

VPLIV POLŽJE SLINE NA TVORBO BIOFILMA IN NA RAST BAKTERIJ, IZOLIRANIH IZ KRONIČNIH RAN

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Prva gimnazija Maribor

Avtorica: Rebeka Lea Sajko

Mentorici: prof. dr. Maja Rupnik, univ. dipl. biol., Andreja Senčar, dipl. biolog, prof. biol.

Maribor, 2020

KAZALO VSEBINE:

POVZETEK	5
ABSTRACT	6
ZAHVALA.....	7
1 UVOD.....	8
1.1. Teoretična podlaga naloge	8
1.1.1. Polžja slina	8
1.1.2. Kronične rane.....	10
1.1.3. Dve pomembni bakteriji pri okužbah kroničnih ran	11
1.2. Namen raziskave in hipoteze.....	12
2 MATERIALI IN METODE.....	13
2.1. Polžja slina	13
2.2. Bakterijski sevi	14
2.3. Gojenje sevov	15
2.4. Preverjanje protimikrobne aktivnosti polžje sline na ploščah z difuzijsko metodo.....	16
2.5. Preverjanje protimikrobne aktivnosti polžje sline v tekočem gojišču z dilucijsko metodo...	17
2.6. Preverjanje vpliva polžje sline na tvorbo biofilma.....	21
3 REZULTATI.....	22
3.1. Protimikrobna aktivnost polžje sline v difuzijskem testu	22
3.2. Protimikrobna aktivnost polžje sline v tekočem gojišču.....	24
3.3. Vpliv polžje sline na tvorbo biofilma.....	28

4	RAZPRAVA	31
4.1.	Vpliv polžje sline na rast sevov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in sevov bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> (hipoteza 1).....	31
4.2.	Povezanost koncentracije polžje sline in intenzitete rasti bakterij (hipoteza 2).....	34
4.3.	Vpliv polžje sline na tvorbo biofilma sevov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in sevov bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> (hipoteza 3).....	36
4.4.	Povezanost koncentracije polžje sline in intenzitete tvorbe biofilma (hipoteza 4).....	37
4.5.	Omejitve raziskave	38
4.6.	Možnosti nadaljnjih raziskav	39
5	DRUŽBENA ODGOVORNOST V PROGRAMU MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA ..	40
6	ZAKLJUČKI.....	41
7	PRILOGE.....	42
8	LITERATURA IN VIRI	48

Kazalo slik:

Slika 1: Gojenje bakterij <i>Staphylococcus aureus</i> na krvni plošči	15
Slika 2: Testiranje z difuzijsko metodo za <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Slika 3: Barvanje s kristal vijoličnim barvilom pri drugem testiranju tvorbe biofilma	21
Slika 4: Testiranje z difuzijsko metodo za <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Slika 5: Merjenje premera inhibicijske cone diska s kljunastim merilom za <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Slika 6: Prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo za tri seve bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in en sev bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Slika 7: Vpliv polžje sline pri prvem poskusu testiranja tvorbe biofilma za tri seve bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in en sev bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Slika 8: Vpliv polžje sline pri drugem poskusu testiranja tvorbe biofilma za seve <i>Staphylococcus aureus</i>	29

Kazalo tabel:

Tabela 1: Sevi <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , uporabljeni v raziskavi.	14
Tabela 2: Shema pipetiranja prvega testiranja z dilucijsko metodo.	18
Tabela 3: Shema pipetiranja drugega testiranja z dilucijsko metodo.	19
Tabela 4: Širine inhibicijskih con pri testih z difuzijsko metodo.	22
Tabela 5: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 540 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	42
Tabela 6: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 620 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	43
Tabela 7: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 540 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	44

Tabela 8: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 620 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	45
Tabela 9: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 570 nm za prvi poskus testiranja tvorbe biofilma.	46
Tabela 10: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 570 nm za drugi poskus testiranja tvorbe biofilma.	47

Kazalo grafikonov:

Grafikon 1: Povprečne vrednosti absorbcije pri 540 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	26
Grafikon 2: Povprečne vrednosti absorbcije pri 620 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	26
Grafikon 3: Povprečne vrednosti absorbcije pri 540 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	27
Grafikon 4: Povprečne vrednosti absorbcije pri 620 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.	27
Grafikon 5: Povprečne vrednosti absorbcije pri 570 nm za prvi poskus testiranja tvorbe biofilma.	30
Grafikon 6: Povprečne vrednosti absorbcije pri 570 nm za drugi poskus testiranja tvorbe biofilma.	30

POVZETEK

O kronični rani govorimo, kadar se rana ne zaceli v pričakovanem času, praviloma v šestih do osmih tednih. Takšne vrste poškodb pogosto spremljajo okužbe, pri katerih so največkrat prisotne bakterije *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Obe vrsti sta med najpogostejšimi bakterijami, ki razvijejo večkratno odpornost proti antibiotikom. Na rani običajno raste v obliki biofilma - to je skupek pritrjenih bakterij, obdanih z njihovimi zunajceličnimi produkti, ki jih ščitijo pred zunanjimi vplivi in tako še povečujejo odpornost proti antibiotikom. Iskanje novih naravnih učinkovin, ki delujejo protimikrobno, predvsem pa vplivajo na zmanjševanje biofilma, je hitro razvijajoče se področje. Polžja slina je primer tovrstne naravne učinkovine, ki se vse pogosteje uporablja v kozmetični industriji. V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv polžje sline na tvorbo biofilma in na rast bakterij, izoliranih iz kroničnih ran. Ugotovili smo protimikrobno delovanje polžje sline na izbrane seve bakterije *Staphylococcus aureus* in na izbrane seve bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Polžja slina ima zaradi zaviralnega vpliva na rast bakterij in na tvorbo biofilma v prihodnosti možnost uveljavitve kot alternativna terapija antibiotikom pri oskrbi kroničnih ran.

KLJUČNE BESEDE: *Cornu aspersum*; kronične rane; polžja slina; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

A wound that does not heal over the normal expected healing time frame (6-8 weeks) is considered chronic. This type of injury is often accompanied by infections, mostly caused by bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Both of them are known to be able to develop multi-drug resistance towards antibiotics. In wounds, they usually form a biofilm – a group of bacteria that stick to each other and often also to a surface. They are surrounded by their extracellular products that serve them as a protection from the environment thus increasing their antibiotic resistance. Search field for new natural antimicrobial substances is developing rapidly. Snail slime is one of such substances which is more and more frequently used in cosmetic industry. Our study was looking into influence of snail slime on biofilm development and growth of bacteria, isolated from chronic wounds. We established that there was an antimicrobial activity of snail slime on selected strains of *Staphylococcus aureus* as well as *Pseudomonas aeruginosa*. Snail slime has an inhibitory influence on bacterial growth and biofilm development and as such it has a potential for implementation as an alternative therapy for antibiotics when treating chronic wounds.

KEY WORDS: chronic wounds; *Cornu aspersum*; *Pseudomonas aeruginosa*; snail slime; *Staphylococcus aureus*

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojima mentoricama, da sta mi omogočili izvedbo raziskovalne naloge. Prav tako se jima zahvaljujem za njuno strokovno vodenje pri raziskovalnem delu in za dragocene nasvete pri izdelavi naloge.

Zahvalo dolgujem tudi timu raziskovalnega laboratorija, ki mi je bil v vsakem trenutku pripravljen pomagati.

Moje raziskovalnega dela ne bi bilo brez razumevanja in spodbude mojih staršev. Hvaležna sem jima za podporo in spodbudne besede.

1 UVOD

1.1. Teoretična podlaga naloge

1.1.1. Polžja slina

Polži ali taksonomska enota razred *Gastropoda* so skupno ime za približno 70 000 vrst vodnih in kopenskih živali, ki jih uvrščamo v obsežno deblo nevretenčarjev, poimenovano mehkužci oz. *Mollusca* (Garms in sod., 1981). Najbolj znani predstavniki kopenskih polžev so iz rodu *Helix* ali *Cornu*, med njimi navadni vrtni polž *Cornu aspersum* (*C. aspersum*). Polži izločajo sluz, imenovano tudi mukus ali slina, ki obdaja celotno zunanjo površino živali. Slina nastaja v posebnih epidermalnih žlezah slinavkah v polževi nogi, služi pa kot adheziv (lepilo), emolient (mehčalec), lubrikant (sredstvo, ki zmanjšuje trenje) in vlažilec ter ima zaščitno in tudi reparativno funkcijo (Campion, 1961; Newar in Ghatak, 2015). V naši raziskavi smo uporabili slino polža *C. aspersum*.

Navadni vrtni polž *C. aspersum* ima že tisočletja posebno mesto v kulinariki, na kar kažejo številne arheološke najdbe. O poskusih zdravljenja različnih poškodb kože in drugih bolezenskih stanj s polžjo slino pa obstajajo zapisi že od antike (Hipokrat, Plinij idr.) (Bonnemain, 2005). Zdravilne in negovalne učinke polžje sline uporabljajo tudi danes v kozmetični in farmacevtski industriji za izdelavo različnih krem in drugih preparatov (Drorganic, 2020; Tsoutsos in sod., 2009).

Natančna sestava polžje sline še ni povsem pojasnjena. Ve se, da več kot 95 % mokre teže mukusa predstavlja voda. Sicer je glavna sestavina mukusa mucin, ki vsebuje beljakovine z protimikrobnim delovanjem (Adikwu in Alozie, 2007; Iguchi in sod., 1982). Mukus vsebuje še številne druge aktivne substance (Trapella in sod., 2018).

Zaradi široke uporabe antibiotikov, vse od odkritja penicilina leta 1928, so se številni bakterijski sevi prilagodili nanje z razvojem rezistence (Applebaum, 1992). V zadnjem desetletju je postala rezistenca mikroorganizmov na antibiotike resen svetovni zdravstveni problem (Davies in sod., 2013), zaradi česar je Svetovna zdravstvena organizacija sprejela posebno resolucijo, globalni

načrt aktivnosti, s katero poziva k skrbni uporabi antibiotikov in hkrati aktivno spodbuja k raziskavam in razvoju novih antimikrobnih substanc, ki bi lahko nadomestile in dopolnile trenutna antimikrobna zdravila (Shallcross in Davies, 2014). Najnovejše raziskave na področju zdravljenja bakterijskih okužb kroničnih ran so pokazale spodbudne rezultate pri iskanju naravnih učinkovin z antimikrobnim delovanjem. Raziskovalci so uspeli pokazati tako antimikrobno delovanje kot tudi reparativno sposobnost določenih aktivnih komponent, pridobljenih iz polžje slin (Pitt in sod., 2015; Etim in sod., 2016; Cilia in Fratini, 2018; Trapella in sod., 2018; Nantarat in sod., 2019).

1.1.2. Kronične rane

Rana je odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih dejavnikov (Slovenski medicinski slovar, 2020). Celjenje rane je kompleksen fiziološki proces, sestavljen iz sosledja prepletajočih in dopolnjujočih se faz (Eming in sod., 2014): zaustavitve krvavitve (hemostaze), vnetja (antimikrobnega delovanja vnetnih dejavnikov in prostorske zaježitve poškodbe), faze proliferacije (rasti granulacijskega tkiva, angiogeneze in epitelizacije) in faze preoblikovanja granulacijskega tkiva v zrelo brazgotino.

Celjenje pri kronični rani je močno upočasnjeno ali popolnoma zavrto. Kadar se rana ne zaceli v pričakovanem času (praviloma v šestih do osmih tednih) oziroma v procesu celjenja ne pride do ponovne vzpostavitve anatomske in funkcionalne integritete, govorimo o kronični rani (Lazarus, 1994). Vzroki za nastanek kronične rane so različni. Glede na etiologijo ločimo štiri glavne kategorije kroničnih ran (The Wound Healing Society, 2020): razjeda zaradi pritiska (preležanina), venska razjeda, razjeda zaradi periferne arterijske okluzivne bolezni in razjeda na diabetičnem stopalu. Ocenjujejo, da se v razvitem zahodnem svetu s kronično rano vsaj enkrat tekom življenja sreča 1-2 % prebivalstva (Gottrup, 2004). Zaradi staranja prebivalstva je pričakovati, da se bo pojavnost kroničnih ran v prihodnje še povečevala (Wicke, 2009). S podaljševanjem življenjske dobe se namreč večja število bolnikov s kroničnimi boleznimi razvitega sveta, te pa so ključni dejavnik tveganja za nastanek kroničnih ran.

Proces celjenja se običajno ustavi v fazi vnetja zaradi različnih nevarnostnih dejavnikov prekomernega imunskega odziva (prekomerno izločanje citokinov, proteolitičnih encimov in prostih kisikovih radikalov). Tako nastala poškodba tkiva poveča dovzetnost za poselitev rane z bakterijami. Okužbe kroničnih ran navadno povzročijo bakterije, ki naseljujejo bolnikovo kožo ali črevo. Velikokrat so okužbe mešane. Med najpogostejše povzročitelje spadajo bakterije rodu *Pseudomonas* in bakterije *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Tomažič in sod., 2014, str. 165, 166).

1.1.3. Dve pomembni bakteriji pri okužbah kroničnih ran

S. aureus in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) spadata med najpogostejše bakterije pri okužbah kroničnih ran. Največkrat raste v obliki biofilma, odpornega na antimikrobno terapijo (Gjødsebøl in sod., 2006). Bakterija *S. aureus* raste v zgornjih plasteh rane, medtem ko se *P. aeruginosa* pogosteje pojavlja v globljih predelih (Fazli, 2009).

Tako *S. aureus* kot *P. aeruginosa* sta oportunistično patogeni bakteriji, ki povzročata okužbe pri imunsko oslabljenih osebah. *S. aureus*, po Gramu pozitivna kroglasta bakterija, je del normalne bakterijske mikrobiote na koži in sluznicah, poleg tega je splošno prisotna v okolju (v zraku, prahu, vodi, na različnih površinah). *P. aeruginosa* je po Gramu negativna bakterija. Je ubikvitaren bacil, prisoten skoraj povsod v naravi – v prsti in v vodi, v hrani, je tudi del prehodne bakterijske mikrobiote kože (Long in sod., 2018.).

Okužba rane je proces, ki poteka v več fazah (IWII, 2016): (1) endogene bakterije (naravna mikrobiota) ali eksogene bakterije kontaminirajo rano; (2) sledi kolonizacija tako baze kot dna rane, pri čemer gre za omejeno namnoževanje, brez odgovora gostitelja; (3) v zadnji fazi procesa okužbe pride do intenzivnejše rasti bakterij in njihove infiltracije globlje v tkivo; zaradi virulentnih dejavnikov, ki jih sproščajo bakterije, pride do imunskega odgovora gostitelja, tj. do sproščanja vnetnih citokinov in s tem do poškodbe tkiva. Da lahko druga faza razvoja okužbe (kolonizacija) preide v zadnjo fazo, tj. infekcijo, je potrebna prisotnost dovolj velikega števila bakterij – po definiciji International Wound Infection Institute (IWII, 2016) je meja 10^5 bakterij na gram tkiva.

Bakteriji *S. aureus* in *P. aeruginosa* se na imunski odgovor gostitelja odzoveta in zaščitita s tvorbo biofilma (Gjødsebøl in sod., 2006; Fazli, 2009). Biofilm je skupek bakterijskih celic, obdan z zunajceličnim matriksom, ki ga le-te izločajo. Nastane z združevanjem prosto plavajočih, nepritrjenih posameznih bakterijskih celic v bakterijske agregate, ki se hkrati pritrjajo tudi na podlago. Pritrjanje je sprva šibko in reverzibilno, z dodatnim izločanjem ekstracelularnih polimernih substanc (EPS) pa postane pritrjanje ireverzibilno. Z EPS obdana rastoča kolonija je tako zaščitena pred imunskim odzivom gostitelja, prav tako pa s tem bakterije pridobijo toleranco na antimikrobno terapijo (Costerton in sod., 1987). Biofilm je kot način rasti bakterij prisoten kar v 60 % pri kroničnih ranah in le v 6 % pri akutnih ranah (James in sod., 2008).

1.2. Namen raziskave in hipoteze

Namen raziskave je proučiti vpliv polžje sline na tvorbo biofilma in na rast bakterij, izoliranih iz kroničnih ran. S svojo raziskavo želim preveriti učinkovitost protimikrobne aktivnosti polžje sline kot naravne učinkovine.

Postavila sem štiri hipoteze:

1. Polžja slina zavira rast sevov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in sevov bakterije *Staphylococcus aureus*.
2. Pri višji koncentraciji polžje sline je rast bakterij slabša kot pri nižji.
3. Polžja slina zavira tvorbo biofilma sevov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in sevov bakterije *Staphylococcus aureus*.
4. Pri višji koncentraciji polžje sline je tvorba biofilma slabša kot pri nižji.

2 MATERIALI IN METODE

2.1. Polžja slina

Za namene raziskave smo od proizvajalca BLK d. o. o. dobili nefiltrirano polžjo slino. Slino pridobivajo od polžev vrste *C. aspersum* z neinvazivno ekstrakcijo z uporabo ozona. Prejeti vzorci sline so bili s konzervansi in brez. Slino smo hranili v hladilniku pri 4° C. Tik pred izvedbo poskusa smo del vzorcev prefiltrirali z mikrofiltriranjem z velikostjo por 0,20 µm (Syringe filtration unit Filtropur S 0.2, Sarstedt). Za raziskavo smo uporabili štiri različne vzorce polžje sline: (1) nefiltrirana, brez konzervansov, (2) nefiltrirana, s konzervansi, (3) filtrirana, brez konzervansov in (4) filtrirana, s konzervansi.

2.2. Bakterijski sevi

V raziskavi smo uporabili seve dveh bakterijskih vrst: *S. aureus* in *P. aeruginosa*. Sevi so prikazani v Tabela 1. Sevi so bili izolirani iz kroničnih ran in so del zbirke sevov Oddelka za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za hrano (NLZOH).

Tabela 1: Sevi *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*, uporabljeni v raziskavi.

Sevi <i>Staphylococcus aureus</i>	Sevi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ZZV 17-8432 (423)	ZZV 17-8416 (402)
ZZV 17-8435 (1688)	ZZV 17-8418 (1632)
ZZV 17-8439 (1690)	ZZV 17-8424 (424)
ZZV 17-8422 (420)	
ZZV 17-8419 (1630)	
ZZV 17-8417 (403)	
ZZV 17-8415 (1389)	
ZZV 17-8428 (1686)	
ZZV 17-8430 (1689-1)	
ZZV 17-8431 (420)	

2.3. Gojenje sevov

Bakterije smo gojili na trdnih gojiščih na ploščah in v tekočih gojiščih oziroma bujonih.

Uporabljali smo:

- krvne plošče: Columbia agar + 5 % horse blood (bioMérieux) (glej Slika 1)
- plošče MH: Mueller Hinton Agar II (Biolife)
- plošče NB: Nutrient Broth (Biolife) + Agar Bios Special LL (Biolife)
- tekoče gojišče ali bujon MH: Mueller Hinton Broth (Biolife)

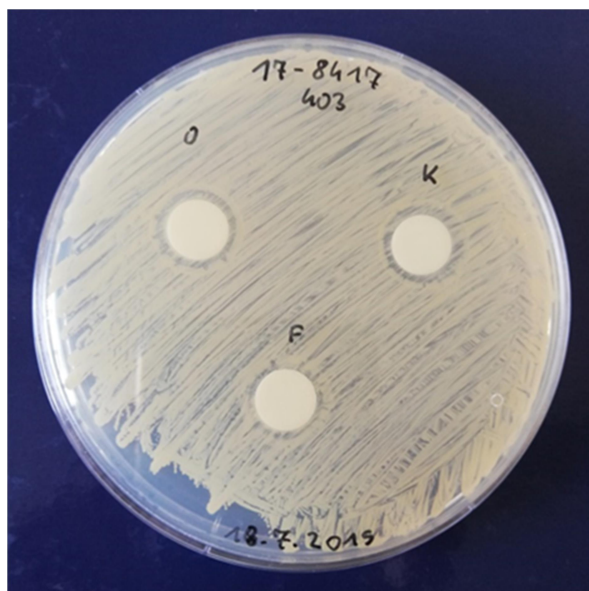


Slika 1: Gojenje bakterij *Staphylococcus aureus* na krvni plošči (Avtor, 2019).

2.4. Preverjanje protimikrobne aktivnosti polžje slin na ploščah z difuzijsko metodo.

Protimikrobno aktivnost polžje slin smo preverjali z difuzijsko metodo na ploščah MH. Na plošče smo nacepili bakterije vrste *S. aureus*, sev ZZV 17-8417 (403) (glej Slika 2), in bakterije *P. aeruginosa*, sev ZZV 17-8418 (1632).

Difuzijsko metodo smo izvedli tako, da smo s cepilno zanko na plošče MH cepili kulturo preiskovanega seva po vsej površini plošče iz treh smeri, ki so med seboj pod kotom 60°. Nato smo nanjo položili diske v primerni razdalji in na prvega s pipeto nakapljali 100 µL nefiltrirane polžje slin brez konzervansov (0), na drugega 100 µL nefiltrirane polžje slin s konzervansi (K) in na tretjega 100 µL PBS – fosfatnega pufru s soljo, kar je predstavljalo kontrolo (F). Plošče smo nato inkubirali pri 37° C in po štiriindvajsetih urah odčitali inhibicijske cone, tj. cone brez bakterijske rasti, s kljunastim merilom. Rezultate smo podali kot širino inhibicijske cone (tj. kolobarja brez bakterijske rasti okoli diska) v milimetrih.



Slika 2: Testiranje z difuzijsko metodo za *Staphylococcus aureus*, sev ZZV 17-8417 (Avtor, 2019).

2.5. Preverjanje protimikrobne aktivnosti polžje sline v tekočem gojišču z dilucijsko metodo

Protimikrobne aktivnosti polžje sline v tekočem gojišču smo preverjali z dilucijsko metodo. Dilucijski test smo izvedli po sledečem protokolu (Rupnik in sod., 2001):

Najprej smo pripravili različne razredčine polžje sline; v ta namen smo pripravili dve epruveti s 500 μL bujona MH. Nato smo prvi epruveti s pipeto dodali 500 μL filtrirane polžje sline brez konzervansov, pridobljene 12. 7. 2019, in premešali z vorteksom (VIBROMIX10 Vortex Mixer, Domel). Iz prve epruvete smo s pipeto prenesli 500 μL vsebine v drugo epruveto in ponovno premešali z vorteksom. Tako smo pridobili dve razredčini polžje sline, 1:2 in 1:4.

Zatem smo pripravili mikrotitrsko ploščico s šestindevetdesetimi vdolbinicami in v devet vdolbinic prve vrste ploščice s pipeto prenesli 100 μL nerazredčene sline (C1). V devet vdolbinic druge vrste ploščice smo prenesli 100 μL razredčine sline 1:2 (C2) in v devet vdolbinic tretje vrste 100 μL razredčine sline 1:4 (C3). V četrto vrsto smo za kontrolni poskus brez polžje sline napipetirali 100 μL bujona MH (MH).

Nato smo s sterilno vatenko prenesli kulturo v stekleno epruveto in tako pripravili suspenzije bakterij v fiziološki raztopini približno 0,50 McFarland. V vdolbinice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali 10 μL suspenzije bakterij in dodali 90 μL bujona MH, tako da je bila končna razredčina suspenzije bakterij 1:10. Ta postopek smo ponovili za vsak sev, ki je bil v svoji vrsti.

Na koncu smo vsako suspenzijo bakterij prenesli v dva stolpca mikrotitrskje ploščice, da smo dobili dve paraleli za vsak sev. V prvi stolpec bakterij nismo prenesli, namesto suspenzije bakterij smo dodali po 100 μL bujona MH, da smo tako dobili kontrolo brez bakterij.

Mikrotitrsko ploščico smo nato dali v inkubator na 37° C in čez štiriindvajset ur s spektrofotometrom (Sunrise absorbance microplate reader, Tecan) pri 540 nm in 620 nm izmerili optično gostoto, ki je ocena za koncentracijo bakterij.

Izvedli smo dve testiranja, s katerima smo preverjali protimikrobne aktivnosti polžje sline v treh razredčinah na različne seve dveh vrst bakterij. V prvem testiranju smo preverjali učinek sline na tri različne seve bakterije *P. aeruginosa* (sevi: ZZV 17-8418, ZZV 17-8416, ZZV 17-8424) in na en sev bakterije *S. aureus* (sev ZZV 17-8417) (glej Tabela 2). Slina, ki smo jo uporabili, je bila filtrirana in brez konzervansov.

V drugem testiranju smo preverjali učinek slina na deset različnih sevov bakterije *S. aureus* (sevi: ZZV 17-8432, ZZV 17-8435, ZZV 17-8439, ZZV 17-8422, ZZV 17-8419, ZZV 17-8417, ZZV 17-8415, ZZV 17-8428, ZZV 17-8430, ZZV 17-8431) (glej Tabela 3). Slina, ki smo jo uporabili, je bila filtrirana in brez konzervansov.

Tabela 2: Shema pipetiranja prvega testiranja z dilucijsko metodo.


	<u>Kontrola</u>	<u>P. A. 17-8418</u>		<u>P. A. 17-8416</u>		<u>P. A. 17-8424</u>		<u>S. A. 17-8417</u>	
	<u>– brez bakterij</u>	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]
Razredčina sline C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Razredčina sline C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Razredčina sline C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
Kontrola – brez sline	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH


C1 = nerazredčena slina


C2 = razredčina sline v bujonu MH 1:2


C3 = razredčina sline v bujonu MH 1:4

MH = dodano samo gojišče MH

 = kontrola (samo bujon MH brez bakterij)

 = *Pseudomonas aeruginosa* ZZV 17-8418 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Pseudomonas aeruginosa* ZZV 17-8416 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Pseudomonas aeruginosa* ZZV 17-8424 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8417 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,52 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

Tabela 3: Shema pipetiranja drugega testiranja z dilucijsko metodo.


	<u>Kontrola</u> – brez <u>bakterij</u>	<u>S. A. 17-</u> <u>8432</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8435</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8439</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8415</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8430</u>	
		[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]
Razredčina sline C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Razredčina sline C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Razredčina sline C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
Kontrola – brez sline	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH
Razredčina sline C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Razredčina sline C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Razredčina sline C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
Kontrola – brez sline	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH
	<u>Kontrola</u> – brez <u>bakterij</u>	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]	[1]	[2]
		<u>S. A. 17-</u> <u>8417</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8419</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8428</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8422</u>		<u>S. A. 17-</u> <u>8431</u>	


C1 = nerazredčena slina


C2 = razredčina sline v bujonu MH 1:2


C3 = razredčina sline v bujonu MH 1:4


MH = dodano samo gojišče MH


 = kontrola (samo bujon MH brez bakterij)


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8432 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8435 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8439 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8415 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2]


 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8430 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8417 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8419 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8428 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2]

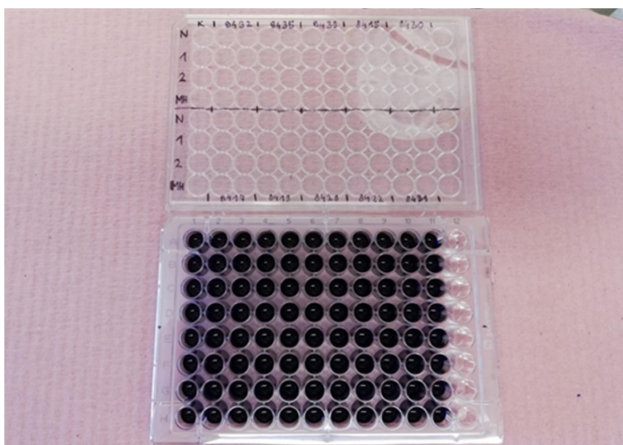
 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8422 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

 = *Staphylococcus aureus* ZZV 17-8431 (suspenzija bakterij v fiziološki raztopini 0,50 McFarland, končna razredčina v bujonu MH 1:10), v dveh paralelah [1], [2].

2.6. Preverjanje vpliva polžje slin na tvorbo biofilma

Vpliv polžje slin na tvorbo biofilma smo preverjali tako, da smo mikrotitrne ploščice, ki smo jih uporabili pri testiranju z dilucijsko metodo, dali v inkubator na 37° C še za štiriindvajset ur. Nato smo po standardnem postopku produkcije biofilma sevov *S. aureus* (NLZOH, 2014) vsebino vdolbinic najprej previdno odpipetirali in nato trikrat sprali z 200 µL pufru PBS, tako da smo najprej dodali pufer PBS, dvakrat previdno premešali in pufer odpipetirali. Ploščice smo nato pustili, da se posušijo. Sledilo je barvanje z 1 % kristal vijoličnim barvilom (glej Slika 3), ki obarva nastali biofilm: v vsako vdolbinico smo dodali 100 µL barvila in deset minut inkubirali. Barvilo smo nato odpipetirali. Potem smo mikrotitrsko ploščico ponovno spirali po enakem postopku, tokrat z destilirano vodo. Ko se je ploščica posušila, smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 570 nm.

Izvedli smo dve testiranji, pri čemer smo preverjali protimikrobne aktivnosti polžje slin v treh razredčinah na tvorbo biofilma različnih sevov dveh vrst bakterij. V prvem testu smo preverjali učinek filtrirane slin brez konzervansov na tri različne seve bakterije *P. aeruginosa* (sevi: ZZV 17-8418, ZZV 17-8416, ZZV 17-8424) in na en sev bakterije *S. aureus* (sev ZZV 17-8417) (glej Tabela 2). V drugem testu smo preverjali učinek filtrirane slin brez konzervansov na deset različnih sevov *S. aureus* (sevi: ZZV 17-8432, ZZV 17-8435, ZZV 17-8439, ZZV 17-8422, ZZV 17-8419, ZZV 17-8417, ZZV 17-8415, ZZV 17-8428, ZZV 17-8430, ZZV 17-8431) (glej Tabela 3).



Slika 3: Barvanje s kristal vijoličnim barvilom pri drugem testiranju tvorbe biofilma (Avtor, 2019).

3 REZULTATI

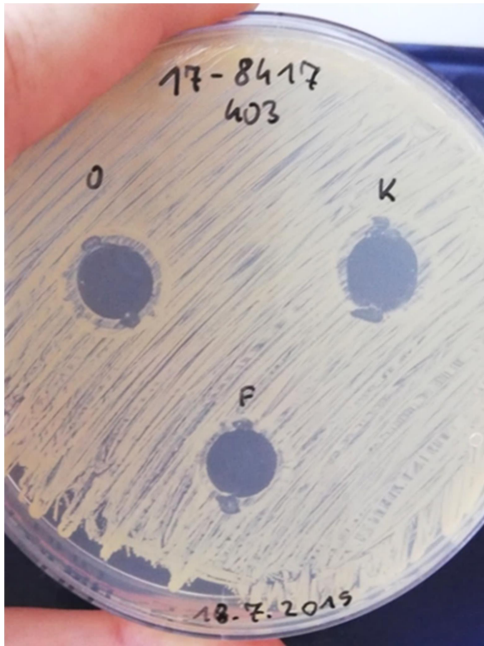
3.1. Protimikrobna aktivnost polžje sline v difuzijskem testu

Na Slika 4 in Slika 5 sta prikazana testa z difuzijsko metodo za bakteriji *S. aureus* in *P. aeruginosa*. Na obeh ploščah je vidna konfluentna rast. Pod diski bakterije ne rastejo. Pri bakteriji *S. aureus* je opazna cona inhibicije pri vseh treh diskih, tudi pri kontroli. Pri bakteriji *P. aeruginosa* je cona inhibicije vidna le pri diskih s polžjo slino. Izmerjene širine inhibicijskih con so prikazane v Tabela 4.

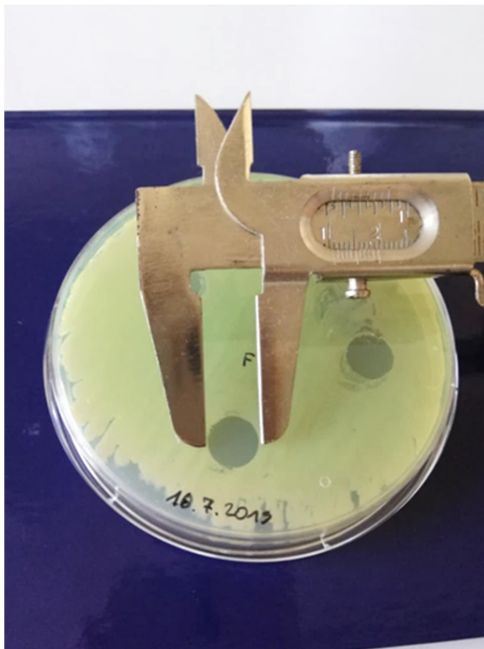
Tabela 4: Širine inhibicijskih con pri testih z difuzijsko metodo.

	Inhibicijska cona		
	0	K	F
<i>Staphylococcus aureus</i> , sev ZZV 17-8417	1,8 mm	1,6 mm	0,9 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , sev ZZV 17-8418	1,0 mm	0,8 mm	0,0 mm

0 = nefiltrirana polžja slina brez konzervansov, K = nefiltrirana polžja slina s konzervansi, F = kontrola s pufrom PBS.



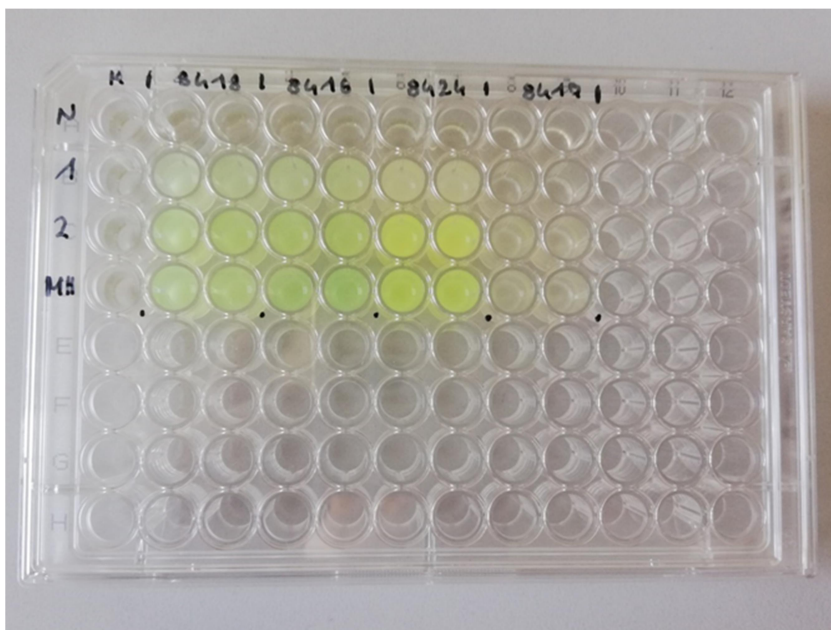
Slika 4: Testiranje z difuzijsko metodo za *Staphylococcus aureus*, sev ZZV 17-8417. 0 = nefiltrirana polžja slina brez konzervansov, K = nefiltrirana polžja slina s konzervansi, F = kontrola s PBS (Avtor, 2019).



Slika 5: Merjenje premera inhibicijske cone diska s kljunastim merilom za *Pseudomonas aeruginosa*, sev ZZV 17-8418. 0 = nefiltrirana polžja slina brez konzervansov, K = nefiltrirana polžja slina s konzervansi, F = kontrola s PBS (Avtor, 2019).

3.2. Protimikrobna aktivnost polžje sline v tekočem gojišču

Protimikrobno aktivnost polžje sline smo kvantitativno določili z dilucijskim testom. Rast kultur pri prvem testiranju pri različnih razredčinah polžje sline za tri seve bakterije *P. aeruginosa* in za en sev bakterije *S. aureus* je prikazana na Slika 6. Pri nerazredčeni polžji slini (prva vrstica ploščice) je jasno videti minimalno rast bakterij. Pri razredčini polžje sline 1:2 (druga vrstica ploščice) intenzivnejša obarvanost kaže na močnejšo rast bakterij; pri sevih bakterije *P. aeruginosa* je obarvanost sicer intenzivnejša kot pri sevu bakterije *S. aureus*, a ta razlika je zaradi različne naravne obarvanosti kultur bakterij (intenzivno zelena pri *P. aeruginosa* in belkasta pri *S. aureus*). Pri razredčini sline 1:4 in pri kontroli (tretja in četrta vrstica) je obarvanost še intenzivnejša, a na pogled med njima ni opazne razlike.



Slika 6: Prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo za tri seve bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (sevi: ZZV 17-8418, ZZV 17-8416, ZZV 17-8424) in en sev bakterije *Staphylococcus aureus* (sev ZZV 17-8417). N = nerazredčena polžja slina, 1 = razredčina polžje sline (Avtor, 2019).

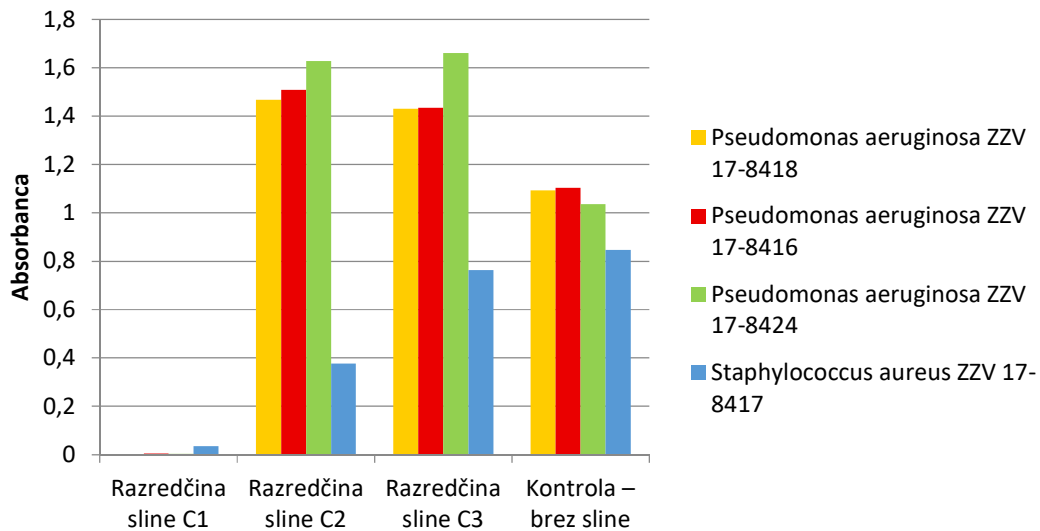
V drugem testiranju z dilucijsko metodo smo preverjali antimikrobno aktivnost samo za seve bakterije *S. aureus*. Spodaj so za drugo testiranje prikazani le rezultati spektrofotometrične analize, fotografije rasti kultur desetih sevov *S. aureus* v mikrotitrski ploščici ni.

Rezultati spektrofotometrične analize za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo so prikazani v Grafikon 1 (pri 540 nm) in v Grafikon 2 (pri 620 nm), za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo pa v Grafikon 3 (pri 540 nm) in v Grafikon 4 (pri 620 nm). Vrednosti so povprečja absorbcije med paralelami za posamezni sev, od katerih so odštete vrednosti kontrole. Originalne povprečne vrednosti, ki smo jih izmerili s spektrofotometrijo, še brez odštete kontrole, so prikazane v Prilogah v Tabelah 5 do 8.

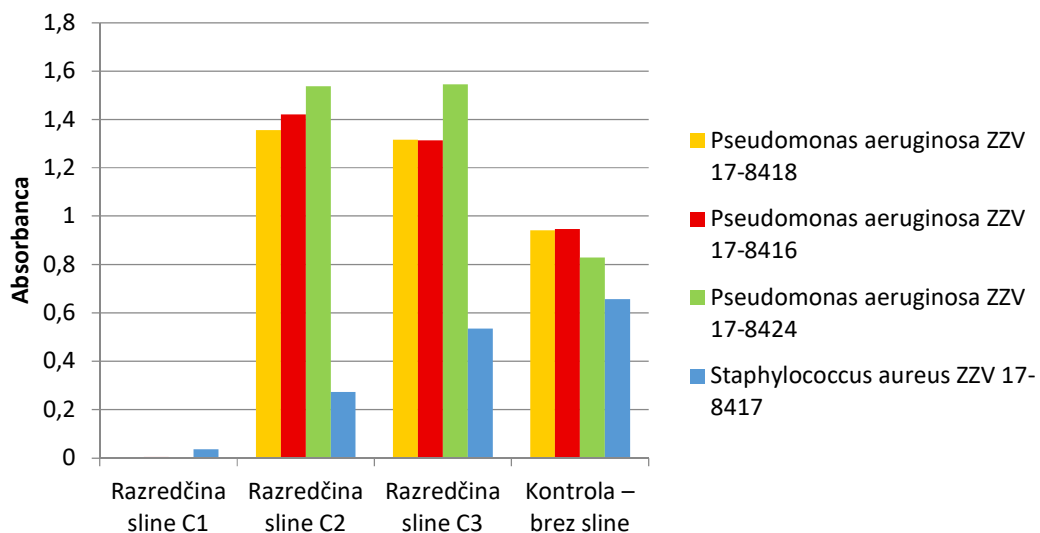
V Grafikonu 1 in 2 vidimo pri nerazredčeni slini odsotnost rasti sevov bakterije *P. aeruginosa* ali le minimalno rast (nizka absorbanca). Pri kontroli, kjer slina ni dodana, je rast vseh treh sevov bakterije *P. aeruginosa* povečana. Še intenzivnejša rast prav tako vseh treh sevov bakterije *P. aeruginosa* je pri obeh razredčinah sline. Pri sevih bakterije *S. aureus* pa je videti monotono naraščajočo rast od najvišje do najnižje koncentracije sline.

Grafikonu 3 in 4: prikazani so rezultati dilucijskega testa za seve *S. aureus*. Tako v Grafikonu 3 kot v Grafikonu 4 je videti postopno večanje absorbanca (koncentracije bakterij) s padanjem koncentracije polžje sline. Opaziti je razlike med sevi; pri nekaterih je večanje koncentracije bakterij monotono, pri drugih ne. Poleg tega se pri nekaterih sevih koncentracija bakterij s padanjem koncentracije polžje sline močno poveča, pri nekaterih le malo.

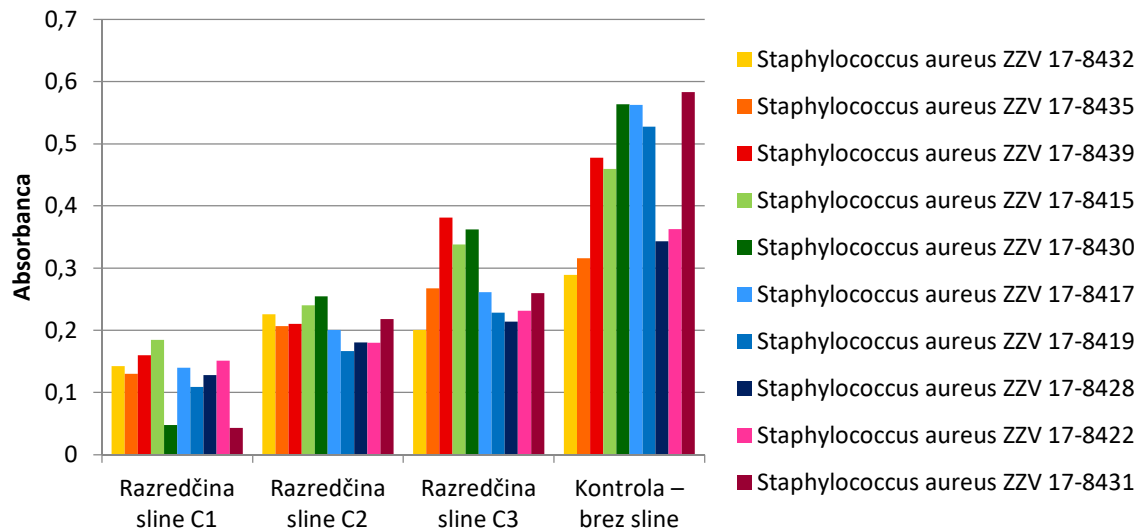
Grafikon 1: Povprečne vrednosti absorpcije pri 540 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.



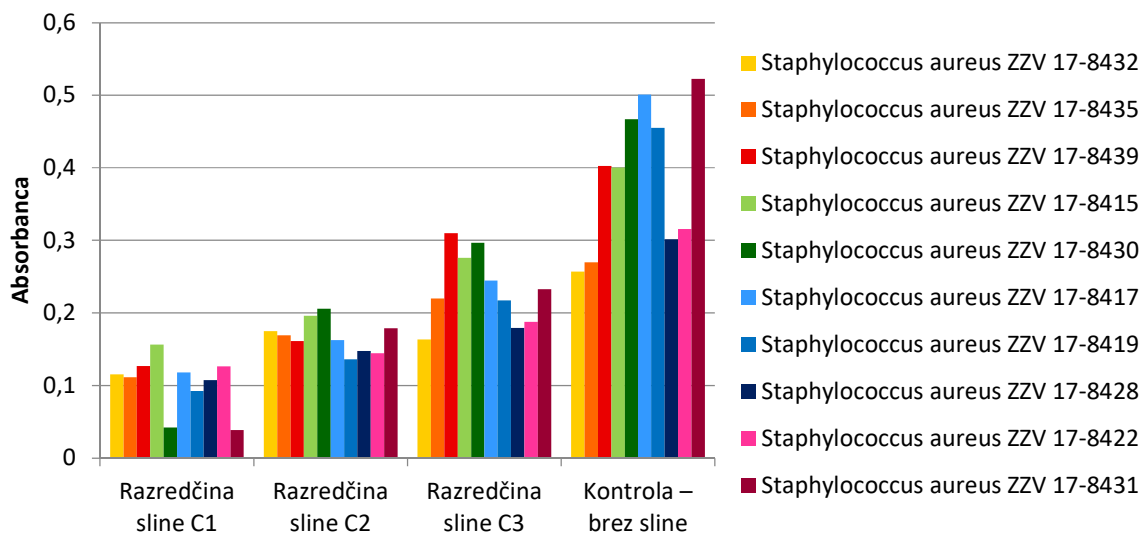
Grafikon 2: Povprečne vrednosti absorpcije pri 620 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.



Grafikon 3: Povprečne vrednosti absorpcije pri 540 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.

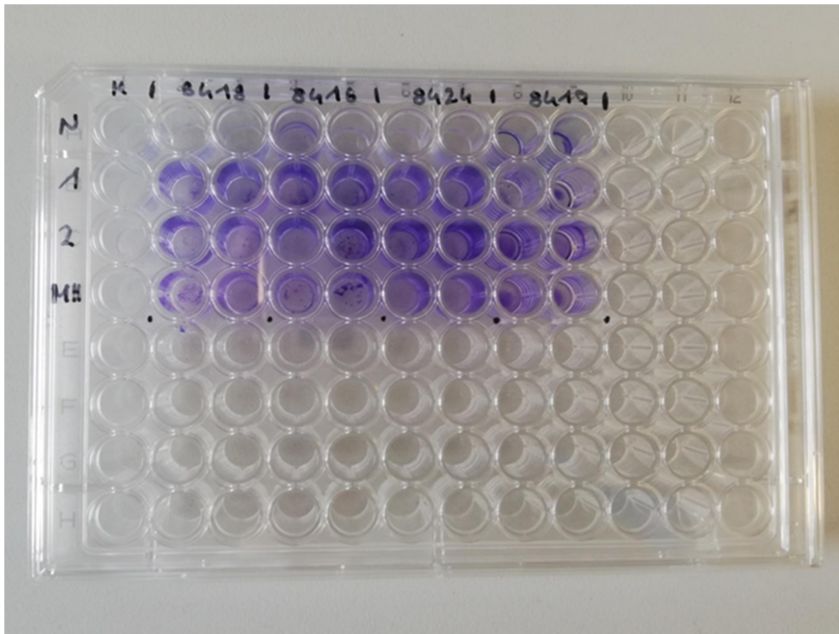


Grafikon 4: Povprečne vrednosti absorpcije pri 620 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.



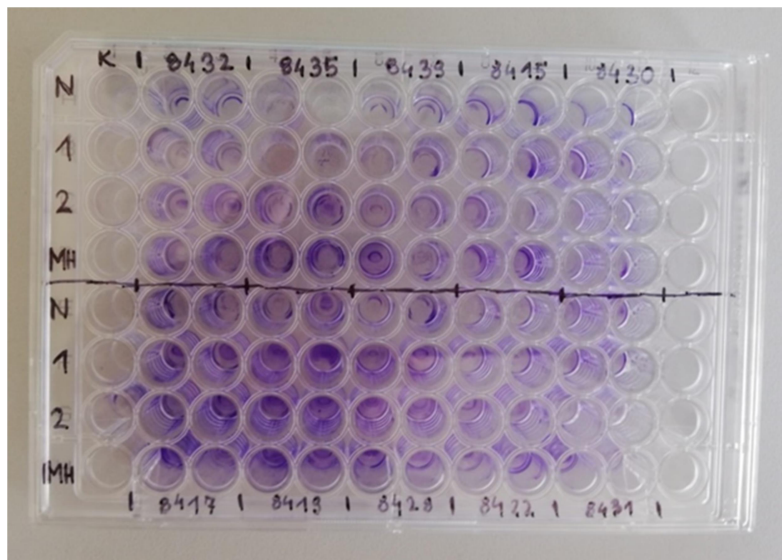
3.3. Vpliv polžje sline na tvorbo biofilma

Produkcija biofilma sevov bakterije *P. aeruginosa* in bakterije *S. aureus* pri različnih razredčinah polžje sline je prikazana na Slika 7 in Slika 8. Na Slika 7 so rezultati prvega testa tvorbe biofilma pri treh sevih *P. aeruginosa* in pri enem sevu *S. aureus*. Opazna je minimalna obarvanost v prvi vrstici, kjer je bila največja koncentracija polžje sline, kar kaže na zmanjšano tvorbo biofilma. Med drugimi tremi vrsticami z nižjimi koncentracijami polžje sline ni opaziti razlike v intenziteti obarvanosti.



Slika 7: Vpliv polžje sline pri prvem poskusu testiranja tvorbe biofilma za tri seve bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (sevi: ZZV 17-8418, ZZV 17-8416, ZZV 17-8424) in en sev bakterije *Staphylococcus aureus* (sev ZZV 17-8417). N = nerazredčena polžja slina, 1 = razredčina polžje sline 1:2, 2 = razredčina polžje sline 1:4, MH = kontrola brez polžje sline (Avtor, 2019).

Na Slika 8 so prikazani rezultati drugega testa tvorbe biofilma pri desetih sevih *S. aureus*. Ni jasne razmejnitve v intenziteti obarvanosti med različnimi koncentracijami polžje sline. Vzorec obarvanosti nima jasnega pravila.



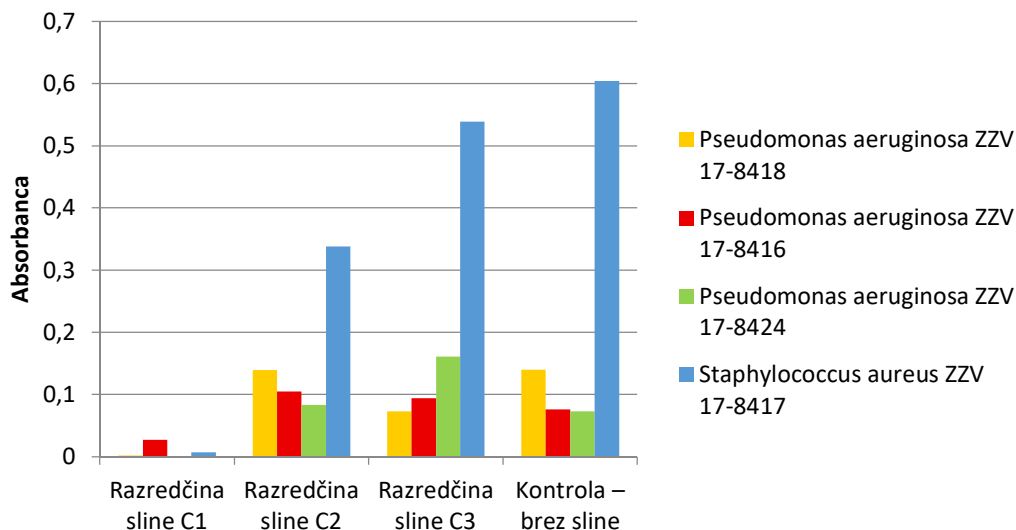
Slika 8: Vpliv polžje sline pri drugem poskusu testiranja tvorbe biofilma za seve *Staphylococcus aureus* (sevi: ZZV 17-8432, ZZV 17-8435, ZZV 17-8439, ZZV 17-8422, ZZV 17-8419, ZZV 17-8417, ZZV 17-8415, ZZV 17-8428, ZZV 17-8430, ZZV 17-8431) N = nerazredčena polžja slina, 1 = razredčena polžja slina 1:2, 2 = razredčena polžja slina 1:4, MH = kontrola brez polžje sline (Avtor, 2019).

Rezultati spektrofotometrične analize (pri 570 nm) za prvi poskus testiranja tvorbe biofilma so prikazani v Grafikon 5, za drugi poskus testiranja tvorbe biofilma pa v Grafikon 6. Vrednosti so povprečja absorbcije med paralelama za posamezni sev, od katerih so odštete vrednosti kontrole. Originalne povprečne vrednosti, ki smo jih izmerili s spektrofotometrijo, še brez odštete kontrole, so prikazane v Prilogah v Tabelah 9 in 10.

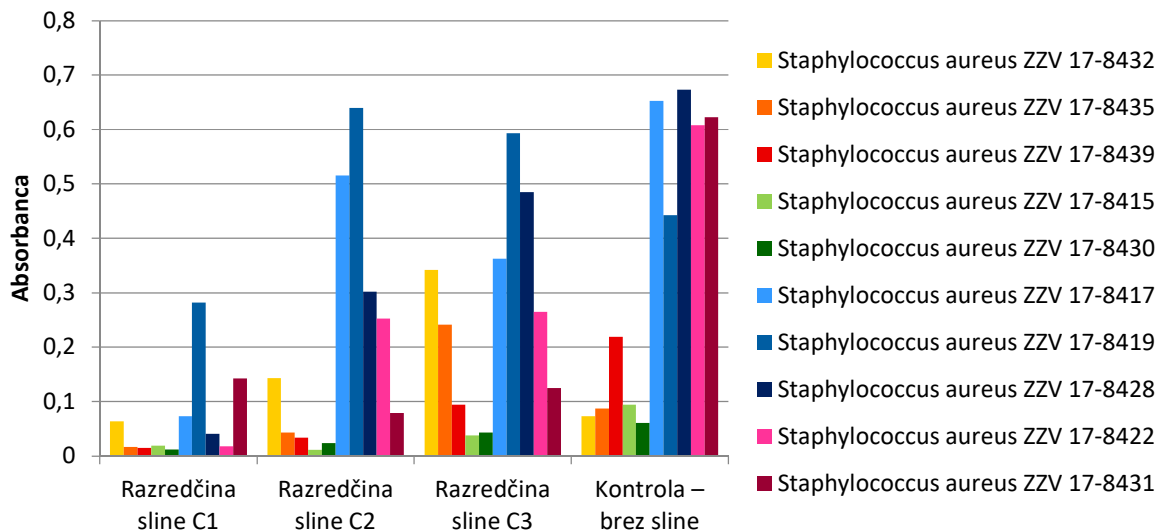
Kot smo lahko že s prostim očesom razbrali z mikrotitrne ploščice (Slika 7), je tudi spektrofotometrija pri prvem testiranju pri nerazredčeni slini pokazala le minimalno tvorbo mikrofilma, tako pri sevih bakterije *P. aeruginosa* kot pri sevu bakterije *S. aureus* (Grafikon 5). Pri treh koncentracijah razredčene sline (C2, C3 in kontrola) je pri sevih bakterije *P. aeruginosa* sicer videti rahlo povečanje absorbance, a povečanje ni v odvisnosti od spreminjanja koncentracije sline. Nasprotno pa pri sevu bakterije *S. aureus* vidimo postopno večanje absorbance ob padajoči koncentraciji polžje sline.

Nejasen vzorec odziva desetih sevov bakterije *S. aureus* na spreminjanje koncentracije polžje sline, opažen s prostim očesom pri drugem testiranju (Slika 8), je viden tudi pri spektrofotometrični analizi (Grafikon 6). Kljub temu je razbrati trend naraščanja absorbance s padanjem koncentracije polžje sline.

Grafikon 5: Povprečne vrednosti absorpcije pri 570 nm za prvi poskus testiranja tvorbe biofilma. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.



Grafikon 6: Povprečne vrednosti absorpcije pri 570 nm za drugi poskus testiranja tvorbe biofilma. C1 = nerazredčena filtrirana polžja slina brez konzervansov, C2 = razredčena slina v bujonu MH 1:2, C3 = razredčena slina v bujonu MH 1:4.



4 RAZPRAVA

4.1. Vpliv polžje slin na rast sevov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in sevov bakterije *Staphylococcus aureus* (hipoteza 1)

Z difuzijskim testom, s katerim smo ugotavljali protimikrobno aktivnost polžje slin, smo potrdili zaviralni vpliv slin na rast izbranega seva bakterije *P. aeruginosa*. Cona inhibicije je bila vidna tako pri disku z nefiltrirano slino brez konzervansov kot pri disku z nefiltrirano slino s konzervansi. Coni inhibicije sta bili širine 1,0 in 0,8 milimetra, vendar pa rast bakterij v coni inhibicije ni bila popolnoma zavrta, kot je zahtevano za difuzijske antibiogramne, temveč le oslABLJENA.

Pri izbranem sevu bakterije *S. aureus* zaviralnega vpliva polžje slin na rast bakterij ne moremo jasno potrditi. Z difuzijskim testom smo dobili širši coni inhibicije (1,8 mm za nefiltrirano slino brez konzervansov, 1,6 mm za nefiltrirano slino s konzervansi; Tabela 4) kot pri *P. aeruginosa*. Tudi pri sevu bakterije *S. aureus* je bila rast bakterij v coni inhibicije le oslABLJENA, ne popolnoma zavrta (jasno razvidno na Sliki 5 - kot ne popolnoma čist kolobar okoli diska). A proti pričakovanju je bila cona inhibicije vidna tudi pri disku s kontrolo s pufrom PBS, širine 0,9 mm. Zakaj se je razvila cona inhibicije tudi pri kontroli, ne vemo. Vsekakor to pomeni, da cone inhibicije pri obeh diskih s slino ne moremo z gotovostjo vrednotiti kot odraz protimikrobne aktivnosti polžje slin na *S. aureus*, ali vsaj ne izključno kot odraz protimikrobne aktivnosti. Možno je, da se je pri disku s kontrolo pojavila navidezna 'cona inhibicije' zaradi našega načina izvedbe difuzijskega testa. Pri difuzijskih antibiogramih se na plošče agarja sicer postavlja diske, ki so od proizvajalca že impregnirani z ustrežno koncentracijo antibiotika. V naši raziskavi pa smo diske pripravili sami: neimpregnirane diske smo namestili na trdno gojišče in nato nanje s pipeto nakapljali po 100 μ L polžje slin. Kolikšen volumen slin je potrebno nanesti na disk, ni standardizirano. Mogoče je bil volumen nakapljane slin prevelik in je bakterije v neposredni okolici diska odplaknilo, kar je bilo po 24-tih urah inkubacije videti kot navidezna cona inhibicije. Zanimivo je, da smo na isti način pripravili diske za difuzijski test tako pri *S. aureus* kot tudi pri *P. aeruginosa*, a je bila 'cona inhibicije' pri kontroli vidna le pri *S. aureus*. Če je bil

razlog za pojav navidezne 'cone inhibicije' pri *S. aureus* način priprave diskov, zakaj potem razlika v rasti bakterij okoli diska s kontrolo med *S. aureus* in *P. aeruginosa*?

Ne glede na nepričakovano cono inhibicije pri kontroli pri sevu bakterije *S. aureus* pa ne moremo zanemariti dejstva, da se je vendarle pojavila cona inhibicije, približno dvakrat večja, tudi pri obeh diskih s polžjo slino. Če od teh dveh con odštejemo 'cono inhibicije' pri kontroli, dobimo korigirani dimenziji cone inhibicije, ki sta še vedno relativno široki – 0,9 in 0,7 mm. Predvidevamo, da široki coni inhibicije pri diskih s slino, ne glede na pojav 'cone inhibicije' tudi pri kontroli, nakazujeta protimikrobno aktivnost polžje sline na sev bakterije *S. aureus*.

Dejstvo, da je bila rast bakterij v conah inhibicije le oslABLJENA in ne popolnoma zavrta, lahko mogoče pripišemo temu, da le nekatere od številnih komponent, ki sestavljajo mukus, delujejo protimikrobno, nekatere druge pa morda lahko služijo bakterijam kot hranilni substrat in imajo s tem protislovni učinek prvim.

Vpliv sline *C. aspersa* na rast bakterij *P. aeruginosa* in *S. aureus* so ugotavljali tudi Pitt in sod. (2015). Rezultati njihove raziskave so pokazali močan protimikrobni učinek polžje sline na več sevov bakterij *P. aeruginosa* in šibak učinek na seve bakterije *S. aureus*. Za razliko od naše raziskave so v difuzijskem testu uporabili razredčeno slino, ki so jo predhodno centrifugirali in za difuzijski test uporabili le supernatant. Podobno poročajo o izrazitejšem protimikrobnem učinku polžje sline na rast bakterij *P. aeruginosa* in šibkejšem učinku na rast *S. aureus* Bortolotti in sod. (2016).

Nasprotno pa Štrancar in sod. (2019) s svojo raziskavo niso potrdili občutljivosti izbranih sevov bakterij *P. aeruginosa* in *S. aureus* na slino polža *C. aspersa*. V difuzijskem testu so uporabili razredčeno slino, pripravljeno iz odmrznjene in sveže sline.

Razlike v izsledkih med raziskovalci je moč razložiti z razlikami v izboru bakterijskih sevov, v protokolih priprave polžje sline in v načinu izvedbe difuzijskega testa.

Vpliv polžje sline na rast bakterij smo ugotavljali tudi z dilucijskim testom. Kot je razvidno na Grafikonih 1-4, je bila rast bakterij, tako sevov *P. aeruginosa* kot sevov *S. aureus*, zavrta ali

zmanjšana, kadar je bila suspenziji bakterij dodana nerazredčena slina.

Zaključimo lahko, da smo z dilucijsko metodo (za seve *P. aeruginosa* in seve *S. aureus*) in delno z difuzijsko metodo (za sev *P. aeruginosa*) deloma potrdili našo prvo hipotezo, da polžja slina zavira rast izbranih sevov bakterije *P. aeruginosa* in sevov bakterije *S. aureus*, vendar je to veljalo le za neredčen pripravek sline.

4.2. Povezanost koncentracije polžje sline in intenzitete rasti bakterij (hipoteza 2)

Z dilucijskim testom smo ugotovili povezanost intenzitete rasti bakterij *P. aeruginosa* in bakterij *S. aureus* s koncentracijo polžje sline, dodane bakterijski suspenziji. Pričakovali bi monotono naraščanje (tj. naraščanje brez občasnega padanja) absorbance oz. koncentracije bakterij s padanjem koncentracije sline. To lahko potrdimo za izbrani sev bakterije *S. aureus*, ki smo ga testirali v prvem dilucijskem testu – najnižja absorbanca je bila pri najvišji koncentraciji sline (tj. pri nerazredčeni slini) in je postopno naraščala s padanjem koncentracije sline od 1:2 do 1:4 in do kontrole brez sline (Grafikon 1 in 2). Nasprotno pa ne moremo potrditi monotonega naraščanja za izbrane seve bakterije *P. aeruginosa*, saj je bila koncentracija bakterij pri dveh razredčinah sline višja kot pri kontroli. Rečemo lahko, da je intenziteta rasti izbranih sevov bakterije *P. aeruginosa* povezana s koncentracijo sline, a z nemonotonim trendom. Zakaj je bila rast bakterij višja pri razredčini sline C2 in C3 kot pri kontroli, ni jasno. Zdi se, da je imela razredčena slina v primerjavi s kontrolo celo spodbujevalni učinek na rast bakterij. Morda so bile pri razredčeni slini rast zavirajoče komponente mukusa v prenizki koncentraciji, da bi lahko učinkovito zavrle rast bakterij, eventualne hranilne substance iz mukusa pa prisotne v tolikšni meri, da so spodbujale rast bakterij, v primerjavi s kontrolo, kjer teh substanc ni bilo.

V drugem dilucijskem testu smo testirali izključno seve bakterije *S. aureus* (Grafikon 3 in 4). Tudi s tem testom lahko potrdimo povezanost med intenziteto rasti sevov bakterije *S. aureus* in koncentracijo polžje sline. Naraščanje absorbance s padanjem koncentracije sline je bilo monotono pri devetih od desetih testiranih sevov. Le pri enem sevu ni videti bistvene razlike v absorbanci med razredčino sline C2 in C3. Rezultati, prikazani v omenjenih dveh grafikonih, kažejo tudi na to, da se različni sevi različno intenzivno odzovejo na prisotnost protimikrobnih učinkovin v tekočem gojišču, saj se pri nekaterih sevih rast bakterij ob padajoči koncentraciji sline povečuje bolj strmo kot pri drugih.

Na osnovi rezultatov dilucijskega testa lahko potrdimo našo drugo hipotezo, da je pri višji koncentraciji polžje sline rast bakterij slabša kot pri nižji, vendar trditev velja le za izbrane seve bakterije *S. aureus*.

4.3. Vpliv polžje sline na tvorbo biofilma sevov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in sevov bakterije *Staphylococcus aureus* (hipoteza 3)

V naši raziskavi smo potrdili vpliv polžje sline na tvorbo biofilma pri izbranih sevih bakterije *P. aeruginosa* in pri izbranih sevih bakterije *S. aureus*. Pri poskusu tvorbe biofilma je bila namreč pri največji koncentraciji polžje sline (nerazredčeni slini) opazna le minimalna obarvanost, kar kaže na zmanjšano tvorbo biofilma. Nasprotno je bila obarvanost intenzivna pri razredčeni slini in pri kontroli, kar kaže na zmanjšan protimikrobni učinek polžje sline (oz. njeno odsotnost pri kontroli) in zato intenzivno tvorbo biofilma.

Znano je, da bakterije v biofilmih pogosto kažejo drugačne lastnosti kot prosto plavajoče bakterije v suspenziji, kot je povečana rezistenca na imunski odziv gostitelja in večja odpornost na antimikrobno zdravljenje (Costerton, 1999). Glede na to bi lahko v naši raziskavi pričakovali tudi drugačen, tj. zmanjšan protimikrobni učinek polžje sline na tvorbo biofilma, kot smo ga dejansko opazili.

Pri pregledu literature nismo našli raziskav, ki bi proučevale vpliv polžje sline na tvorbo biofilma, zato naših rezultatov ne moremo primerjati z rezultati drugih raziskovalcev.

Na osnovi naših rezultatov poskusa tvorbe biofilma lahko potrdimo tretjo hipotezo, ki pravi, da polžja slina zavira tvorbo biofilma sevov bakterije *P. aeruginosa* in sevov bakterije *S. aureus*, če zanemarimo zmanjševanje rasti bakterij pred testiranjem tvorbe biofilma.

4.4.Povezanost koncentracije polžje sline in intenzitete tvorbe biofilma (hipoteza 4)

S spektrofotometrično analizo pri poskusu tvorbe biofilma smo kvantitativno ovrednotili povezanost koncentracije polžje sline in intenzitete tvorbe biofilma, izražene z absorbanco. Rezultati analize so se razlikovali med bakterijama *P. aeruginosa* in *S. aureus*, pa tudi med posameznimi sevi bakterije *S. aureus*. Za tri izbrane seve bakterije *P. aeruginosa* ne moremo potrditi povezanosti med koncentracijo polžje sline in absorbanco (Grafikon 5). Pri nerazredčeni slini je sicer vidna minimalna tvorba biofilma, pri drugih koncentracijah pa nekoliko večja, a intenziteta tvorbe biofilma se z zmanjševanjem koncentracije sline ne spreminja. Razlog za to ni jasen.

Pri edinem sevu bakterije *S. aureus*, ki je bil testiran v prvem poskusu tvorbe biofilma, pa je videti pravilno, monotono naraščanje absorbance ob zmanjševanju koncentracije sline (Grafikon 5). Pri drugem poskusu tvorbe biofilma, kjer smo testirali deset sevov bakterije *S. aureus*, lahko potrdimo monotono naraščanje absorbance oz. intenzitete tvorbe biofilma le pri štirih sevih.

Razlog za odsotnost koncentracijske odvisnosti protimikrobne učinkovitosti polžje sline pri večini sevov je mogoče v načinu izvedbe poskusa. Poskus tvorbe biofilma smo namreč izvedli kot nadaljevanje poskusa zaviranja rasti bakterij v tekočem gojišču. Možno je, da bi dobili v poskusu tvorbe biofilma drugačne rezultate, če bi pred dodajanjem sline najprej počakali, da se bakterije čez noč namnožijo in jih dali v stresalnik, da ne bi tvorile biofilma; šele drugi dan bi dodali slino in jih nato dali v inkubator brez stresa, da bi lahko preverili delovanje sline na tvorbo biofilma.

Na osnovi rezultatov spektrofotometrične analize pri poskusu tvorbe biofilma lahko le delno potrdimo našo četrto hipotezo, ki pravi, da je tvorba biofilma pri višji koncentraciji polžje sline slabša kot pri nižji. Tako za seve bakterije *P. aeruginosa* kot tudi seve bakterije *S. aureus* lahko namreč potrdimo samo, da je tvorba biofilma slabša pri nerazredčeni slini glede na vse druge koncentracije sline, ne moremo pa potrditi prave, graduirane koncentracijske odvisnosti protimikrobne učinkovitosti polžje sline na tvorbo biofilma, z izjemo nekaj sevov bakterije *S. aureus*.

4.5. Omejitve raziskave

Naša raziskava ima nekaj omejitev. Za raziskavo smo uporabili samo en vzorec slin. Ta se lahko razlikuje od polžje farme do polžje farne, lahko je odvisna tudi od letnega časa. Zanimiva bi bila raziskava med različnimi slinami, glede na zgoraj omenjene dejavnike.

Problem je tudi (ne)standardizacija polžje slin. Trenutno ni standardiziranega protokola priprave oz. obdelave slin za ugotavljanje njene protimikrobne učinkovitosti in standardiziranega protokola izvedbe posameznih testov. Zato je težje zagotavljati reproducibilnost rezultatov in rezultate primerjati med raziskovalnimi skupinami.

V raziskavi smo uporabili le en sev bakterije *P. aeruginosa* in en sev bakterije *S. aureus* pri difuzijskim testu, ter 3 seve bakterije *P. aeruginosa* in deset sevov bakterije *S. aureus* pri dilucijskem testu in pri poskusu tvorbe biofilma. Rezultate raziskave lahko interpretiramo samo za seve, izbrane v raziskavi.

Vsak poskus, tj. difuzijski test, dilucijski test in test tvorbe biofilma, smo izvedli le enkrat za vsak sev. Da bi lahko potrdili reproducibilnost rezultatov in da bi lahko rezultate statistično ovrednotili, bi bilo potrebno poskuse ponoviti večkrat.

4.6. Možnosti nadaljnjih raziskav

Naša raziskava je pokazala protimikrobno delovanje sline polža vrste *C. aspersa* na izbrane seve bakterij *P. aeruginosa* in izbrane seve bakterije *S. aureus*. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno preveriti zaviralno delovanje polžje sline tudi pri drugih sevih proučevanih bakterij. Glede na izsledke pričujoče raziskave je namreč pričakovati različno protimikrobno učinkovitost polžje sline pri različnih sevih. Poleg tega bi bilo dobro posamezne poskuse ponoviti večkrat, zaradi potrditve reproducibilnosti rezultatov in možnosti njihove statistične interpretacije, kot smo že omenili v prejšnjem poglavju.

V nadaljevanju bi bilo smiselno preveriti zaviralni vpliv sline na rast bakterij, pridobljene tudi iz drugih vrst polžev. Znano je namreč, da sestava polžje sline variira med posameznimi vrstami (Denny, 1983), zato je pričakovati različne in različno intenzivne protimikrobne učinke pri različnih vrstah polžje sline.

Polžja slina je sestavljena iz številnih znanih in neznanih komponent, nekatere od njih imajo dokazane protimikrobne lastnosti (Iguchi in sod., 1982; Cilia in Fratini, 2018; Otsuka-Fuchino in sod., 1992). Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo potrebno natančneje opredeliti kompleksno biokemijsko sestavo polžje sline in ugotoviti, katere so glavne bioaktivne molekule, ki so sposobne zavirati rast bakterij, kar bi imelo poseben pomen pri iskanju alternativnih možnosti zdravljenja okužb z bakterijami z izraženo odpornostjo na antibiotike.

5 DRUŽBENA ODGOVORNOST V PROGRAMU MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA

Družbena odgovornost je temelj napredka človeštva, ki poudarja tako odgovornost do soljudi kot do narave. Zato si v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano z zaupanja vrednimi laboratorijskimi storitvami in strokovno podporo prizadevajo k varovanju zdravja posameznika in skupnosti, varovanju okolja in varnosti hrane. Njihove temeljne vrednote so v skladu z osnovnimi načeli družbene odgovornosti, saj v organizaciji poudarjajo pomembnost strokovnosti na vseh področjih njihovih dejavnosti, kjer dosegajo zahtevane standarde znanja, ki jim omogočajo učinkovit odziv na nove izzive javnega zdravja, delujejo neodvisno in nepristransko pri oblikovanju strokovnih mnenj, zavedajo se nujnosti biti odgovoren, kot osebne drže posameznika tako v odnosu do sodelavcev in kolegov v drugih inštitucijah, uporabnikov storitev, kot tudi do premoženja in ugleda zavoda. Prizadevajo si za točnost, natančnost, pravilnost in pravočasnost, ki so temelj zanesljivosti in s tem zaupanja uporabnikov njihovih storitev (Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2020).

V raziskovalni nalogi smo se usmerili na področje medicine, kjer smo preizkušali novo metodo zdravljenja bakterijskih okužb kroničnih ran. Zdravljenje kroničnih ran predstavlja tako breme za bolnika kot tudi finančno obremenitev zdravstva. Posebej zahtevno je zdravljenje kroničnih ran, ki jih spremljajo okužbe s *S. aureus* in s *P. aeruginosa*, saj te bakterije pogosto razvijejo odpornost proti antibiotikom. Iskanje novih metod zdravljenja ran na osnovi naravnih učinkovin, ki ne povzročajo odpornosti bakterij, je v zadnjem času hitro razvijajoče se področje. Preverjali smo učinkovitost protimikrobne aktivnosti polžje slin kot naravne učinkovine. Z znanstvenim pristopom k celjenju kroničnih ran in z novimi metodami zdravljenja bakterijskih okužb, ki temeljijo na uporabi naravnih učinkovin, je mogoče izboljšati in skrajšati okrevanje bolnikov s kroničnimi ranami ter hkrati zagotoviti ekonomsko učinkovitejši pristop zdravljenja kroničnih ran.

6 ZAKLJUČKI

Naravne učinkovine postajajo vse pomembnejša alternativa pri nadzoru okužb zaradi naraščajoče rezistence bakterij na antibiotike. V zadnjem času se odkriva in raziskuje vse več naravnih učinkovin s protimikrobnimi učinki. Ena takih je polžja slina, za katero lahko v prihodnje pričakujemo uporabo tudi na področju medicine, predvsem pri oskrbi ran zaradi njene dokazane protimikrobne aktivnosti in vpliva na pospešeno celjenje.

V raziskovalni nalogi smo ugotovili, da polžja slina zaviralno vpliva na tvorbo biofilma in na rast bakterij, izoliranih iz kroničnih ran. Ugotovili smo močnejši protimikrobni vpliv sline na izbrane seve bakterije *S. aureus* kot na izbrane seve bakterije *P. aeruginosa*.

Čeprav je zaviralni vpliv polžje sline na rast bakterij šibek, ima slina v prihodnosti potencial kot alternativna terapija pri oskrbi kroničnih ran.

7 PRILOGE

Tabela 5: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 540 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.

	Kontrola – brez bakterij	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ZZV 17-8418	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ZZV 17-8416	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ZZV 17-8424	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ZZV 17- 8417
Razredčina sline C1	0,043	0,043	0,0465	0,0455	0,079
Razredčina sline C2	0,046	1,513	1,554	1,674	0,4225
Razredčina sline C3	0,045	1,476	1,48	1,705	0,8075
Kontrola – brez sline	0,046	1,1385	1,1495	1,0805	0,8925

Tabela 6: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 620 nm za prvi poskus testiranja z dilucijsko metodo.

	Kontrola – brez bakterij	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZZV 17-8418	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZZV 17-8416	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ZZV 17-8424	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8417
Razredčina sline C1	0,038	0,0385	0,0415	0,041	0,0725
Razredčina sline C2	0,04	1,396	1,461	1,576	0,312
Razredčina sline C3	0,038	1,3535	1,352	1,5825	0,5735
Kontrola – brez sline	0,038	0,979	0,985	0,867	0,694

Tabela 7: Povprečne izmerjene vrednosti absorpcije pri 540 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.

	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8432	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8435	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8439	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8415	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8430
Razredčina sline C1	0,0395	0,155	0,151	0,1665	0,1955	0,0815
Razredčina sline C2	0,0405	0,2155	0,2095	0,202	0,2365	0,246
Razredčina sline C3	0,052	0,2155	0,2715	0,362	0,328	0,3485
Kontrola – brez sline	0,042	0,299	0,3115	0,4445	0,442	0,509
Razredčina sline C1	0,0395	0,1575	0,1315	0,1465	0,166	0,078
Razredčina sline C2	0,0405	0,203	0,1765	0,188	0,185	0,2195
Razredčina sline C3	0,052	0,2965	0,269	0,2315	0,2395	0,2845
Kontrola – brez sline	0,042	0,543	0,497	0,3435	0,3575	0,5645
	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8417	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8419	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8428	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8422	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8431

Tabela 8: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 620 nm za drugi poskus testiranja z dilucijsko metodo.

	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8432	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8435	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8439	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8415	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8430
Razredčina sline C1	0,0455	0,188	0,1755	0,2055	0,23	0,0935
Razredčina sline C2	0,0465	0,272	0,253	0,2565	0,287	0,3015
Razredčina sline C3	0,062	0,2625	0,3295	0,443	0,4	0,424
Kontrola – brez sline	0,049	0,338	0,365	0,5265	0,508	0,6125
Razredčina sline C1	0,0455	0,185	0,1545	0,1735	0,1965	0,0885
Razredčina sline C2	0,0465	0,247	0,213	0,227	0,2265	0,2645
Razredčina sline C3	0,062	0,3235	0,2905	0,2755	0,2935	0,322
Kontrola – brez sline	0,049	0,6115	0,5765	0,392	0,4115	0,632
	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8417	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8419	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8428	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8422	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8431

Tabela 9: Povprečne izmerjene vrednosti absorpcije pri 570 nm za prvi poskus testiranja tvorbe biofilma.

	Kontrola	Povprečje za 17-8418	Povprečje za 17-8416	Povprečje za 17-8424	Povprečje za 17-8417
Razredčina sline C1	0,049	0,051	0,0755	0,0445	0,056
Razredčina sline C2	0,044	0,183	0,149	0,1265	0,382
Razredčina sline C3	0,043	0,116	0,137	0,204	0,5815
Kontrola – brez sline	0,046	0,186	0,1215	0,1185	0,6495

Tabela 10: Povprečne izmerjene vrednosti absorbcije pri 570 nm za drugi poskus testiranja tvorbe biofilma.

	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8432	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8435	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8439	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8415	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8430
Razredčina sline C1	0,049	0,113	0,0655	0,0635	0,068	0,0605
Razredčina sline C2	0,049	0,192	0,092	0,0825	0,06	0,073
Razredčina sline C3	0,046	0,388	0,2875	0,14	0,0835	0,0895
Kontrola – brez sline	0,0485	0,1215	0,136	0,2675	0,1425	0,1095
Razredčina sline C1	0,049	0,122	0,331	0,09	0,0665	0,1915
Razredčina sline C2	0,049	0,5645	0,6885	0,351	0,301	0,1275
Razredčina sline C3	0,046	0,409	0,639	0,531	0,311	0,1705
Kontrola – brez sline	0,0485	0,701	0,491	0,7215	0,6565	0,6715
	Kontrola – brez bakterij	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8417	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8419	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8428	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8422	<i>Staphylococcus aureus</i> ZZV 17-8431

8 LITERATURA IN VIRI

LITERATURA:

- Adikwu, M. U. in Alozie, B. U. *Application of snail mucin dispersed in detarium gum gel in wound healing*. Sci Res Essays 2007; 2: 195.
- Applebaum, P. C. *Antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae: An overview*. Clin Infect Dis 1992; 15: 77-83.
- Bonnemain, B. *Helix and drugs: snails for Western health care from antiquity to the present*. Evid-Based Complement Alternat Med 2005; 2: 25-8.
- Bortolotti, D. in sod. *Letter to the Editor: Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail Helix aspersa*. British Journal of Biomedical Science, 2016; 73(1), pp. 49–50.
- Campion, M. *The structure and function of the cutaneous glands in Helix aspersa*. Quart J Microsc Sci 1961; 102: 195-216.
- Cilia, G. in Fratini, F. *Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus*. J Complement Integr 2018; 15: 1-10.
- Costerton, J.W. in sod. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999; 284:1318–1322.
- Costerton, J. W. *Bacterial biofilms in nature and disease*. Ann Rev Microbiol, 1987; 41: 435-464.
- Denny, M. *Molecular biomechanics of molluscan mucus secretions. V: Metabolic biochemistry and molecular biomechanics*. Amsterdam: Elsevier, 1983; 431-465.
- Eming, S. A. in sod. *Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation*. Sci Transl Med 2014; 6: 1-36.
- Etim, L., Aleruchi, C., Obande, G. *Antibacterial properties of snail mucus on bacteria isolated from patients with wound infection*. Br Microbiol Res J 2016; 11: 1-9.

- Garms, H. in sod. *Živalstvo Evrope: priročnik za določanje živalskih vrst*. Ljubljana: Mladinska knjiga, 1981.
- Gjødsebøl, K. in sod. *Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study*. Int Wound J 2006; 3: 225-231.
- Iguchi, S. M., Aikawa, T., Matsumoto, J. J. *Antibacterial activity of snail mucus mucin*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1982; 72: 571-4.
- Ihan, A. in sod. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002.
- International Wound Infection Institute (IWII). *Wound infection in clinical practice*. Wounds International 2016; 1-17.
- James, G. A. in sod. *Biofilms in chronic wounds*. Wound Repair Regen 2008; 16: 37-44.
- Lazarus, G. S. in sod. *Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing*. Wound Repair and Regen 1994; 2: 165-170.
- Long, S. S. in sod. (ur.). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 5. izd. Elsevier, 2018.
- Nantarat, N. in sod. *Antibacterial Activity of the Mucus Extract from the Giant African Snail (*Lissachatina fulica*) and Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) Against Pathogenic Bacteria Causing Skin Diseases*. Trop Nat Hist 2019; 19: 103-112.
- Newar, J. in Ghatak, A. *Studies on the adhesive property of snail adhesive mucus*. Langmuir 2015; 31: 12155-12160.
- NLZOH. *Produkcija biofilma – Staphylococcus aureus*. Maribor: Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, 2014.
- Otsuka-Fuchino, H. in sod. *Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail*. CompBiochem Physiol 1992; 101: 607-613.
- Pitt, S. J. in sod. *Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa**. Brit J Biomed Sci 2015; 72: 174-181.

Rupnik, M. in sod. *Splošna mikrobiologija: navodila za vaje*. Ljubljana: Študentska založba, 2001. ISBN 961-6356-36-4.

Shallcross, L. J. in Davies, S. C. *The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance*. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 2883-5.

Slovenski medicinski slovar. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2012.

Štrancar, N. in sod. *Chemical and Antimicrobial Analysis of Mucus from Helix aspersa and Helix pomatia Snail Species*. Roskilde University, 2019.

Tomažič, J. in sod. *Infekcijske bolezni*. 1. izd. Ljubljana: Združenje za slovensko infektologijo, Slovensko zdravniško društvo, 2014. ISBN 978-961-6956-09-3.

Trapella, C. in sod. *HelixComplex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and pro-migration effects on mammalian fibroblasts*. Sci Rep 2018; 8: 17665.

Tsoutsos, D. in sod. *The efficacy of Helix aspersa Müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols*. J Dermatolog Treat 2009; 20: 219-22.

VIRI:

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano [online]. [Citirano 23. januar 2020]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.nlzoh.si/o-nas/poslanstvo-vizija-vrednote>.

Drorganic.co.uk [online]. [Citirano 2. februar 2020]. Dostopno na spletnem naslovu: <https://drorganic.co.uk/collections/organic-snail-gel-skincare-products>.