



Srednja šola Slovenska Bistrica
Ulica dr. Jožeta Pučnika 21
2310 Slovenska Bistrica

ANTIMIKROBNO DELOVANJE ZELIŠČNIH EKSTRAKTOV

Antimicrobial activity of herbal extracts

RAZISKOVALNO PODROČJE: BIOLOGIJA

RAZISKOVALNA NALOGA

Mentorica:

Vera Cunk Manić, univ. dipl. biol., prof.

Avtorica:

Jerneja Vavdi

Somentorica:

Alenka Pislak, univ. dipl. mikrobiol., lab.

Jezikovni pregled:

mag. Gregor Artnik, prof. slov. in angl.

Slovenska Bistrica, februar 2024



KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Opredelitev problema	2
1.2	Raziskovalno vprašanje	2
1.3	Namen naloge	2
1.4	Hipoteze	2
2	TEORETIČNI DEL	3
2.1	Zelišča	3
2.2	Flavonoidi	8
2.3	Antibiotiki in naravni antibiotiki	8
2.4	Bakterije	9
3	EKSPERIMENTALNI DEL	11
3.1	Preiskovani vzorec	11
3.2	Material in pripomočki	11
3.2.1	Pripomočki	11
3.2.2	Materiali	13
3.3	Metode dela	14
3.4	Priprava zeliščnih ekstraktov	15
3.3.1	Priprava gojišč	17
3.3.3	Difuzijski antibiogram	17
4	REZULTATI	20
4.1	Suha zelišča v etanolu	21
4.2	Sveža zelišča v etanolu	23
4.3	Suha zelišča v heksanu	25
4.4	Sveža zelišča v heksanu	26
4.5	Kontrole	28
5	RAZPRAVA	31
6	ZAKLJUČEK	35
7	LITERATURA IN VIRI	37
7.1	LITERATURA	37
7.2	VIRI	37

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Česen (Understanding Herbs – Garlic [<i>Allium sativum</i>], 2019).....</i>	3
<i>Slika 2: Korenina hrena (Zaper in hren proti virozi – za zdrave pljučne alveole, 2023).....</i>	5
<i>Slika 3: Kopriva (Velika kopriva [<i>Urtica dioica</i>], 2023).....</i>	6
<i>Slika 4: Navadni netresk (osebni arhiv, 2023)</i>	6
<i>Slika 5: Navadni žajbelj (Hamidpour, M., idr., 2014)</i>	7
<i>Slika 6: Česen kot naravni antibiotik (Comunale, J., 2023).....</i>	9
<i>Slika 7: Zgradba bakterijske celične stene (Belušič, G., idr., 2019).....</i>	10
<i>Slika 8: Pripomočki (osebni arhiv, 2023).....</i>	11
<i>Slika 9: Terilnica in označene čaše (osebni arhiv, 2023)</i>	12
<i>Slika 10: Pripomočki in materiali za pripravo gojišč (osebni arhiv, 2023).....</i>	13
<i>Slika 11: Materiali za pripravo ekstraktov (osebni arhiv, 2023)</i>	13
<i>Slika 12: Tehtanje zelišč (osebni arhiv, 2023)</i>	15
<i>Slika 13: Ekstrakti pred filtriranjem (osebni arhiv, 2023)</i>	16
<i>Slika 14: Filtriranje ekstraktov (osebni arhiv, 2023).....</i>	16
<i>Slika 15: Filtrirani ekstrakti (osebni arhiv, 2023)</i>	16
<i>Slika 16: Nanašanje suspenza z avtomatsko pipeto (osebni arhiv, 2023).....</i>	18
<i>Slika 17: Nanos ekstrakta na disk (osebni arhiv, 2023).....</i>	18
<i>Slika 18: Gojišča z ekstrakti (osebni arhiv, 2023)</i>	19
<i>Slika 19: Način merjenja inhibicijskih con/območij (osebni arhiv, 2023).....</i>	20
<i>Slika 20: Učinek etanolnih ekstraktov iz suhih zelišč (osebni arhiv, 2023)</i>	21
<i>Slika 21: Učinek etanolnih ekstraktov iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2023).....</i>	23
<i>Slika 22: Učinek heksanovih ekstraktov iz suhih zelišč (osebni arhiv, 2023)</i>	25
<i>Slika 23: Učinek heksanovih ekstraktov iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2023)</i>	26
<i>Slika 24: Kontrola fiziološke raztopine (osebni arhiv, 2023).....</i>	28
<i>Slika 25: Kontrola suspenzije izolirane bakterijske kolonije na gojišču (osebni arhiv, 2023)</i>	28

KAZALO GRAFOV

<i>Graf 1: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri etanolnih ekstraktih iz posušenih zelišč (osebni arhiv, 2024).....</i>	22
<i>Graf 2: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri etanolnih ekstraktih iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2024).....</i>	24
<i>Graf 3: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri heksanovih ekstraktih iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2024).....</i>	27
<i>Graf 4: Povprečni premer območij nižje koncentracije bakterij pri ekstraktih iz svežih in suhih zelišč (osebni arhiv, 2024).....</i>	30

POVZETEK

Ob soočanju z bakterijskimi okužbami se posamezniki pogosto zatečejo k antibiotikom ali si sami pomagajo z naravnimi zelišči. Kot odziv na naraščajočo odpornost mikrobov na antibiotike postaja raziskovanje naravnih alternativ vse pomembnejše. Rastline, kot so česen, žajbelj, timijan, hren, ingver, kurkuma, kopriva in druge, vsebujejo močne kemične spojine, podobne antibiotikom, in ponujajo možnost naravnega zdravljenja. V raziskovalni nalogi smo iskali, katero izmed izbranih zelišč bo imelo največji protimikrobni učinek z metodo disk difuzije. Zastavili smo si tri hipoteze in s predstavljenimi metodami raziskovanja preverjali ter raziskovali, kako ekstrakti česna, hrena, koprive, netreska in žajblja vplivajo na izolirano kolonijo površinskih bakterij. Prav tako smo primerjali ekstrakte, pripravljene iz posušenih zelišč in svežih zelišč. V prvem delu naloge smo pripravili teoretični pregled strokovnih člankov o antimikrobnem delovanju zelišč. Nadaljevali smo z raziskovalnim delom, pri čemer smo z metodo disk difuzije testirali različne ekstrakte iz zelišč. Primerjali smo ekstrakte iz svežih in suhih zelišč v polarnem in nepolarnem topilu, tako da smo merili inhibicijska območja okrog diskov. Etanolni ekstrakti iz posušenih zelišč so učinkovitejši pri zaviranju rasti bakterij kot ekstrakti iz svežih zelišč. Česen se je izkazal kot najmočnejši naravni antibiotik, sledil je žajbelj, še posebej v etanolnih ekstraktih iz posušenih zelišč. V zaključku smo ovrednotili začetne hipoteze in podali predloge za izboljšave raziskave.

KLJUČNE BESEDE:

Antimikrobno delovanje, zeliščni izvlečki, česen, hren, kopriva, netresk, žajbelj, metoda disk difuzije

ABSTRACT

When it comes to bacterial infections, people often turn to antibiotics or natural remedies using herbs. However, due to the increasing resistance of microbes to antibiotics, research into natural alternatives is becoming more important. Certain plants like garlic, sage, thyme, horseradish, ginger, turmeric, nettle, and others contain chemical compounds similar to antibiotics, which offer the possibility of natural treatment. In our research, we aimed to determine which of the selected herbs would have the greatest antimicrobial effect using the disk diffusion method. We set up three hypotheses and tested them using the presented research methods, investigating how extracts from garlic, horseradish, nettle, horseradish, and sage affect the isolated colony of surface bacteria. We also compared extracts prepared from dried and fresh herbs. In the first part of the assignment, we reviewed professional articles on the antimicrobial action of herbs. We then conducted the research work, testing various herbal extracts using the disc diffusion method. We measured the inhibition zones around the discs and compared extracts of fresh and dry herbs in polar and non-polar solvents. The results showed that ethanol extracts from dried herbs are more effective in inhibiting bacterial growth than extracts from fresh herbs. Garlic was found to be the most potent natural antibiotic, followed by sage, especially in ethanol extracts from dried herbs. Finally, we evaluated the initial hypotheses and made suggestions for improving the research.

KEY WORDS:

Antimicrobial activity, herbal extracts, garlic, horseradish, nettle, houseleek, sage, disc diffusion method

1 UVOD

V raziskovalni nalogi smo preučevali antimikrobno delovanje etanolnih in heksanovih ekstraktov česna (*Allium sativum*), žajblja (*Salvia officinalis*), koprive (*Urtica dioica*), hrena (*Armoracia rusticana*) in navadnega netreska (*Sempervivum tectorum*) na izolirano kolonijo bakterij.

V sodobnem svetu se soočamo z naraščajočo grožnjo nalezljivih bolezni in razvojem odpornosti mikroorganizmov na antibiotike. To je privedlo do vse večjega zanimanja za naravne alternative zdravljenja obolenj. Med alternativami so zeliščni ekstrakti, ki se že stoletja uporabljajo v tradicionalni medicini po vsem svetu.

Česen (*Allium sativum*) je eno izmed najbolj raziskanih zelišč v zvezi s preprečevanjem bakterijskih okužb. Širok nabor mikroorganizmov, vključno z bakterijami, glivami, praživalmi in virusi, se je izkazal za občutljivega na pripravke iz strtega česna, kar znanstveniki pripisujejo organski žveplovi spojini, alicinu (Ankri in Mirelman, 1999).

Uporaba koprive (*Urtica dioica*) je znana predvsem v naravni medicini pri zdravljenju okužb sečil in pri lajšanju težav pri revmatičnih bolnikih. Kljub temu, da je kopriva še zaenkrat manj raziskana pri antimikrobnem delovanju, so študije že dokazale pozitivne rezultate uporabe koprive pri zdravljenju nekaterih bakterijskih obolenj (Nettles, 2022).

Žajbelj se že dolga leta uporablja v tradicionalni medicini za lajšanje bolečin, in sicer kot preventiva pred bakterijskimi in virusnimi okužbami. Več študij kaže, da bi se žajbelj lahko uporabljal pri razvoju zdravih zaradi svoje terapevtske dejavnosti, o kateri poročajo v številnih državah Azije in Bližnjega vzhoda, zlasti na Kitajskem in v Indiji (Hamidpour idr., 2014).

Navadni netresk (*Sempervivum tectorum*) je pogosta pomoč pri vnetju ušes. Antimikrobno učinkovitost pa so pokazale tudi študije, ki so sok rastline preizkusili na bakterijah, ki povzročajo otitis (Stojković idr., 2015).

Korenine hrena (*Armoracia rusticana*) se uporabljajo za zdravljenje okužb dihalnih poti in nezapletenih okužb sečil. Študije so dokazale, da lahko močno antibakterijsko delovanje korenin hrena pripišemo različnim izotiocianatom, ki so prisotni v rastlini (Negro, 2022).

1.1 Opredelitev problema

Ljudje se pogosto soočamo z raznimi bakterijskimi okužbami, ki jih v hujših primerih zdravimo z antibiotiki, v blažji obliki zdravljenja pa si pomagamo sami z naravnimi učinkovinami. V domači lekarni so najpogostejše rastline, kot so česen, žajbelj, timijan, hren, ingver, kurkuma, netresk, kopriva ipd. To so rastline, ki imajo visoko vsebnost kemijskih spojin, ki ubijajo bakterije, podobno kot antibiotiki. Pomembno je, da bi si ljudje znali sami pomagati pri blažjih bakterijskih okužbah, in sicer s preprostimi in naravnimi učinkovinami.

1.2 Raziskovalno vprašanje

Katero izmed izbranih zelišč bo imelo ob uporabi disk metode največji antibakterijski učinek na izolirano kolonijo bakterij?

1.3 Namen naloge

Z raziskovalno nalogo smo želeli spoznati temeljne metode raziskovanja v mikrobiologiji in raziskati, kako ekstrakti česna, koprive, netreska, hrena in žajblja vplivajo na izolirano kolonijo površinskih bakterij. Prav tako smo opazovali razliko v antimikrobni aktivnosti med ekstrakti, pripravljenimi iz posušenih zelišč, in tistimi, ki so bili pripravljeni iz svežih zelišč.

1.4 Hipoteze

Hipoteza 1: Največjo inhibicijsko cono bo ustvaril česen, saj je najmočnejši naravni antibiotik med izbranimi zelišči.

Hipoteza 2: V gojiščih, kamor bomo nanесли ekstrakte iz suhih zelišč, se bo ustvarila večja inhibicijska cona kot pri svežih zeliščih. Posušena zelišča vsebujejo manj vode kot sveža in imajo zato višjo koncentracijo antimikrobnih snovi.

Hipoteza 3: Kopriva ne bo imela velikega antimikrobnega učinka na izolirano bakterijo zaradi šibkih antimikrobnih snovi v rastlini.

2 TEORETIČNI DEL

Zelišča imajo že dolgo zgodovino uporabe v medicini, saj so predstavljala temeljno sredstvo za zdravljenje in lajšanje različnih simptomov obolenj v različnih kulturah po svetu. Njihova uporabnost v medicini je raznolika in zajema širok spekter koristnosti – od lajšanja simptomov do podpore dolgoročnemu zdravju. Rastline tvorijo medicinsko pomembne snovi, med katere sodijo eterična olja, glikozidi, flavonoidi, alkaloidi, čreslovine in grenčine (Möhring, 2003, str. 14–15).

2.1 Zelišča

Česen (*Allium sativum*) je aromatična rastlina, ki se že tisočletja uporablja kot hrana, začimba in zdravilo v različnih kulturah po svetu. S svojo značilno pikantno aromo in zdravilnimi lastnostmi je česen postal ključna sestavina mnogih kulturnih kuhinj ter pomembno sredstvo tradicionalne medicine.

Rastlina česna pripada družini čebulnic (*Alliaceae*) in je znana po svojih značilnih koreninah, ki so sestavljene iz skupine zob, imenovanih stroki. Vsak strok vsebuje večje število manjših čebulic, imenovanih nageljni, ki so ključne za razvoj nove rastline. Česen je rastlina, ki izvira iz osrednje Azije, vendar se je zaradi svoje vsestranske uporabnosti razširil po vsem svetu. Številne študije so potrdile njegove antibakterijske, protivnetne in antioksidativne lastnosti. Ključna sestavina, ki je razlog za mnoge zdravilne učinke, je alicin, ki se sprosti, ko se česen drobi ali razreže (Oberbeil idr., 2002, str. 96–97).



Slika 1: Česen (Understanding Herbs – Garlic [*Allium sativum*], 2019)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Česen vsebuje okoli 0,5 % hlapnega eteričnega olja, sestavljenega iz žveplovih učinkovin (dialildisulfidi, dialiltrisulfidi, metilaliltrisulfidi). V strokih je brezbarvna aminokislina aliin (S-alil-L-cistein sulfoksid), ki je brez vonja in nima nobene farmakološke učinkovitosti. Ko strok zmeljemo, se sprosti encim alinaza, ki povzroči pretvorbo aliina v 2-propensulfensko kislino, ta pa dimerizira in tvori alicin (*Allium sativum*, 2023).

Česen zavira nastanek radikalov, spodbudi endogene mehanizme njihove razgradnje in izboljša delovanje celičnih antioksidativnih mehanizmov (superoksiddismutaze, katalaze, glutation-peroksidaze), ščiti lipoproteine nizke gostote (LDL) pred oksidacijo in zavira jedrni transkripcijski dejavnik kapa B (NF-kB). *In vivo* raziskave so pokazale, da česnovo olje zmanjša lipidno peroksidacijo v jetrih in mitohondrijih. Antioksidativni učinki so zanimivi v povezavi z antiateroskleroznimi, antihepatotoksičnimi in protirakavimi učinki česna in njegovih sestavin, saj igra na primer oksidacija LDL pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju ateroskleroze. Staran česnov izvleček in S-alilcistein *in vitro* zavirata oksidacijo LDL in ščitita endotelijske celice pljučne arterije pred poškodbami zaradi oksidiranih molekul LDL. V poskusih na govejih endotelijskih celicah pljučne arterije in glodalskih makrofagih je starani izvleček česna zmanjšal izločanje peroksidov zaradi oksidiranih LDL (Kreft idr., 2013, str. 184–191).

Navadni hren (*Armoracia rusticana*) je zelnata rastlina, ki je že stoletja cenjena zaradi svojih kulinaričnih in zdravilnih lastnosti. Ta robustna rastlina, ki spada v družino križnic, je doma v Evropi, vendar jo najdemo tudi na drugih kontinentih, saj uspeva v zmernem podnebjju. Hren se pogosto goji zaradi korenin, ki so znane po izrazitem, pikantnem okusu. Močno protibakterijsko delovanje korenin hrena je mogoče pripisati različnim izotiocianatom (gorčičnim oljem, ITC), ki nastanejo z encimsko razgradnjo. Raziskave antibakterijske aktivnosti so pokazale, da imajo protibakterijsko delovanje le ekstrakti in frakcije, ki vsebujejo ITC (izotiocianate). Izotiocianati (ITC) so močni inhibitorji bakterijskih celic, sploh njihovih celičnih membran. To vodi do povečane prepustnosti membrane, sprememb v membranskem potencialu in izgube celovitosti membrane, kar povzroči iztekanje kalijevih ionov. Vse to zmanjša odpornost bakterijske celice in lahko privede do citolize (Negro idr., 2022).

Antibakterijsko učinkovanje hrena potrjuje tudi klinična raziskava zeliščnega pripravka s hrenom in kapucinko, ki je pri zdravljenju akutnih sinusitisa, bronhitisa in okužb sečil po učinkovitosti povsem primerljiv z antibiotičnim zdravljenjem – a vendar je uporaba hrenovega pripravka znatno varnejša. Na

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Češkem so pred nekaj leti preučevali tudi vpliv hlapnih snovi nekaterih začimbnic na različne seve bakterije *Staphylococcus aureus*. Med vsemi testiranimi se je za najmočnejše izkazalo prav eterično olje hrena, sledili pa so česen, šetraj, timijan in materina dušica (Topolovec, 2018, str. 34).



Slika 2: Korenina hrena (Zaper in hren proti virozi – za zdrave pljučne alveole, 2023)

Kopriva (*Urtica dioica*) se nanaša na različne vrste rastlin iz rodu *Urtica*, ki vključujejo večinoma trajnice, ki so znane po svojih žarnih dlakah, ki lahko povzročijo draženje kože. Ena najpogostejše znanih vrst kopriv je običajna kopriva (*Urtica dioica*). Kljub dražečim učinkom se kopriva uporablja v kulinariki in tradicionalni medicini. Mladi listi koprive so bogati s hranili, vključno z vitaminom C, železom, magnezijem in drugimi minerali, zato je v domači medicini izjemno cenjena (Nettles, 2022).

Čeprav je rastlina znana po svoji tradiciji o zdravljenju revmatičnih bolnikov, malo študij namiguje na antibakterijske učinkovine, ki bi uničile bakterijske okužbe. S kemijsko analizo snovi v koprivi so znanstveniki v raziskavi odkrili prisotnost neofitadiena, ki je znan kot antibakterijska spojina. Poleg tega so bili v rastlini opaženi tudi alkaloidi, fenoli, flavonoidi, tanini in saponini, ki naj bi igrali pomembno vlogo pri antibakterijskem učinku (Salih idr., 2014).

Kopriva vsebuje tudi veliko mineralnih snovi – od tega 480 mg kalija na 100 g sveže teže in 1–4 g silikatov (silicijevih kislin). V koprivi se nahaja še 400 mg kalcija ter sekundarnih rastlinskih snovi – estrov kofeinske kisline, ki jih je največ v svežih listih koprive (Saum idr., 2014, str. 38–39).



Slika 3: Kopriva (Velika kopriva [*Urtica dioica*], 2023)

Navadni netresk (*Sempervivum tectorum*) je pritlična rastlina, ki jo najdemo v skalnih razpokah v večjem delu Slovenije. Spada v skupino tolstičevk (*Crassulaceae*). Ljudska imena rastline so ušesnik, uhec ali uhlek. Danes je znano, da se lahko s segretim netreskovim sokom ozdravi blago vnetje ušes, rastlino pa uporabljajo tudi v homeopatiji. Študije, ki so raziskovale antimikrobno delovanje soka netreska, so pokazale delovanje proti patogenim bakterijam. To sposobnost so po kemični raziskavi netreska pripisali organskim kislinam, sploh jabolčni kislini ter fenolom, ki imajo veliko antioksidativnih lastnosti (Stojković idr., 2015).



Slika 4: Navadni netresk (osebni arhiv, 2023)

Žajbelj (*Sativa officinalis*) iz rodu *Salvia* je največji član družine *Lamiacea* ali mete, ki vsebuje več kot 900 vrst po vsem svetu. Rastline so večinoma aromatične in so trajnice s cvetovi v različnih barvah. Številne vrste *Salvia*, vključno z navadnim žajbljem (*Salvia officinalis*), so domorodne v sredozemski regiji in nekatere vrste se po vsem svetu uporabljajo kot aromatične začimbe in tradicionalna zeliščna zdravila. Učinkovine v žajblju so čreslovine in triterpeni, pa tudi eterično olje z glavnimi učinkovinami tujonom, cineolom in kafro. Vse te imajo visoko antioksidativno aktivnost, predvsem ko gre za etanolne ekstrakte, pravijo študije. Ugotovitve raziskav podpirajo stališče, da hidroalkoholni izvleček *S. officinalis* zavira rast nekaterih bakterij, ki povzročajo zobni karies, npr. *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* in *Actinomyces viscosus*. Na podlagi te študije in svetovnega zanimanja za uporabo tradicionalnih zdravil namesto kemičnih raztopin bi *S. officinalis* s svojim baktericidnim učinkom lahko bil naravno zdravilo za zdravljenje bolezni, ki prizadenejo ustno votlino (Hamidpour idr., 2014).

V drugi študiji so raziskovali učinek koprive pri zdravljenju hiperplazije prostate. Različne dvojno slepe, s placebom kontrolirane klinične raziskave so preučevale terapevtsko učinkovitost izvlečka korenine koprive pri zdravljenju benigne hiperplazije prostate. Uporabljen je bil suhi standardizirani izvleček (5 : 1, 20-% metanol). V raziskavi s 600 mg dnevnega odmerka pri 50 bolnikih so se pokazali statistično značilni rezultati, vključno z zmanjšanjem koncentracije globulina, ki veže spolne hormone, ter povečanjem izločenega urina (za 44 %) in urinskega toka (za 9 %) v primerjavi s placebom (Kreft idr., 2013, str. 374).



Slika 5: Navadni žajbelj (Hamidpour, M., idr., 2014)

2.2 Flavonoidi

Flavonoidi so najbolj barvita skupina rastlinskih pigmentov, ki dajejo rumeno, rdečo in modro barvo cvetovom, plodovom in listom. Njihove vloge v rastlinah so zelo različne: privabljajo opraševalce, uravnavajo rast, zavirajo bakterijske in virusne encime ter ščitijo pred ultravijoličnimi žarki UVB. Zaradi dokazanih ugodnih učinkov prehrane, bogate s flavonoidi, na številne patološke procese so flavonoidi pogoste sestavine prehranskih dopolnil. Pri tem moramo opozoriti, da imajo v prevelikih koncentracijah tudi toksične učinke, zato je pri dolgotrajnejši uporabi pripravkov s flavonoidi potrebna pazljivost. Flavonoidi predstavljajo zelo raznoliko skupino spojin in imajo tudi zelo širok spekter bioloških učinkov. V raziskavah so dokazali pozitivne učinke pri številnih boleznih, kot so hipertenzija in srčno-žilne motnje, hiperholesterolemija, vnetje, sladkorna bolezen, astma in alergije, rakave in revmatične bolezni ter aids. Poudariti moramo, da je večina farmakoloških lastnosti sicer dokazana v *in vitro* poskusih, vendar pa obstaja zelo malo kliničnih raziskav in podatkov o terapevtski učinkovitosti (Kreft idr., 2013, str. 514).

2.3 Antibiotiki in naravni antibiotiki

Antibiotiki so zdravila za zdravljenje bakterijskih okužb. Farmacevtska industrija je doslej razvila številne antibiotike, ki jih delimo na dve skupini: antibiotiki širokega spektra – delujejo na mnogo različnih vrst bakterij in antibiotiki ozkega spektra – delujejo samo na eno (specifično) vrsto bakterij. Antibiotična zdravila delujejo na različne načine. Nekateri antibiotiki preprečijo sintezo celične stene bakterij. Drugi antibiotiki bakterijam preprečijo tvorbo beljakovin ali vitaminov, ki jih te nujno potrebujejo za preživetje. Posebna skupina antibiotikov deluje tako, da bakterijam preprečuje, da bi pri razmnoževanju pravilno predale svoj dedni zapis. Na voljo so celo antibiotiki, ki delovanje bakterij zavrejo na več omenjenih načinov hkrati, kar je še posebej učinkovito (Kaj so antibiotiki in kako delujejo, 2023).

Naravni antibiotiki niso sintetizirani v laboratoriju kot večina antibiotikov, ki jih običajno predpisujejo zdravniki. Naravne antibiotične rastline in snovi so stoletja uporabljale številne različne kulture po vsem svetu, vendar je bil prvi antibiotik, ki se je široko uporabljal v zahodni medicini, penicilin, ki nastane kot stranski produkt bioloških procesov plesni *Penicillium notatum*. Škotski bakteriolog Alexander Fleming je odkril antibiotik penicilin, ko je bila kultura bakterije *Staphylococcus aureus* okužena z

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

zeleno plesnijo. *Penicillium notatum* je sproščal kemične izločke, za katere so opazili, da ubijajo in preprečujejo rast bakterij (Comunale, 2023).



Slika 6: Česen kot naravni antibiotik (Comunale, J., 2023)

Namen naravnih antibiotikov je zagotoviti poceni, enostavne in nesintetične rešitve za različne vrste okužb. Pokazalo se je, da prekomerna uporaba močnih, laboratorijsko sintetiziranih antibiotikov na recept spodbuja razvoj odpornih mikrobov. Prekomerno predpisovanje močnih antibiotikov za boj proti pogostim boleznim lahko nenamerno spodbudi nastanek nevarnih, antibiotikom odpornih bakterij. Če nekatere bakterijske vrste razvijejo evolucijske prilagoditve, ki jih naredijo odporne na antibiotike na recept, lahko preživijo medicinsko zdravljenje. Z nenehno uporabo antibiotikov si pacienti nezavedno škodijo in ubijajo mikroorganizme, vključno s koristnimi, z namenom blaženja simptomov obolenja. Naravni antibiotiki lahko omejijo prekomerno uporabo antibiotikov na recept (ibid.).

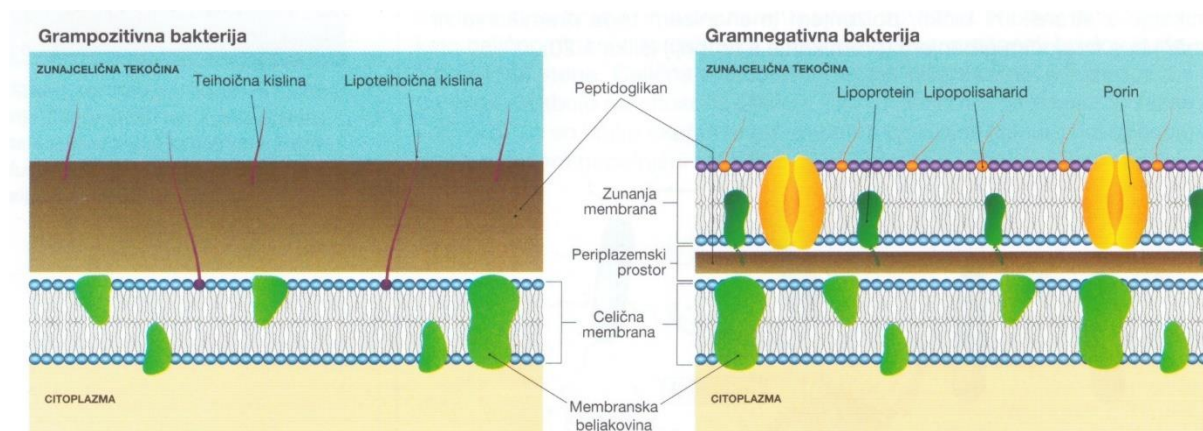
2.4 Bakterije

Bakterije so mikroskopsko majhna enocelična živa bitja, ki niso vidna s prostim očesom. Spadajo med prokariote in imajo preprosto celično strukturo s trdo celično steno iz peptidoglikana, povprečna velikost prokariotske celice je od 0,5 do 2 mikrometra. Glede na obliko ločujemo različne skupine, od najbolj enostavnih, kot so okrogle (koki), paličaste (palčke ali bacili) in spiralne ali svedraste bakterije (spirile in spirohete), do bolj neobičajnih, ukrivljenih, nitastih, celic z različnimi izrastki, pa tudi zelo nenavadnih, kot so celice oblike pošne znamke (Belušič idr., 2019).

Večino bakterij delimo glede na zgradbo celične stene na grampozitivne in gramnegativne bakterije

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

(poimenovanje po Gramu). Grampozitivne imajo debelo celično steno, ki je večinoma iz peptidoglikana ali mureina in nimajo zunanje membrane, za razliko od gramnegativnih bakterij, ki imajo tanko celično steno med zunanjo ter notranjo membrano (Rowden, 2023). Peptidoglikan je polimer verige sladkorjev, ki so med seboj navzkrižno povezane s kratkimi verigami aminokislin. Celična membrana gramnegativnih bakterij je iz lipidov in polimerov sladkorjev. V zunanjem delu te membrane je molekula, imenovana lipopolisaharid (LPS ali endotoksin), lipidni del te molekule (lipid A) pa je strupen za živali in se sprosti ob razkroju bakterijske celice (ibid.).



Slika 7: Zgradba bakterijske celične stene (Belušič, G., idr., 2019)

Bakterije so enocelični organizmi, razmnožujejo se nespolno s cepitvijo, pri kateri so potomci gensko enaki staršu oz. so njegovi kloni. Bakterije se med seboj ne združujejo v tkiva, temveč v kolonije – skupek genetsko enakih bakterij, ki vse izvirajo iz iste celice. Na primernih gojiščih se bakterije cepijo tako hitro, da se iz ene same celice že v enem dnevu razvije bakterijska kolonija, ki jo lahko vidimo s prostim očesom (Belušič idr., 2019).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Preiskovani vzorec

V raziskovalni nalogi smo preučevali, kako etanolni in heksanovi ekstrakti česna, hrena, koprive, netreska in žajblja vplivajo na rast izolirane kolonije površinskih bakterij. Z uporabo difuzijskega antibiograma smo opazovali, ali so ekstrakti ustvarili cono inhibicije oziroma območje manjše koncentracije bakterij.

Naš preiskovani vzorec je bila naključna kolonija površinskih bakterij, ki smo jo izolirali iz brisa površine. Delo je potekalo pri sterilnih pogojih v šolskem laboratoriju ob prižganem gorilniku, vsi pripomočki pa so bili pred uporabo sterilizirani v sterilizatorju za 20 minut pri 120 °C. Pri izvedbi poskusa smo uporabljali rokavice.

3.2 Material in pripomočki

3.2.1 Pripomočki

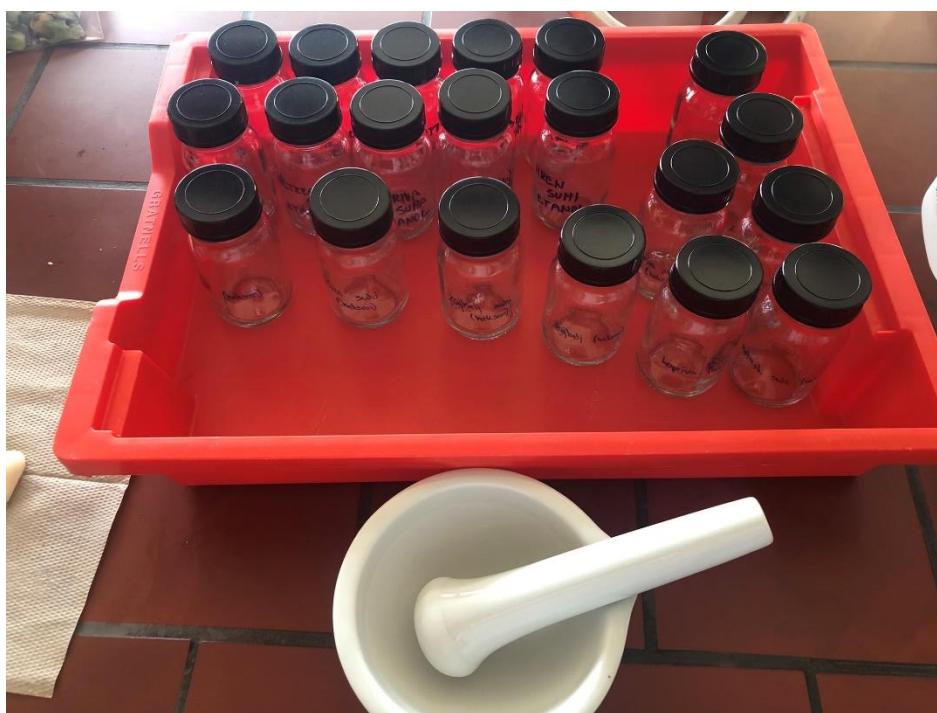
- tehtnica
- spatula
- steklena paličica
- čaše
- grelna plošča
- pincete
- petrijevke (velikost pribl. 10 cm)
- vatirane palčke
- gorilnik
- kljunasto merilo
- terlnica
- nož
- deska
- čaše s pokrovi
- lij



Slika 8: Pripomočki (osebni arhiv, 2023)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

- filtrirni papir
- diski iz filtrirnega papirja (velikosti 10 mm)
- cepilna zanka
- kapilare
- avtomatska pipeta
- epruvete s pokrovi
- mufa

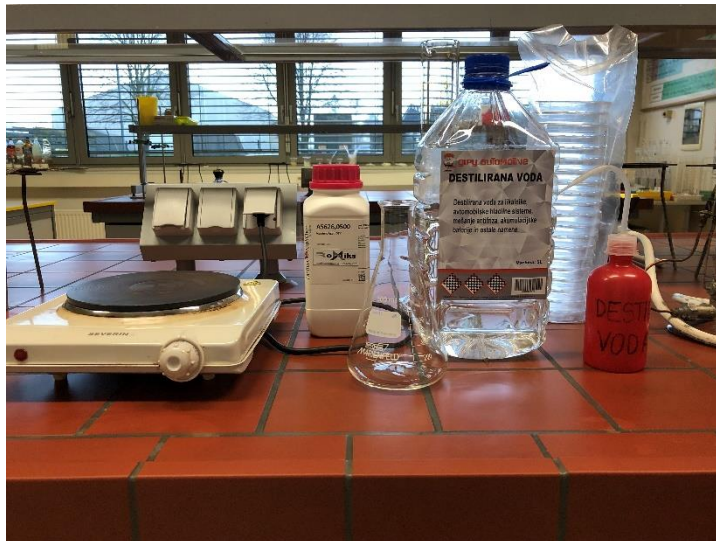


Slika 9: Terilnica in označene čaše (osebni arhiv, 2023)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

3.2.2 Materiali

- 70-% etanol
- heksan (min. 95 %)
- destilirana voda,
- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
- hranilni agar
- stroki česna
- česen v prahu
- korenina hrena
- posušeni hren
- kopriva
- posušena kopriva
- netresk
- posušeni netresk
- žajbelj
- posušeni žajbelj



Slika 10: Pripomočki in materiali za pripravo gojišč (osebni arhiv, 2023)



Slika 11: Materiali za pripravo ekstraktov (osebni arhiv, 2023)

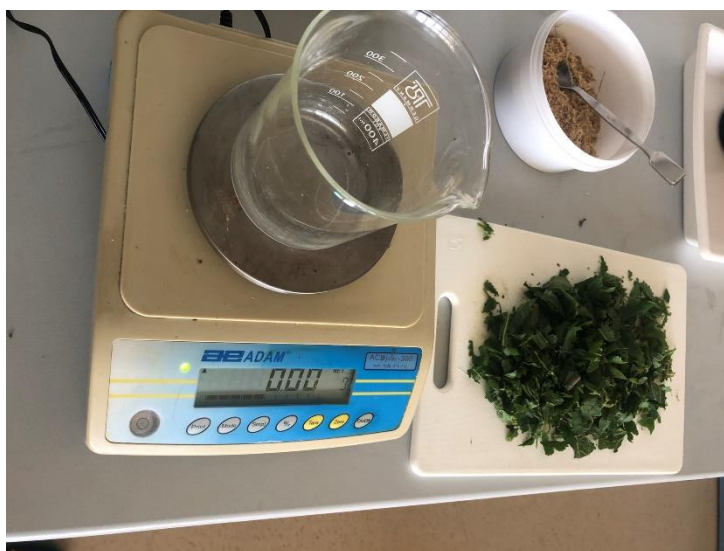
3.3 Metode dela

Pri svojem delu smo uporabili naslednje metode:

- metodo oblikovanja empiričnih testov, npr.:
 - metodo opazovanja, s katero smo preverjali, ali podane napovedi dejansko držijo (fotografiranje);
 - metodo meritev (tehtanje, filtriranje);
- metodo zbiranja podatkov in skeniranja slik;
- metodo opisne analize, s katero smo opisovali podatke;
- induktivno metodo kot metodo za sklepanje od delnega k celotnemu oziroma od individualnega k univerzalnemu; na osnovi opazovanja oziroma zbranih podatkov smo iskali vzorce in jih povezovali v teorije;
- deduktivno metodo kot metodo, ki na osnovi vnaprej določene teorije izvaja opazovanja z namenom, da bi jo dokazala ali ovrgla;
- grafične prikaze v programu Excel, s katerimi smo ponazarjali pojave ali merjene vrednosti ter kvalitativne in kvantitativne relacije med opazovanimi vrednostmi:
 - pokončni stolpični diagram, ki smo ga uporabili, ko so bili podatki razvrščeni v več pojavnih oblik in so dosegali več različnih diskretnih vrednosti;
- iskanje dodatne literature in virov.

3.4 Priprava zeliščnih ekstraktov

Izbrana sveža zelišča smo najprej sesekljali na manjše kose in jih skupaj s suhimi stehtali. Zelišča smo nato strli v terilnici, da smo dobili manjši volumen. Pripravili smo si dvajset čaš s tesnilnim pokrovom, v katere smo dali vsako zelišče posebej in jih prelili z določeno količino topila (etanol in heksan). Ker je bil volumen nekaterih zelišč še vedno velik (kopriva, žajbelj), smo jim zato dodali več topila, da je bila zel popolnoma pokrita s topilom.



Slika 12: Tehtanje zelišč (osebni arhiv, 2023)

Tako smo dobili dvajset ekstraktov za pet zelišč – sveže zelišče v etanolu in heksanu ter posušeno zelišče v etanolu in heksanu. Čaše smo pokrili s tesnilnimi pokrovi, da topilo ne bi izhlapelo, in zelišča namakali en teden. Po enem tednu smo ekstrakte prefiltrirali s filtrirnim papirjem.

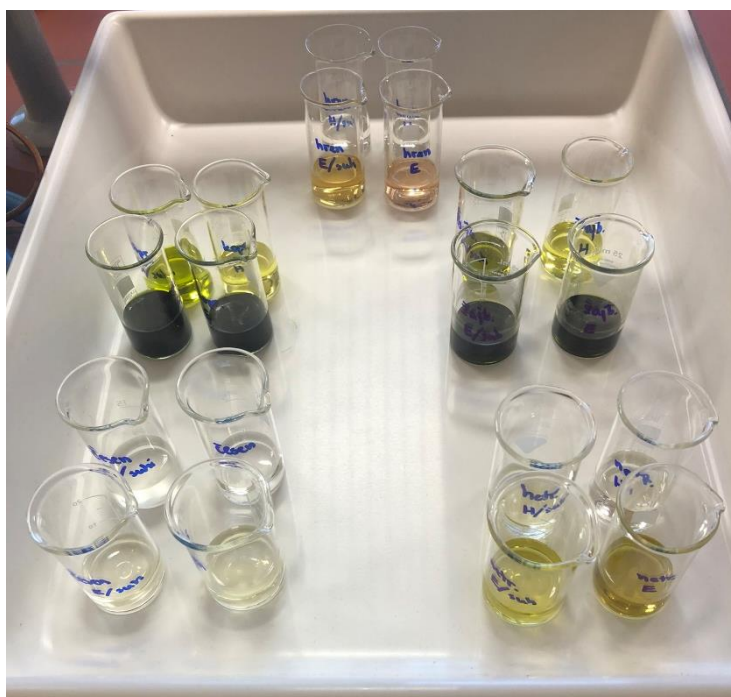
VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov



Slika 14: Filtriranje ekstraktov (osebni arhiv, 2023)



Slika 13: Ekstrakti pred filtriranjem (osebni arhiv, 2023)



Slika 15: Filtrirani ekstrakti (osebni arhiv, 2023)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Pripravili smo etanolne ekstrakte:

- 10 g svežega česna v 20 ml etanola,
- 10 g česna v prahu v 20 ml etanola,
- 10 g svežega hrena v 50 ml etanola (zaradi večjega volumna zelišča),
- 10 g posušenega hrena v 50 ml etanola,
- 10 g sveže koprove v 50 ml etanola,
- 10 g posušene koprove v 100 ml etanola (zaradi večjega volumna zelišča),
- 10 g svežega netreska v 20 ml etanola,
- 10 g posušenega netreska v 20 ml etanola,
- 10 g svežega žajblja v 50 ml etanola,
- 10 g posušenega žajblja v 50 ml etanola.

Po enakem postopku in z enakimi količinami zelišč ter topila smo pripravili še heksanove ekstrakte.

3.3.1 Priprava gojišč

Gojišča smo pripravili iz 7,5 grama agarja in 300 ml destilirane vode. Agar¹ smo pokuhali na grelni plošči in ga ohladili na 40 °C ter ga prelili v petrijevke. Pustili smo, da se agar strdi, preden smo gojišča uporabili.

3.3.3 Difuzijski antibiogram

Z vatirano palčko smo bris vzeli z mobilnega telefona, ki ni bil predčasno očiščen. Iz vzetega brisa površine smo izolirali eno kolonijo bakterij. S cepilno zanko smo jo prenesli v epruveto s 5 ml fiziološke raztopine, da smo naredili suspenz, ki smo ga z avtomatsko pipeto prenesli po 1 ml v pet petrijevk. Ko smo z avtomatsko pipeto nanegli suspenz, smo morali počakati, da se je vpil v agar.

¹ Agar je polisaharid morskih alg in je najpogosteje uporabljen za pripravo gojišč v mikrobiologiji (Filipič, B., idr., 1999).



Slika 16: Nanašanje suspenza z avtomatsko pipeto (osebni arhiv, 2023)

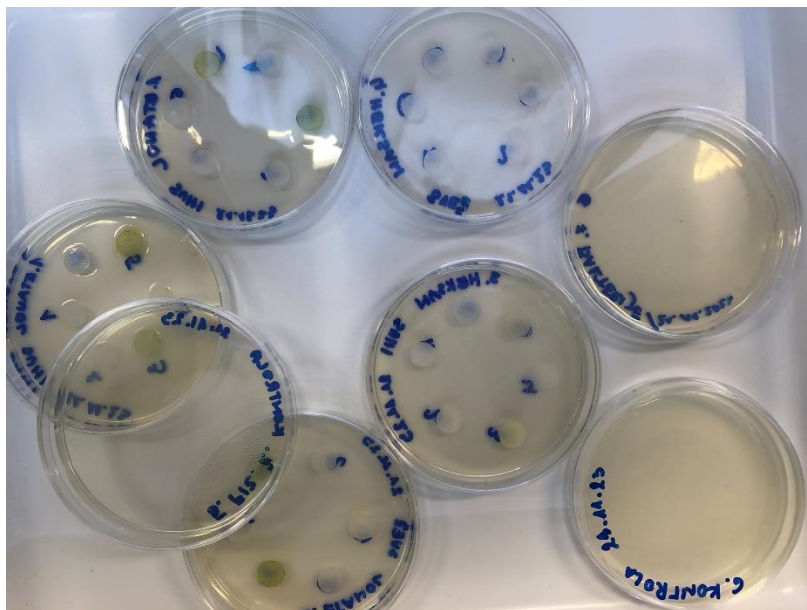
V naslednjem koraku smo na petrijevke položili diske iz filtrirnega papirja, ki smo jih prepojili z ekstrakti. Le-te smo na diske nanegli s pomočjo kapilar, da smo vedno imeli enako količino ekstrakta na disku. Kapilaro smo namočili v čašo z izvlečkom (5 ml) ter tekočino prenesli na disk.



Slika 17: Nanos ekstrakta na disk (osebni arhiv, 2023)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Po pripravi difuzijskega antibiograma smo petrijevke postavili v temen prostor pri sobni temperaturi in počakali 48 ur na rezultate.



Slika 18: Gojišča z ekstrakti (osebni arhiv, 2023)

4 REZULTATI

Namen naloge je bil primerjati nastale inhibicijske cone ali vsaj območja nižjih koncentracij bakterij med različnimi ekstrakti. Želeli smo primerjati, kakšne bodo razlike med izvlečki iz polarnega in nepolarnega topila, ter opaziti razlike med delovanjem svežih in suhih zelišč. Merjenje inhibicijskih con oz. območij je potekalo s kljunastim merilom. V meritvah je osnova premer diska (10 mm).



Slika 19: Način merjenja inhibicijskih con/območij (osebni arhiv, 2023)

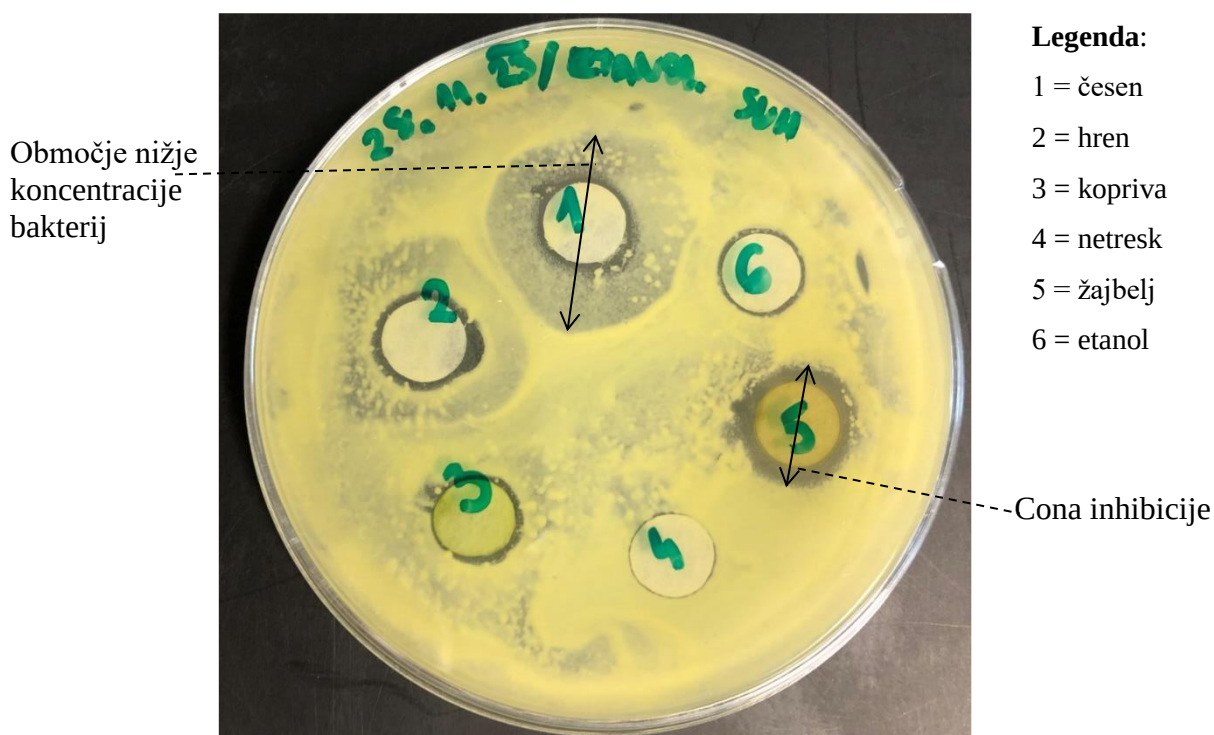
Na vsaki petrijevki so zapisane številke, ki označujejo vrsto zelišča po naslednji legendi:

- 1 = česen
- 2 = hren
- 3 = kopriva
- 4 = netresk
- 5 = žajbelj
- 6 = kontrola (samo topilo)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

4.1 Suha zelišča v etanolu

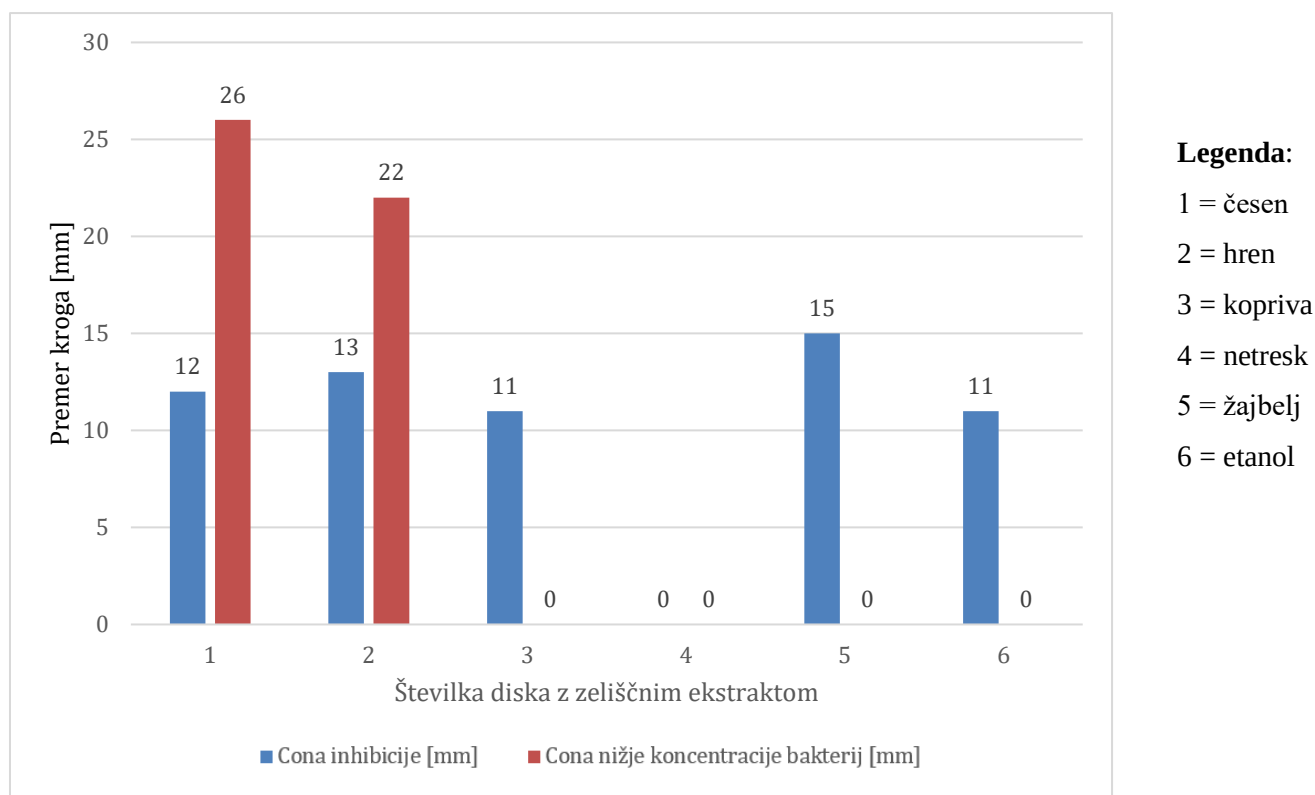
V prvi petrijevki smo imeli 6 diskov, označenih po zgornji legendi. Preverjali smo delovanje etanolnih ekstraktov iz posušenih zelišč. Naša kontrola je bil etanol (označen s številko 6). Merili smo cone inhibicije ali območje manjše koncentracije bakterij.



Slika 20: Učinek etanolnih ekstraktov iz suhih zelišč (osebni arhiv, 2023)

Slika 20 predstavlja dobljene rezultate na gojišču etanolnih ekstraktov iz suhih zelišč. Pri netresku (disk številka 4) ni mogoče opaziti nobene antimikrobne aktivnosti, opazili pa smo inhibicijsko cono premera 15 mm, ki se je ustvarila pri žajbljevem ekstraktu. Pri česnu in hrenu so se ustvarila območja nižje koncentracije bakterij premerov 26 in 22 mm, kar namiguje na antimikrobno delovanje izvlečkov. Tudi kopriva in kontrola sta ustvarili inhibicijski coni velikosti 11 mm.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov



Graf 1: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri etanolnih ekstraktih iz posušenih zelišč (osebni arhiv, 2024)

Graf 1 prikazuje premere inhibicijskih con ter cone nižjih koncentracij bakterij pri polarnih ekstraktih iz posušenih zelišč. Razberemo lahko, da so cone inhibicije nastale pri skoraj vseh ekstraktih, razen pri netresku, ki ni imel niti območja nižje koncentracije bakterij. Največji antimikrobni učinek glede na velikost inhibicijske cone smo dobili pri žajblju (disk številka 5) s 15-mm cono inhibicije, sledili so hren (13 mm), česen (12 mm) in kopriva (11 mm). Pri izvlečku česna in hrena smo opazili tudi območje nižje koncentracije bakterij, kjer so bakterije še vseeno prisotne, in sicer v premerih 26 in 22 mm.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

4.2 Sveža zelišča v etanolu

V drugi petrijevki smo preverjali antimikrobna delovanja etanolnih ekstraktov iz svežih zelišč, za kontrolo (pod številko 6) pa smo imeli etanol.



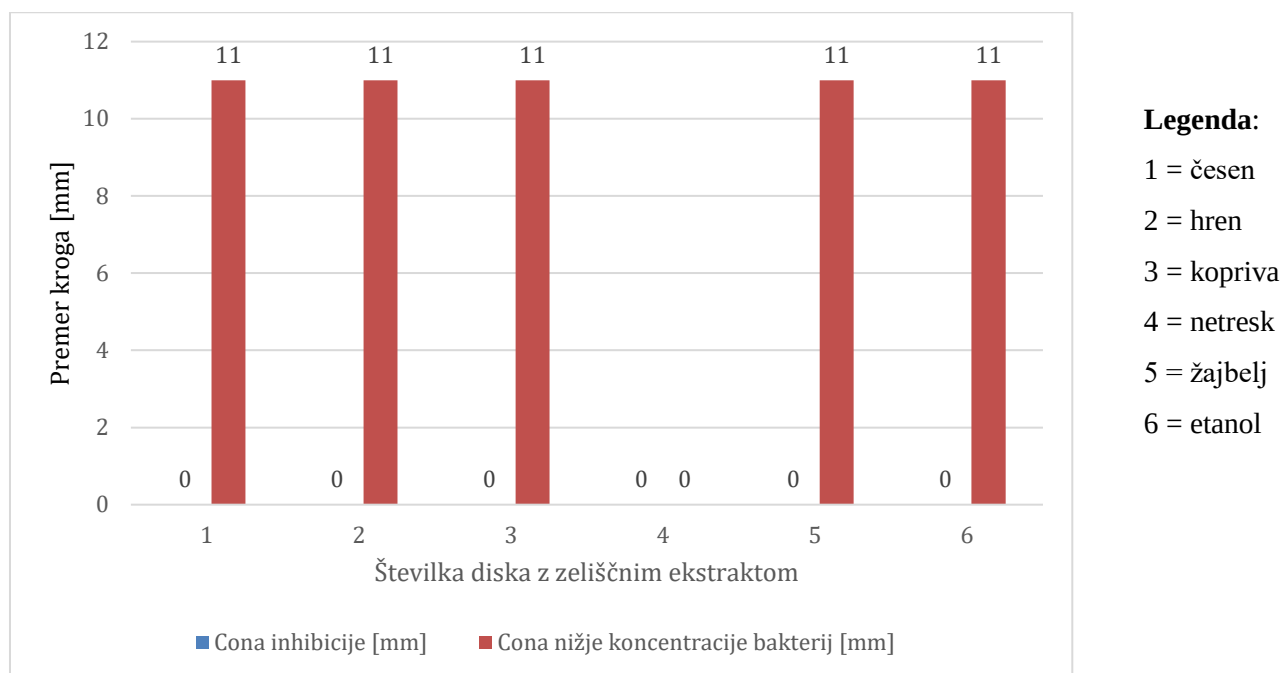
Legenda:

- 1 = česen
- 2 = hren
- 3 = kopriva
- 4 = netresk
- 5 = žajbelj
- 6 = etanol

Slika 21: Učinek etanolnih ekstraktov iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2023)

Slika 21 prikaže, da ni prišlo do antimikrobnega delovanja pri nobenem etanolnem ekstraktu iz svežih zelišč. Pri netresku (disk številka 4) izgleda, kot da je nastalo manjše območje nižje koncentracije bakterij, a ker to ni enakomerno razporejeno okoli diska, gre verjetno za neenakomeren premaz suspenzije bakterij. Vseeno pa lahko govorimo o minimalnem območju nižje koncentracije bakterij pri vseh diskih, saj se je pri vseh ustvaril tanek pas, v katerem lahko vidimo čisti agar brez bakterij velikosti 11 mm. V primerjavi s suhimi zelišči v etanolu so bila sveža manj učinkovita.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov



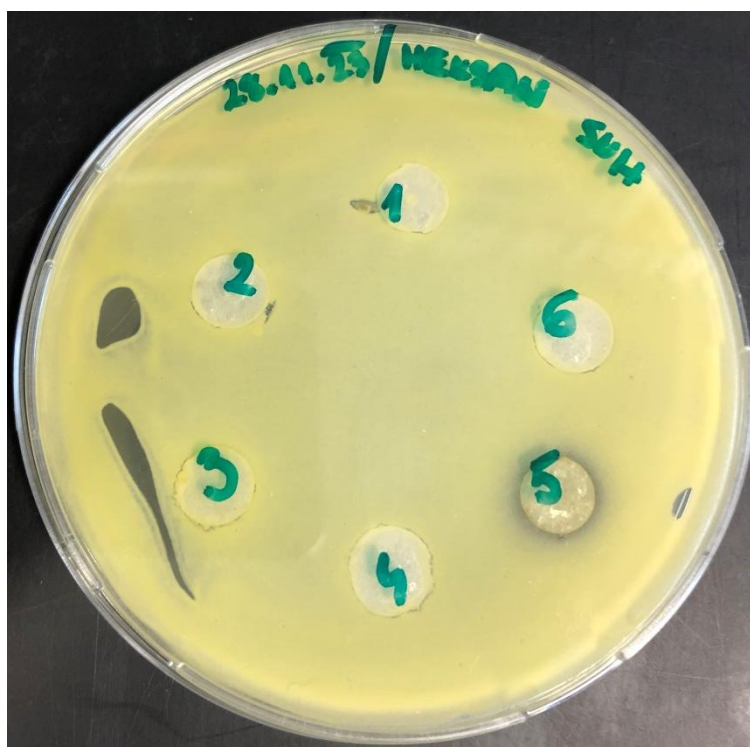
Graf 2: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri etanolnih ekstraktih iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2024)

Iz grafa 2 lahko razberemo, da so se minimalna območja nižjih koncentracij bakterij premera 11 mm oblikovala pri česnu, hrenu, koprivi, žajblju in etanolu. Netresk ni pokazal nobene antimikrobne aktivnosti na izolirano bakterijsko kolonijo.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

4.3 Suha zelišča v heksanu

V tretjo petrijevko smo nanegli diske s heksanovimi ekstrakti iz suhih zelišč. Disk številka 6, ki je služil za kontrolo, je bil prepojen s heksanom. Z eksperimentom smo želeli primerjati učinke spojin zeliščnih ekstraktov v nepolarnem topilu.



Legenda:

- 1 = česen
- 2 = hren
- 3 = kopriva
- 4 = netresk
- 5 = žajbelj
- 6 = heksan

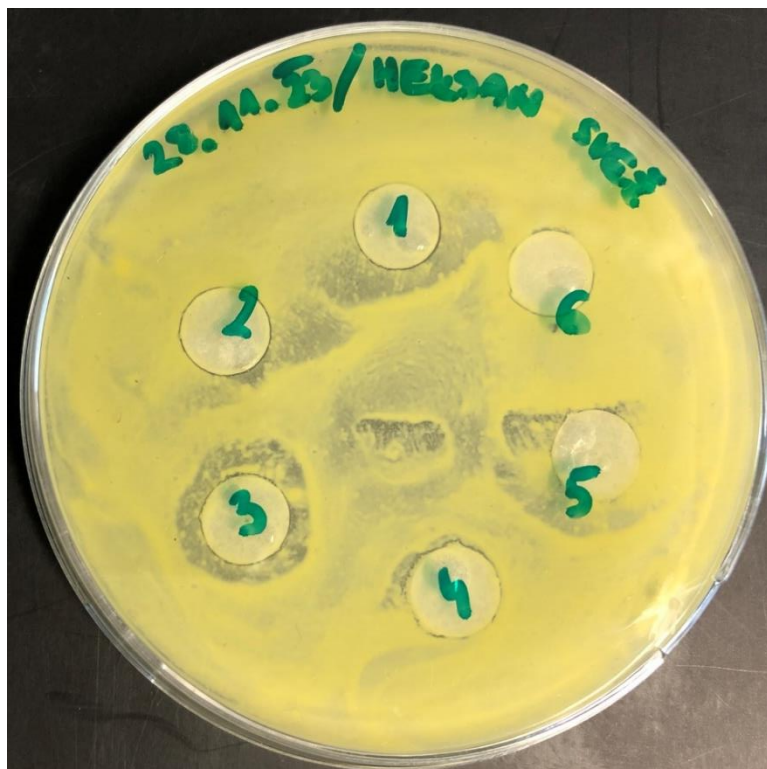
Slika 22: Učinek heksanovih ekstraktov iz suhih zelišč (osebni arhiv, 2023)

Heksanovi ekstrakti iz suhih zelišč (slika 22) niso pokazali učinkovitosti proti bakterijam, razen disk številka 5, kjer je žajbelj ustvaril minimalno območje nižje koncentracije bakterij velikosti 12 mm. Na nekaterih delih petrijevke opazimo tudi površine, na katerih se suspenzija ni enakomerno razporedila. Kljub temu so heksanovi ekstrakti iz suhih zelišč pokazali manjšo učinkovitost kot polarni etanolni ekstrakti.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

4.4 Sveža zelišča v heksanu

S četrto petrijevko smo želeli preveriti še razliko med suhimi in svežimi zelišči v nepolarnem topilu. Na diske smo nanесли heksanove ekstrakte iz svežih zelišč, za kontrolo pa smo imeli heksan na šestem disku.



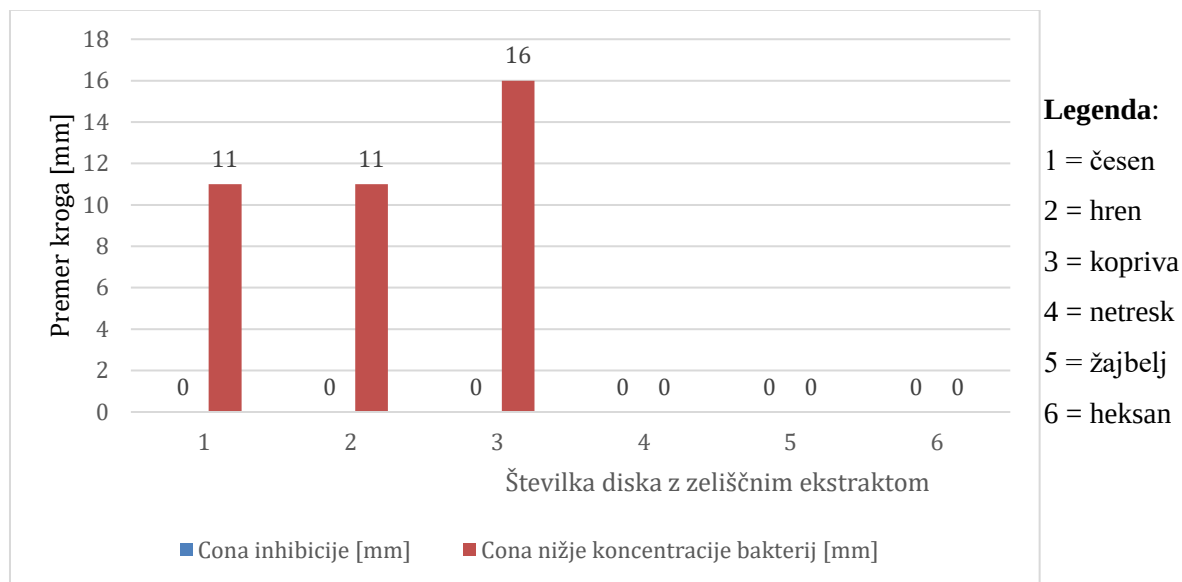
Legenda:

- 1 = česen
- 2 = hren
- 3 = kopriva
- 4 = netresk
- 5 = žajbelj
- 6 = heksan

Slika 23: Učinek heksanovih ekstraktov iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2023)

Na sliki 23 vidimo, da se je vidno območje nižje koncentracije bakterij naredilo okoli diska številka 3 z izvlečkom sveže koprive. Manjša območja nižje koncentracije bakterij smo lahko opazili tudi pri česnu (disk številka 1) in hrenu (disk številka 2). Pri disku številka 5 ni razvidno, ali gre samo za neenakomeren nanos suspenzije ali je nastalo območje nižje koncentracije bakterij. Zopet je prišlo do neenakomernega premaza suspenzije, zato je na sredini petrijevke manjša koncentracija bakterijske suspenzije. Nasploh heksan sam po sebi nima antibakterijskega učinka na našo izbrano bakterijo, vendar pa jo imajo izvlečki, predvsem ekstrakti iz svežih zelišč.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov



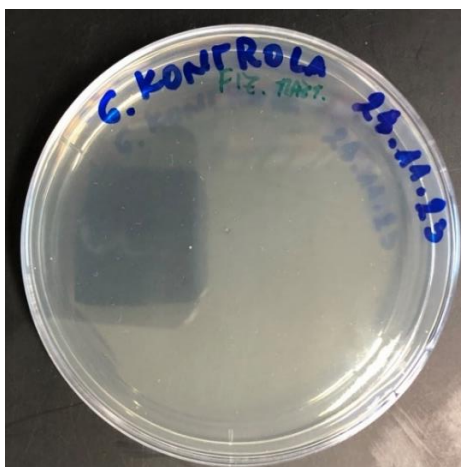
Graf 3: Premeri inhibicijskih con in nižjih koncentracij bakterij pri heksanovih ekstraktih iz svežih zelišč (osebni arhiv, 2024)

Graf 3 prikazuje natančne izmerjene vrednosti premerov območij nižjih koncentracij bakterij pri heksanovih ekstraktih iz svežih zelišč. Vidimo, da je kopriva (disk številka 3) ustvarila največje območje nižje koncentracije bakterij s premerom 16 mm. Pri česnu (disk številka 1) in hrenu (disk številka 2) smo lahko opazili minimalno območje velikosti 11 mm. Netresk (disk številka 4), žajbelj (disk številka 5) in heksan (disk številka 6) niso pokazali antimikrobne aktivnosti na izolirano bakterijo.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

4.5 Kontrole

Da smo pri eksperimentu dokazali zgolj učinke zeliščnih ekstraktov, smo naredili še dve kontrolni petrijevki. Ena od petrijev (slika 24) je služila kot kontrola, da fiziološka raztopina ni bila okužena, preden smo jo zmešali v bakterijsko suspenzijo. Na petrijevki ni bilo zaznati nobene bakterijske aktivnosti, zato smo lahko sklepali, da je bila fiziološka raztopina sterilna.



Slika 24: Kontrola fiziološke raztopine (osebni arhiv, 2023)

Z drugo petrijevko (slika 25) pa smo preverili suspenzijo izolirane bakterijske kolonije na gojišču brez ekstraktov, da smo lahko razbrali razliko med petrijevkami, v katerih so bili nanešeni ekstrakti, in kontrolo brez ekstraktov.



Slika 25: Kontrola suspenzije izolirane bakterijske kolonije na gojišču (osebni arhiv, 2023)

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Podatke povprečnih deležev premerov območij z nižjo koncentracijo bakterij pri ekstraktih iz svežih in suhih zelišč prikazujemo v grafu 4. Povprečni delež smo izračunali s formulo za aritmetično sredino:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{N},$$

pri čemer smo za vsako zelišče posebej sešteli premere območij inhibicijskih con ali območij nižjih koncentracij ter vsoto delili s 4 (etanolni ekstrakti iz suhih in svežih zelišč ter heksanovi ekstrakti iz suhih in svežih zelišč).

Izračun povprečnega premera območij z nižjo koncentracijo pri česnu v vseh topilih:

$$\bar{x} = \frac{26 \text{ mm} + 11 \text{ mm} + 0 \text{ mm} + 11 \text{ mm}}{4} = 12 \text{ mm}.$$

Izračun povprečnega premera območij z nižjo koncentracijo pri hrenu v vseh topilih:

$$\bar{x} = \frac{22 \text{ mm} + 11 \text{ mm} + 0 \text{ mm} + 11 \text{ mm}}{4} = 11 \text{ mm}.$$

Izračun povprečnega premera območij z nižjo koncentracijo pri koprivi v vseh topilih:

$$\bar{x} = \frac{11 \text{ mm} + 16 \text{ mm} + 0 \text{ mm} + 0 \text{ mm}}{4} = 6,75 \text{ mm}.$$

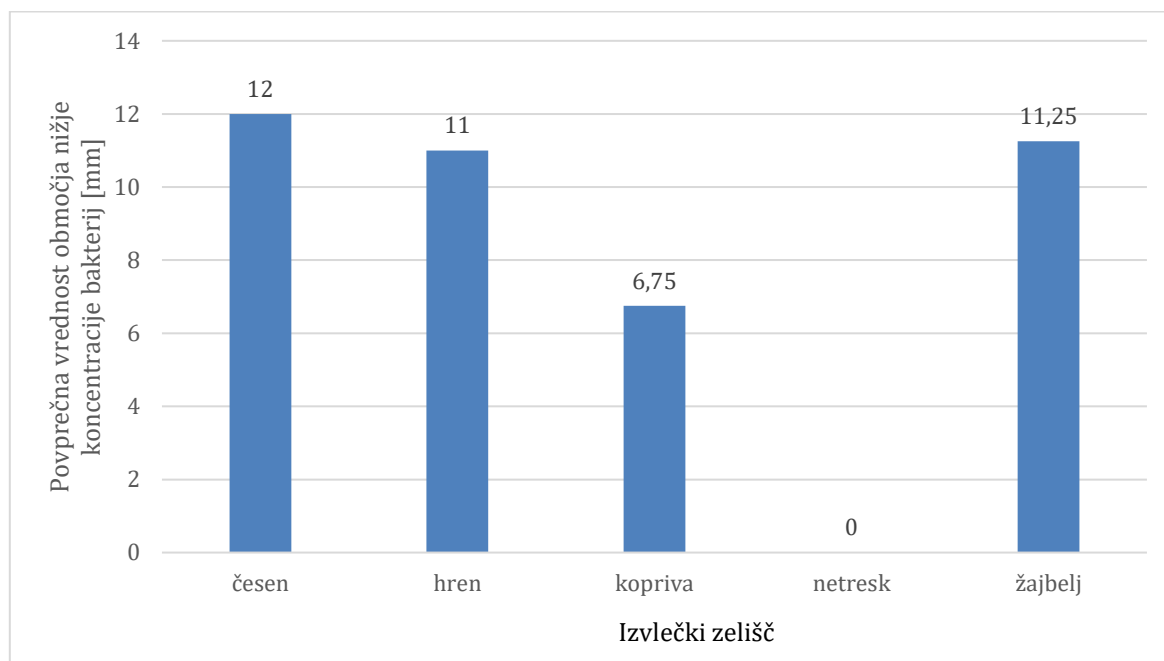
Izračun povprečnega premera območij z nižjo koncentracijo pri netresku v vseh topilih:

$$\bar{x} = \frac{0 \text{ mm} + 0 \text{ mm} + 0 \text{ mm} + 0 \text{ mm}}{4} = 0 \text{ mm}.$$

Izračun povprečnega premera območij z nižjo koncentracijo pri žajblju v vseh topilih:

$$\bar{x} = \frac{11 \text{ mm} + 11 \text{ mm} + 12 \text{ mm} + 11 \text{ mm}}{4} = 11,25 \text{ mm}.$$

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov



Graf 4: Povprečni premer območij nižje koncentracije bakterij pri ekstraktih iz svežih in suhih zelišč (osebni arhiv, 2024)

Graf 4 prikazuje povprečne vrednosti premerov območij z nižjo koncentracijo bakterij pri ekstraktih iz svežih in suhih zelišč, pri čemer opazimo, da je česen v povprečju deloval najbolj zaviralno, seveda poleg žajblja in hrena.

5 RAZPRAVA

Iz rezultatov eksperimentalnega dela smo uspeli priti do sklepov in jih primerjati z izhodiščnimi študijami raziskovalnega dela.

Naši rezultati nakazujejo, da nekatera zelišča delujejo na naključno izbrano izolirano bakterijsko kolonijo zaviralno. V prvem delu raziskave smo preučevali antimikrobno delovanje etanolnih (polarnih) ekstraktov iz posušenih in svežih zelišč na rast bakterij.

Pri eksperimentu, izvedenem na posušenih zeliščih v polarnem topilu, smo opazili različno antimikrobno aktivnost med različnimi vrstami zelišč. Največjo inhibicijsko cono smo zabeležili pri žajblju, in sicer s premerom 15 mm, medtem ko sta kopriva (11 mm) in kontrolni etanol (11 mm) pokazala najmanjše antimikrobno delovanje v primerjavi s hrenom (13 mm) in česnom (12 mm). Presenetljivo pa pri ekstraktu suhega netreska nismo zaznali antimikrobne aktivnosti, na katero so namigovali v študiji (Stojković, D., idr., 2015). Ključna razlika, da v našem primeru ni bilo antimikrobne aktivnosti, je izbrana bakterijska kolonija, saj so v omenjeni študiji predstavili netresk kot zaviralca bakterij, ki povzročajo ušesna obolenja. Njihov vzorec je bil odvzet iz ušesnega masla bolnikov, ki so obolevali za otitisom, naša uporabljena bakterija pa je bila vzeta s površine mobilnega telefona, ki ni bil predčasno razkužen, in verjetno ni bila patogena.

Pri pregledu območij nizkih koncentracij bakterij pri etanolnih ekstraktih iz suhih zelišč je imel česen pričakovano najboljše rezultate (26 mm), to pa je nakazovala že izhodiščna študija (*Allium sativum*, 2023). Po kemijski analizi so namreč ugotovili, da je česen močan zaviralec bakterij zaradi alicina, vendar so avtorji raziskave to potrdili za sveže nariban česen. V našem primeru se je zgodilo, da je imel suhi česen večji vpliv na rast bakterij kakor sveži. V naši raziskavi je poleg česna bil učinkovit zaviralec še hren (22 mm), kar so ugotavljali v študiji (Negro, E., idr., 2022). Njihovi ekstrakti hrena so bili na metanolni osnovi, v čemer se naša raziskovalna naloga razlikuje od njihove študije.

Pri eksperimentu z ekstrakti iz svežih zelišč v etanolu so izvlečki česna, hrena, koprive, žajblja in kontrolni etanol ustvarili enako veliko območje nižje koncentracije bakterij (11 mm). Samo pri netresku ni bilo opaziti nobene antimikrobne učinkovitosti. Obstaja možnost, da netresk ni bil dovolj posušen in je bila koncentracija vode še vedno previsoka, da bi lahko zdravilne učinkovine prišle do izraza. Kot smo predvidevali, so bili ekstrakti iz suhih zelišč v polarnem topilu učinkovitejši pri zaviranju rasti bakterij kakor sveža zelišča, kar pa se ne sklada s študijo o česnu (*Allium sativum*, 2023), v kateri so

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

preučevali antimikrobni učinek svežega česna. Glede na to, da ni bilo mogoče videti ali izmeriti razlike med ekstrakti iz svežih zelišč in kontrolnim etanolom, ne moremo trditi, da so zelišča prispevala k antimikrobnemu učinku svežih zeliščnih ekstraktov.

Z eksperimentom v petrijevki, kamor smo nanесли ekstrakte iz suhih zelišč v heksanu, smo želeli ugotovljati razliko med polarnim in nepolarnim topilom (etanol in heksan). V petrijevki s heksanovimi izvlečki iz suhih zelišč ni prišlo do antimikrobnega delovanja. Napake so lahko razvidne že iz nanosa suspenzije na petrijevko, saj je neenakomerno razporejen po površini, kar je lahko privedlo do debelejšega nanosa na eni strani in tanjšega na drugi strani petrijevke. Kljub neenakomernemu premazu suspenzije pa lahko vidimo majhno območje nižje koncentracije bakterij (12 mm), ki se je ustvarilo pri žajblju (disk številka 5). V primerjavi s študijo (Hamidpour, M., idr., 2014) je tudi pri nas žajbelj pokazal antimikrobno aktivnost.

Raziskali smo tudi razlike med izvlečki iz svežih in suhih zelišč v heksanu. Rezultati kažejo, da je bilo vidno območje nižje koncentracije bakterij iz svežih zelišč največje pri koprivi (disk številka 3), in sicer v velikosti 16 mm. Manjša območja so bila opazna tudi pri česnu (disk številka 1), hrenu (disk številka 2) in žajblju (disk številka 5), vendar so bila ta težje merljiva zaradi neenakomernega premaza suspenzije bakterij in ni bilo mogoče določiti stroge meje med antimikrobno dejavnostjo ter neenakomernim premazom suspenzije. Razlika med difuzijo kontrolnega heksana in heksanovimi ekstrakti iz svežih zelišč je opazna, saj heksan sam ni imel nobenega učinka na rast bakterij. Nasploh lahko sklepamo, da heksan sam po sebi nima antibakterijskega učinka na izbrane bakterije, vendar pa so sveža zelišča pripomogla k antimikrobnemu delovanju.

Primerjava rezultatov med posušeni in svežimi zelišči v polarnem topilu kaže, da so ekstrakti iz suhih zelišč v etanolu pokazali večjo učinkovitost pri zaviranju rasti bakterij v primerjavi s svežimi zelišči. To lahko nakazuje, da proces sušenja vpliva na večjo koncentracijo aktivnih spojin v suhih zeliščih, ki imajo zato manjšo vsebnost vode, ali pa da sveža zelišča vsebujejo manjše količine aktivnih spojin in imajo več vsebnosti vode. V študiji (Wei Chiang Chan, E., idr., 2012) so ugotovili, da ima zelišče največjo učinkovitost, ko je uporabljeno v kombinaciji sveže-suho v eteričnem olju. V naši raziskavi suhih in svežih zelišč nismo mešali med sabo, vendar bi tudi to možnost svetovali v prihodnjih raziskavah.

Iz analize rezultatov smo dognali, da so bili etanolni ekstrakti učinkovitejši pri zaviranju rasti bakterij kakor heksanovi, do prepričljivejših sklepov pri svežih in suhih zeliščih pa ne moremo priti, saj so nam rezultati pokazali drugače. Vsekakor so bili najučinkovitejši etanolni ekstrakti iz posušanih zelišč,

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

vendar pa ta niso bila toliko uspešna tudi v nepolarnem topilu. V heksanu je bila večja antimikrobna aktivnost pri svežih zeliščih, pri čemer so se v nasprotju s suhimi zelišči ustvarili zaviralni pasi oziroma območja nižje koncentracije bakterij. Kombinacija etanola in suhih zelišč je delovala najbolje od vseh, vendar pa so tudi sveža zelišča v heksanu pokazala učinkovitost.

Primerjali smo še povprečne premere območij nižjih koncentracij bakterij med posameznimi svežimi in suhimi zelišči, da smo ugotovili, katero posamezno zelišče je bilo najučinkovitejše. Za najmočnejši naravni antibiotik se je v našem primeru izkazal česen (*Allium sativum*), kar smo na začetku tudi predvidevali glede na predpostavljene študije (*Allium sativum*, 2023). V našem primeru je bil česen v prahu učinkovitejši od svežega pri zaviranju rasti bakterij, s čimer lahko potrdimo, da imajo suha zelišča večjo koncentracijo antimikrobnih učinkovin in se zato ustvarijo večje inhibicijske cone. Tudi hren se je v naši raziskavi izkazal za učinkovitega zaviralca rasti bakterij. Najbolj je bilo to razvidno iz obeh etanolnih ekstraktov ter heksanovega ekstrakta svežega hrena. Žajbelj je v vseh štirih petrijevkah pokazal vsaj minimalno antimikrobno delovanje, še posebej v petrijevki z ekstrakti iz posušenih zelišč v etanolu, kjer ustvaril čisto območje brez bakterij. V nepolarnih izvlečkih posušenih zelišč je žajbelj edini kazal na zaviranje rasti bakterij in antimikrobno delovanje, česar ekstrakti iz ostalih zelišč niso bili sposobni. V raziskovalni nalogi (Tumpa, 2013) so prav tako preizkušali žajbljev antimikrobni učinek z uporabo etanolnih ekstraktov. Pri njihovem poskusu z antibiogramom žajbelj v 100-% etanolu ni pokazal izrazitega antimikrobnega delovanja. Cona inhibicije je merila približno 11 mm, kar se sklada tudi z rezultati, ki smo jih dobili pri našem raziskovalnem delu. Sklepamo lahko, da je žajbelj učinkovit zaviralec rasti bakterij.

Eden izmed razlogov, zakaj je prišlo do nepričakovanih rezultatov, so bile koncentracije ekstraktov. Zaradi različnega volumna posameznih zelišč smo pri pripravi izvlečkov morali prilagajati količino topila, da smo potopili vso količino zeli v čaši. Maso zelišč smo želeli ohraniti pri vseh enako in smo si jo vnaprej določili (10 g), medtem ko smo količino topila racionalno odmerjali. Za primer lahko vzamemo svežo koprivo, ki ima zelo košate liste in smo ji morali dodati bistveno več topila kakor česnu ali netresku. S tem pa smo nehote spremenili koncentracijo zeliščnih ekstraktov, ker nismo točno vedeli, koliko zdravilnih učinkovin preide v ekstrakt. Zato bi v prihodnje bilo dobro raziskavo razširiti še z večjim testiranim vzorcem in delom v laboratoriju s profesionalnimi pripomočki. Ker je pri naši raziskovalni nalogi šlo zgolj za test posameznega ekstrakta, smo težje prišli do splošnih zaključkov, ki bi lahko kaj dokazovali. Premajhen vzorec testiranih zelišč težje privede do posploševanja zaključkov, pri čemer zanemarimo možnost naključij, ki so pri tovrstnih raziskavah možna. Zato bi bilo za nadaljnje raziskave potrebnih več testnih petrijevk, da bi lahko na večjem vzorcu kaj dokazali. Prav tako bi bilo

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

treba pri vseh vzorcih vzeti enako koncentracijo topila (etanola in heksana), s tem pa bi imeli enake koncentracije ekstraktov iz zelišč.

Prav tako bi bilo dobro, da bi imeli profesionalne pripomočke za delo, kot je na primer stresalnik, s katerim bi enakomerneje pretresli suspenzijo bakterij ter ekstrakte. Za enakomernejšo razporeditev suspenzije po petrijevkah bi bilo bolje uporabiti ukrivljeno stekleno palčko, ki pa je žal nismo imeli. Premaz smo naredili s tresenjem petrijevke, saj je raziskava potekala v šolskem laboratoriju, v katerem so pripomočki omejeni.

6 ZAKLJUČEK

Naša raziskava je bila osredotočena na preučevanje antimikrobnega delovanja ekstraktov iz suhih in svežih zelišč, pridobljenih s polarnim (etanol) in nepolarnim (heksan) topilom. Rezultati našega eksperimentalnega dela ponujajo vpogled v potencialne zaviralne lastnosti različnih zelišč pri vplivu na rast bakterij.

Iz opravljene raziskave lahko sklepamo, da različna zelišča kažejo različno stopnjo antimikrobnega delovanja. Netresk ni pokazal nobenega antimikrobnega delovanja, medtem ko ga česen je. To lahko pripisujemo raznolikosti v koncentracijah aktivnih spojin v zeliščih.

Česen in hren sta pokazala najmočnejše antibakterijsko delovanje, kar kaže na njuno vsebnost kemičnih učinkovin s potencialnimi zaviralnimi lastnostmi. Do teh ugotovitev so prišli tudi drugi znanstveniki (Allium sativum, 2023; Negro, E., idr., 2022), ki prepoznavaajo česen in hren kot naravni sredstvi z izrazitim antimikrobnim potencialom.

Razlike med suhimi in svežimi zelišči so bile očitne znotraj posameznega topila, pri čemer so suha zelišča v etanolu pokazala večjo učinkovitost pri zaviranju rasti bakterij kot sveža zelišča v etanolu; pri heksanu pa so sveža zelišča bila učinkovitejša od suhih. Ta pojav je lahko posledica koncentracije aktivnih spojin in se poveča med sušenjem zelišč, ko ostane v njih manjša količina vode ter večja koncentracija učinkovin.

Etanolni ekstrakti so se izkazali za učinkovitejše pri zaviranju rasti bakterij v primerjavi s heksanovimi ekstrakti. To lahko pripisujemo polarnosti etanola, ki omogoča boljše ekstrakcijo polarnih spojin iz zelišč, kot so na primer flavonoidi. Heksan kot nepolarno topilo je manj učinkovit pri ekstrakciji teh spojin (Kreft idr., 2013, str. 514).

Česen je imel najmočnejši učinek na bakterije ne glede na uporabljeno topilo, kar nakazuje močan potencial tega zelišča kot naravnega antibiotika. Ta rezultat podpirajo številne študije, kot je na primer študija *Allium sativum* iz leta 2023, ki prepoznavaajo česen kot naravno sredstvo z izrazitimi antimikrobnimi lastnostmi. S tem smo si tudi odgovorili na zastavljeno raziskovalno vprašanje: »Katero izmed izbranih zelišč bo imelo ob uporabi disk metode največji antibakterijski učinek na izolirano kolonijo bakterij?«, saj je česen z največjo povprečno vrednostjo območij nižjih koncentracij bakterij izpodrinil vsa ostala testirana zelišča.

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

Ob koncu smo prišli do naslednjih sklepov, ki so nas pripeljali do potrditve ali zavrnitve hipotez.

Potrjujemo hipotezo 1: »Največjo inhibicijsko cono bo ustvaril česen, saj je najmočnejši naravni antibiotik med izbranimi zelišči.« Večkrat smo namreč dokazali, da je česen ustvaril vsaj območje nižje koncentracije bakterij, če ne že inhibicijskih con. To smo dokazali tako s suhim česnom kot tudi s svežim pri etanolovih pripravkih.

Delno potrjujemo hipotezo 2: »V gojiščih, kamor bomo nanесли ekstrakte iz suhih zelišč, se bo ustvarila večja inhibicijska cona kot pri svežih zeliščih.« To pa zato, ker zaradi prevladujoče učinkovitosti suhih zelišč v etanolu, a zaradi manjših območij nižje koncentracije bakterij pri heksanovem ekstraktu iz svežih zelišč tega ne moremo z gotovostjo potrditi. Prav tako je heksan nepolarno topilo, ki je manj učinkovito pri ekstrakciji spojin. Možno je tudi, da je v eni petrijevki bil enakomernejši nanos bakterijske suspenzije kot drugod in se morda zato pri izvlečkih suhih zelišč v heksanu ni nič zgodilo.

Zavračamo hipotezo 3: »Kopriva ne bo imela velikega antimikrobnega učinka na izolirano bakterijo zaradi šibkih antimikrobnih snovi v rastlini.« Ugotavljamo namreč, da je netresk pokazal manj antimikrobne aktivnosti kot kopriva. Slednja je skoraj v vsakem ekstraktu ustvarila manjše območje nižje koncentracije bakterij, zato je učinkovit naravni antibiotik proti izbrani izolirani koloniji bakterij.

Kljub nekaterim omejitvam, kot je neenakomeren nanos suspenzije bakterij, so naši rezultati prispevali k razumevanju antimikrobnih lastnosti zelišč. Razlike med študijami in našimi rezultati lahko deloma pripišemo raznolikosti bakterijskih kolonij in koncentracijam aktivnih spojin v zeliščih. Nadaljnje raziskave bi bile potrebne za natančnejšo karakterizacijo učinkovin in boljšo standardizacijo eksperimentalnih pogojev. V prihodnje tudi svetujemo, da se bujnejša zelišča zmeljejo v drobne delce, saj bi v takem primeru lahko porabili enako količino topila pri vseh zeliščih in bi se izognili težavi morebitnih različnih koncentracij ekstraktov. V celoti pa naša raziskava poudarja potencial zelišč za razvoj naravnih antimikrobnih sredstev.

7 LITERATURA IN VIRI

7.1 LITERATURA

1. BELUŠIČ, G., DOLENC KOCE, J., TURK, M., VITTORI, M., ZALAR, P. 2019. Biologija 2, O zgradbi in delovanju organizmov. Ljubljana: Mladinska knjiga. 12–32.
2. FILIPIČ, B., CENCIČ, A. 1999. Splošna mikrobiologija: navodila za vaje. Maribor: Fakulteta za kmetijstvo. 22–25.
3. KREFT, S., idr. 2013. Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo. 378, 514.
4. MÖHRING, Wolfgang. 2003. Zdravilna moč čajev. Ljubljana: Prešernova družba. 15–21.
5. OBERBEIL, K., LENTZ, C. 2002. Zdravilna moč sadja in zelenjave: učinkovita uporaba zdravilnih lastnosti hrane. Ljubljana: Prešernova družba. 96–97.
6. SAUM, K., GOTTFRIED MAYER, J., WITASEK, A. 2014. Zdravilna moč samostanske prehrane: preprečevati, zdraviti, ozdraviti. Ljubljana: Arkadija. 38–39.
7. TOPOLOVEC, S. 2018. Zdravilna moč začimb za otroke. Ljubljana: Jasno in glasno. 34.
8. TUMPA, S. 2013. Protimikrobni učinek rastlinskih etanolnih in vodnih ekstraktov na *Escherichia coli* in *Candida albicans*: raziskovalna naloga. Maribor. 24–30.

7.2 VIRI

1. Allium sativum. Pridobljeno 2. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/allium.htm>.
2. Ankri, S. & Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Pridobljeno 4. novembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457999800033>.
3. Comunale, J. Natural Antibiotic: Definition, Purpose & Types. Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://study.com/academy/lesson/what-is-a-natural-antibiotic-foods-plants.html>.
4. Drugs. Nettles. Pridobljeno 4. novembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.drugs.com/npp/nettles.html>.
5. Hamidpour, M., Hamidpour, R., in Hamidpour, S. Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Sage (Salvia) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression,

VAVDI, Jerneja. 2024. Antimikrobno delovanje zeliščnih ekstraktov

- Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. Pridobljeno 4. novembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4003706>.
6. Kaj so antibiotiki in kako delujejo. 2023. Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/okuzbe/antibiotiki>.
 7. Negro, E., Sendker, J., Stark, T., Lipowicz, B., Hensel, A. Phytochemical and functional analysis of horseradish (*Armoracia rusticana*) fermented and non-fermented root extracts. Pridobljeno 2. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X22001605>.
 8. Rowden, A. What is the difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria? Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/gram-positive-vs-gram-negative>.
 9. Salih, N., Arif, E. Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica*). Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu https://www.researchgate.net/publication/326235290_Antibacterial_effect_of_nettle_Urtica_dioica.
 10. Stojković, D., Barros, L., Petrović, J., Glamoclija, J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., Soković, M. Ethnopharmacological uses of *Sempervivum tectorum* L. in southern Serbia: Scientific confirmation for the use against otitis linked bacteria. Pridobljeno 4. novembra 2023 na spletnem naslovu <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26551879>.
 11. Understanding Herbs – Garlic (*Allium sativum*). 2019. Pridobljeno na spletnem naslovu <https://www.healinghouseherbal.com/blog/understanding-hrbs-garlic-allium-sativum#>.
 12. Velika kopriva (*Urtica dioica*). 2023. Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/velika-kopriva-urtica-dioica>.
 13. WEI CHIANG CHAN, E., QUAN KONG, L., YEN YEE, K., YEE CHUA, W., YING LOO, TZE. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. Pridobljeno 14. januarja 2023 na spletnem naslovu <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2231253612230036>.
 14. Zaper in hren proti virozi – za zdrave pljučne alveole. 2023. Pridobljeno 3. decembra 2023 na spletnem naslovu <https://www.zaper-zaperino.com/hren-viroza-zaper>.