

GIMNAZIJA FRANCA MIKLOŠIČA LJUTOMER

PROTIMIKROBNO IN PROTIBIOFILMSKO DELOVANJE NARAVNIH SNOVI PROTI BAKTERIJAM *ESCHERICHIA COLI*

Raziskovalna naloga na področju biologije

Avtor: Jon Milič

Mentorica: dr. Marija Meznarič, prof. bio. in kem.

Somentorica: izr. prof. dr. Martina Oder, dipl. san. inž.

Ljutomer, januar 2025

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici dr. Mariji Meznarič za usmerjanje, dostopnost in pomoč pri pisanju.

Zahvala gre tudi somentorici izr. prof. dr. Martini Oder, za pomoč pri načrtovanju in izvedbi raziskovalnega dela ter pri pisanju raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujem za strokovno pomoč in predano znanje.

Hvala doc. dr. Romani Krištof in Suzani Košenina za pomoč pri laboratorijskem delu Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani in pri pripravi eksperimentalnega dela.

Nazadnje pa se zahvaljujem vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri mojem raziskovalnem delu.

POVZETEK

Ljudje smo dandanes vse bolj izpostavljeni mikroorganizmom, ki imajo različne vplive na naše zdravje. Zaradi vse večje uporabe antibiotikov, čistil in drugih sintetičnih snovi, prihaja do rezistence patogenih mikroorganizmov. To otežuje njihovo odstranjevanje, kar posledično lahko pripelje do vedno več bakterijskih obolenj. Zaradi tega smo se v raziskavi odločili proučiti alternative sodobnim čistilom. V raziskavi smo uporabili eterična olja. Ugotavljali smo učinkovitost eteričnih olj sivke, ingverja in smrekovih vršičkov pri odstranjevanju bakterije *Escherichia coli* in sposobnosti eteričnega olja sivke pri odstranjevanju biofilmov. Uporabili smo 100 % koncentracije vseh ekstraktov, pri eteričnih oljih sivke pa smo uporabljali tudi olja razredčena na 50 % in 25 %. Pri eteričnem olju sivke smo preverjali tudi učinkovitost teh olj pridobljenih iz rastlin leta 2022, 2023 in 2024. Na hranljivem mikrobiološkem gojišču smo najprej pripravili prekonočno kulturo bakterij *E. coli*, katero smo kasneje uporabljali v eksperimentalnem delu. Na gojišča smo nanašali diske, prepojene z eteričnimi olji in na podlagi inhibicijskih con ugotavljali protimikrobno učinkovitost posamezne snovi. V drugem delu poskusov, smo bakterije prenesli v mikrotitrske plošče, v katerih smo vzgojili biofilm, ki smo ga v naslednjih korakih tretirali z eteričnimi olji. Po izpostavitvi biofilma eteričnim oljem smo s čitalcem mikrotitrskih plošč izmerili optično gostoto barvila kristal vijolično, ki smo ga ekstrahirali iz prehodno obarvanih celic in ugotavljali učinkovitost olj pri odstranjevanju biofilmov. Za proučevana eterična olja, smo dokazali učinkovitost pri uničevanju *E. coli* in odstranjevanju biofilma. Na količino aktivnih snovi v rastlinah, lahko vplivajo tudi okoljski dejavniki, saj smo zaznali razlike med posameznimi eteričnimi oglji, glede na leto, ko so bile rastline nabrane.

Ključne besede: mikroorganizmi, *Escherichia coli*, antibiogram, biofilmi, eterična olja

ABSTRACT

Nowadays, people are increasingly exposed to microorganisms that have various effects on our health. Due to the increasing use of antibiotics, cleaning agents and other synthetic substances, pathogenic microorganisms are becoming resistant. This makes it difficult to remove them, which in turn can lead to more and more bacterial diseases. For this reason, we decided to study alternatives to modern cleaners in the research. Essential oils were used in the research. We determined the effectiveness of essential oils of lavender, ginger and spruce tops in removing Escherichia coli bacteria and the ability of lavender essential oil in removing biofilms. We used 100% concentration of all extracts, and for lavender essential oils we also used oils diluted to 50% and 25%. In the case of lavender essential oil, we also checked the effectiveness of these oils obtained from plants in 2022, 2023 and 2024. We first prepared an overnight culture of *E. coli* bacteria on a nutritious microbiological medium, which we later used in the experimental work. Discs soaked with essential oils were applied to the cultures and the antimicrobial effectiveness of each substance was determined based on the inhibition zones. In the second part of the experiments, we transferred the bacteria to microtiter plates, in which we grew a biofilm, which was treated with essential oils in the next steps. After exposing the biofilm to essential oils, we measured the optical density of the crystal violet dye, which was extracted from transiently colored cells, using a microtiter plate reader, and determined the effectiveness of the oils in removing biofilms. For the studied essential oils, we proved their effectiveness in destroying *E. coli* and removing biofilm. The amount of active substances in plants can also be influenced by environmental factors, as we detected differences between individual ethereal charcoals, depending on the year the plants were harvested.

Keywords: microorganisms, *Escherichia coli*, antibiogram, biofilms, essential oils

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 10

2 TEORETIČNA IZHODIŠČA 11

2.1 BAKTERIJE 11

2.2 ESCHERICHIA COLI 11

2.3 ETERIČNA OLJA 12

2.3.1 Pridobivanje eteričnih olj 13

2.4 SIVKA (*Lavandula sp.*) 14

2.4.1 Etereično olje sivke 14

2.5 INGVER (*Zingiber officinale*) 15

2.5.1 Eterično olje ingverja 15

2.6 SMREKOVI VRŠIČKI (*Picea abies*) 15

2.6.1 Eterično olje smrekovih vršičkov 16

2.7 BIOFILMI 16

3 NAMEN, CILJI in HIPOTEZE 18

3.1 NAMEN 18

3.2 CILJI 18

3.3 HIPOTEZE 18

4 MATERIALI IN METODE DELA 19

4.1 MATERIALI in PRIPOMOČKI 19

4.1.1 Oprema 20

4.2 METODE DELA 21

4.2.1 Parna destilacija 21

4.2.2 Testne bakterije 22

4.2.3 Priprava hranilnega agarja in ENDO agarja 22

4.2.4 Priprava bakterijskih kultur 23

4.2.5 Redčenje eteričnih olj 23

4.2.6 Priprava mikrotitrskih plošč 23

4.2.7 Protimikrobno delovanje eteričnih olj (antibiogram) 24

4.2.8 Odstranjevanje biofilma z eteričnimi olji 24

5 REZULTATI *28*

5.1 REZULTATI PROTIMIKORBNEGA DELOVANJA ETERIČNIH OLJ **28**

5.1.1 Primerjava učinkovin eteričnih olj s pozitivnimi kontrolami 30

5.2 REZULTATI ODSTRANJEVANJA BIOFILMA Z ETERIČNIMI OLJI **31**

6 RAZPRAVA *33*

6.1 RAZPRAVA REZULTATOV ANTIBIOGRAMA **33**

6.2 REZULTATI MERJENJA OPTIČNE GOSTOTE PRI ODSTRANJEVANJU BIOFILMOV **34**

7 ZAKLJUČKI *35*

7.1 SKLEPI **36**

8 SEZNAM LITERATURE *37*

8.1 VIRI SLIK **40**

KAZALO SLIK

Slika 1: *Escherichia coli* (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 12
Slika 2: Naprava za parno destilacijo (Witeg) (vir: Milič, 2024). 13
Slika 3: Sivka (*Lavandula* sp.) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 14
Slika 4: Korenika ingverja (*Zingiber officinale*) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 15
Slika 5: Smrekovi vršički (*Picea abies*) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 16
Slika 6: Proces nastajanja biofilmov (vir: Liu et al., 2024). 17
Slika 7: Eterična olja sivke (vir: Milič, 2024). 20
Slika 8: Sistem za parno destilacijo (Witeg) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 21
Slika 9 in 10: Sterilizirani materiali in aparatura za sterilizacijo NC 40M® (NUVE) (vir: Milič, 2024). 22
Slika 11: 24 mestna mikrotitrska plošča (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate). 23
Slika 12 in 13: Petrijevke z nanešeno bakterijamisko suspenzijo (levo) in petrijevke z diski, prepojenimi z eteričnimi olji (desno)(vir: Milič, 2024). 24
Slika 14: Tretirana mikrotitrska plošča s 24 utori z obarvanimi biofilmi (zgornji dve vrstici) (vir: Milič, 2024). 26
Slika 15: Mikrotitrska plošča s 96 utori in prenesenimi vsebinami iz mikrotitrske plošče s 24 utori (vir: Milič, 2024). 26
Slika 16: Čitalec mikrotitrskih plošč Infinite 200^® PRO (Tecan) (vir: Milič, 2024). 26
Slika 17: Izpis računalniškega program za merjenje optične gostote (vir: Milič, 2024). 27
Slika 18: Inhibicijske cone 100 % koncentracije eteričnega olja sivke letnika 2023 (vir: Milič, 2024). 30
Slika 19: Inhibicijske cone 100 % koncentracije eteričnih olj smrekovih vršičkov in ingverja letnika 2024 (vir: Milič, 2024). 30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Prikaz vsebin utorčkov 24 mestne mikrotitrske plošče.....25
Tabela 2: Prikaz rezultatov antibiograma, premer inhibicijskih con v cm. 29
Tabela 3: Vpliv eteričnega olja sivke v različnih koncentracijah na odstranjevanje biofilma E. coli. 31

SEZNAM KRATIC in OKRAJŠAV

EHEC Enterohemoragičen sev *Escherichia coli*

EIEC Enteroinvazivni sev *Escherichia coli*

EPEC Enteropatogeni sev *Escherichia coli*

ETEC Enterotiksigeni sev *Escherichia coli*

e.o. Eterično olje

E. coli *Escherichia coli*

PBS Fosfatni pufer (ang. Phospate-Buffered Saline)

1 UVOD

Mikroorganizmi ali mikrobi so organizmi, katerih ni možno videti s prostim očesom. Večina jih je za človeka nenevarna in s človekom živi v sožitju. Izjema so patogeni mikroorganizmi, kateri človeku lahko povzročajo bolezni s sproščanjem toksinov v medcelično in posledično v gostiteljsko celico. Te delimo v pet glavnih skupin: bakterije, virusi, glivice, praživali in helminti (Bartlett, 2020). Bakterije se razmnožujejo zelo hitro in intenzivno z nespolnim procesom cepitve oz. delitve. Poleg tega pa s procesom konjugacije izmenjujejo plazmide z okoliškimi bakterijami in s tem povečajo gensko pestrost v populaciji. Z razvojem medicine in tehnologije se je začelo podcenjevanje mikrobov, kar jim je posledično pomagalo pri razvijanju in širjenju. Ena izmed prilagoditev, katere so dosegli mikroorganizmi je tvorba biofilmov. Ti so razlog za veliko bakterijskih okužb. Težave povzročajo v medicini, farmaciji in drugih panogah kot na primer v živilski industriji. Pogosto so razlog za navzkrižne kontaminacije. V zadnjih nekaj letih prihaja tudi do odpornosti bakterijskih sevov na antibiotike in razkužila (Kranjc, 2021).

2 TEORETIČNA IZHODIŠČA

2.1 BAKTERIJE

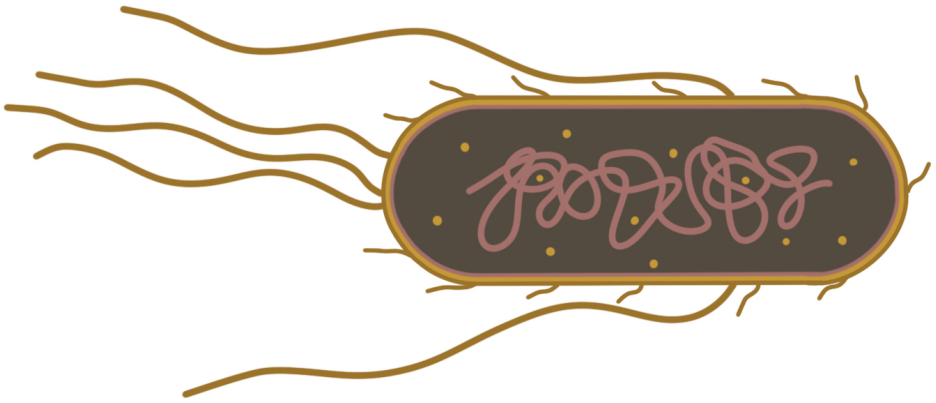
Bakterije so prokariontske celice. To je bila prva vrsta celic, ki se je pojavil na Zemlji ob pojavu življenja. Pojavile naj bi se že pred več kot 3,9 milijardami let (Vilhar et al., 2019).
Bakterije so po velikosti podobne arhejam. Merijo od 0,5 μm do 2 μm. Poznamo tudi manjše in večje bakterije. Primer velike bakterije je žveplova bakterija (*Thiomargarita namibiensis*), kar je največja odkrita bakterija na Zemlji in je velika od 100 do 750 μm. Za razliko od večine drugih prokariontov jo lahko opazujemo s prostim očesom. Bakterije najdemo v različnih oblikah. Najenostavnejše oblike so koki (okrogle), bacili (paličaste) in svedraste ter spiralne, pojavljajo pa se tudi bakterije v drugih oblikah z različnimi izrastki (Belušič et al., 2019).

2.2 ESCHERICHIA COLI

E. coli spada v družino *Enterobacteriaceae* in je prevladujoča bakterija v črevesni flori. Večina sevov je nepatogenih, nekaj pa je tudi takšnih (patogenih), ki lahko povzročijo bolezen. Zaradi mutacij, pa so nekateri sevi pridobili sposobnost povzročanja prebavnih, sečnih in tudi nevroloških bolezni. Zaradi tega je *E. coli* eden izmed vodilnih povzročiteljev različnih vrst diareje po celem svetu (Nataro et al., 1998). Bakterije, ki predstavljajo vrsto *E. coli* lahko delimo v več različnih sevov, kot so enterotoksigeni sevi (ETEC), ki proizvajajo toksine iz toplotno labilnih in toplotno stabilnih enterotoksinov. Poznamo tudi enteropatogeni sev *E. coli* (EPEC), ki proizvaja citotoksine in se oprijema črevesnih celic in s tem moti transport elektrolitov. V skupino patogenih sevov štejemo enteroinvazivni sev (EIEC) in najkasneje odkrit enterohemoragičen sev (EHEC). Okužba človeka z *E. coli* pogosteje kot iz živalskih virov izvira iz sočloveka, saj imajo živalske vrste druge seve bakterije kot ljudje. Pogosto do okužb pride preko kontaminiranega mesa ali sirov, za diarejične okužbe pa je najpogostejši vzrok pitna voda, ki je fekalno onesnažena (Olsvik et al., 1991). Zato za *E. coli* tudi pravimo, da je pokazatelj fekalnega onesnaženja, ki je lahko človeškega ali živalskega izvora (Boelee et al., 2019).

E. coli ima paličasto obliko in je dolga približno od 1-3μm, široka od 0,25 do 1μm in ima celičen volumen v razponu 0.6–0.7 μm^3 , kar je približno enake velikosti kot mitohondrij (Reshes et al., 2007). Bakterija ima fosfolipidni dvosloj oz. celično membrano, ki obdaja in izolira citoplazmo. Za oporo in obrambo pred zunanjostjo ima celica tudi celično steno iz peptidoglikana. Na zunanji membrani celične stene so prisotni tudi lipopolisaharidi, ki imajo lahko ključni pomen za patogenost patogenih sevov. Bakterija nima pravega jedra, namesto tega ima en krožni kromosom, ki se nahaja v

citoplazmi. *E. coli* se premika s pomočjo bičkov (Slika 1), katere premika in vrti, da se odmakne od nevarnih dejavnikov ali pa se približa ugodnemu okolju. Celica ima na zunanjosti kratke lasaste tvorbe imenovane pili. Ti služijo procesu konjugacije, pri katerem pride do prenosa plazmidov, ki so presežne molekule DNA, med organizmi in posledično do nastanka rezistentnih bakterij. Prav tako pa so lahko uporabni za pritrjevanje na površine (Achuth, 2024).



Slika 1: Escherichia coli (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

2.3 ETERIČNA OLJA

Eterična olja se že od srednjega veka uporabljajo v baktericidne, medicinske, kozmetične in sanitarne namene. Najpogosteje se pridobivajo s postopkom destilacije. Dokazano je, da imajo lahko pozitivne učinke na živa bitja in na celice posameznih organizmov (Bakkali et al., 2008). Eterična olja pa so uporabna tudi za odstranjevanje bakterij in upočasnitev njihovega razmnoževanja. V te namene se uporabljajo vse pogosteje, zaradi odpornosti bakterij na kemikalije in zdravila. Bakterije na eterična olja rezistence še niso razvile ali pa je niso razvile v tako veliki meri kot na čistila in razkužila, saj se v antibakterijske namene uporabljajo le kratek čas, njihova uporaba pa ni prekomerna kot pri večini čistil, razkužil in antibiotikov. Rastline eterična olja v naravi proizvajajo za svojo korist, človek pa jih pridobiva in uporablja na področjih, kjer je to potrebno oz. možno (Nazzaro et al., 2013).

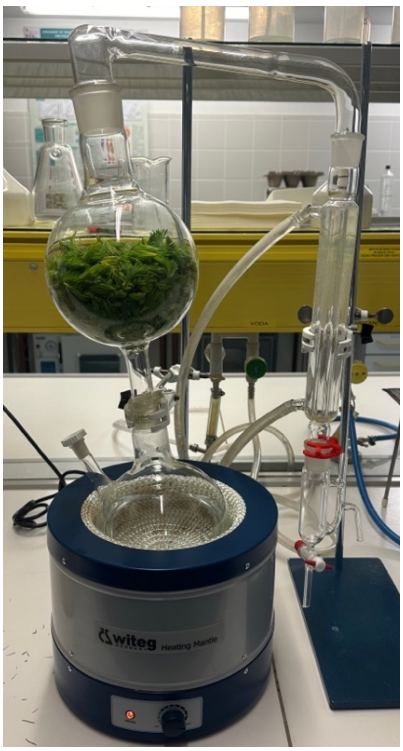
Eterična olja so specifične kombinacije hlapnih spojin, katere proizvajajo rastline. Pridobivamo jih s stiskanjem ali z destilacijo. Že pred leti so poznali več kot 3000 različnih eteričnih olj, okoli 300 jih je komercializiranih in se uporabljajo v kozmetičnih, živilskih, farmacevtskih in drugih industrijah (Zuzarte et al., 2015).

2.3.1 Pridobivanje eteričnih olj

Za pridobivanje eteričnih olj uporabljamo številne stare in nove metode. Kljub modernizaciji so starejše tehnike še vedno v uporabi predvsem zaradi cenejšega postopka ekstrakcije željenih snovi. Med klasične metode štejemo hladno stiskanje, destilacijo, ekstrakcijo s topilom… Izbira tehnike je odvisna tudi od vrste rastlinskega materiala (Freitas et al., 2023). Zaradi vse večje industrializacije eteričnih olj, so stare metode ponekod postale prepočasne, zato se za industrijske namene uporabljajo inovativne metode ekstrakcije. To so ultrazvočna, impulzna električno podprta in superkritična tekočinska ekstrakcija ter s pomočjo ohmsko podprte tehnologije (Huo et al., 2024).

2.3.1.1 Parna destilacija

Parna destilacija je najpogostejši način ekstrahirana eteričnih olj in predstavlja približno 93 % vsega pridobivanja le teh. Ta vrsta destilacije je okolju prijazna, varna in enostavna. Njena večja pomanjkljivost pa je predvsem dolgotrajnost procesa. Na Sliki 2 je naprava za parno destilacijo (Witeg). Destilacija poteka tako, da grelna posoda segreje vodo, ki se spremeni v paro. Ta para se povzdigne skozi bučko, v kateri je rastlinski material. Vodni hlapi, nato iz rastlin izvzamejo naravne snovi in jih odnesejo do hladilnika, kjer se para ob stiku s hladno površino spremeni nazaj v tekoče stanje. Nato se v zbiralnem nastavku ločijo eterična olja in hidrolat, ki je stranski produkt parne destilacije (Nour et al., 2024).



Slika 2: Naprava za parno destilacijo (Witeg) (vir: Milič, 2024).

2.4 SIVKA (*Lavandula sp.*)

Sivka, (Slika 3) spada v družino *Lamiaceae* - ustnatice in nato po sistematski razdelitvi družine med *Ocimoideae*. Najdemo jo po celem svetu. Glavne pridelovalke sivke so Bolgarija, Francija in Kitajska. Uporablja se na področju medicine kot antibiotik in antioksidant, za zmanjševanje in odpravljanje stresa, za zdravljenje glavobolov in živčnosti… Prav tako pa ima pomembno vlogo tudi v kozmetični in živilski industriji. Sivko pogosto najdemo na vrtovih ljudi, v parkih in tudi drugje kot okrasno rastlino. Pogosto je zasajena v mediteranskih obmorskih kampih, saj oddaja prijetne vonjave, naj pa bi preganjala tudi komarje. Najdemo jo tudi v omarah, saj obleke prepoji z vonjem sivke, poleg tega pa odganja molje. Zaradi tega je sivka ena izmed najbolj uporabljenih rastlin na številnih področjih kot so kozmetična industrija, turizem in tudi medicina (Salahudin et al., 2023).



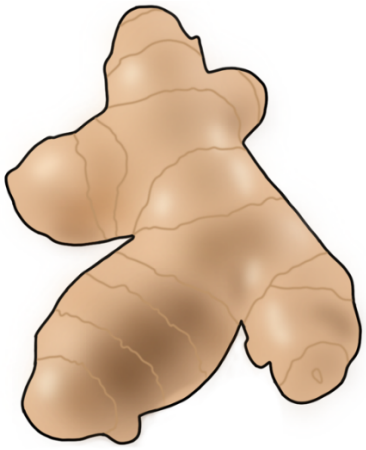
Slika 3: Sivka (Lavandula sp.) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

2.4.1 Etereično olje sivke

Eterično olje sivke se uporablja kot samostojen produkt ali kot dodatek številnim zdravilom in kozmetičnim produktom. Izdelki iz sivke se uporabljajo že stoletja, eterična olja pa imajo tudi protibakterijske učinke. Ta naj bi imela tudi pomirjevalne in antidepresivne učinke. Zaradi tega se ti produkti uporabljajo po celem svetu (Cavanagh et al., 2005).

2.5 INGVER (*Zingiber officinale*)

Ingver je zelnata tropska trajnica iz družine *Zingiberaceae*. Uporablja se v obliki olj, v prahu, svež, konzerviran… Pogosto ga najdemo v živilski industriji in tudi v medicini (Vasala, 2012). Uporablja se predvsem ingverjeva korenika (Slika 4). Ta ima številne zdravilne učinke kot so preprečevanje slabosti, bruhanja in vrtoglavice, prav tako pa pomaga pri težavah s črevesjem (Langner et al., 1998).



Slika 4: Korenika ingverja (Zingiber officinale) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

2.5.1 Eterično olje ingverja

Ingverjevo eterično olje ima številne zdravilne učinke. Že v preteklosti so ga uporabljali na Kitajskem in tudi v drugih Azijskih državah. Danes se zaradi večjih potreb na trgu, goji že po celem svetu. Pridobivamo ga iz suhe ali sveže korenike ingverja (Munda et al., 2018).

Eterično olje ima številne terapevtske in analgetične učinke. Prav tako pa se uporablja tudi v medicini. Raziskave pa so pokazale, da bi naj 5% raztopina eteričnega olja krepko zmanjšala pooperativne slabosti in bruhanja (Geiger, 2005).

2.6 SMREKOVI VRŠIČKI (*Picea abies*)

Smrekovi vršički (Slika 5), so del navadne smreke (*Picea abies*). Rastejo kot podaljšek na koncu veje, v času rasti drevesa, spomladi. Navadna smreka, je ena najpogostejših iglavcev v Evropi. Veliko vrednost predstavljajo predvsem lesni izdelki iz masivnega smrekovega lesa. Smrekovi vršički se uporabljajo v medu, čajih in tudi v obliki drugih napitkov (Jansson et al., 2013).



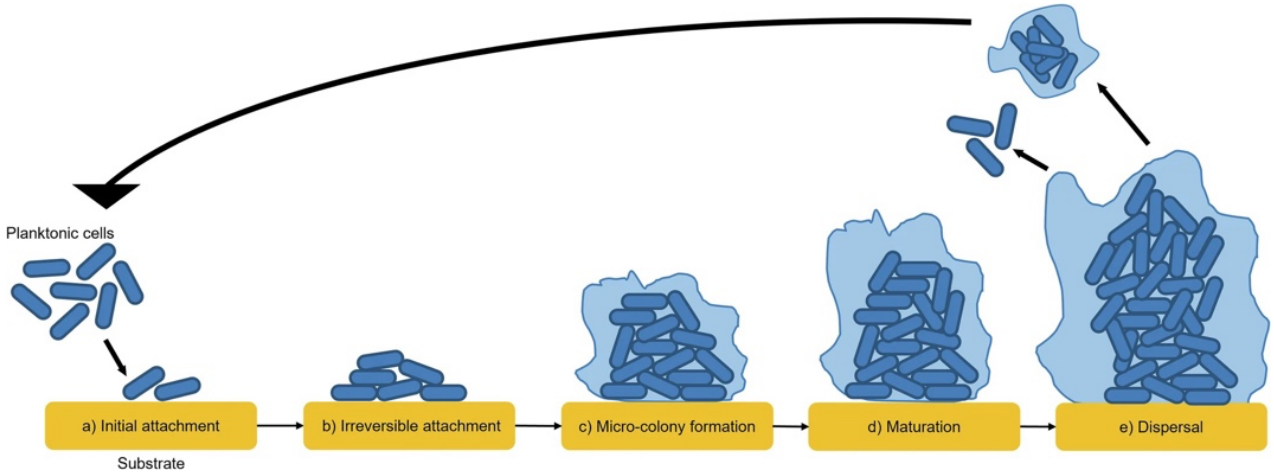
Slika 5: Smrekovi vršički (Picea abies) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

2.6.1 Eterično olje smrekovih vršičkov

Eterično olje iz smrekovih vršičkov se pridobiva s postopkom parne destilacije. To olje ima izjemne antioksidativne lastnosti. Prav tako, ima tudi močno protimikrobno delovanje. Zaradi se lahko uporablja kot naravno protimkrobno sredstvo (Zeng et al., 2012).

2.7 BIOFILMI

Biofilm je skupek celic pritrjenih na podlago. Nastane s tvorjenjem tanke plasti iz vode, organskih snovi in mikroorganizmov. Zaradi tega imajo biofilmi ključno vlogo pri varovanju bakterij in pri njihovem pritrjevanju na podlago. Ker prisotnost biofilmov predstavlja nevarnosti v različnih industrijah, jih je potrebno odstraniti oz. preprečiti njihov nastanek. Za to uporabljamo spojine z biocidnim učinkom, a so te v veliki večini slabo učinkovite. Zaradi tega, so se začele uporabljati druge snovi, kot so eterična olja (Dabič, 2022). Tvorba biofilma poteka v petih fazah (Slika 6). Prva stopnja nastanka je pritrditev plavajočih bakterijskih celic na površino. V drugi fazi so celice šibko pritrjene, nato se formirajo mikro kolonije pri tem pa jim pomagajo bakterijski izrastki, kot so bički, pili, flagele in fimbrije. Bakterije se razmnožujejo in tvorijo mikrokolonije ter pričnejo s tvorbo ekstracelularnih polimernih substanc. Biofilmski matriks obda bakterije in ovira delovanje protimikrobnih snovi. Biofilm na ta način raste ter zori. Včasih se zaradi zunanjih vplivov del biofilma odlušči in mikroorganizmi se lahko sprostijo v okolje kot planktonske celice (Tuon et al., 2023; Liu et. al, 2024).



Slika 6: Proces nastajanja biofilmov (vir: Liu et al., 2024).

3 NAMEN, CILJI in HIPOTEZE

3.1 NAMEN

Namen raziskovalne naloge je bil ovrednotiti potencial eteričnega olja sivke, ingverja in smrekovih vršičkov za uničenje oz. znižanje števila *E. coli* ter raziskati učinkovitost eteričnih olj sivke za odstranjevanje biofilmov iz površin. Z rezultati želimo odkriti najprimernejše alternative sodobnim čistilom in razkužilom, na katera imajo današnje bakterije vse večjo odpornost.

3.2 CILJI

Cilji raziskovalnega dela so bili:

- Ugotoviti, kateri izmed izbranih ekstraktov eteričnih olj (sivka, ingver, smrekovi vršički) je najučinkovitejši pri odstranjevanju *E. coli*.
- Ugotoviti razlike v učinkovitosti odstranjevanja oz. znižanja števila *E. coli* med različnimi generacijami (2022, 2023, 2024) in različnimi koncentracijami (100 %, 50 %, 25 %) eteričnega olja sivke.
- Ovrednotiti in primerjati sposobnosti odstranjevanja biofilmov z ekstrakti sivke različnih generacij (2022, 2023, 2024) in različnih koncentracij (50 %, 25 %).

3.3 HIPOTEZE

H1: Izbrana eterična olja imajo antibakterijske lastnosti in so učinkovita pri odstranjevanju *E. coli*.
H2: Eterična olja višjih koncentracij, bodo bolj učinkovita pri odstranjevanju *E. coli* kot razredčena eterična olja.
H3: Med različnimi generacijami eteričnega olja sivke bodo opazne razlike v učinkovitosti.
H4: Eterična olja sivke so primerna za odstranjevanje biofilmov iz površin.

4 MATERIALI IN METODE DELA

V okviru raziskave smo uporabljali tri različne generacije (rastline nabrane leta 2022, 2023, 2024) in tri različne koncentracije (100 %, 50 %, 25 %) eteričnega olja sivke (*Lavandula sp.*) (Slika 7), eterično olje ingverja (*Zingiber officinale*) in smrekovih vršičkov (*Picea abies*), za ugotavljanje antimikrobnega delovanja zoper *E. coli.* V drugem delu raziskave smo ugotavljali učinkovitost ekstrakta sivke pri odstranjevanju biofilmov. Uporabili smo 50 % in 25 % koncentracijo eteričnega olja, generacij 2022, 2023, 2024.

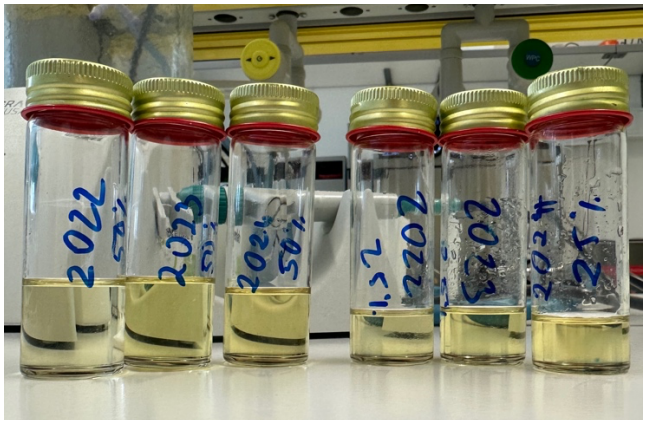
Praktični del raziskovanja je potekal od junija 2024 do septembra 2024. Eksperimente smo izvajali v laboratoriju Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani. Eterična olja smrekovih vršičkov in ingverja smo izdelali sami, eterična olja sivke smo pridobili iz zbirke eteričnih olj Zdravstvene fakultete.

4.1 MATERIALI in PRIPOMOČKI

V raziskavi smo uporabili naslednji material:

- Standardni sev bakterije *E. coli* ATCC 35218,
- eterično olje sivke-generacija 2022, 100 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2023, 100 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2024, 100 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2022, 50 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2023, 50 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2024, 50 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2022, 25 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2023, 25 % koncentracija,
- eterično olje sivke-generacija 2024, 25 % koncentracija,
- eterično olje ingverja-generacija 2024, 100 % koncentracija,
- eterično olje smrekovih vršičkov-generacija 2024, 100 % koncentracija,
- Tween 80,
- antibiotik Cefoxitin (pozitivna kontrola 1),
- vodikov peroksid (H_2O_2, pozitivna kontrola 2),
- fiziološka raztopina (negativna kontrola),
- ENDO agar,
- fosfatni pufer (PBS),

- destilirano vodo (d.$H_2$0),
- navadni bujon,
- barvilo kristal vijolično,
- etanol (C_2H_5OH),
- hranilno mikrobiološko gojišče (navadni agar),
- petrijevke,
- epruvete,
- mikrotitrske plošče (s 24 in 96 odprtinami),
- avtomatske pipete,
- nastavki za pipete,
- cepilno zanko,
- celulozne diske,
- in drugi drobni material.



Slika 7: Eterična olja sivke (vir: Milič, 2024).

4.1.1 Oprema

- Inkubator (Memmert),
- aspiracijski sistem oz. vakuumska črpalka (Integra Vacusafe),
- čitalec mikrotitrskih plošč Infinite 200® PRO (Tecan),
- sterilizator NC 40M® (NUVE),
- laboratorijska tehtnica,
- laboratorijski gorilnik,
- parni destilator (Witeg).

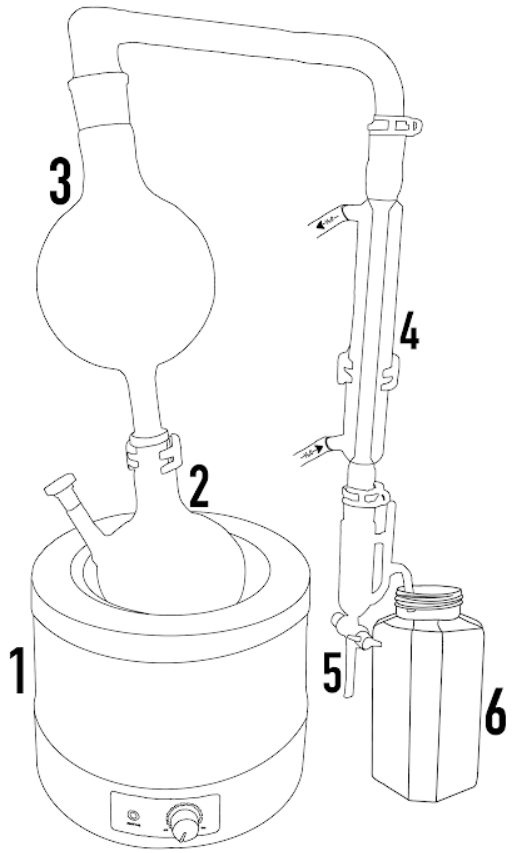
4.2 METODE DELA

4.2.1 Parna destilacija

Za namen pridobitve eteričnih olj smo uporabili parni destilator Witeg. Sami smo pridobili eterično olje smrekovih vršičkov in ingverja. Smrekove vršičke smo nabrali in takoj naslednji dan izvedli parno destilacijo s svežimi vršički. Korenine ingverja smo kupili in jih očistili, zmleli ter za ekstrakcijo uporabili grobo mleti ingver.

Skica parnega destilatorja je prikazana na Sliki 8.

V bučko (2) smo nalili destilirano vodo. To vodo je segrela grelna posoda (1). Ko je voda začela vreti in se spreminjati v paro, se je dvignila v bučko (3), kjer se je nahajal naravni material (smrekovi vršički, ingver). Voda je iz rastlin ekstrahirala snovi in jih ponesla do hladilnika (4). Para v hladilniku kondenzira nazaj v tekočino. V zbiralniku (5) se je nabralo eterično olje, v posodici (6) pa stranski produkt hidrolat.



Slika 8: Sistem za parno destilacijo (Witeg) (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

4.2.2 Testne bakterije

Pri raziskavi smo uporabili standardni sev bakterije *E. coli* ATCC 35218, pridobljene iz banke mikroorganizmov Brno, Češka, ki je bil shranjen v zbirki mikroorganizmov Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani.

4.2.3 Priprava hranilnega agarja in ENDO agarja

V 250 mL stekleničko smo dodali 4,6 g že prej odtehtanega hranilnega agarja v prahu in dodali 200 mL destilirane vode. V drugi steklenički smo zmešali 4 g ENDO agarja in 100 mL destilirane vode. Vse skupaj smo pretresli in raztopili. Raztopina navadnega agarja je bila rumene barve, raztopina ENDO agarja pa roza barve. ENDO agar smo uporabili kot selektivno gojišče za *E. coli,* na hranilnem agarju smo naredili antibiogram oz. test občutljivosti *E. coli*. Ko smo končali z mešanjem, smo stekleničke priprli in na njih nalepili indikatorski trak. Nato smo vse skupaj postavili v sterilizator NC 40$M^{®}$ (NUVE), ki ga prikazuje Slika 10. Po končani sterilizaciji indikatorski trak dobi črno obarvane črte, ko je sterilizacija končana oz. če je bila sterilizacija uspešna (Slika 9).
Sterilizacija je potekala 15 minut pri 121°C. Po sterilizacij smo dobili gojišča brez mikroorganizmov in spor. Nato smo agar še v tekoči obliki prelili v petrijevke in s tem pripravili gojišča za nadaljevanje eksperimentalnega dela.



Slika 9 in 10: Sterilizirani materiali in aparatura za sterilizacijo NC 40M® (NUVE) (vir: Milič, 2024).

4.2.4 Priprava bakterijskih kultur

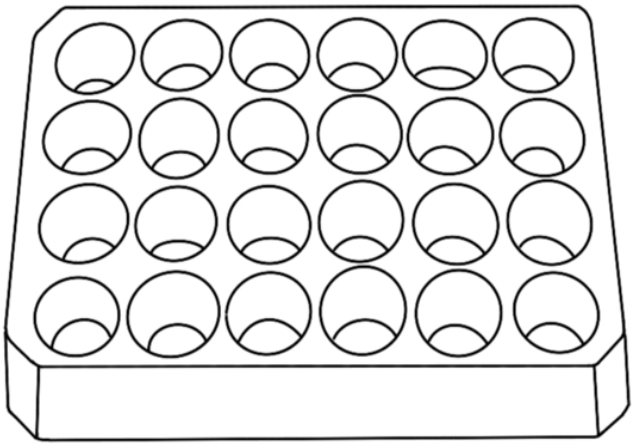
En dan pred izvedbo poskusa, smo v epruveto z navadnim bujonom, s pomočjo cepilne zanke prenesli bakterijske kolonije *E. coli* in čez noč inkubirali pri temperaturi 37 °C. Tako smo dobili t.i. prekonočno kulturo. Naslednji dan smo 500 µL prekonočne kulture prenesli v 50 mL navadnega bujona in tako dobili suspenzijo bakterijskih celic, ki smo jo s sterilnim brisom nanesli na gojišče v petrijevki s hranilnim agarjem.

4.2.5 Redčenje eteričnih olj

Ker so eterična olja netopna v vodi, smo za redčenje uporabili Tween 80. Ta je bil uporabljen kot emulgator. Za redčenje eteričnih olj sivke smo dodali Tween 80 v razmerju 1:1. Uporabili smo 10 mL eteričnega olja sivke vsake generacije in 10 mL emulgatorja. Tako smo dobili 50 % koncentracijo ekstrakta. Za pridobivanje 25 % koncentracije, smo že razredčeni snovi ponovno dodali emulgator v enakem razmerju in v enaki količini kot je bil uporabljen za pridobivanje prve razredčine.

4.2.6 Priprava mikrotitrskih plošč

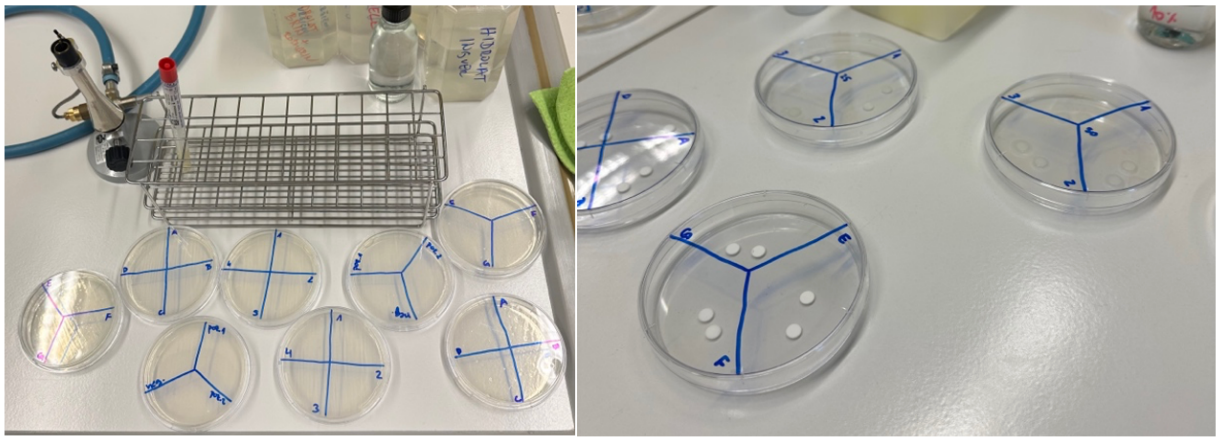
Mikrotitrske plošče smo uporabili v poskusih, s katerimi smo preverjali učinkovitost eteričnih olj pri odstranjevanju biofilma iz površin. V mikrotitrsko ploščo s 24 odprtinami (Slika 11) smo v utorčke v prvih treh vrstah dodali 0,5 mL navadnega bujna in enako količino prekonočne bakterijske kulture *E. coli*. Zadnja vrsta je bila kontrolna, zato ni imela bakterij. Nato smo ploščo dali v inkubator na temperaturo 37 °C za 1 uro. V utorih, kjer je bila dodana bakterijska kultura, se je v eni uri ustvaril biofilm.



Slika 11: 24 mestna mikrotitrska plošča (vir: Milič, 2024; slika je bila izdelana s pomočjo programskega orodja Procreate).

4.2.7 Protimikrobno delovanje eteričnih olj (antibiogram)

Za ugotavljanje protimikrobnega delovanja eteričnih olj smo uporabili gojišča z nanešeno bakterijsko kulturo *E. coli* (priprava je opisana v poglavju 4.2.4). Vsako petrijevko smo razdelili na 3 ali 4 dele (Sliki 12 in 13). Nato smo v vsako tretjino oz. četrtino namestili disk prepojen z eteričnim oljem. Diske smo pripravili tako, da smo s pipeto na vsak disk dodali po 20 µL eteričnega olja in počakali, da se je eterično olje vpilo v disk. Na gojišče v prvi petrijevki smo namestili diske z različnimi koncentracijami eteričnega olja sivke generacije 2022, na drugo tri koncentracije eteričnega olja sivke iz leta 2023 na tretjo pa eterična olja sivke iz leta 2024. V petrijevke razdeljene na četrtine smo nanesli po dva diska z eteričnim oljem ingverja in po dva diska prepojena z oljem smrekovih vršičkov. V zadnjo petrijevko pa smo namestili dve pozitivni in eno negativno kontrolo. Pozitivna kontrola 1 je bila antibiotik Cefoxitin (30 µg), druga pozitivna kontrola 2 je bil vodikov peroksid (10 % koncentracija), negativna kontrola pa je bila fiziološka raztopina. Pri pozitivnih kontrolah smo morali dobiti veliko inhibicijsko cono, pri negativni pa te ni smelo biti. Poskus smo ponovili trikrat. Prikazal nam je protimikrobno delovanje eteričnih olj proti bakteriji *E. coli*.



Slika 12 in 13: Petrijevke z nanešeno bakterijamisko suspenzijo (levo) in petrijevke z diski, prepojenimi z eteričnimi olji (desno)(vir: Milič, 2024).

4.2.8 Odstranjevanje biofilma z eteričnimi olji

Za preverjanje učinkovitosti eteričnih olj pri odstranjevanju biofilmov smo uporabili pripravljene mikrotitrske plošče iz poglavja 3.2.6. Izbrali smo eterična olja sivke iz let 2022, 2023, 2024 v dveh koncentracijah (50 % in 25 %). Uporabili smo mikrotitrsko ploščo, v kateri je bil predhodno ustvarjen biofilm. Bakterije so bile prisotne le v prvih treh vrstah plošče (Tabela 1, vrstice A, B, C). Sprva smo vsebino vsakega utorčka (bakterijsko suspenzijo) previdno izsesali s pomočjo vakuumske

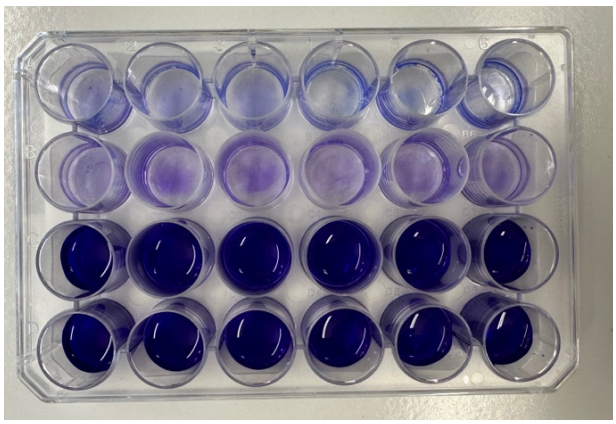
črpalke (Integra Vacusafe), da nismo poškodovali biofilma. Nato smo v vsako odprtino odpipetirali 500 µL fosfatnega pufra (PBS), s katerim smo odstranili nepritrjene celice. Za tem smo PBS izsesali. Nato smo v vsak utorček dodali 500 µL eteričnega olja, z namenom, da preverimo, ali bo olje odstranilo ustvarjen biofilm. Eterično olje smo pustili delovati 10 minut. Po desetih minutah smo eterično olje izsesali in ponovno dodali 500 µL PBS, da smo eterično olje res odstranili. V vsak utor smo dodali po 500 µL barvila kristal vijolično, ki smo ga pustili delovati 5 minut. Barvilo je obarvalo bakterijske celice, ki so bile na podlagi (Slika 14). Za tem smo barvilo odsesali, dodali PBS (500 µL) in izsesali tudi tega. Na koncu smo v vsak utor dodali še 500 µL etanola (96 %) za 2 minuti. Z dodanim etanolom smo ekstrahirali barvilo iz celic.

Iz vsakega utora na 24 mestni mikrotitrski plošči, smo prenesli po 200 µL etanola z barvilom kristal vijolično v utore na 96 mestni mikrotitski plošči (Slika 15). To smo položili v čitalec mikrotitrskih plošč 200® PRO (Tecan) (Slika 16). S pomočjo računalniškega programa smo označili ustrezne parametre in postopke, ki jih naj aparat naredi pred meritvami (Slika 17). Postopek se je začel s pet sekundnim orbitalnim tresenjem (aparatura je vzorec vrtela v krožni obliki). Nato je aparatura v vsaki odprtini pomerila optično gostoto pri 620 nm valovne dolžine in to po štiri meritve na odprtino. Program nam je po koncu meritev izračunal povprečno vrednost za te štiri meritve v posamezni odprtini in izpisal rezultate optične gostote za vse vzorce.

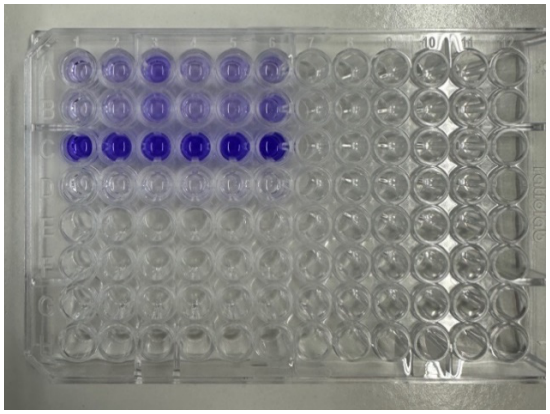
Tabela 1: Prikaz vsebin utorčkov 24 mestne mikrotitrske plošče.

	1	2	3	4	5	6
A	Bakterije + e.o. sivke (2022/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2023/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2024/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2022/25 %)	Bakterije + e.o. sivke (2023/25 %)	Bakterije + e.o. sivke (2024/25 %)
B	Bakterije + e.o. sivke (2022/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2023/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2024/50 %)	Bakterije + e.o. sivke (2022/25 %)	Bakterije + e.o. sivke (2023/25 %)	Bakterije + e.o. sivke (2024/25 %)
C	Kontrola: bakterije brez olja	Kontrola: bakterije brez olja	Kontrola: bakterije brez olja	Kontrola: bakterije brez olja	Kontrola: bakterije brez olja	Kontrola: bakterije brez olja
D	Kontrola brez bakterij	Kontrola brez bakterij	Kontrola brez bakterij	Kontrola brez bakterij	Kontrola brez bakterij	Kontrola brez bakterij

Legenda: e.o. = eterično olje, (2022/50) = letnik eteričnega olja/koncentracija eteričnega olja



Slika 14: Tretirana mikrotitrska plošča s 24 utori z obarvanimi biofilmi (zgornji dve vrstici) (vir: Milič, 2024).

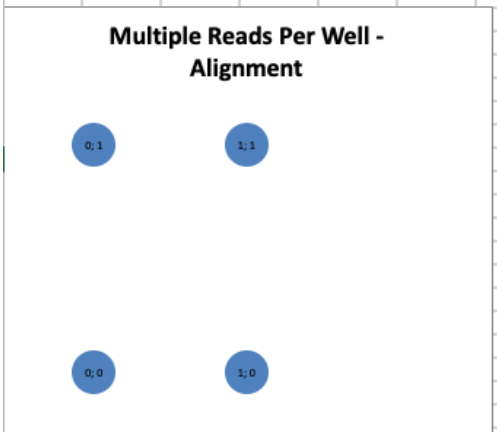


Slika 15: Mikrotitrska plošča s 96 utori in prenesenimi vsebinami iz mikrotitrske plošče s 24 utori (vir: Milič, 2024).



Slika 16: Čitalec mikrotitrskih plošč Infinite 200^® PRO (Tecan) (vir: Milič, 2024).

Application: Tecan i-control				Tecan i-control, 2.0.10.0										
Device: infinite 200Pro				Serial number: 1101006572					Serial number of connected stacker:					
Firmware: V_3.22_12/10_Infinite (Dec 14 20				MAI, V_3.22_12/10_Infinite (Dec 14 2010/13.07.14)										
Date:	8. 08. 2024													
Time:	09:46:18													
System				DESKTOP-OSRO6R4										
User				DESKTOP-OSRO6R4\Uporabnik										
Plate				Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene Cat. No.: 655101/655161/655192 [GRE96ft.pdfx]										
Plate-ID (Stacker)														
Shaking (Orbital) Duration:				5	s									
Shaking (Orbital) Amplitude:				1	mm									
Label: Label1														
Mode				Absorbance										
Multiple Reads per Well (Square (filled))				2 x 2										
Multiple Reads per Well (Border)				750	µm									
Measurement Wavelength				620	nm									
Bandwidth				10	nm									
Number of Flashes				25										
Settle Time				0	ms									
Part of Plate				A1-D6										
Start Time	8. 08. 2024 09:46:23													



Slika 17: Izpis računalniškega program za merjenje optične gostote (vir: Milič, 2024).

5 REZULTATI

Raziskava je bila sestavljena iz dveh delov. Ugotavljali smo sposobnosti eteričnih olj pri uničevanju *E. coli* s pomočjo antibiograma, z merjenjem optične gostote pa smo raziskovali učinkovitost eteričnih olj pri odstranjevanju biofilmov. Rezultati so razvidni iz tabel 2 in 3.

5.1 REZULTATI PROTIMIKORBNEGA DELOVANJA ETERIČNIH OLJ

Tabela 2 prikazuje velikost premera inhibicijskih con izbranih eteričnih olj in kontrol. Pri interpretaciji rezultatov, smo upoštevali povprečne vrednosti premerov. Iz Tabele 2 je razvidno, da je imelo 100 % eterično olje sivke letnik 2023 izmed vseh snovi najbolj izrazito inhibicijsko cono, torej najučinkovitejše delovanje na *E. coli*. Vse snovi so imele učinek pri uničevanju bakterij, razen negativne kontrole (kar je željeni rezultat) in eteričnega olja ingverja, ki je le pri enem od treh ponovitev pokazalo učinkovitost. Pri posameznih koncentracija eteričnih olj med leti ni bilo velike razlike, razen pri 100 % koncentraciji eteričnega olja sivke, kjer je eterično olje letnika 2023 izrazito izstopalo (Slika 18). Rezultat je bil celo boljši od pozitivne kontrole 1 (antibiotik) in tudi od pozitivne kontrole 2 (vodikov peroksid). Snov z najmanjšim antibakterijskim delovanjem je poleg fiziološke raztopine bilo eterično olje ingverja (Slika 19). To je od najučinkovitejše snovi (eterično olje sivke (letnik 2023/100 % koncentracija) odstopalo za 4,1 cm, kar pomeni, da je bilo približno 15x manj učinkovito. Poskus smo ponovili trikrat v dveh paralelkah.

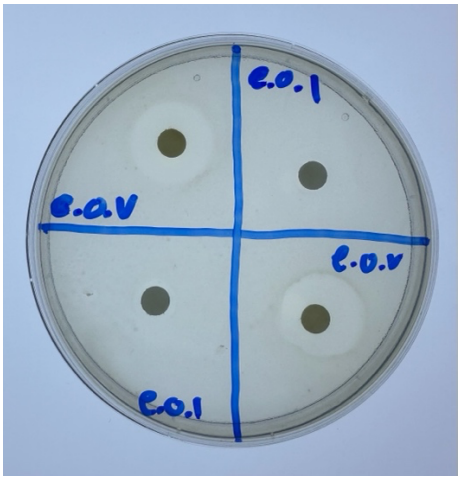
Tabela 2: Prikaz rezultatov antibiograma, premer inhibicijskih con v cm.

	Velikost premera inhibicijskih con antibiogramov izbranih eteričnih olj in kontrol (cm)			
Eterično olje (leto/koncentracija)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	**Povprečje meritev**
e.o. sivke (2022/100%)	1,5	1,6	1,5	**1,5**
e.o. sivke (2023/100%)	3,6	4,2	5,5	**4,4**
e.o. sivke (2024/100%)	1,5	1,5	1,4	**1,5**
e.o. sivke (2022/50%)	1,1	1,1	1,6	**1,3**
e.o. sivke (2023/50%)	1,2	0,9	1,2	**1,1**
e.o. sivke (2024/50%)	1,6	1,1	1,5	**1,4**
e.o. sivke (2022/25%)	0,9	0,9	1,1	**1**
e.o. sivke (2023/25%)	1	1	1	**1**
e.o. sivke (2024/25%)	0,7	0,8	0,9	**0,8**
e.o. ingverja (2024/100%)	0	0,9	0	**0,3**
e.o. smrek. vršičkov (2024/100%)	1,9	1,8	0,7	**1,5**
Antibiotik Cefoxitin (poz. 1)	2,2	2,1	2,3	**2,2**
Vodikov peroksid 10% (poz. 2)	1,9	1,2	2,7	**1,9**
Fiziološka raztopina (Neg. 1)	0	0	0	**0**

Legenda: e.o. = eterično olje, (2022/100) = letnik eteričnega olja/koncentracija eteričnega olja



Slika 18: Inhibicijske cone 100 % koncentracije eteričnega olja sivke letnika 2023 (vir: Milič, 2024).



Slika 19: Inhibicijske cone 100 % koncentracije eteričnih olj smrekovih vršičkov in ingverja letnika 2024 (vir: Milič, 2024).

5.1.1 Primerjava učinkovin eteričnih olj s pozitivnimi kontrolami

Kot pozitivni kontroli smo uporabili antibiotik Cefoxitin in 10 % raztopino vodikovega peroksida. Pri uničevanju bakterij *E. coli* je bil antibiotik učinkovitejši od vodikovega peroksida, zato smo za nadaljnje primerjave uporabili antibiotik.

Učinkovitejši antibiotik Cefoxitin je imel premer inhibicijske cone 2,2 cm. Edina snov učinkovitejša od tega je bilo 100 % eterično olje sivke generacije 2023 z inhibicijsko cono 4,4 cm. To je dvakrat učinkovitejše delovanje kot antibiotik. Slabše delovanje so imeli vodikov peroksid, eterično olje sivke letnikov 2024 in 2022 v 100 % koncentraciji, katera pa imata primerjalno med njima enako

učinkovanje. Prav tako je enako učinkovito eterično olje smrekovih vršičkov (1,5 cm). Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je najučinkovitejše eterično olje sivke generacije 2023, nato olje iz leta 2022 in ter 2024, najmanj učinkovito eterično olje ingverja.

5.2 REZULTATI ODSTRANJEVANJA BIOFILMA Z ETERIČNIMI OLJI

Pri poskusih odstranjevanje biofilma iz površin s pomočjo eteričnega olja smo uporabili metodo merjenja optične gostote predhodno obarvanih bakterijskih celic. Rezultati so prikazani v Tabeli 3. Največja optična gostota je bila v odprtinah, kjer so bile netretirane bakterije (meritve vrstice C). Ti rezultati predstavljajo celotno količino biofilma, ki se je ustvaril na površinah. Najmanjša vrednost optične gostote je pri kontroli brez bakterij (meritve vrstice D). Čeprav v teh utorih ni bilo bakterijske kulture, je barvilo kristal vijolično obarvalo površino. Barvila je tako malo, da ga s prostim očesom sploh nismo zaznali.

Tabela 3: Vpliv eteričnega olja sivke v različnih koncentracijah na odstranjevanje biofilma E. coli.

		Vrednosti optične gostote pri 620 nm		
	Vsebina utorov	e.o. 2022	e.o. 2023	e.o. 2024
Poskus 1	Bakterije + e.o. sivke 50 %	0,4135	0,4089	0,4239
Poskus 2		0,2795	0,3175	0,3737
Poskus 3		0,3512	0,32375	0,32865
Povprečje poskusov		**0,3481**	**0,3500**	**0,3754**
Poskus 1	Bakterije + e.o. sivke 25 %	0,41715	0,42795	0,47945
Poskus 2		0,32665	0,35185	0,3944
Poskus 3		0,3585	0,38595	0,3929
Povprečje poskusov		**0,3683**	**0,3886**	**0,4222**
Poskus 1	Kontrola: bakterije brez olja	0,4888	0,5584	0,5611
Poskus 2		0,51	0,5362	0,5358
Poskus 3		0,5314	0,5571	0,5597
Povprečje poskusov		**0,5100**	**0,5505**	**0,5522**
Poskus 1	Kontrola brez bakterij	0,2405	0,2679	0,2672
Poskus 2		0,2403	0,2787	0,2575
Poskus 3		0,2505	0,2308	0,2755
Povprečje poskusov		**0,2437**	**0,2591**	**0,2667**

Legenda: e.o. – eterično olje

Najučinkovitejše preučevano eterično olje pri odstranjevanju biofilmov je bila 50 % koncentracija eteričnega olja sivke, letnika 2022, sledi olje iz leta 2023, prav tako 50 % koncentracije in nato olje 25 % koncentracije iz leta 2022. Najslabše je na biofilm delovalo eterično olje s 25 % koncentracijo iz leta 2024. Ostala olja sivke (2023, 2024/25 % koncentracija) so pokazala podobno delovanje. Pri odstranjevanju biofilma je bilo najmanj učinkovito eterično olje sivke iz leta 2024 v 25 % koncentraciji. Poskus smo ponovili trikrat, v dveh paralelkah.

6 RAZPRAVA

V zadnjih letih velikokrat slišimo o vse večji odpornosti mikroorganizmov na čistila in razkužila, kar je številne znanstvenike pripeljalo do tega, da so začeli raziskovati učinkovitost naravnih snovi pri boju z mikroorganizmi (Gavarić et al.; 2015, Fink et al., 2018; Oder et. al, 2024). Naravne snovi predstavljajo velik potencial za nadomestitev klasičnih čistil in razkužil, saj rezultati analiz kažejo dobre rezultate, poleg tega pa praviloma niso škodljive za zdravje ljudi in zaradi biorazgradljivosti ne predstavljajo obremenitve za okolje kot različna kemična sredstva (Samanta et al., 2013).

V sklopu raziskave smo želeli raziskati protimikrobno delovanje eteričnih olj na bakterije *E. coli* in njihov učinek na odstranjevanje biofilmov iz površin.

6.1 RAZPRAVA REZULTATOV ANTIBIOGRAMA

Na podlagi rezultatov analiz, s katerimi smo preučevali protimikrobno delovanje eteričnih olj proti *E. coli*, so bila vsa eterična olja učinkovita. Med njimi sicer prihaja do razlik in vidimo lahko (Tabela 2), da je bilo najučinkovitejše eterično olje sivke pri 100 % koncentraciji letnika 2023, pri katerem je bil premer inhibicijske cone 4,4 cm. To je celo boljši rezultat kot pri antibiotiku in vodikovem peroksidu, ki smo ju uporabili kot pozitivno kontrolo. Za takšne razlike med olji sivke so lahko krivi okoljski vplivi. To potrjujeta tudi Baser in Buchbauer (2010), ki sta ugotovila, da je vsebnost oziroma tvorba aktivnih komponent v oljih zelo odvisna od podnebnih pogojev, letnega časa nabiranja rastlin, sončnega obsevanja, temperature in vlage.

Ostala uporabljena eterična olja sivke so bila precej manj učinkovita kot olje iz leta 2023 in njihovi rezultati inhibicijskih con so podobni (med 1 in 1,5 cm). Je pa zanimivo, da nismo zaznali bistvenih razlik med različnimi koncentracijami eteričnih olj, kar pa je v nasprotju z ugotovitvami nekaterih avtorjev, ki so preučevali podobna področja (Shi et al., 2018; Kan et. al, 2019). Na podlagi tega lahko sklepamo, da z razredčitvijo nismo bistveno zmanjšali protibakterijskega delovanja snovi. Ti sklepi nam lahko pomagajo pri iskanju bolj ekonomičnih in cenejših alternativ sodobnim čistilom, zato bi bilo smiselno preveriti še antibakterijsko delovanje eteričnih olj še nižjih koncentracij (npr. 1%).

Najmanj učinkovito je bilo olje ingverja, kar nas je presenetilo, saj ingverju pripisujejo protimikrobno delovanje (Cavanagh et al., 2005). Učinkovitost eteričnega olja smrekovih vršičkov je primerljiva z rezultati sivke (razen tistega iz leta 2023).

Ker smo dokazali, da so eterična olja lahko zelo učinkovita tako pri zniževanju števila mikroorganizmov, bi jih lahko uporabili kot alternativo konvencionalnim čistilom in dezinfekcijskim sredstvom.

6.2 REZULTATI MERJENJA OPTIČNE GOSTOTE PRI ODSTRANJEVANJU BIOFILMOV

V drugem delu raziskave smo z merjenjem optične gostote preverjali učinkovitost eteričnih olj sivke pri odstranjevanju biofilma iz površin. Rezultati za vse uporabljene snovi kažejo pozitivni učinek pri odstranjevanju biofilmov *E. coli* iz podlage. Najboljša snov za odstranjevanje biofilma je bilo eterično olje sivke v 50 % koncentraciji generacije 2022. Eterično olje s 25 % koncentracijo iz leta 2022, je imelo boljši učinek na biofilm kot tisto iz leta 2024 v 50 % koncentraciji. Torej koncentracija eteričnega olja nima vpliva na njegovo učinkovitost, kar so ugotovili tudi Duarte in sodelavci (2016). V svoji raziskavi so ugotovili, da različne koncentracije eteričnega olja koriandra bistveno ne vplivajo na učinkovitost pri odstranjevanju biofilmov. Prav nasprotno pa so ugotovili Thompson in sodelavci (2013), ki pravijo, da je med naravnimi čistilnimi sredstvi največ celic s površine odstranilo borovo olje, ki je bilo najbolj učinkovito ravno pri najvišji koncentraciji. Glede na rezultate celotne biomase biofilma, torej površin, na katerih so bile bakterije in jih nismo tretirali z eteričnimi olji lahko vidimo, da so bila prav vsa eterična olja učinkovita pri odstranjevanju biofilma iz površin.

7 ZAKLJUČKI

V raziskavi smo preučili različna eterična olja in ugotavljali njihova antimikrobna delovanja na *E. coli* ter njihovo učinkovitost pri odstranjevanju biofilmov. S pomočjo antibiogramov smo spoznali in ovrednotili sposobnost izbranih snovi pri uničevanju *E. coli*. Na podlagi rezultatov optične gostote pa smo ugotovili, kako učinkovita so eterična olja pri odstranjevanju biofilmov. Po opravljeni analizi rezultatov, smo zastavljene hipoteze potrdili ali delno potrdili.

Hipoteza 1: Izbrana eterična olja imajo antibakterijske lastnosti in so učinkovita pri odstranjevanju *E. coli*.
Hipoteza potrjena: Vsa eterična olja so vsaj delno učinkovala pri odstranjevanju *E. coli*. Edino eterično olje, ki pri vseh treh ponovitvah ni pokazalo učinkovitosti, je eterično olje ingverja, saj v dveh od treh poskusov, ni delovalo protibakterijsko na bakterije *E. coli*.

Hipoteza 2: Eterična olja višjih koncentracij, bodo bolj učinkovita pri uničevanju *E. coli* kot razredčena eterična olja.
Hipoteza delno potrjena: Kljub majhnim razlikam, so bila eterična olja sivke s koncentracijo 100 % bolj učinkovita kot s koncentracijo 50 %, le-ta pa je bila bolj učinkovita od 25 % koncentracije. Poleg tega, je nerazredčeno eterično olje smrekovih vršičkov bilo bolj učinkovito od preostalih razredčenih olj. Eterično olje ingverja v 100 % koncentraciji je imelo slabše protibakterijsko delovanje kot razredčena eterična olja sivke, zato hipotezo lahko le delno potrdimo.

Hipoteza 3: Med različnimi generacijami eteričnega olja sivke bodo opazne razlike v učinkovitosti.
Hipoteza potrjena: Razlike med različnimi generacijami so bile majhne s posameznimi odstopanji. Pri opazovanju antibakterijskega delovanja je bilo najučinkovitejše eterično olje sivke letnika 2023, najmanj učinkovito pa tisto letnika 2024. Pri odstranjevanju biofilmov, pa je bil najučinkovitejši ekstrakt iz leta 2022, najslabši pa iz leta 2024. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je bilo v obeh poskusih najmanj učinkovito eterično olje iz leta 2024. Eterično olje iz leta 2022 je bilo bolj učinkovito pri odstranjevanju biofilmov, eterično olje sivke iz leta 2023 pa pri uničevanju *E. coli*.

Hipoteza 4: Eterična olja sivke so primerna za odstranjevanje biofilmov.
Hipoteza potrjena: Vsa uporabljena eterična olja sivke ne glede na koncentracijo ali generacijo, so bila učinkovita pri odstranjevanju biofilmov.

7.1 SKLEPI

Po opravljeni raziskavi in analizi podatkov, smo z raziskavo dosegli zastavljene cilje. Ugotovili smo, katero izmed izbranih eteričnih olj je najučinkovitejše pri uničevanju *E. coli* in prišli do spoznanja, da koncentracija ni ključni dejavnik za njegovo učinkovitost. Raziskovali smo tudi učinkovitost eteričnih olj sivke pri odstranjevanju biofilmov in ugotavljali vplive različnih generacij in koncentracij olj.

Raziskovalno delo, ki smo ga opravili, bi lahko v prihodnosti nadaljevali s še podrobnejšimi raziskavami, ki bi se usmerjale predvsem na eterična olja sivke, saj ta prikazujejo najmočnejši učinek na *E. coli*. V prihodnjih raziskavah bi se lahko bolj poglobili na sestavo eteričnega olja in ugotavljali, katera je tista komponenta oz. aktivna snov, ki v oljih predstavlja največjo učinkovitost. Na podlagi tega bi lahko razmišljali o uporabi le posameznih aktivne snovi, ki se nahajajo v oljih. Prav tako bi bilo smiselno raziskati tudi učinke na drugih bakterijah in uporabiti tudi mešano bakterijsko kulturo (več vrst bakterij skupaj), saj se v realnem življenju nikjer ne pojavlja samo ena vrsta.

Zaključimo lahko, da eterična olja predstavljajo velik potencial pri boju z mikroorganizmi, poleg njihovega protibakterijskega in protibiofilmskega delovanja pa bi zaradi manjše uporabe kemičnih snovi veliko prispevali tudi k varovanju okolja in javnega zdravja.

8 SEZNAM LITERATURE

Achuth, B. S. (2024). *Escherichia coli* or *E. coli* – Structure and function. Pridobljeno iz Biotech reality (15.12.2024): https://www.biotechreality.com/2024/05/escherichia-coli-or-e-coli-structure-and-function.html#Structure

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and chemical toxicology, 46, 446-475. Pridobljeno iz ScienceDirect (29.12.2024): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691507004541

Bartlett, J. H. (2020). Microorganisms. In: Suvarna, K. S., Layton, C., Bancroft J. D. (eds.). Theory and Practice of Histological Techniques, 291–315. Pridobljeno iz National library of medicine (08.12.2024): https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7315325/

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2010). Handbook of essential oils : science, technology, and applications. Boca Raton: Taylor & Francis Group.

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, 8-13.

Boelee, E., Geerling, G., van der Zaan, B., Blauw, A., Vethaak, A. D. (2019). Water and health: From enviromental pressures to integrated responses. Acta tropica, 193, 217-226. Pridobljeno iz ScienceDirect (21.02.2025): https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.011

Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. (2005). Lavander essential oil: a review. Australian infection control, 10, 35-37. Pridobljeno iz ScienceDirect (01.01.2025): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1329936016300888

Dabič, M. (2022). Potencial uporabe limonela, karvakrola in evgenola za nadzor biofilmov. Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta. Pridobljeno iz repozitorija Univerze v Ljubljani (03.01.2025): https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=163363&lang=slv

Duarte, A., Luis, A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. Food Control, 61, 115-122. Pridobljeni iz doi Foundation (23.02.2024): https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.03

Fink, R., Kulaš, S., Oder, M. (2018). Efficacy of sodium dodecyl sulphate and natural extracts against *E. coli* biofilm. International Journal of Environmental Health Research, 28(3), 306–314. Pridobljeno iz Taylor & Francis Online (22.02.2025): https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1470230

Freitas, L. C., Moraes, V. S. V., da Silva, S. B., de Carvahlo Junior, R. N. (2023). Acquisition of essential oils through traditional techniques. Essential oils: extraction methods and application. Pridobljeno iz Wiley online library (30.12.2024): https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119829614.ch36

Gavarić, N., Kovač, J., Kretschmer, N., Kladar, N., Smole Možina, S., Bucar, F., Bauer, R., & Božin, B. (2015). Natural products as antibacterial agents – antibacterial potential and safety of post-distillation and waste material from Thymus vulgaris *L. Lamiaceae*. In: Bobbarala, V. (ed). Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials. IntechOpen, 123–151. Pridobljeno iz IntechOpen (22.02.2025): https://www.intechopen.com/chapters/48961

Geiger, J. L. (2005). The essential oil of ginger, *Zingiber officinale*, and anaesthesia. International journal of aromatherapy, 15, 7-14. Pridobljeno iz ScienceDirect (02.01.2025): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0962456204001213

Huo, Y., Deng, W., Sun, X., Zhou, L., Zhang, Q., Hu, J. (2024). Extract toolkit for essential oils: State of the art, trends, and challenges. Food chemistry, 461, 140854. Pridobljeno iz ScienceDirect (21.02.2025): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814624025044

Jansson, G., Danusevičius, D., Grotehusman, H., Kowalczyk, J., Krajmerova, D., Skrøppa, T., Wolf, H. (2013). Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Forest tree breeding in Europe, pp 123-176. Pridobljeno iz Springer nature link (02.01.2025): https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6146-9_3

Kan J, Jin W, Wang J, Sun Y, Wu X, Liu L (2019). Antibacterial and anti biofilm activities of peppermint essential oil against Staphylococcus aureus. LWT – Food Science and Technology 101: 639 645. doi: 10.1016/j.lwt.2018.11.093

Kranjc, K. (2021). Potencial ekstraktov in hidrolatov izbranih mediteranskih rastlin za nadzor biofilmov na površinah. Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta. Pridobljeno iz repozitorija Univerze v Ljubljani (08.12.2024): https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=143236&lang=slv

Langner, E., Greifenberg, S., Gruenwald, J. (1998). Ginger: history and use. Advances in Therapy, 15(1): 25-44. Pridobljeno iz Europe PMC (02.01.2025): https://europepmc.org/article/med/10178636/reload=0

Liu, H. Y., Prentice, E. L., Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms, 2: 1-10. Pridobljeno iz PubMed (03.01.2025): https://www.nature.com/articles/s44259-024-00046-3/figures/1

Munda, S., Dutta, S., Haldar, S., Lal, M. (2018). Chemical analysis and therapeutic uses od ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) essential oil: a review. Journal of essential oil bearing plants, 21, 994-1002. Pridobljeno iz Taylor & Francis Online (02.01.2025): https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2018.1524794

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 11 (1). Pridobljeno iz American society for microbiology (08.12.2024): https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/cmr.11.1.142

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effects of essential oils on phatogenic bacteria. Pharmaceuticals, 6 (12), 1451-1474. Pridobljeno iz MDPI (29.12.2024): https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451Nov

Nour, A. H., Ismail, N. A. (2024). Characterization of bioactive compounds in patchouli oil using microwave-assisted and traditional hydrodistillation methods. Pridobljeno iz ScienceDirect (30.12.2024): https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/steam-distillation

Oder, M., Piletić, K., Fink, R., Marijanović, Z., Krištof, R., Bićanić, L., Tomić Linšak, D., Gobin, I.. (2024). A synergistic anti-bacterial and anti-adhesion activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lemon eucalyptus tree (*Eucalyptus citriodora Hook*) essential oils on *Legionella pneumophila*. Biofouling, 40, (1), 54-63.

Olsvik, Ø., Wasteson, Y., Lund, A., Hornes, E. (1991). Phatogenic *Escherichia coli* found in food. International journal of food microbiology, 12 (1), 103-113. Pridobljeno iz ScienceDirect (08.12.2024): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016816059190051P

Reshes, G., Vanounou, S., Fishov, I., Feingold, M. (2007). Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. Biophisical Journal, 94 (1), 251-264. Pridobljeno iz National library if medicine (09.12.2024): https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2134870/#:~:text=coli%20is%20Gram%2Dnegative%20and,a%20cylindrical%20section%20in%20between

Salahudin, H., Kamal, S., Akhter, N., Bibi, I., Rehman, K., Akash, M. S. H., Gohar, U. F. (2023). Lavander. Essentials of medicinal and aromatic crops, 965-982. Pridobljeno iz Springer nature link (01.01.2025): https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-35403-8_37

Samanta, .A, Ojha, K., Mandal, A., Sarkar, A. (2013). Extraction and characterization of an eco-friendly surfactant for its use in enhanced oil recovery. Journal of Petroleum Engineering & Technology 3(1): 20-9.

Shi, C., Zhang, X., Guo, N. (2018). The antimicrobial activities and action-mechanism of tea tree oil against food-borne bacteria in fresh cucumber juice. Microbial Pathogenesis, 125, 262–271. Pridobljeno iz ScienceDirect (22.02.2025): https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.036

Thompson, A., Meah, D., Ahmed, N., Conniff-Jenkins, R., Chileshe, E., Phillips, C. O., Claypole, T. C., Forman, D.W., Row, P. E. (2013). Comparison of the antibacterial activity of essential oils and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*, 1-19.

Tuon, F. F., Suss, P. H., Telles, J. P., Dantas, L. R., Borges, N. H., Ribeiro, V. S. T. (2023). Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. Antibiotics (Basel, Switzerland), *12*(1), 87. Pridobljeno iz MDPI: https://doi.org/10.3390/antibiotics12010087

Vasala, P.A. (2012). Ginger. Handbook of herbs and spices (second edition), 1, 319-335. Pete, K. V. (ed.) CRC Press. Pridobljeno iz ScienceDirect (02.01.2025): https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780857090393500189

Vilhar, B., Tratnik, M., Stušek, P., Škornik, S. (2019). Evolucija, biotska pestrost in ekologija, Evolucija, 72-73.

Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., He, Q. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). Food science, 77 (7), C824-C829. Pridobljeno iz IFT (02.01.2025): https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2012.02767.x

Zuzarte, M., Salguiero, L. (2015). Essential oils chemistry. In: de Sousa, D. P. (ed.). Bioactive essential oils and cancer, pp. 19-61. Pridobljeno iz Springer Nature (30.12.2024): https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-19144-7_2

8.1 VIRI SLIK

Slika 1: Milič, J. (2024).
Slike 2-5: Milič, J. (2024).
Slika 6: Liu, H. Y., Prentice, E. L., Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. Pridobljeno iz PubMed (03.01.2025): https://www.nature.com/articles/s44259-024-00046-3/figures/1
Slike 7-18: Milič, J. (2024).