



Srednja šola Slovenska Bistrica

Srednja šola Slovenska Bistrica

Ulica dr. Jožeta Pučnika 21

2310 Slovenska Bistrica

Raziskovalna naloga

KARVAKROL V BOJ PROTI BAKTERIJAM

Carvacrol in the Fight Against Bacteria

Raziskovalno področje: biologija

Mentorici:

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

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

Avtorica:

Anika Sever

Lektorica:

Vesna Sever, prof. slov.

Slovenska Bistrica, februar 2025

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem gospe Alenki Pislak, ki si je vzela čas, mi podala mnoge nasvete in mi pomagala pri zasnovi kot tudi izvedbi eksperimenta ter me tako naučila marsikaj novega v zvezi z laboratorijskim delom v bioloških znanostih. Zahvalila bi se rada še profesorici gospe Veri Cunk Manić, ki mi je podala vso teoretično biološko znanje, ki sem ga do sedaj pridobila v srednji šoli in mi dala vse potrebne smernice za pisanje raziskovalne naloge. Zahvaljujem se tudi Vesni Sever za lektoriranje in za vso spodbudo, podporo, ideje ter nasvete med pisanjem raziskovalne naloge.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	IZBIRA RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	1
1.2	NAMEN RAZISKAVE	2
1.3	HIPOTEZE.....	2
2	TEORETIČNI DEL	3
2.1	KARVAKROL.....	3
2.2	BAKTERIJE	4
2.3	ETERIČNA OLJA	4
2.3.1	ETERIČNO OLJE DIVJEGA ORIGANA.....	5
2.3.2	ETERIČNO OLJE TIMIJANA.....	6
2.3.3	ETERIČNO OLJE ČAJEVCA.....	6
2.3.4	ETERIČNO OLJE EVKALIPTA.....	6
2.3.5	ETERIČNO OLJE SIVKE	7
2.4	OLJČNO OLJE	7
2.5	DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM	8
2.6	LABORATORIJSKO DELO Z BAKTERIJAMI	8
3	EKSPERIMENTALNI DEL	10
3.1	MATERIALI IN LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI	10
3.1.1	MATERIALI	10
3.1.2	LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI.....	10
3.2	METODOLOGIJA.....	11
3.2.1	STERILIZACIJA PRIPOMOČKOV	11
3.2.2	PRIPRAVA GOJIŠČ.....	11
3.2.3	IZOLIRANJE ČISTE BAKTERIJSKE KULTURE	12

3.2.4	DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM	13
4	REZULTATI.....	16
4.1	ETERIČNO OLJE DIVJEGA ORIGANA.....	16
4.2	ETERIČNO OLJE TIMIJANA.....	18
4.3	ETERIČNO OLJE ČAJEVCA.....	20
4.4	ETERIČNO OLJE EVKALIPTA.....	22
4.5	ETERIČNO OLJE SIVKE	23
4.6	KONTROLE	25
5	RAZPRAVA	26
6	ZAKLJUČEK.....	30
7	LITERATURA IN VIRI	32
7.1	LITERATURA	32
7.2	VIRI.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1:	Molekula karvakrola	3
Slika 2:	Zgradba celične stene pri Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterijah.....	4
Slika 3:	Prikaz difuzijskega antibiograma.....	8
Slika 4:	Materiali in laboratorijski pripomočki	10
Slika 5:	Pripravljena gojišča.....	11
Slika 6:	Gojišče z brisom mize po 1 tednu.....	12
Slika 7:	Izolirana kultura bež bakterij	12
Slika 8:	Olivno oje in posamezna eterična olja	13
Slika 9:	Priprava suspenzije bež bakterije.....	14
Slika 10:	Priprava razredčitev in difuzijskega antibiograma	15
Slika 11:	Oznake petrijevk	15
Slika 12:	Antibiogram eteričnega olja divjega origana v 100 % koncentraciji.....	17
Slika 13:	Antibiogram redčitev eteričnega olja divjega origana	17
Slika 14:	Antibiogram eteričnega olja timijana v 100 % koncentraciji.....	19
Slika 15:	Antibiogram redčitev eteričnega olja timijana.....	19

Slika 16: Antibiogram eteričnega olja čajevca v 100 % koncentraciji.....	21
Slika 17: Antibiogram redčitev eteričnega olja čajevca	21
Slika 18: Antibiogram eteričnega olja evkalipta v 100 % koncentraciji.....	22
Slika 19: Antibiogram redčitev eteričnega olja evkalipta	22
Slika 20: Antibiogram eteričnega olja sivke v 100 % koncentraciji	23
Slika 21: Antibiogram redčitev eteričnega olja sivke	24
Slika 22: Kontrola fiziološke raztopine.....	25
Slika 23: Kontrola agarja	25
Slika 24: Kontrola suspenzije bakterij	25

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja divjega origana	18
Graf 2: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja timijana	20
Graf 3: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja sivke.....	24

POVZETEK

V današnjem svetu se ob porastu bakterijskih rezistenc vse več ljudi zateka k novim potencialnim možnostim za zdravljenje bakterijskih okužb. V mnogih raziskavah se je za močno antibakterijsko sredstvo izkazal karvakrol in njegov izomer timol, ki sta v najvišjih koncentracijah naravno prisotna v eteričnih oljih origana in timijana. Najvišje količine karvakrola naj bi vseboval divji origano.

Zato smo v raziskavi s pomočjo difuzijskega antibiograma dokazovali antibakterijsko delovanje eteričnih olj, ki karvakrol vsebujejo (eterično olje divjega origana *Origanum minutiflorum* in timijana *Thymus vulgaris*) v primerjavi z antibakterijskim delovanjem eteričnih olj, ki te spojine ne vsebujejo (eterično olje čajevca *Melaleuca alternifolia*, evkalipta *Eucalyptus globulus* in sivke *Lavandula angustifolia*).

V teoretičnem delu smo sprva s pomočjo virov in literature postavili temelje za boljše razumevanje raziskave. Nato smo v eksperimentalnem delu izvedli poskus in skupaj z dosedanjimi raziskavami drugih prišli do sklepov. Antibakterijski učinek sta pokazala eterično olje divjega origana in timijana, kar smo povezali z vsebnostjo karvakrola in timola, kot tudi eterično olje sivke, ki vsebuje drugačne snovi, ki imajo antibiotičen učinek, kljub temu pa sta olji z vsebnostjo karvakrola imeli znatno močnejše učinkovanje. Vsa olja smo prav tako redčili z olivnim oljem in ugotovili, da se z redčenjem antibakterijsko učinkovanje manjša. V zaključku smo podali sklepe, ovrednotili na začetku zastavljeni hipotezi in podali tudi predloge za izboljšave raziskave. Celotna raziskava nam je pomagala bolje razumeti antibakterijsko delovanje eteričnih olj z vsebnostjo karvakrola.

Ključne besede: karvakrol, eterična olja, bakterije, antibakterijsko delovanje, difuzijski antibiogram, inhibicijska cona

ABSTRACT

In today's world, with the rise of bacterial resistance, an increasing number of people are turning to new potential options for treating bacterial infections. Numerous studies have identified carvacrol and its isomer thymol as strong antibacterial agents, both of which are naturally present in the highest concentrations in essential oils of oregano and thyme. Wild oregano is reported to contain the highest levels of carvacrol.

Therefore, in our study, we used the disk diffusion method to demonstrate the antibacterial activity of essential oils containing carvacrol (wild oregano *Origanum minutiflorum* and thyme *Thymus vulgaris*) compared to essential oils that do not contain this compound (tea tree *Melaleuca alternifolia*, eucalyptus *Eucalyptus globulus*, and lavender *Lavandula angustifolia*).

In the theoretical part, we established a foundation for a better understanding of the study with the help of literature and different scientific sources. In the experimental part, we conducted the study and, in combination with previous research, came to conclusions. Wild oregano and thyme essential oils exhibited antibacterial effects, which we linked to carvacrol and thymol. Lavender essential oil also showed antibacterial activity, attributed to different bioactive compounds with antibiotic properties. However, the essential oils containing carvacrol demonstrated significantly stronger antibacterial effects. Additionally, we diluted all essential oils with olive oil and observed a reduction in antibacterial activity with increasing dilution.

In conclusion, we summarized our findings, evaluated the initial hypotheses, and provided recommendations for improving the study. This research has contributed to a better understanding of the antibacterial properties of essential oils containing carvacrol.

Key words: carvacrol, essential oils, bacteria, antibacterial properties, disk diffusion method, zone of inhibition

1 UVOD

1.1 IZBIRA RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Ljudje se že od nekdaj srečujemo z mikrobi, predvsem bakterijami in okužbami, ki jih te povzročajo. V namen boja proti bakterijskim okužbam v sodobni medicini uporabljamo polsintetično in sintetično pridobljene antibiotike. Vendar je velik problem v zadnjih letih postala bakterijska rezistenca, zaradi katere veliko redno uporabljenih antibiotikov ne pomaga več, saj so bakterije na njih razvile odpornost (Kobal idr., 2015).

Zato se vedno več poudarka daje na iskanje učinkovin, ki na bakterije učinkujejo podobno kot sintetični antibiotiki in nanje bakterije niso odporne (Kobal idr., 2015).

Ena izmed takšnih snovi naj bi bil karvakrol, ki je fenolna sestavina, naravno prisotna v nekaterih rastlinah. Narejene so bile že mnoge študije, ki so pokazale, da naj bi karvakrol imel močno antibakterijsko učinkovanje, primerljivo s polsintetičnimi in sintetičnimi antibiotiki. V visokih koncentracijah (okoli 80 %, tudi do 90 %) se pojavlja predvsem v rastlinskih oljih origana, v navadnem origanu (*Origanum vulgare*) in divjem origanu (*Origanum minutiflorum*) ter v navadnem timijanu (*Thymus vulgaris*) (Maćzka idr., 2023).

V raziskovalni nalogi želimo raziskati antibakterijsko delovanje eteričnih olj divjega origana (*Origanum minutiflorum*) in timijana (*Thymus vulgaris*), ki imata visoko vsebnost karvakrola, ju primerjati z morebitnim antibakterijskim učinkom eteričnih olj rastlin, ki te snovi ne vsebujejo. V našem poskusu smo za takšna olja vzeli eterično olje čajevca, evkalipta in sivke. Prav tako pa smo želeli še preveriti, če oz. kako se antibakterijsko delovanje spreminja, če eterična olja redčimo.

1.2 NAMEN RAZISKAVE

S to raziskovalno nalogo želimo spoznati temeljne metode raziskovanja v mikrobiologiji in ugotoviti, ali imajo eterična olja rastlin divjega origana (*Origanum minutiflorum*) in timijana (*Thymus vulgaris*), ki vsebujejo karvakrol, znatno močnejše antibakterijsko delovanje kot eterična olja čajevca (*Melaleuca alternifolia*), evkalipta (*Eucalyptus globulus*) in sivke (*Lavandula angustifolia*), ki te snovi ne vsebujejo. Prav tako bi radi raziskali, kako se spreminja antibakterijsko delovanje, če eterična olja redčimo (redčitve smo naredili z oljčnim oljem).

1.3 HIPOTEZE

Za našo raziskavo smo si zastavili naslednji hipotezi:

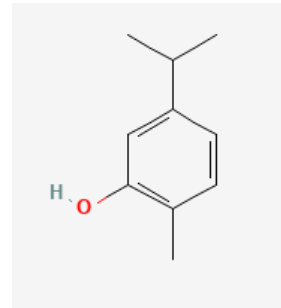
Hipoteza 1: Eterična olja z visoko vsebnostjo karvakrola (olje divjega origana in timijana) bodo imela večje inhibicijske cone kot eterična olja brez karvakrola (olja čajevca, evkalipta in sivke).

Hipoteza 2: Z manjšanjem koncentracije eteričnih olj se bodo inhibicijske cone manjšale.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 KARVAKROL

Karvakrol ali po IUPAC nomenklaturi 2-metil-5-izopropilfenol (z molekulsko formulo $C_{10}H_{14}O$) je monotrepenoidni fenol oz. aromatski alkohol, ki je v mnogih študijah pokazal antibakterijsko in antiglivično delovanje. V prehrabni industriji se uporablja kot naravni aditiv zaradi svojih protimikrobnih sposobnosti. V naravi je prisoten v nekaterih rastlinah, po navadi skupaj z njegovim izomerom timolom, ki ima podobne protimikrobne lastnosti (Maćzka idr., 2023).



Slika 1: Molekula karvakrola (Vir: National Center for Biotechnology Information, 2025)

Karvakrol se v najvišjih koncentracijah pojavlja v eteričnih oljih origana iz družine ustnatic (*Lamiaceae*) med katere spada tudi vrsta navadni origano (*Origanum vulgare*), ki ga v gospodinjstvih uporabljamo kot začimbo. Koncentracije karvakrola se v njem lahko gibljejo med 0,3 in 50 % (Morshedloo idr., 2018).

Najvišje koncentracije karvakrola (okoli 80 %, tudi do 90 %) ima vrsta divji origano (*Origanum minutiflorum*) (Nieto idr., 2017).

Druga vrsta, ki ima visoko vsebnost karvakrola, je navadni timijan (*Thymus vulgaris*), ki je prav tako iz družine ustnatic (*Lamiaceae*) in vsebuje od 2 % do 8 % karvakrola (Satyal idr., 2016).

Karvakrol se je izkazal za močno antibakterijsko sredstvo proti mnogim bakterijam. (Maćzka idr., 2023). Po raziskavah naj bi bakterijske celice inhibiral oz. zavrl na način, da poškoduje celično membrano, kjer v prokariontskih celicah nastaja ATP¹ oz. adenozin trifosfat. S tem povzroči propad prokariontske celice (Ultee idr., 1999).

¹ ATP je glavna energijsko bogata spojina v celicah vseh organizmov (Dermastia idr., 2011)

2.2 BAKTERIJE

Bakterije so enocelični mikroorganizmi, ki v svoji celici nimajo jedra, kar jih uvršča med prokariote. Poleg celične membrane celico obdaja tudi celična stena, sestavljena iz peptidoglikanov. Povprečna velikost bakterijske celice je od 0,5 do 2 μm (Belušič idr., 2022).

Glede na zgradbo celične stene lahko večino bakterij delimo na grampozitivne in gramnegativne bakterije. Grampozitivne bakterije imajo enostavnejšo, debelejšo celično steno, pretežno sestavljeno iz peptidoglikana. Gramnegativne bakterije imajo kompleksnejšo, tanjšo celično steno, z dodatno zunanjo celično membrano, v katero so vgrajeni lipopolisaharidi. Ločimo jih lahko z metodo barvanja po Gramu, kjer se grampozitivne bakterije obarvajo temno modro vijoličasto, gramnegativne bakterije pa rdeče. Različna obarvanost je posledica različne strukture celičnih sten (Štušek idr., 2011).



Slika 2: Zgradba celične stene pri Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterijah (Štušek idr., 2011)

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 lahko v nekaj ali celo enem dnevu razvije bakterijska kolonija, ki je vidna s prostim očesom (Belušič idr., 2019).

2.3 ETERIČNA OLJA

Eterična olja so koncentrirani izvlečki iz rastlinskih delov (npr. listov, stebel, korenin, cvetov, ...), ki so pridobljena na različne načine, najpogosteje s parno destilacijo. Večina eteričnih olj je na sobni temperaturi tekoča, vendar v vodi niso topna. Zato jih lahko

raztapljamo v nepolarnih topilih kot so npr. olja (največkrat se kot nosilno olje uporablja olivno, jojobino ali mandljevo olje) ali voski. Za uporabo je večina eteričnih olj potrebno redčiti, saj so lahko zelo agresivna in bi v primeru uporabe v 100 % koncentraciji imela nezaželene učinke (npr. pojav izpuščajev, draženje oči, nekatera eterična olja so lahko ob zaužitju v visokih koncentracijah celo smrtno nevarna). Občutljiva so na svetlobo in kisik, zato jih moramo pravilno hraniti, saj se sicer hitro pokvarijo. Uporaba je precej razširjena v dišavnih, kozmetičnih, prehrabnih industriji ter aromaterapiji. Številna eterična olja imajo antibakterijsko, antivirusno, protiglivično in protivnetno delovanje, podpirajo delovanje imunskega sistema, sproščajo mišice, pomirjajo prebavila, pomirjajo razdraženost in nespečnost, izboljšajo koncentracijo. Na lastnosti in kakovost eteričnih olj vpliva veliko dejavnikov kot npr. podnebje, vreme, lastnosti tal in lokacija rastišča, zato imajo lahko eterična olja ene vrste rastlin, ki raste na različnih krajih, različno sestavo in s tem tudi lastnosti. Kakovostna eterična olja so shranjena v temnih stekleničkah z varnostnim pokrovčkom. Poleg slovenskega imena (npr. Eterično olje sivke) morajo imeti zapisano latinsko ime rastline, deželo rasti, način pridelave in pridobivanja. Vsaka serija mora biti preverjena, kar potrjujejo ustrezni certifikati, ki so pogosto prosto dostopni uporabnikom. (Rak Namestnik, b. d.)

2.3.1 ETERIČNO OLJE DIVJEGA ORIGANA

Eterično olje divjega origana je eterično olje močnega vonja, ki je pridobljeno iz endemične rastline divji origano (*Origanum minutiflorum*), ki raste izključno v gorovju Taurus v Južni Turčiji. To eterično olje je v mnogih raziskavah pokazalo antibakterijsko delovanje proti širokemu naboru bakterij, med drugimi tudi proti *E. coli*². Glavni aktivni sestavini olja sta fenola karvakrol in njegov izomer timol, ki imata močne antimikrobne in antioksidativne lastnosti. Med vsemi eteričnimi olji ima ravno origanovo največjo koncentracijo karvakrola, ki se razlikuje od kemotipa³ origana. Koncentracija se v večini kemotipov giblje med 50 in 80 %. V nekaterih primerih je lahko koncentracija karvakrola v eteričnem olju tudi do 90 % (Sakkas in Papadopoulou, 2016).

² *Escherichia coli* je vrsta paličastih bakterij, ki je prisotna povsod, predvsem v črevesju živali in tudi človeka. Le nekateri sevi te bakterije so patogeni. Široko uporabljena je v biotehnologiji (npr. za sintezo inzulina). (Belušič idr., 2022).

³ Kemotipi so skupina osebkov znotraj vrste, ki se po vsebnosti določene snovi razlikuje od drugih (Kemotíp, 2014).

V tej raziskovalni nalogi bomo od sedaj naprej eterično olje divjega origana imenovali kariganovo olje, vendar s tem ne mislimo na vrsto origana (*Origanum vulgare*), ki se v gospodinjstvu uporablja kot začimba v hrani. Ta vrsta ima namreč nižjo vsebnost karvakrola kot divji origano, zato smo se v tej raziskovalni nalogi odločili za uporabo slednjega.

2.3.2 ETERIČNO OLJE TIMIJANA

Eterično olje timijana je močno fenolno olje, ki je po izgledu svetlo rumena tekočina, ki ima močan zeliščni vonj. Pridobiva se iz cvetočih vršičkov in listov timijana (*Thymus vulgaris*), ki ga v gospodinjstvih pogosto uporabljamo kot začimbo (Borugă idr., 2014). Koncentracija karvakrola v njem po navadi znaša med 2 % in 8 %. Še bolj znana sestavina tega olja je timol (koncentracija tega se giblje 23 %–60 %) izomer karvakrola, ki ima njemu podobno antimikrobno delovanje. Poleg karvakrola in timola se v eteričnem olju navadnega timijana (*Thymus vulgaris*) kot glavne komponente nahajajo še γ -terpinen (18 %–50 %), *p*-cimene (8 %–44 %), karvakrol (2 %–8 %), and linalol (3 %–4 %) (Satyal idr., 2016).

2.3.3 ETERIČNO OLJE ČAJEVCA

Eterično olje avstralskega čajevca je bistra, brezbarvna oz. rahlo svetlo rumena tekočina, ki ima značilen oster vonj. Narejeno je iz listov in tankih vejic čajevca (*Melaleuca alternifolia*), ki je grmasto drevo z izviro iz Avstralije. Klub enakemu poimenovanju ga ne smemo zamenjati s čajevcem (*Camellia sinens*), iz katerega pridelujejo prave čaje. V zdravstvu se olje uporablja predvsem za kožne težave in obolenja, pomaga tudi pri pikih insektov. Potrjeno ima namreč antiseptično delovanje na mnoge mikrobe. Je eno izmed redkih eteričnih olj, ki se lahko uporablja nerazredčeno (predvsem pri glivičnih obolenjih nohtov). (Gorenjske lekarne, 2015).

Njegova glavna aktivna sestavina je terpinen-4-ol, ki se je izkazala kot zaviralec bakterij (Do idr., 2021).

2.3.4 ETERIČNO OLJE EVKALIPTA

Eterično olje evkalipta je brezbarvno olje, pridobljeno iz listov evkalipta (*Eucalyptus globulus*), ki izvira iz Avstralije. Glavna sestavina olja je evkaliptol (70 – 90 %). Olje se

pretežno uporablja kot dišava v kozmetični industriji in za izdelavo osvežilnih bonbonov (Del Principe idr., 2003).

2.3.5 ETERIČNO OLJE SIVKE

Eterično olje sivke je brezbarvno olje z značilnim cvetličnim vonjem. Pridobljeno je iz cvetočih vršičkov vrst rastlin iz rodu *Lavandula*. Najbolj razširjena vrsta je navadna sivka ali prava sivka *Lavandula angustifolia*. Uporablja se predvsem v kozmetični industriji kot dišava in za pomiritev v aromaterapiji (Del Principe idr., 2003).

Glavni sestavini v eteričnem olju sivke, ki sta se je izkazali za najbolj antibakterijski, sta linalol (vsebnost 34,1 %) in linalil acetat (33,3 %) (Kwiatkowski idr., 2020).

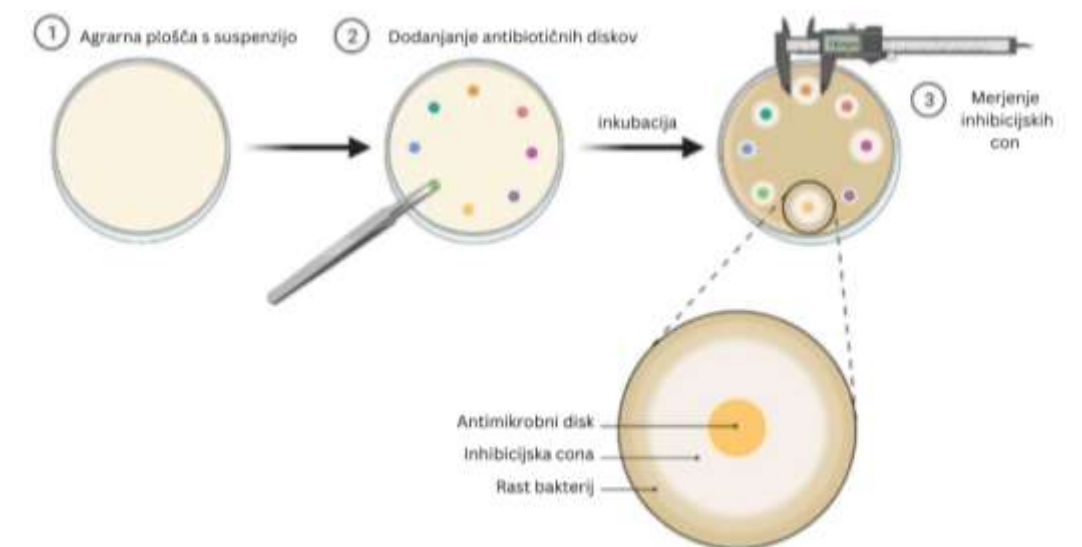
2.4 OLJČNO OLJE

Oljčno olje je iztisnjen sok iz plodu oljke (olive). Vsebuje 98–99 % triacilglicerolov z visokim deležem oleinske kisline in 1–2 % minornih sestavin, ki niso triacilglicerolnega izvora. Pomembnejše minorne sestavine so steroli (fitosteroli), vitamin E (alfa-tokoferol) in aromatske spojine (olju dajejo aromo) ter biofenoli (Bešter idr., 2014).

2.5 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM

V raziskovalni nalogi bomo za ugotavljanje antibakterijskega delovanja eteričnih olj uporabili **difuzijski antibiogram**. To je laboratorijski test, ki analizira učinkovitost antibakterijskega delovanja določene snovi (Institut »Jožef Stefan«, b. d.).

Na petrijevko z agarjem dodamo suspenzijo določene bakterije. To pripravimo tako, da v sterilni nevtralen tekoč medij (npr. fiziološko raztopino) dodamo kolonijo ene vrste bakterije in dobro premešamo (najbolj učinkovito to naredimo z napravo vorteks oz. stresalnikom). Kulturi bakterij nato dodamo z izbrano snovjo, katere antibakterijski učinek preverjamo, napojen disk iz filtrirnega papirja. Okoli diska se bo skozi čas snov sprostila



Slika 3: Prikaz difuzijskega antibiograma (Vir: Sharma, 2022)

ter vpila v agar in pojavila se bo tako imenovana **inhibicijska cona**, območje, kjer je snov inhibirala bakterije, zato slednje tam niso zrastle. Da lahko ugotovimo in primerjamo učinkovitost antibakterijskega delovanja določene snovi, izmerimo premer inhibicijske cone. Večji kot je, močnejše antibakterijske lastnosti ima, tj. uniči več bakterij (ibid).

2.6 LABORATORIJSKO DELO Z BAKTERIJAMI

Pri delu z bakterijami je ključnega pomena sterilnost, da naši rezultati ostanejo sledljivi, saj bi v nasprotnem primeru lahko iz okolja prinesli preostale bakterije in rezultati ne bi bili točni. V primeru dela s patogenimi bakterijami bi lahko ob nepravilnem ravnanju te prenesli v okolje in posledično tudi nase, s čimer bi potencialno ogrozili tudi lastno zdravje. Zato se pri kakršnem koli laboratorijskem delu z bakterijami držimo naslednjih pravil:

- Vse pripomočke in materiale, ki jih bomo uporabljali in bodo v posrednem ali neposrednem stiku z bakterijami, je predhodno treba sterilizirati v sterilizatorju.
- Pri delu imamo zaprta vsa okna, da onemogočimo prepih in potencialen vnos novih mikroorganizmov.
- Eksperiment opravljamo v neposredni bližini prižganega plinskega gorilnika.
- Cepilno zanko in vse preostale pripomočke, ki jih večkrat uporabimo med delom, vsakič razžarimo nad plinskim gorilnikom. Pinceto, škarje, kovinske ali steklene žlice, nože, steklene palčke, je potrebno potopiti v etanol in nato zažgati.
- Epruvet in gojišč ne puščamo odprtih.
- Delovno površino redno čistimo z razkužili.
- Posebej odlagamo potrebščine (epruvete, konice pipet), ki jih lahko ponovno uporabimo, v zanje pripravljene »odlagalnice« (npr. čaše) in material, ki ga bomo zavrgli. Oboje je potrebno sterilizirati, šele nato lahko neuporabljen material zavržemo, pripomočke pa pripravimo za ponovno uporabo (Glinšek Biškup idr., 2023).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI IN LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI

Eksperiment smo izvajali v šolskem laboratoriju pri sterilnih pogojih, ob prižganem gorilniku.



Slika 4: Materiali in laboratorijski pripomočki (Vir: Osebni arhiv, 2024)

3.1.1 MATERIALI

- eterično olje divjega origana,
- eterično olje timijana,
- eterično olje čajevca,
- eterično olje evkalipta,
- eterično olje sivke,
- oljčno olje,
- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl_(aq)),
- etanol,
- agar.

3.1.2 LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI

- sterilne palčke za odvzem brisa,
- petrijevke,
- epruveta,
- pokrovčki za epruvete,
- stojalo za epruvete
- diski iz filtrirnega papirja ($2r = 7 \text{ mm}$),
- avtomatska pipeta,
- konice za avtomatsko pipeto,
- plinski gorilnik,
- cepilna zanka,
- pinceta,
- čaše,
- kljunasto merilo
- alkoholni flumaster.

3.2 METODOLOGIJA

V tej raziskovalni nalogi smo uporabili naslednje metode dela:

- opazovanje,
- fotografiranje,
- merjenje,
- beleženje,
- rezanje diskov,
- eksperimentiranje oz. izvedba poskusa,
- zbiranje in urejanje podatkov v tabele in grafe,
- računanje,
- analiziranje podatkov in napak,
- sklepanje, povzemanje
- iskanje literature in virov.

3.2.1 STERILIZACIJA PRIPOMOČKOV

V sterilizator smo za 30 minut na 170 °C dali sterilizirati naslednje pripomočke:

- petrijevke,
- epruvete,
- čaše,
- pokrovčke za epruvete,
- konice za avtomatsko pipeto,
- diske iz filter papirja,
- fiziološko raztopino.

3.2.2 PRIPRAVA GOJIŠČ

Za pripravo gojišč bakterij smo vzeli 7,5 g agarja⁴ in 300 ml destilirane vode. Agar smo kuhali na grelni plošči in ga pustili vreti za 5 min, da smo s tem zagotovili sterilnost gojišč. Mešanico smo pustili, da ji je temperatura padla pod 50 °C in jo nato prelili v petrijevke. Pred uporabo gojišč smo počakali, da se je agar strdil.



Slika 5: Pripravljena gojišča (Vir: Osebni arhiv, 2024)

⁴ Agar je polisaharid rdečih morskih alg, ki je najpogosteje uporabljen v namen priprave gojišč v mikrobiologiji (Dolinar, 1976).

3.2.3 IZOLIRANJE ČISTE BAKTERIJSKE KULTURE

Za natančne rezultate pri delu z bakterijami moramo izolirati kulture posameznih vrst bakterij. S tem preprečimo nenatančne rezultate, saj lahko le tako zagotovimo sledljivost le-teh.

S sterilno palčko smo sprva vzeli brise na 3 različnih površinah; tla, miza in kljuka. Tako smo lahko kasneje izbrali gojišče, na katerem so se bakterije najbolj razvile, v našem primeru je bilo to gojišče z brisom mize. Brise smo pustili na sobni temperaturi pribl. 1 teden, da so na gojišču zrastle različne kolonije bakterij, ki smo jih lahko prepoznali po različnih barvah. Petrijevke moramo vedno odložiti in pustiti tako, da je gojišče na vrhu, da se kondenz, ki nastane, ne nabira na agarju, temveč pade na spodnjo stran petrijevke.



Slika 6: Gojišče z brisom mize po 1 tednu (Vir: Osebni arhiv, 2024)

Za poizkus smo se nato odločili za naključno kolonijo bež bakterij, ki smo jih nacepili na novo gojišče. S cepilno zanko, ki smo jo predhodno razžarili nad ognjem, (s tem smo uničili vse potencialne mikrobe na zanki in preprečili kontaminacijo oz. nenameren prenos bakterij ali drugih mikroorganizmov iz ene snovi v drugo) in počakali, da se je ohladila, smo zajeli kolonijo izbranih bakterij in jih nanесли po gojišču. Bakterije smo pustili rasti 3 dni.



Slika 7: Izolirana kultura bež bakterij (Vir: Osebni arhiv, 2024)

3.2.4 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM

Za poskus antibakterijskega delovanja eteričnih olj z in brez vsebnosti karvakrola smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma.

Pri poskusu smo uporabili 5 različnih eteričnih olj:

- eterično olje divjega origana (*Origanum minutiflorum*),
- eterično olje timijana (*Thymus vulgaris*),
- eterično olje čajevca (*Melaleuca alternifolia*),
- eterično olje evkalipta (*Eucalyptus globulus*),
- eterično olje sivke (*Lavandula angustifolia*).

Eterična olja divjega origana in timijana vsebujeta karvakrol. Za primerjavo antibakterijskih lastnosti smo vzeli eterično olje čajevca, evkalipta in sivke, saj ta olja karvakrola ne vsebujejo. Tako bomo lahko kasneje primerjali, ali vsebnost karvakrola vpliva na rast bakterij, torej ali imajo eterična olja z vsebnostjo karvakrola močnejše antibakterijsko delovanje kot olja, ki tega fenola ne vsebujejo.



Slika 8: Olivno olje in posamezna eterična olja (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Da smo lahko bakterije kasneje enakomerno porazdelili po agarju, smo pripravili suspenzijo⁵ bakterij v fiziološki raztopini. Vzeli smo sterilno epruveto in s pomočjo avtomatske pipete odmerili 13 ml sterilne fiziološke raztopine. Vzeli smo cepilno zanko in jo podržali nad prižganim plinskim gorilnikom, da se je razžarela ter počakali, da se je ohladila (v nasprotnem primeru bi lahko zaradi previsoke temperature uničili bakterije). Z njo smo nato iz gojišča nacepljenih bakterij odvzeli kolonijo bakterij. Z zanko smo pomešali po fiziološki raztopini, da smo z nje dobili čim več bakterij. Epruveto smo pokrili s čepkom in jo ročno premešali, da so se bakterije enakomerno razpršile po celotnem mediju (fiziološka raztopina je postala motna). Za popolnoma enakomerno suspenzijo bi morali uporabiti vorteks oz. stresalnik, ki ga v laboratoriju nismo imeli.

⁵ Suspenzija je zmes tekočine in trdnih delcev kake v njej netopne snovi (Suspénzija, 2014)



Slika 9: Priprava suspenzije bež bakterije (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Z avtomatsko pipeto smo nato odmerili po 0,8 ml suspenzije in jo zlili na vse petrijevke z agarjem, na katerih bomo naredili difuzijski antibiogram. Pred uporabo smo morali počakati, da se je suspenzija vpila v agar.

Tri petrijevke smo pustili za kontrolo. Na prvo nismo nanesti ničesar in smo jo imeli za kontrolo sterilnosti agarja. Na drugo smo nanesti 0,8 ml suspenzije bakterij, a smo jo uporabili za kontrolo rasti bakterij in ne za antibiogram. Tretjo smo imeli za kontrolo sterilnosti fiziološke raztopine in nanjo nanesti 0,8 ml le-te. Pri tem smo menjali konico avtomatske pipete, da nismo nanesti bakterij in s tem povzročili kontaminacije.

Želeli smo tudi raziskati, ali in kako se bo velikost inhibicijskih con (in s tem povezano antibakterijsko delovanje) spreminjala glede na koncentracijo posameznega eteričnega olja.

Zato smo za posamezno olje vzeli po dve petrijevki. Na prvi smo preverjali inhibicijske cone 100 % koncentracije posameznega olja in za kontrolo uporabili sterilno fiziološko raztopino. Na drugi plošči smo preverjali inhibicijske cone različnih redčitev. Te smo pripravili tako, da smo za nosilno snov uporabili olivno olje, saj se na ta način mnoga eterična olja redčijo za uporabo. Olja smo dozirali kapljično, saj v laboratoriju nismo imeli pripomočkov, ki bi zagotovili bolj natančno odmerjanje tako majhnih količin. Za kontrolo smo uporabili olivno olje.

Redčitve posameznega eteričnega olja smo pripravili v koncentracijah oz. razmerjih (razmerje eterično olje : celoti):

- 1:2 = 3 kapljice eteričnega olja, 3 kapljice oljčnega olja,
- 1:5 = 1 kapljica eteričnega olja, 4 kapljice oljčnega olja,
- 1:10 = 1 kapljica eteričnega olja, 9 kapljic oljčnega olja.



Slika 10: Priprava razredčitev in difuzijskega antibiograma (Vir: Osebni arhiv, 2025)

S sledečimi številkami smo si označili posamezne snovi in koncentracije, ki smo jih nato kapljično (1 kapljica na disk) nanesli na diske iz filtrirnega papirja, premera 7 mm in te položili na označena mesta v vsako izmed petrijevok, za vsako posamezno eterično olje:

Prva petrijevka za posamezno eterično olje:

- 1 – 100 % koncentracija posameznega eteričnega olja,
- 2 – fiziološka raztopina (kontrola).

Druga petrijevka za posamezno eterično olje:

- 1 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:2,
- 2 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:5,
- 3 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:10,
- 4 – olivno olje (kontrola).



Slika 11: Oznake petrijevok (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Vse petrijevke smo pustili na sobni temperaturi in po 4 dneh pregledali rezultate.

4 REZULTATI

Namen naloge je bil primerjati nastale inhibicijske cone med eteričnimi olji origana in timijana, ki vsebujeta karvakrol in eteričnimi olji čajevca, evkalipta in sivke, ki karvakrola ne vsebujejo. Želeli smo primerjati, kakšne bodo razlike med eteričnimi olji z in brez karvakrola ter opazovati, kako se spreminja antibiotično delovanje, če ista olja redčimo.

Za vsako posamezno eterično olje imamo po dve petrijevki, na katerih so številke, ki označujejo eterična olja in njihove redčitve po že prej omenjeni legendi:

- Prva petrijevka za posamezno eterično olje:
 - 1 – 100 % koncentracija posameznega eteričnega olja,
 - 2 – fiziološka raztopina (kontrola).
- Druga petrijevka za posamezno eterično olje:
 - 1 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:2,
 - 2 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:5,
 - 3 – koncentracija posameznega eteričnega olja v razmerju 1:10,
 - 4 – olivno olje (kontrola).

Merjenje inhibicijskih con je potekalo s kljunastim merilom. Kjer celotnega premera (d) inhibicijske cone ni bilo mogoče izmeriti, smo izmerili le polmer (r) od središča diska in ga pomnožili z 2 ($d = 2r$). V meritvah je kot osnova vštet premer diska (7 mm).

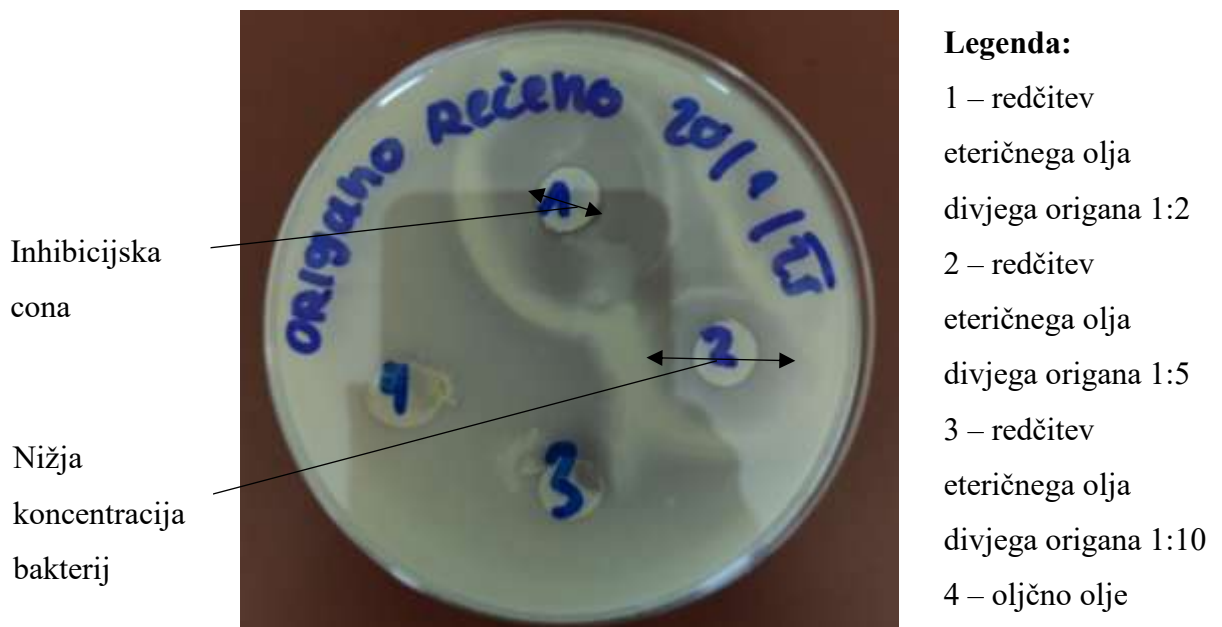
4.1 ETERIČNO OLJE DIVJEGA ORIGANA

V prvi petrijevki smo opazovali delovanje 100 % eteričnega olja divjega origana. Za kontrolo smo uporabili sterilno fiziološko raztopino. Na drugi petrijevki smo opazovali redčitve eteričnega olja divjega origana, ki smo jih naredili z oljčnim oljem v razmerjih 1:2, 1:5 in 1:10. Tukaj smo za kontrolo nanegli oljčno olje, ki smo ga uporabili za redčitve.



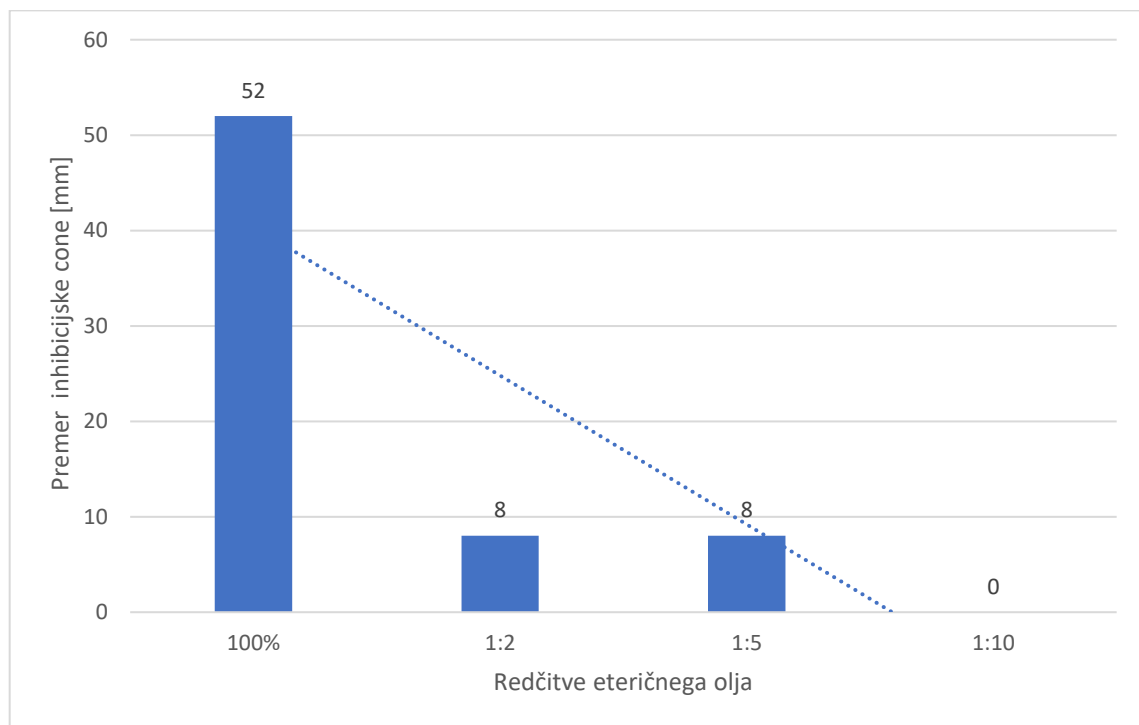
Slika 12: Antibiogram eteričnega olja divjega origana v 100 % koncentraciji (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na prvi petrijevki (Slika 12) smo lahko opazili inhibicijsko cono pri 100 % koncentraciji eteričnega olja divjega origana (disk številka 1), ki je merila 52 mm, kar kaže na močno antibakterijsko delovanje eteričnega olja divjega origana. Na disku s fiziološko raztopino (disk številka 2) ni nastala inhibicijska cona, kar je bilo pričakovano, saj nam je ta disk služil kot kontrola.



Slika 13: Antibiogram redčitev eteričnega olja divjega origana (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na drugi petrijevki (Slika 13) smo opazili majhne inhibicijske cone pri redčitvi v razmerju 1:2 (disk številka 1) in 1:5 (disk številka 2), pri obeh premera 8 mm. Na teh dveh diskih smo opazili tudi nižje koncentracije bakterij (označeno na Sliki 13), pri redčitvi 1:2 s premerom 26 mm in pri redčitvi 1:5 s premerom 17 mm. Pri redčitvi v razmerju 1:10 (disk številka 3) ni bilo opaziti inhibicijske cone. Enako je bilo pri disku števila 4, kjer je bilo naneseno oljčno olje, ki je služilo kontroli.



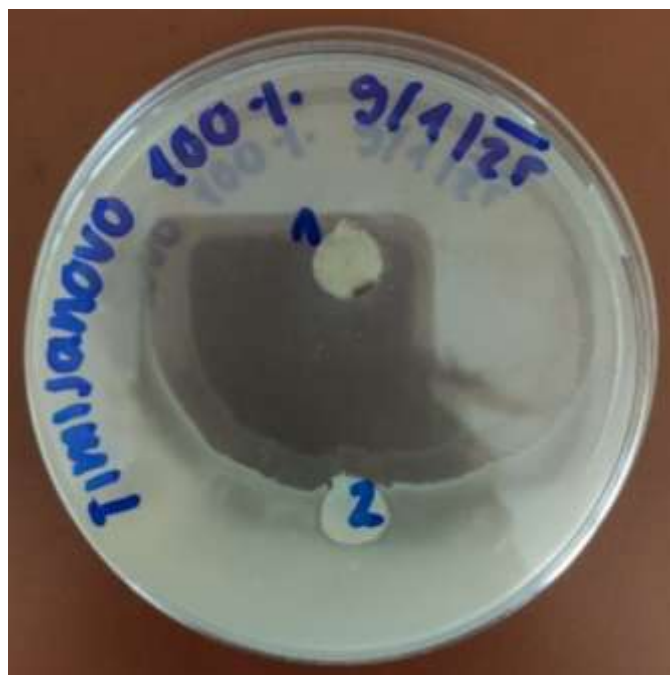
Graf 1: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja divjega origana

(Vir: Osebni arhiv, 2025)

Graf 1 prikazuje velikost inhibicijskih con različnih koncentracij eteričnega olja divjega origana (100%, v razmerju 1:2, 1:5 in 1:10). Z grafa lahko razberemo, da je največji antibakterijski učinek med danimi koncentracijami imelo neredčeno (100 %) eterično olje divjega origana. Prav tako lahko iz trendne črte grafa razberemo, da so se z redčenjem eteričnega olja velikosti inhibicijskih con manjšale, vendar ne premosorazmerno.

4.2 ETERIČNO OLJE TIMIJANA

Na tretji petrijevki smo opazovali delovanje 100 % eteričnega olja timijana. Za kontrolo smo ponovno uporabili sterilno fiziološko raztopino. Na četrti petrijevki smo opazovali inhibicijske cone redčitev (1:2, 1:5 in 1:10) eteričnega olja timijana. Tudi tukaj smo za kontrolo imeli oljčno olje, ki smo ga uporabili za redčitve.



Legenda:

- 1 – 100 % eterično olje timijana
- 2 – fiziološka raztopina

Slika 14: Antibiogram eteričnega olja timijana v 100 % koncentraciji (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na tretji petrijevki (Slika 14) smo opazili veliko inhibicijsko cono pri 100 % koncentraciji eteričnega olja timijana (disk številka 1), ki je merila 60 mm. Zgornji del, ob disku številka 2, s kontrolno fiziološko raztopino, kjer ni rasti bakterij, je najverjetneje posledica močnega delovanja 100 % timijanovega eteričnega olja, kar lahko sklepamo, ker na preostalem delu okoli diska 2 inhibicijske cone ni.

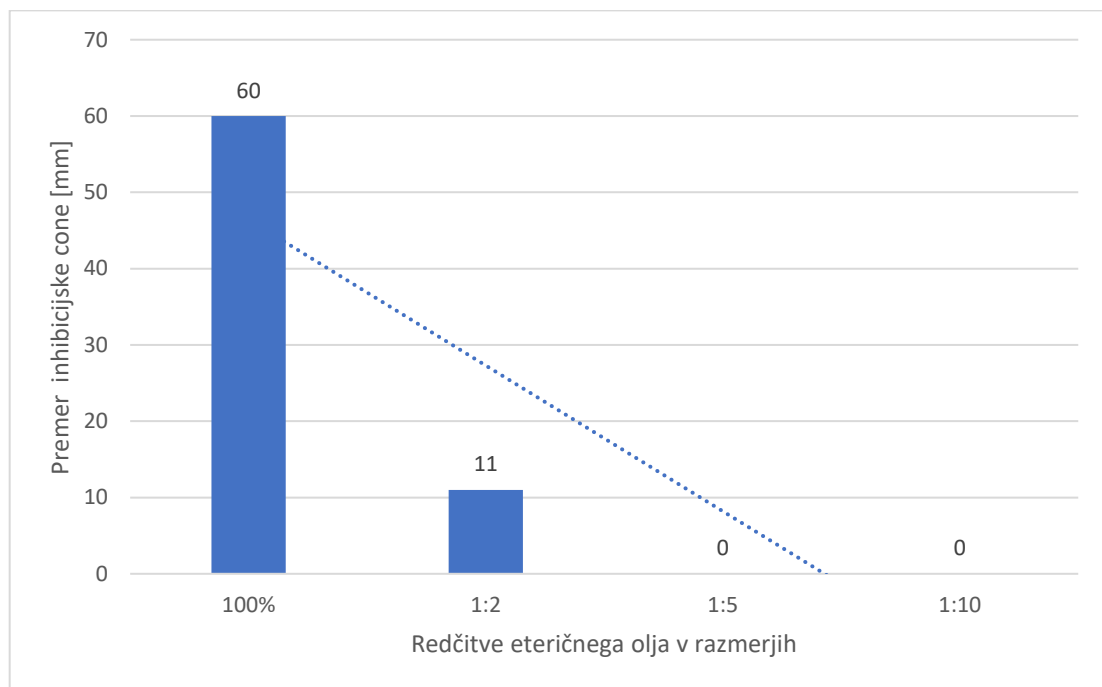


Legenda:

- 1 – redčitev eteričnega olja timijana 1:2
- 2 – redčitev eteričnega olja timijana 1:5
- 3 – redčitev eteričnega olja timijana 1:10
- 4 – oljčno olje

Slika 15: Antibiogram redčitev eteričnega olja timijana (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na četrti petrijevki (Slika 15) smo opazili inhibicijsko cono le pri redčitvi v razmerju 1:2 (disk številka 1), premera 11 mm. Pri redčitvah v razmerju 1:5 (disk številka 2) in 1:10 (disk številka 3), ni bilo opaziti inhibicijske cone. Na disku številka 4, kjer je bilo nanešeno kontrolno oljčno olje, inhibicijske cone prav tako ni bilo. Ob vseh štirih diskih so bile opazne oljne kapljice.



Graf 2: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja timijana (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na Grafu 2 je prikazana velikost inhibicijskih con različnih koncentracij eteričnega olja timijana (100%, v razmerju 1:2, 1:5 in 1:10). Z grafa lahko razberemo, da je največji antibakterijski učinek med danimi koncentracijami imelo neredčeno (100 %) eterično olje timijana. Precej manjša inhibicijska cona je bila pri redčitvi v razmerju 1:2 (11 mm). Podobno kot pri eteričnem olju divjega origana lahko pri timijanovem eteričnem olju iz trendne črte grafa razberemo, da so se z redčenjem eteričnega olja velikosti inhibicijskih con manjšale, vendar ponovno ne premosorazmerno.

4.3 ETERIČNO OLJE ČAJEVCA

Na peti petrijevki smo opazovali delovanje 100 % eteričnega olja čajevca. Za kontrolo smo uporabili sterilno fiziološko raztopino. Na šesti petrijevki smo opazovali redčitve eteričnega olja čajevca, ki smo jih naredili z oljčnim oljem v razmerjih 1:2, 1:5 in 1:10. Kot kontrola nam je služilo oljčno olje.



Legenda:

- 1 – 100 % eterično olje čajevca
- 2 – fiziološka raztopina

Slika 16: Antibiogram eteričnega olja čajevca v 100 % koncentraciji (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na peti petrijevki (Slika 16) ob 100 % koncentraciji eteričnega olja čajevca (disk številka 1) ni bilo opaziti pravih inhibicijskih con. Tik ob disku so se v krogu nabrale oljne kapljice, kar je bilo prej opazno le pri redčitvah in ne pri 100 % koncentracijah eteričnega olja. Kapljice olja so se nahajale na razdalji 7 mm od središča diska 1. Nato je viden obroč ponovne enakomerne rasti bakterij. Nepričakovano pa se je na oddaljenosti 13 mm od središča diska pojavil še nazobčan obroč nižje koncentracije oz. manjše rasti bakterij.



Legenda:

- 1 – redčitev eteričnega olja čajevca 1:2
- 2 – redčitev eteričnega olja čajevca 1:5
- 3 – redčitev eteričnega olja čajevca 1:10
- 4 – oljčno olje

Slika 17: Antibiogram redčitev eteričnega olja čajevca (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na šesti petrijevki (Slika 17) inhibicijske cone ni bilo pri nobeni izmed redčitev (diski od 1 do 3), kot tudi ne na disku številka 4 s kontrolnim oljčnim oljem. Ob diskih so bile opazne oljne kapljice.

4.4 ETERIČNO OLJE EVKALIPTA

Na sedmi petrijevki smo opazovali delovanje 100 % eteričnega olja evkalipta. Za kontrolo smo ponovno uporabili fiziološko raztopino. Na osmi petrijevki smo opazovali redčitve eteričnega olja evkalipta, ki smo jih naredili z oljčnim oljem v razmerjih 1:2, 1:5 in 1:10. Isto oljčno olje je služilo kot kontrola.



Legenda:

- 1 – 100 % eterično olje evkalipta
- 2 – fiziološka raztopina

Slika 18: Antibiogram eteričnega olja evkalipta v 100 % koncentraciji (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na sedmi petrijevki (Slika 18) inhibicijske cone ni bilo ne pri 100 % eteričnem olju evkalipta (disk številka 1), kot tudi ne pri fiziološki raztopini (disk številka 2).



Legenda:

- 1 – redčitev eteričnega olja evkalipta 1:2
- 2 – redčitev eteričnega olja evkalipta 1:5
- 3 – redčitev eteričnega olja evkalipta 1:10
- 4 – oljčno olje

Slika 19: Antibiogram redčitev eteričnega olja evkalipta (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na osmi petrijevki prav tako inhibicijske cone ni bilo na nobeni izmed redčitev (diski od 1 do 3), kot tudi ne na disku številka 4 s kontrolnim oljčnim oljem. Na sredini petrijevke je vidna manjša koncentracija in neenakomerna rast bakterij, pri čemer gre najverjetneje za neenakomeren premaz bakterij. Prav tako so ob diskih vidne kapljice olja.

4.5 ETERIČNO OLJE SIVKE

Deveta petrijevka je služila za opazovanje delovanja 100 % eteričnega olja sivke. Za kontrolo smo uporabili sterilno fiziološko raztopino. Na deseti petrijevki smo opazovali redčitve eteričnega olja sivke, v razmerjih 1:2, 1:5 in 1:10, ki smo jih naredili z oljčnim oljem, ki smo ga prav tako uporabili za kontrolo.



Legenda:

- 1 – 100 % eterično olje sivke
- 2 – fiziološka raztopina

Slika 20: Antibiogram eteričnega olja sivke v 100 % koncentraciji (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na deveti petrijevki je na disku s 100 % koncentracijo eteričnega olja sivke lepo vidna inhibicijska cona s premerom 32 mm. Ob inhibicijski coni je nastal obroč neenakomerne rasti bakterij. Na kontrolnem disku številka 2 s fiziološko raztopino inhibicijske cone ni.

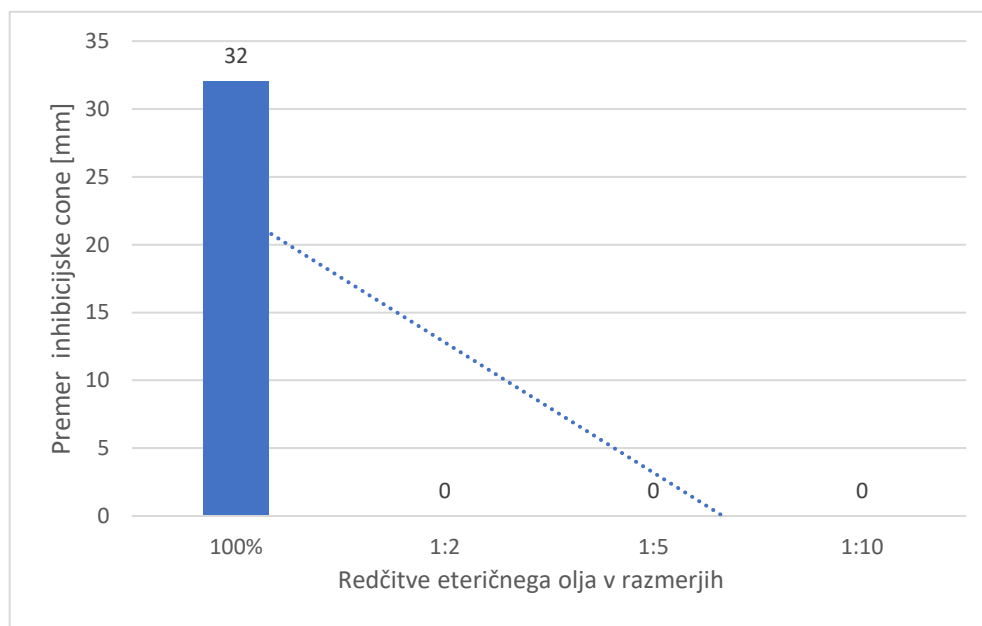


Legenda:

- 1 – redčitev eteričnega olja sivke 1:2
- 2 – redčitev eteričnega olja sivke 1:5
- 3 – redčitev eteričnega olja sivke 1:10
- 4 – oljčno olje

Slika 21: Antibiogram redčitev eteričnega olja sivke (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Na deseti petrijevki (Slika 21) inhibicijske cone ni bilo pri nobeni redčitvi eteričnega olja sivke (diski od 1 do 3) kot tudi ne na disku številka 4 s oljčnim oljem.



Graf 3: Premeri inhibicijskih con pri različnih redčitvah eteričnega olja sivke (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Iz grafa 3 je razvidno, da je inhibicijska cona nastala le pri 100 % koncentraciji eteričnega olja sivke (32 mm). Pri redčitvah olja inhibicijskih con ni bilo. Iz trendne črte grafa 3 lahko odčitamo, da so se z redčenjem inhibicijske cone drastično zmanjšale, oz. jih pri rečitvah sploh ni bilo.

4.6 KONTROLE

Da smo lahko zagotovili točnost rezultatov in dokazovali zgolj antibakterijske učinke eteričnih olj, smo naredili še 3 kontrole: fiziološke raztopine (Slika 22), ki smo jo uporabili za suspenzijo bakterij; agarja (Slika 23), ki smo ga uporabili za vsa gojišča; nanos in rast bakterij (Slika 24), na katerih smo naredili difuzijske antibiograme.



Slika 22: Kontrola fiziološke raztopine (Vir: Osebni arhiv, 2025)



Slika 23: Kontrola agarja (Vir: Osebni arhiv, 2025)



Slika 24: Kontrola suspenzije bakterij (Vir: Osebni arhiv, 2025)

Slika 22 prikazuje kontrolo fiziološke raztopine, ki smo jo uporabili za suspenzijo izolirane bakterijske kolonije kot tudi za kontrolo pri 100 % koncentracijah posameznih eteričnih olj. Zrastla ni nobena bakterijska kolonija, kar zagotavlja sterilnost fiziološke raztopin.

Slika 23 prikazuje kontrolo agarja, ki smo ga uporabili za gojišče pri vseh petrijevkah. Na njem ni zrastle nobena kolonija bakterij, kar kaže na njegovo sterilnost.

S tretjo kontrolno petrijevko (Slika 24) smo preverili suspenzijo izolirane bakterijske kolonije na gojišču brez eteričnih olj, da smo lahko videli razliko med petrijevkami, kjer so eterična olja bila nanešena. Rast bakterij je bila na kontroli enakomerna in ni bilo opaziti drugih kolonij bakterij, s čimer vemo, da gre za izolirano čisto bakterijsko kolonijo.

5 RAZPRAVA

Naši rezultati, dobljeni z eksperimentalnim delom, nakazujejo, da eterična olja, ki vsebujejo karvakrol, na naključno izbrano izolirano bakterijsko kolonijo delujejo zaviralno.

Inhibicijsko cono in s tem povezano antibakterijsko delovanje (večja inhibicijska cona pomeni večje antibakterijsko delovanje) so imela eterična olja divjega origana, timijana in sivke.

Eterično olje divjega origana, je, kot pričakovano, zaradi visoke vsebnosti karvakrola (okoli 80 %), imelo v 100 % koncentraciji veliko inhibicijsko cono (52 mm), iz česar lahko sklepamo, da ima origano dobro antibakterijsko delovanje. Ta sklep podpira tudi dejstvo, da je edino (poleg timijanovega eteričnega olja, ki v naši raziskavi edino poleg oranovega vsebuje karvakrol) ustvarilo inhibicijske cone tudi v redčitvah (1:2 in 1:5, pri obeh 8 mm). V raziskavi (Mollea idr., 2022) se je eterično olje origana izkazalo za dobro antibakterijsko sredstvo proti *Staphylococcus epidermidis* in *Escherichia coli*, kar dodatno potrjuje naše sklepe, da ima oranovo eterično olje močan antibakterijski učinek.

Največjo inhibicijsko cono je v 100 % koncentraciji imelo timijanovo eterično olje (60 mm, kar je 8 mm več kot inhibicijska cona pri 100 % koncentraciji eteričnega olja divjega origana), ki sicer vsebuje manj karvakrola kot eterično olje divjega origana (2 % - 8 %), vendar pa po navedbah v raziskavah (Satyal, 2016) vsebuje več timola (23 % – 60 %), ki je izomer karvakrola in ima podobno antibakterijsko delovanje, kar bi bila možna razlaga za močnejše antibakterijsko delovanje. Dosedanje raziskave (Mollea idr., 2022) so pokazale tudi močno antibakterijsko delovanje timijana proti bakterijama *Staphylococcus epidermidis* in *Escherichia coli*. V raziskavi (Mollea idr., 2022) sta se za učinkovita antibakterijska sredstva izkazali obe eterični olji (timijana in origana) s približno podobnimi inhibicijskimi conami (kar se sklada z našimi rezultati), odvisnimi od vrste bakterij. Po naši raziskavi bi sicer lahko sklepali, da ima timol močnejše antibakterijsko delovanje kot karvakrol, vendar je prav tako možna razlaga za večjo inhibicijsko cono v tem, da smo eterična olja nanašali kapljično, s čimer ne moramo zagotoviti popolnoma enakih količin nanesenih olji, kar pa bi bilo potrebno, da bi lahko zanesljivo primerjali učinke olj in rekli,

da je v našem primeru timijanovo olje imelo močnejše antibakterijsko delovanje. Prav tako smo uporabili le eno naključno kolonijo bakterij in je možno, da je na to bakterijo bolje deloval timol, vendar to še ne pomeni, da isto velja za vse bakterije. Zato bi zagotovo bilo dobro narediti dodatne natančnejše raziskave in primerjati antibakterijsko delovanje karvakrola in timola ter na takšen način priti do konkretnjših ter zanesljivejših ugotovitev, glede tega, kateri fenol ima boljše antibakterijsko delovanje. Po naši raziskavi lahko sicer sklepamo, da je bolj učinkovit timol, vendar tega ne moramo trditi z gotovostjo.

Eterično olje sivke v redčitvah ni povzročilo inhibicijskih con, kot smo to tudi pričakovali, saj sivka ne vsebuje karvakrola. Presenetil pa nas je rezultat pri 100 % koncentraciji, kjer je nastala inhibicijska cona (32 mm) in s tem lahko rečemo, da eterično olje sivke vseeno ima antibakterijsko delovanje. Možen razlog za ta rezultat bi lahko po raziskavah (Kwiatkowski idr., 2020) bila vsebnost linaola (34,1 %) in linalil acetata (33,3 %). Eterično olje sivke je zaradi svoje sestave v raziskavi delovalo antibakterijsko celo proti bakteriji MRSA. Iz tega vidimo, da se lahko v eteričnih oljih nahajajo še druge snovi poleg karvakrola ali timola, ki na bakterije delujejo zaviralno.

Evkaliptovo eterično olje kot pričakovano ni ustvarilo inhibicijskih con, tako v redčitvah kot tudi v 100 % koncentraciji, saj karvakrola ne vsebuje, kar se sklada z našim sklepanjem, da eterična olja brez vsebnosti karvakrola nimajo oz. imajo manjše antibakterijsko delovanje kot tista, ki karvakrol vsebujejo (v našem primeru torej origanovo in timijanovo eterično olje).

Tudi eterično olje čajevca ni ustvarilo pravih inhibicijskih con (le obroč nižje koncentracije bakterij, ki ga bomo kasneje tudi komentirali), kljub temu da je v raziskavah (Do idr., 2021) pokazal antimikrobno delovanje. Čajevca sicer ne vsebuje karvakrola, ampak naj bi vseboval terpinen-4-ol, ki deluje antibakterijsko. V raziskavi so ga izolirali iz eteričnega olja čajevca in je v izolirani obliki imel močnejše antibakterijsko delovanje kot v eteričnem olju, kar bi lahko razložilo, zakaj v naši raziskavi eterično olje čajevca ni ustvarilo inhibicijske cone. Razlike v raziskavah so tudi lahko posledica različnih vrst bakterij, ki so bile uporabljene, saj so bile v navedeni raziskavi testirane 3 vrste (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, in *Escherichia coli*), pri nas pa le 1 naključna vrsta bakterij.

Z grafi (Graf 1, 2 in 3) smo želeli prikazati, kako se bo spreminjalo antibakterijsko delovanje posameznih eteričnih olj. Sklepali smo, da se bo z nižanjem koncentracije

antibakterijsko delovanje manjšalo. Na vseh treh grafih, kjer so prikazana eterična olja, ki so ustvarila inhibicijske cone (eterično olje divjega origana, timijana in sivke), lahko iz trendnih črt grafov vidimo, da so z nižanjem koncentracije posameznega olja padale inhibicijske cone in s tem povezano antibakterijsko delovanje, kar torej potrjuje naše sklepe. Vendar pa antibakterijsko delovanje ni padalo premo sorazmerno (trendne črte smo uporabili le za vizualizacijo padanja).

Za razliko od eteričnega olja sivke, ki redčeno ni ustvarilo inhibicijskih con, sta eterično olje divjega origana in timijana edina rast bakterij zavrla tudi redčena (origanovo olje je imelo v razmerjih 1:2 in 1:5 inhibicijsko cono 8 mm, timijanovo olje pa le v razmerju 1:2 velikosti 11 mm). Obe olji vsebujeta karvakrol, iz česar lahko sklepamo, da sta imela prav zaradi tega najmočnejše antibakterijsko delovanje izmed vseh testiranih olj. Nobeno olje pa ni pri redčitvi 1:10 imelo inhibicijske cone, torej tudi ne antibakterijskega učinka in lahko sklepamo, da je koncentracija bila preprosto premajhna, da bi olja pri majhnem volumnu zavrla bakterije.

Kljub vsemu bi bilo boljše, da bi naredili še več redčitev olj in opazovali, ali obstaja kakšen vzorec, po katerem se antibakterijsko delovanje zmanjšuje.

Poleg inhibicijskih con so se pri redčitvah divjega origana (Slika 13) in sivki pri 100 % koncentraciji (Slika 20) pojavile nižje koncentracije bakterij. Možni razlog bi lahko bil, da je olje kot nepolarna snov difundirala (pronicala) v suspenzijo bakterij, ki je za osnovo imela fiziološko raztopino, ki je polarna. Tako je olje »odrinilo« bakterije in na tistem mestu jih je ostalo manj, kar bi lahko bil razlog za pojav nižje koncentracije bakterij.

Okoli diskov pri redčitvah vseh eteričnih olji smo lahko opazili kapljice. Glede na to, da so se (z eno izjemo) pojavile le pri redčitvah, lahko predvidevamo, da gre za emulzije oljčnega olja, ki smo ga uporabili za redčenje. Oljčno olje na kontrolah ni imelo nikakršnega učinka, zato lahko sklepamo, da na rezultate ni vplivalo.

Edina izjema izven redčitev je bil disk z nanešenim 100 % eteričnim oljem čajevca, kjer so se kapljice pojavile okoli diska (Slika 16). Prav tako je nepričakovano bil prisoten nazobčan pas nižje koncentracije bakterij. Razlog za ta dva pojava težko razložimo, možno je, da je zato kriva sestava eteričnega olja čajevca. Zagotovo bi bilo potrebno poskus s

čajevcem ponoviti in videti, ali se ta pojav ponovi. V takšnem primeru bi morali narediti dodatne raziskave o sestavi eteričnega olja čajevca in ugotoviti, kaj je vzrok za ta nepričakovan pojav.

Pri samem eksperimentu smo bili precej omejeni z metodami dela, ki smo jih lahko uporabili, saj je bil poskus izveden v šolskem laboratoriju, v katerem nismo imeli vseh profesionalnih pripomočkov, ki bi nam zagotovili natančnejšo raziskavo.

Sicer so pri večini petrijevkih bakterije enakomerno zrastle, vendar se to ni zgodilo pri petrijevki z redčitvami evkaliptovega eteričnega olja (Slika 19). Enakomerno rast bakterij bi lahko zagotovili s pripravo bolj enakomerne suspenzije, kar bi dosegli z uporabo stresalnika, ki pa nam ni bil na voljo, zato smo morali suspenzijo premešati ročno.

Zaradi omejenosti s pripomočki, je bilo odmerjanje eteričnih olj nenatančno, ker smo jih odmerjali kapljično, s tem pa nismo mogli zagotoviti popolnoma enakih volumnov olj, kar je lahko prispevalo tudi k nenatančnim rezultatom.

Prav tako bi bilo dobro, da bi identificirali vrsto bakterij, ki smo jo uporabili, saj se delovanje eteričnih olj najverjetneje razlikuje od vrste do vrste zaradi različne zgradbe in z njo povezanih lastnosti, vendar za to nismo imeli pripomočkov.

6 ZAKLJUČEK

Z našo raziskavo smo želeli raziskati, ali imajo eterična olja z vsebnostjo karvakrola znatno močnejše antibakterijsko delovanje kot eterična olja brez vsebnosti karvakrola in s pomočjo lastne raziskave in raziskav drugih smo lahko prišli do naslednjih sklepov.

Eterična olja z vsebnostjo karvakrola, ki sta v naši raziskavi bila eterično olje divjega origana in timijana, so pokazala močno antibakterijsko delovanje, saj so na izbrani koloniji bakterij naredila največje inhibicijske cone. Timijanovo olje je ustvarilo večje inhibicijske cone kot origanovo, iz česar lahko sklepamo, da timol, ki ga timijan vsebuje več, bolje zavre rast bakterij kot karvakrol, ki ga je več v eteričnem olju divjega origana. Vendar pa na podlagi prejšnjih raziskav obstaja odprto vprašanje, kateri fenol bolje uniči bakterije, saj rezultati tujih raziskav kažejo na podobno močno antibakterijsko delovanje obeh, ki je odvisno od vrste bakterij, na katerem so snovi testirane.

Eterično olje evkalipta ni pokazalo antimikrobnega delovanja, kar je bilo tudi pričakovano, saj smo sklepali, da rasti bakterij ne bo zavrlo, ker ne vsebuje karvakrola.

Eterično olje čajevca je na bakterijah naredilo pas nižje koncentracije bakterij, ki bi lahko bil posledica njegove zgradbe, vendar bi za konkreten odgovor bile potrebne dodatne raziskave.

Eterično olje sivke se je nepričakovano izkazalo za prav tako antibakterijsko, vendar ne tako močno kot eterično olje divjega origana in timijana. Zaviralni učinki na bakterije so pri sivki najverjetneje posledica vsebnosti linalinaola in linalil acetata (Kwiatkowski idr., 2020). S tem smo videli, da se v eteričnih oljih nahajajo še druge snovi poleg karvakrola ali timola, ki na bakterije delujejo zaviralno.

Na koncu smo prišli do sklepov s katerimi lahko potrdimo oz. ovržemo na začetku postavljeni hipotezi:

Hipotezo 1: »Eterična olja z visoko vsebnostjo karvakrola (olje divjega origana in timijana) bodo imela večje inhibicijske cone kot eterična olja brez karvakrola (olja čajevca, evkalipta in sivke)« lahko potrdimo, saj so na izbrani koloniji bakterij naredila največje inhibicijske cone in kot tudi edina olja v našem poskusu so ustvarila inhibicijske cone ne le v 100 % koncentraciji, temveč tudi v redčitvah.

Hipotezo 2: »Z manjšanjem koncentracije eteričnih olj se bodo inhibicijske cone manjšale.« lahko prav tako potrdimo, saj so se inhibicijske cone (in s tem povezano antibakterijsko učinkovanje) z redčenjem drastično manjšale oz. jih v primeru sivke pri redčitvah sploh ni bilo.

V nadaljnjih raziskavah bi predlagali, da se test naredi na večjem številu različnih bakterij, ne le na 1 izolirani kulturi, saj bi tako pridobili širši vzorec testiranja. Prav tako bi bilo dobro, če bi bakterije identificirali ali jih vsaj pobarvali po Gramu, saj se od vrste bakterij razlikuje tudi njihova zgradba (npr. različna sestava celičnih sten), zaradi česar antibakterijske snovi tudi drugače vplivajo na posamezno vrsto.

Da bi lahko prišli do bolj konkretnih sklepov glede delovanja karvakrola, bi prav tako lahko vzeli več različnih eteričnih olj iste vrste (npr. origana) in jim s postopkom plinske kromatografije določili sestavo. Na ta način bi lahko celo grafično primerjali antibakterijsko delovanje eteričnih olj v odvisnosti od točnega deleža karvakrola, kot tudi preostalih snovi, ki bi potencialno lahko vplivale na antibakterijsko delovanje posameznih eteričnih olj.

Smiselno bi bilo primerjati tudi antibakterijsko delovanje eteričnih olj s karvakrolom in antibakterijsko delovanje antibiotikov, ki so trenutno v široki uporabi v medicini. Na ta način bi videli, ali morda eterična olja s karvakrolom delujejo bolje kot antibiotiki. Šele z razširjeno raziskavo bi lahko prišli do posplošenih in bolj verodostojnih sklepov o delovanju karvakrola na bakterije.

Vseh teh izboljšav kot že omenjeno nismo mogli narediti zaradi prostorske in materialne omejenosti, saj v šolskem laboratoriju nismo imeli vseh naprav, pripomočkov in materialov, ki bi jih potrebovali za nadgradnjo raziskave. Za to bi bilo potrebno sodelovanje z drugimi strokovnimi ustanovami, ki te pripomočke in materiale imajo (npr. Nacionalni inštitut za biologijo).

Kljub nekaterim omejitvam (še posebej prostorski in materialni pogoji) pa je naša raziskava prispevala k boljšemu razumevanju antibakterijskega delovanja eteričnih olj, predvsem tistih z vsebnostjo karvakrola. Takšna olja, kot tudi sam karvakrol, vključno s preostalimi snovmi v eteričnih oljih, ki delujejo antibakterijsko, imajo zagotovo potencial za nadaljnje raziskave, da jih v prihodnje »postavimo v boj« proti bakterijam.

7 LITERATURA IN VIRI

7.1 LITERATURA

- Belušič, G., Dolenc Koce, J., Turk, M., Vittori, M., Zalar, P. (2019). *Biologija 2, O zgradbi in delovanju organizmov: Učbenik za biologijo v gimnazijah in srednjih strokovnih šolah*. Ljubljana : Mladinska knjiga.
- Del Principe, S., Mondo, L. (2003). *Eterična olja: Arome zdravja*. Ljubljana : Pisanica : Delo revije.
- Dermastia, M., Komel, R., Turk T. (2011). *Kjer se življenje začne: Biologija celice in genetika za gimnazije*. Ljubljana : Rokus Klett.
- Dolinar, K (ur.). (1976). *Leksikon Cankarjeve založbe BIOLOGIJA*. Ljubljana : Cankarjeva založba.
- Glinšek Biškup, U., Jevšnik Virant, M. (2023). *Osnove mikrobiologije za študente laboratorijske biomedicine*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo. https://imi.si/wp-content/uploads/2023/04/Osnove-mikrobiologije-za-studente-LBM_za-CIP.pdf
- Kobal, S., Snoj, T. (2015). *Protibakterijska zdravila v veterinarski medicini*. Ljubljana : Iris, mednarodna trgovina, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani.
- Podobnik, A., Devetak, D., Novak, T. (2004). *Biologija, Učbenik za splošne gimnazije: Raznolikost živih bitij*. Ljubljana : DZS.
- Strušek, P., Škornik, S. in Vodnik, D. 2011. *Zgradba in delovanje organizmov: Učbenik za biologijo v programih gimnazijskega izobraževanja*. Ljubljana : DZS.

7.2 VIRI

- Bešter, E., Bučar-Miklavčič, M., Butinar, B., Čalija, D., Miklavčič Višnjevca, A., Valenčič, V., Volk, S. (2014). *ABC o oljčnem olju*. Znanstveno-raziskovalno središče Koper, Inštitut za oljkarstvo. <https://www.zrs-kp.si/wp-content/uploads/2023/11/ABC-o-oljcnem-olju-2014.pdf>
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Golet, I., Gruia, A. T., Horhat, F. G. (2014) *Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity*. J Med Life. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4391421/>

- Do, D., Nguyen, D., Tran, T., Nguyen, D. Q., Lai, N., Huynh, T., Do, V., Luu, X., Le, X. (2021). *Evaluation of antibacterial properties of some essential oils from Vietnam*. IOP Publishing. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/1166/1/012040/pdf>
- Gorenjske lekarne. (2015). *Čajevec*. <https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek/cajevec>
- Institut "Jožef Stefan". (b. d.). *Kemija v medicini: Mikroorganizmi v/na vsakodnevni predmetih in difuzijski antibiogram*. http://tehnologije.ijs.si/wp-content/uploads/2020/06/STEM4YouthKemijavMedicini_SI_final_mentorji.pdf
- Kemotíp. (2014). V Botanični terminološki slovar (2. dopolnjena in pregledana izdaja). <https://isjfr.zrcsazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik?iztocnica=kemotip>
- Kwiatkowski, P., Łopusiewicz, Ł., Kostek, M., Drożdowska, E., Pruss, A., Wojciuk, B., Sienkiewicz, M., Zielińska-Bliźniewska, H., Dołęgowska, B. (2020). The Antibacterial Activity of Lavender Essential Oil Alone and In Combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA Strains. *Molecules*, 25(1), 95. <https://doi.org/10.3390/molecules25010095>
- Mączka, W., Twardawska, M., Grabarczyk, M., Wińska, K. (2023). *Carvacrol-A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties*. Wrocław University of Environmental and Life Sciences. <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/5/824>
- Mollea, C., Bosco, F., Fissore, D. (2022). Agar Plate Methods for Assessing the Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils against *S. epidermidis* and *E. coli*. *Antibiotics*, 11(12), 1809. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121809>
- Morshedloo, M., Salami, S., Nazeri, V., Maggi, F., Craker, L. (2018). *Essential oil profile of oregano (Origanum vulgare L.) populations grown under similar soil and climate conditions*. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018302723?via%3Dihub#preview-section-cited-by>
- National Center for Biotechnology Information (2025). *PubChem Compound Summary for CID 10364, Carvacrol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvacrol>
- Nieto, G. (2017). *Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family*. University of Murcia. <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/63>

- Rak Namestnik, M.(b. d.). Eterična olja. Lekarne Maribor. <https://www.mblekarne.si/nasveti/koristno1/etericna-olja>
- Sakkas, H, Papadopoulou, C. (2016). *Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils*. University of Ioannina. <https://koreascience.kr/article/JAKO201713647762249.pdf>
- Satyral, P., Murray, B. L., McFeeters, R. L., Setzer, W. N. (2016). Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. University of Alabama in Huntsville . <https://doi.org/10.3390/foods5040070>
- Sharma, R. (2022). Kirby Bauer Disc Diffusion Method For Antibiotic Susceptibility Testing. Microbe notes. <https://microbenotes.com/kirby-bauer-disc-diffusion/>
- Suspénzija. (2014). V Slovar slovenskega knjižnega jezika (2. dopolnjena in deloma prenovljena izd.). <https://fran.si/iskanje?View=1&Query=suspénzija>
- Ultee, A. Kets, E. P. W., Smid, E. J. (1999). *Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus*. American Society for Microbiology. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.65.10.4606-4610.1999>