI M100).



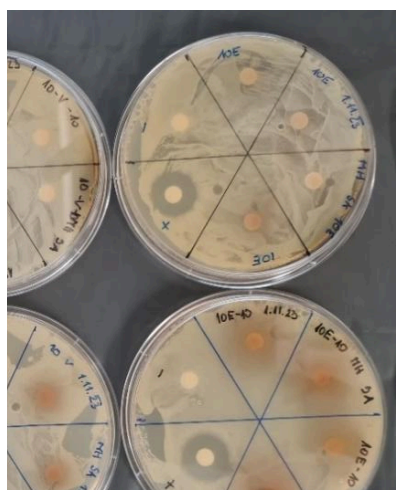
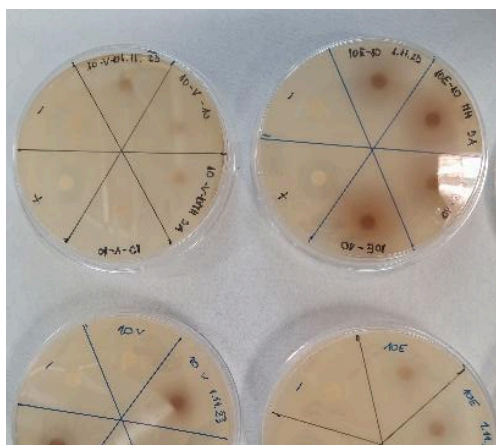
Slika 19: Plošče z Mueller-Hintonovim gojiščem, pripravljene za testiranje po metodi difuzije z diski (vir: osebni arhiv)

Metoda difuzije z diski ali Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda

Metoda difuzije z diski je preprosta in hitra kvalitativna metoda za določanje občutljivosti številnih bakterij na različne antibiotike („antibiogram“) (J. Hudzicki, 2009). Primerno gosto suspenzijo čiste kulture nacepimo na površino trdnega gojišča v petrijevki (Cerar in sod., 2010). Na nacepljeno ploščo položimo celulozne diske, prepojene s standardnimi koncentracijami antibiotikov. Ploščo nato inkubiramo. Med inkubacijo se bakterije razmnožujejo, antibiotiki pa difundirajo v gojišče in zavirajo razmnoževanje občutljivih bakterij (Cerar in sod., 2010). Če je izolat občutljiv na testni antibiotik, zaradi difuzije antibiotika v agar nastane okrog diska zaviralna cona. Po inkubaciji izmerimo premer (mm) zaviralnega pasu okoli diska. Cona inhibicije je sorazmerna občutljivosti organizma za določen antibiotik in je merilo za občutljivost organizma na testni antibiotik. Izmerjene vrednosti primerjamo s standardi, ki so na voljo za posamezni antibiotik in vrsto bakterij. Stopnjo občutljivosti bakterijskega seva izrazimo kot občutljiv (S, angl. sensitive), zmerno občutljiv ali intermediaren (I, angl. intermediate) in neobčutljiv (oziroma odporen (R, angl. resistant)) na protimikrobno učinkovino (Fojkar M, 2014)

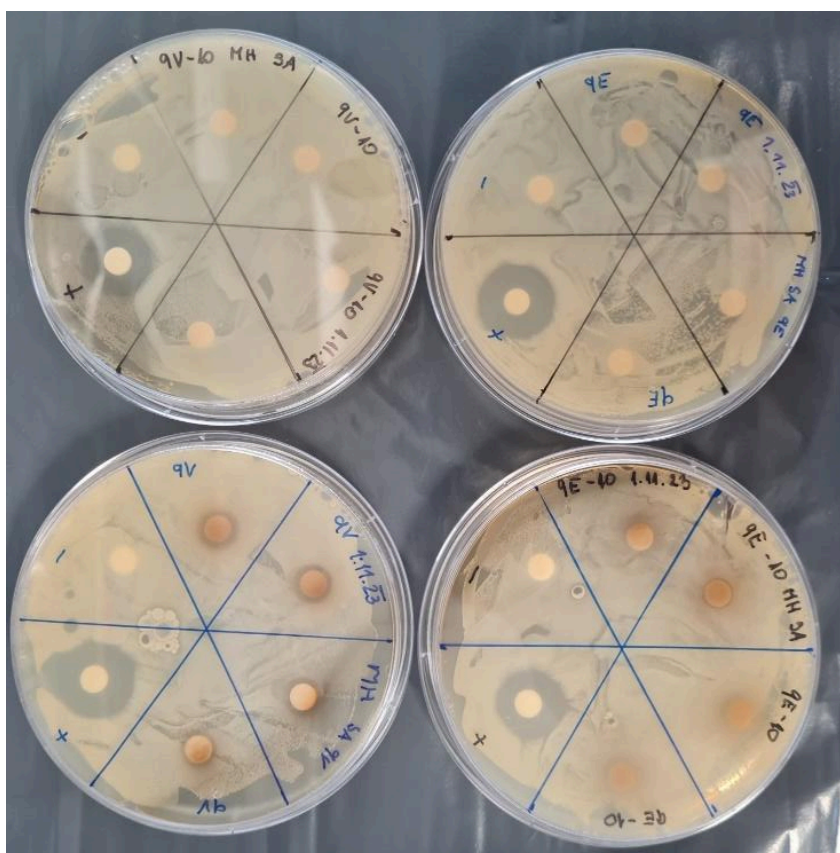
6. MOJE UGOTOVITVE IN RAZPRAVA

Protibakterijski učinek sem testirala na desetih različnih travniških rastlinah, nabranih konec avgusta 2023. Rastline sem izbrala na podlagi podatkov o rastlinah, ki sem jih pridobila iz literature. Odločila sem se, da primerjam izvlečke rastlin v vodi in etanolu, saj sem glede na podatke iz literature ugotovila, da se različne protibakterijske spojine lahko raztapljajo v različnih topilih. Pripravila sem tudi dve različni koncentraciji vzorca. Pri delu je bila zaradi velikega števila vzorcev in razredčitev potrebna velika natančnost. Da bi se rezultati dobro videli, je bilo treba plošče enakomerno premazati s suspenzijo bakterij *S. aureus* in vsaka nenatančnost se je hitro poznala (Slika 20). Že med pripravo vzorcev na ploščah sem ugotovila, da sem pri nekaterih vzorcih zamenjala neredčen in 10-krat redčen vzorec (Slike 20-23). Ker sem napako opazila že med pripravo poskusa, sem zamenjavo vzorcev zabeležila, da ne bi pri vrednotenju rezultatov prišlo do pomote. Druga velika skrb pri delu z bakterijami so okužbe vzorcev. Štiriindvajset ur po pripravi poskusa sem opazila, da nobena od plošč ni bila okužena. Pri vseh ploščah sem okrog diska z gentamicinom, ki je predstavljal pozitivno kontrolo, opazila zaviralni pas premera 16 mm. Prav tako so bile tudi vse negativne kontrole (topilo) brez zaviralnega pasu. Opazila sem, tako kot že med pripravo izvlečkov, da so bili številni diski obarvani, zato je bilo vrednotenje protibakterijskega učinka še težje. Temen obroč okrog diska (Slika 20) bi lahko hitro zamenjali z zaviralnim pasom, ki predstavlja protibakterijski učinek izvlečka (Slike 21-23).

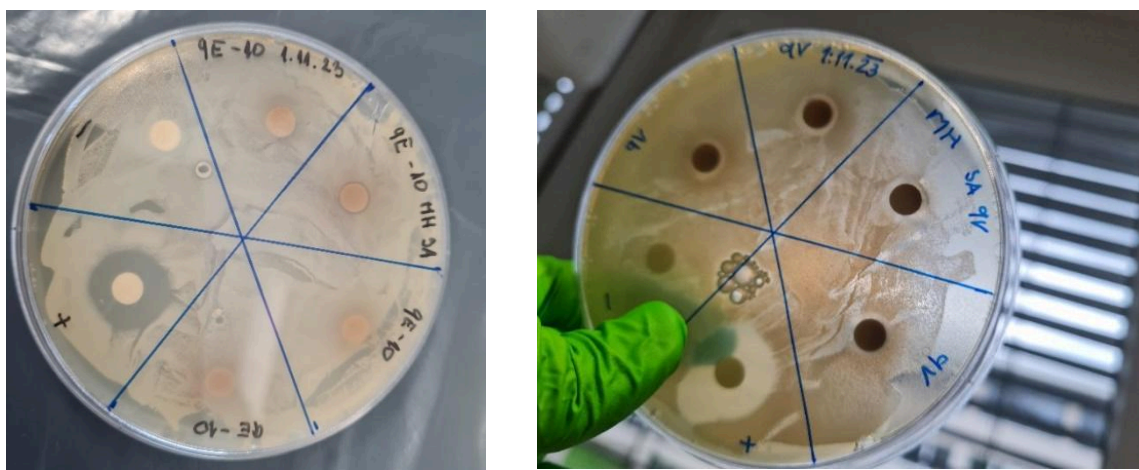


Slika 20. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka poljskega timijana v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov, oziroma 30-odstotni etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+)

Po podrobnem pregledu plošč na različnih podlagah sem protimikrobno učinkovitost zaznala le pri dveh rastlinskih vzorcih: neredčenem vodnem izvlečku travniške kadulje (Sliki 21 in 22) in neredčenem etanolnem izvlečku šentjanževke (Slika 23). Med aktivnimi učinkovinami, ki jih vsebujejo rastline iz družine krčničevk, kamor spada tudi šentjanževka, so spojine iz skupin acifluoroglucinolov in ksantonov, za katere je opisan antibiotični učinek (Caldeira s sod., 2022). Pri etanolnem izvlečku travniške kadulje sem pri eni ponovitvi od štirih opazila zaviralni pas premera manj kot 7 mm (Sliki 21 in 22). Za travniško kaduljo so sicer najmočnejši zaviralni učinek na bakterije opisali za koreninski izvleček (Srečković s sod., 2022).



Slika 21. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka travniške kadulje v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov, oziroma 30-odstotni etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+). Pri plošči, ki označuje 10-krat redčen vzorec, lahko opazimo, da so izvlečki temnejše barve, saj sem neredčen in 10-krat redčen vzorec zamenjala.

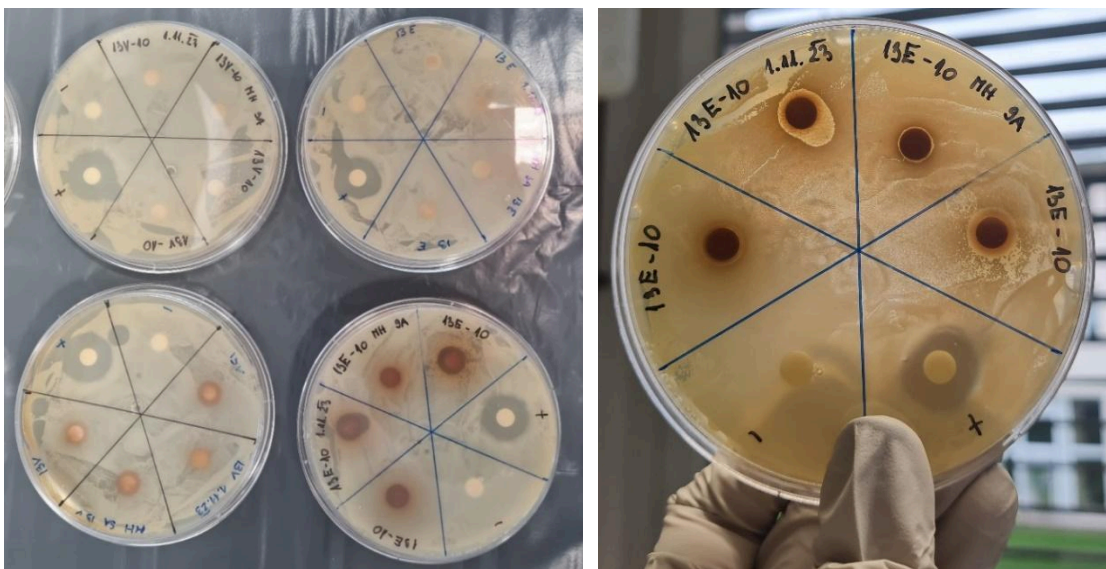


Slika 22. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka travniške kadulje v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov oziroma 30-odstotni etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+). Na ploščah, kjer so diski prepojeni z vodnim izvlečkom iz travniške kadulje, opazimo zaviralni pas pri vseh štirih ponovitvah. Na plošči z etanolnem izvlečkom je šibek zaviralni pas viden le pri eni ponovitvi.

Tabela 2: Premer zaviralnega pasu pri vodnem izvlečku iz travniške kadulje (skupaj z diskom premera 6 mm; povprečna vrednost ± standardna napaka (SEM)).

Ponovitve	Meritev 1 (mm)	Meritev 2 (mm)	Meritev 3 (mm)	Meritev 4 (mm)	Povprečje ± SEM (mm)
1	8	8	8	8	8,00 ± 0,00
2	8	8	8	7	7,75 ± 0,25
3	9	10	10	12	10,25 ± 0,63
4	9	8	9	11	9,25 ± 0,63

Povprečje vseh meritev (mm):

 $8,81 \pm 0,33$ 

Slika 23. Učinek vodnega (V) in etanolnega (E) izvlečka šentjanževke v primerjavi z negativno kontrolo (–) (ddH₂O v primeru vodnih izvlečkov ali 30-odstotni etanol v primeru etanolnih izvlečkov) in antibiotikom gentamicinom (10 µg), ki označuje pozitivno kontrolo (+). Na ploščah, kjer so diski prepojeni z etanolnim izvlečkom iz šentjanževke, opazimo zaviralni pas pri vseh štirih ponovitvah, medtem ko na plošči z vodnimi izvlečki zaviralnega pasu ne opazimo.

Tabela 3: Premer zaviralnega pasu pri etanolnem izvlečku iz šentjanževke (skupaj z diskom premera 6 mm; povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka (SEM)).

Ponovitve	Meritev 1 (mm)	Meritev 2 (mm)	Meritev 3 (mm)	Meritev 4 (mm)	Povprečje $\pm$ SEM (mm)
1	9	9	10	9	$9,25 \pm 0,25$
2	7	7	7	8	$7,25 \pm 0,25$
3	10	10	11	12	$10,8 \pm 0,48$
4	9	9	9	10	$9,25 \pm 0,25$
Povprečje vseh meritev (mm):					$9,13 \pm 0,35$

Posamezne zaviralne pasove sem opazila še pri neredčenem etanolnem izvlečku poljskega timijana, ampak je bil zaviralni pas premera manj kot 7 mm opazen le pri eni od štirih ponovitev (Slika 20).

Iz literature sem izvedela, da so po Gramu negativne bakterije, kamor spada *E. coli*, bolj odporne proti antibiotikom kot po Gramu pozitivne (*S. aureus*). Razlog za to je kompleksna sestava celične stene in zunanje membrane iz lipopolisaharidov, ki preprečuje vdor hidrofbnih spojin (Tajkarimi in sod. 2010, Breijyeh, 2020). Ker je bil protibakterijski učinek pri izvlečkih iz obeh rastlin precej šibek že pri testiranju bakterije *S. aureus*, ki je bolj občutljiva na antibiotike, sva se skupaj s somentorico odločili, da načrtovanih poskusov na bakteriji *E. coli* ne izvedeva.

Na prisotnost protibakterijskih snovi v rastlinskih izvlečkih vplivajo številni dejavniki, kot so sezona in regija nabiranja, uporabljeni deli rastline in način ekstrakcije, kot tudi shranjevanje izvlečkov in zamrzovanje. Zato se poročani rezultati v literaturi razlikujejo. Velik vpliv imajo tudi padavine in vlažnost, ki vplivajo na sestavo in količino izoliranih spojin. Problem predstavlja tudi globalno spreminjanje podnebja, ki spreminja vremenske razmere in zato ogroža sestavo in proizvodnjo spojin, tudi v isti geografski legi. Rastlinski izvlečki vsebujejo številne spojine, ki so pri različnih pogojih izolacije različno prisotne. Zato je testiranje protibakterijske občutljivosti rastlinskih izvlečkov zelo zahtevno (Vau s sod. 2021).

Pri raziskovalni nalogi sem se naučila veliko novega. V mikrobiološkem laboratoriju sem delala prvič, zato sem se naučila veliko praktičnih stvari, ki mi bodo pomagale tako pri pouku kemije v osnovni šoli kot tudi v nadaljevanju šolanja, npr. na gimnaziji in/ali fakulteti, predvsem pa pri novih raziskovalnih nalogah. Delo mi je bilo zelo zanimivo. Velik vtis je name naredil tekoč dušik, saj mi je bilo zanimivo, da kljub temu, da je zmrznjen, iz njega izhaja toliko pare. Pri delu mi je bilo poleg trenja rastlin najbolj všeč kapljanje izvlečkov na testne diske. Poleg samega dela v laboratoriju sem se naučila tudi, da je zelo težko dobiti zelene rezultate, če je vpletenih toliko različnih dejavnikov (že od pogojev v času nabiranja rastlin naprej), npr. vlažnost rastlin, ki ni bila pri vseh rastlinah

enaka, topila, uporabljena pri pripravi izvlečkov, temperatura ekstrakcije in še bi lahko naštevala. Ko sem najprej izvedela, da je bilo učinkovanje izvlečkov tako majhno, sem bila malo razočarana. Ko pa sem izvedela, da je to v laboratoriju zelo pogosto, sem bila vesela, da sem rezultate sploh dobila.

Zelo zanimivo je bilo prebirati literaturo o tem, kako antibiotiki delujejo na bakterijsko celico ter o zdravilnih učinkih rastlin, ki jih je veliko več, kot sem sprva mislila. Zdravilne rastline in njihove učinke na zdravje so poznali že v starih časih, ko so bili ljudje bolj povezani z naravo kot sedaj. Menim, da se lahko iz tradicionalne medicine veliko naučimo. Vendar pa z globalnim segrevanjem in posledično izumiranjem živalskih in rastlinskih vrst to postaja vse težje, zato je pomembno, da se ljudje začno zavedati pomena rastlin in vsake vrste na zemlji, ter jo spoštovati.

7. ZAKLJUČEK

Hipoteza 1: Nekatere rastline bodo imele protibakterijski učinek.

Hipotezo lahko potrdim, saj sem protibakterijski učinek opazila pri dveh rastlinah, in sicer pri vodnem izvlečku iz travniške kadulje in pri etanolnem izvlečku iz šentjanževke.

Hipoteza 2: Pri neredčenem vzorcu bo protibakterijski učinek večji kot pri 10-krat redčenem.

To hipotezo lahko potrdim, saj sem zaviralne pasove opazila le pri neredčenih vzorcih, ki so vsebovali 50 mg/ml izvlečka. Pri 10-krat redčenih vzorcih, ki so vsebovali 5 mg/ml izvlečka, zaviralnega pasu nisem opazila pri nobenem od izvlečkov.

Hipoteza 3: Etanolni izvlečki bodo učinkovali bolje kot vodni izvlečki.

To hipotezo lahko ovržem, saj sem protibakterijski učinek zasledila pri enem vzorcu iz etanalnega izvlečka in pri enem vzorcu vodnega izvlečka.

Hipoteza 4: Protibakterijski učinek bom opazila le pri enem od izvlečkov (vodni ali etanolni izvleček), nikoli pri obeh.

To hipotezo lahko potrdim, saj sem pri obeh vzorcih, kjer sem opazila protibakterijski učinek, le-tega zasledila le pri enem od vzorcev, bodisi pri vzorcu, raztopljenem v vodi, kot v primeru travniške kadulje ali pa pri vzorcu, raztopljenem v etanolu, kot v primeru šentjanževke. Le pri travniški kadulji sem okrog enega diska z etanolnim izvlečkom opazila ozek zaviralni pas.

Hipoteza 5: Na bakteriji *E. coli* in *S. aureus* bodo delovali različni antibiotiki.

Te hipoteze ne morem ovreči ali potrditi, saj testiranja na bakteriji *E. coli* nisem izvedla.

Hipoteza 6: Bakterija *E. coli* bo manj občutljiva na antibiotike kot *S. aureus*.

Te hipoteze prav tako ne morem ovreči ali potrditi, saj testiranja na bakteriji *E. coli* nisem izvedla.

8. LITERATURA

- Brooks B. Zgodbe za otroke, ki si drznejo biti drugačni, Učila International, 2020 ISBN 97-961-00-4566-32
- Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020;25(6):1340.
- Caldeira GI, Gouveia LP, Serrano R, Silva OD. Hypericum Genus as a Natural Source for Biologically Active Compounds. *Plants (Basel)*. 2022;11(19):2509.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564-82.
- Eyler RF, Shvets K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Jul 5;14(7):1080-1090.
- Fojkar M. Odpornost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* proti izbranim antibiotikom : diplomsko delo, univerzitetni študij. 2014:Ljubljana. Pridobljeno s (15. 12. 2023): <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=118330>
- Giguere S. Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2006. p. 3-9.
- Gööck Roland, *Gewürze und Kräuter von A - Z" (V svetu začimb in dišav)*. 1979:Ljubljana:Založba Mladinska knjiga in HP Droga Portorož.
- Gornik A :Protimikrobno in modulatorno delovanje izbranih rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin pri bakterijah *Campylobacter jejuni*, diplomsko delo. 2011 univerzitetni študij [na spletu]. Diplomsko delo. Ljubljana : A. Gornik. Pridobljeno s (15. 12. 2023): <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?>
- Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology 2009.

- Jeršek B. Mikrobiološka analiza: navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. 2013:Ljubljana:Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Klancnik A, Piskernik S, Jeršek B, Mozina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods*. 2010;81(2):121-6.
- McRae J. et al. "Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants." *The Environmentalist* 27. 2007: 165-174.
- Mesec U. Iskanje novih potencialnih zaviralcev N-acetilglukozamin enolpiruvil tranferaze z rešanjem knjižnice spojin Fakultete za farmacijo : diplomska naloga [na spletu]. 2014;Ljubljana. Pridobljeno s (12. 12. 2023): http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2014/Mesec_Uros_dipl_nal_2014.pdf
- Ody P. Zdravljenje z zelišči - praktični vodnik zdravilnih zelišč z zdravili za najpogostejše bolezni. Prevod Iztok Ilich in Jasna Kešpret. 1994:Založba Domus, Ljubljana ISBN 86-7137-089-5.
- CLSI M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Marec 2023
- Piskernik, S, Smole Možina, S. Protimikrobna učinkovitost rastlinskih izvlečkov in vitro in v izbranih živilih. 2016. Pridobljeno s (12. 12. 2023): http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/dd_piskernik_sasa.pdf
- SIST EN 14885:2022/AC:2023. Kemična razkužila in antiseptiki - Uporaba evropskih standardov za kemična razkužila in antiseptike, SIST EN 14885:2022/AC:2023. EN 14885:2022 (2022).
- Srečković N, Mišić D, Gašić U, Matić SLj, Katanić Stanković JS, Mihailović NR, Monti DM, D'Elia L, Mihailović V. Meadow sage (*Salvia pratensis* L.): A neglected

sage species with valuable phenolic compounds and biological potential, *Industrial Crops and Products*, 2022;189:115841.

- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010;21:1199-1218.
- Tsioutsiou EE, Amountzias V, Vontzalidou A, Dina E, Stevanović ZD, Cheilari A, Aligiannis N. Medicinal Plants Used Traditionally for Skin Related Problems in the South Balkan and East Mediterranean Region-A Review. *Front Pharmacol*. 2022;13:936047.
- Vaou, Natalia, et al. "Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives." *Microorganisms* 2021: 9(10) 2041.
- Zampaloni C, Mattei P, Bleicher K, Winther L, Thäte C, Bucher C, Adam JM, Alanine A, Amrein KE, Baidin V, Bieniossek C, Bissantz C, Boess F, Cantrill C, Clairfeuille T, Dey F, Di Giorgio P, du Castel P, Dylus D, Dzygiel P, Felici A, García-Alcalde F, Haldimann A, Leipner M, Leyn S, Louvel S, Misson P, Osterman A, Pahil K, Rigo S, Schäublin A, Scharf S, Schmitz P, Stoll T, Trauner A, Zoffmann S, Kahne D, Young JAT, Lobritz MA, Bradley KA. A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter. *Nature*. 2024;625(7995):566-571.

Drugi spletni viri (dostopano december 2023 in januar 2024):

- <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-cocci/staphylococci/catalase-positive/staphaurex-positive/staphylococcus-aureus.html>
- <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/catalase-negative-7/colistin-susceptible-2/escherichia-coli-o157-h7.html>
- <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/staphylococcus-aureus-mrsa-in-ca-mrsa>
- https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/ecoli_05082015.pdf
- <https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek>

- https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/ecoli_05082015.pdf
- <https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/rastlinski-svet>
- <https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/zivljenjski-prostor>
- <https://www.urbanatura.si/vsebina/>
- <https://www.proteus.si/wp-content/uploads/2023/08/Predstavitev-Vla%C5%BEni-travniki.pdf>
- https://www.hribi.net/slika_rastlina/navadna_crnoglavka_prunella_vulgaris/5137).
- https://dijaski.net/gradivo/bio_vaj_diferencialno_barvanje_po_gramu_01
- <https://www.semينا.si/katalog/posebne-linije/herbal-line/rs-herbal-line-divji-timijan-pojlajeva-materina-dusica-thymus-pulegoides/>
- <https://herbessa.si/blogs/blog-zelisc/kamilica-matricaria-recutita>
- <https://www.oaza-zelisc.si/eo-divji-origano>