

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

Primerjava antimikrobne učinkovitosti evgenola, indol-3-karbinola in karvona s triklosanom

Raziskovalno področje:

zdravstvo

Raziskovalna naloga

Avtor: ANA BRENCE

Mentor: ZDENKA KEUC, TAMARA ŠIŠKO

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 163

Mesto: 1

Priznanje: zlato

PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, februar 2019

» Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

Primerjava antimikrobne učinkovitosti evgenola, indol-3-karbinola in karvona s triklosanom

Raziskovalno področje:

zdravstvo

Raziskovalna naloga



PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, februar 2019

VSEBINA

POVZETEK.....	10
ZAHVALA.....	11
1 UVOD.....	12
1.1 Namen naloge.....	15
1.2 Raziskovalno vprašanje	16
1.3 Hipoteze	16
1.3.1 Razlage hipotez	16
1.4 Metode dela	18
2 PREGLED LITERATURE	19
2.1 Okužbe povezane z zdravstveno oskrbo	19
2.1.1 Problematika biofilmov	24
2.2 sterilizacija.....	24
2.3 Antimikrobna učinkovitost evgenola, indol-3-karbinola in karvona	25
2.4 Antimikrobne površine	26
2.4.1 Anorganski antimikrobni materiali	28
2.5 Triklosan	31
2.6 Protokol protimikrobnega testa površinske učinkovitosti	34
3 PRAKTIČNI DEL	35
3.1 Materiali	37
3.1.1 Kemikalije	37
3.1.2 Laboratorijska oprema.....	37
3.2 Difuzijski antibiogram.....	38
3.2.1 Opis mikroorganizmov uporabljenih v raziskavi	39
3.2.2 Priprava testnih organizmov	41
3.2.3 Priprava difuzijskih antibiogramov	41

3.2.4 Priprava antibiogramov s sterilnimi nerjavnimi površinami.....	42
3.3 Antioksidativna aktivnost preiskovanih snovi	42
4 REZULTATI TESTIRANJA.....	43
4.1 Antioksidacijska učinkovitost preiskovanih snovi	43
4.2 Antioksidacijska učinkovitost triklosana	45
4.3 Antimikrobna učinkovitost preiskovanih snovi.....	47
4.3.1 Antimikrobna učinkovitost za glive kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	47
4.3.2 Antimikrobna učinkovitost za <i>E. coli</i>	49
4.3.3 Antimikrobna učinkovitost na <i>B. cereus</i>	51
4.4 Antimikrobna učinkovitost bakra in jekla z nanešenimi aktivnimi učinkovinami.....	54
5 RAZPRAVA	56
5.1 Antimikrobna učinkovitost preiskovanih snovi.....	56
5.2 Antimikrobna učinkovitost bakra in nerjavnega jekla z nanešenimi aktivnimi učinkovinami	58
5.3 Antioksidacijska učinkovitost preiskovanih snovi in triklosana	59
6 ZAKLJUČKI.....	59
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	61
8 UPORABLJENA LITERATURA.....	62
8.1 Članki	62
8.2 Knjige	66
8.3 Druga gradiva	66

Seznam preglednic

Preglednica 1. Produkti, ki vsebujejo triclosan (Glasser, 2004)	32
Preglednica 2. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije) za 0,5% in koncentracije I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona).....	44

Preglednica 3. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije) 5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona).....	45
Preglednica 4. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS izražene v odstotni vrednosti inhibicije.....	46
Preglednica 5. Rezultati protimikrobne učinkovitosti preiskanih snovi na kulturo <i>S. cerevisiae</i>	47
Preglednica 6. Rezultati protimikrobne učinkovitosti preiskanih snovi na kulturo <i>S. cerevisiae</i>	47
Preglednica 7. Protimikrobna učinkovitost 0,10 %, 0,25 % in 0,50 % TCS na <i>S. Cerevisiae</i>	48
Preglednica 8. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 0.5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo <i>E. coli</i>	49
Preglednica 9. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo <i>E. coli</i>	49
Preglednica 10. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% koncentracij TCS na <i>E. coli</i>	50
Preglednica 11. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 0,5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo <i>B. cereus</i>	51
Preglednica 12. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 0,5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo <i>B. cereus</i>	51
Preglednica 13. Rezultati protimikrobne učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% koncentracij TCS na <i>B. Cereus</i>	53
Preglednica 14. Rezultati protimikrobne učinkovitosti bakra (Cu) in nerjavnega jekla (SS) z nanešenimi (0,5% in 5%) aktivnimi učinkovinami na izbrane kulture.....	54

Seznam slik

Slika 1. Delež metilicilina-odpornega <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) izoliran iz okužene krvi, Evropa, 2007 (Pantost in Venditti, 2009).....	13
Slika 2. Strukturna formula triklosana (Boyce in Pittet, 2002)	15
Slika 3. Strukturna formula evgenola (Jadhav s sod., 2004)	17
Slika 4. Strukturna formula I3C (Sung, 2007).....	17
Slika 5. Strukturni formuli obeh enantiomerov karvona (Laska s sod., 1999).....	18
Slika 6. Skinman Soft N (ECO LAB, 2018).....	21
Slika 7. Opazovana razširjenost preprečevanja okužb s 95% intervalom zaupanja v letih 2011-2012 (ECDC, 2018)	22
Slika 8. Prevalenca okužb z bakterijami, odpornimi na antibiotike v EU in EEA, 2015 (ECDC, 2015) ...	23

Slika 9. Razvoj biofilma na katetru (Marshall, 1992)	24
Slika 10. Delovanje antimikrobnih površin (Singha s sod., 2016)	27
Slika 11. Preživetje methicillin-odpornih <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) na treh bakrenih zlitinah: C19700 (99% Cu), C24000 (80% Cu), C77000 (55% Cu) in nerjavnem jeklu (S304) pri sobni temperaturi (Noyce s sod., 2010)	28
Slika 12. Opazovanje bakterijskih kolonij <i>Escherichia coli</i> v času 24 h ur v kontaktu z bakrovimi ioni in PVC (Schoenen in Schlomer, 1989)	29
Slika 13. Antibakterioidno delovanje bakra; (A) baker se raztopi na površini in povzroči poškodbe bakterijske celice; (B) zaradi poškodb celične membrane, pride do izgube membranskega potenciala in citoplazemske vsebnosti (C) bakrovi ioni stimulirajo razvoj reaktivnih kisikovih oblik, ki povzročajo nadaljnje poškodbe celic in pripeljejo do degradacije (D) genoma in plazmidne DNA (Grass s sod., 2011)	29
Slika 14. Uporaba bakra na bolnišničnih posteljah (BRC CREW, 2014)	29
Slika 15. Življenjska doba bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> na izbranih bakrovih zlitinah, srebru in nerjavnem jeklu (Mikolay s sod. (2010))	30
Slika 16. Učinkovitost antimikrobnih nerjavnih površin pri zatiranju bakterij, plesni in kvasovk (Maxwell in Gerba, 2014)	31
Slika 17. Delovno okolje (lasten vir)	38
Slika 18. Priprava gojišč (STEMforYouth, 2018)	41
Slika 19. Primer metode antimikrobnega testa s kovino (Sadri, 2017)	42
Slika 20. Delovanje radikala DPPH (CHIMACTIV, 2016)	43
Slika 21. Rezultati vzorcev I3C, evgenola, karvona in mešanice I3C, evgenola in karvona ter »slepe proba« po 10 min (lasten vir)	44
Slika 22. Rezultati vzorcev 0,10%, 0,25% in 0,5% TCS ter »slepa proba« po koncu testiranja (po 10 min) (lasten vir)	46
Slika 23. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice (M) na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 24. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 0,5% I3C, na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 25. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 26. Antimikrobna učinkovitost 5% in 0,5% evgenola (E) na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 27. Antimikrobna učinkovitost negativnih kontrol na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 28. Antimikrobna učinkovitost antibiotikov (Chloramphenicol (PK 1) in Streptomycin (PK 2)) na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	48
Slika 29. Antimikrobna učinkovitost 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	49

Slika 30. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice učinkovin (M) I3C, evgenola in karvona na <i>E. coli</i> (lasten vir).....	50
Slika 31. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% I3C na <i>E. coli</i> (lasten vir).....	50
Slika 32. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na <i>E. coli</i> (lasten vir).....	50
Slika 33. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% evgenola (E) na <i>E. coli</i> (lasten vir)	50
Slika 34. Negativna kontrola na <i>E. coli</i> (lasten vir)	50
Slika 35. Pozitivna kontrola z antibiotikoma Chloramphenicol (PK 1) in Streptomycin (PK 2) na <i>E. coli</i> (lasten vir)	50
Slika 36. Antimikrobna učinkovitost TCS (pri koncentracijah 0,10%, 0,25% in 0,50%) na <i>E. coli</i> (lasten vir)	51
Slika 37. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice (M) I3C, evgenola in karvona na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	52
Slika 38. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% I3C na <i>B. cereus</i> (lasten vir).....	52
Slika 39. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	52
Slika 40. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% evgenola (E) na <i>B. cereus</i> (lasten vir).....	52
Slika 41. Negativni kontroli na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	52
Slika 42. Pozitivni kontroli z antibiotikoma Chloramphenicol (PK1) in Streptomycin (PK2) na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	52
Slika 43. Antimikrobna učinkovitost propan-2-ola na <i>E.coli</i> in <i>B. cereus</i> (lasten vir)	52
Slika 44. Antimikrobna učinkovitost 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	53
Slika 45. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5% raztopino evgenola in 0,10% raztopino TCS, na <i>E. coli</i> (lasten vir).....	54
Slika 46. Negativni kontroli (NK) z bakrom in nerjavnim jeklom, na <i>E. coli</i> (lasten vir)	54
Slika 47. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5% raztopino evgenola (E) in 0,10% raztopino TCS, na <i>S. cerevisiae</i> (lasten vir)	55
Slika 48. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5% raztopino evgenola in 0,10% raztopino TCS ter negativna kontrola nerjavnega jekla, na <i>B. cereus</i> (lasten vir)	55
Slika 49. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 0,10% raztopino TCS in v 5% raztopino eugenola (E), na <i>E.coli</i> (lasten vir)	56
Slika 50. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 0,10% raztopino TCS in v 5% raztopino eugenola, ter negativna kontrola (NK) na <i>E. coli</i> (lasten vir)	56
Slika 51. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 5% raztopino eugenola in v 0,10% raztopino TCS, na <i>E. coli</i> (lasten vir)	56

Slika 52. Sidranje estra evgenola v encimsko mesto lipooksigenaze (Sadeghian s sod., 2008).....	57
Slika 53. Kopolimer evgenola in metakrilata (Fajrin s sod., 2018).....	60

Seznam grafov

Graf 1. Znižanje bolnišničnih okužb z MRSA v Veliki Britaniji (Otter, 2015).	13
Graf 2. Stopnja odpornosti na meticilin pri invazivnih okužbah <i>S. aureus</i> (EARS-Net, 2014).	14
Graf 3. Število novih antibiotikov na trgu po letih (Busch in Guidi, 2017)	15
Graf 4. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 0,5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)	44
Graf 5. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)	45
Graf 6. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 0,10%, 0,25% in 0,5% raztopin triklosana	46
Graf 7. Rezultati premerov inhibicijskih con 5,0 % koncentracij učinkovin, negativne ter pozitivne kontrole in 0,10%, 0,25% ter 0,50% koncentracij triklosana	53
Graf 8. Rezultati premerov inhibicijskih con 0,5 % koncentracij učinkovin, negativne ter pozitivne kontrole in 0,10%, 0,25% ter 0,50% koncentracij triklosana	54
Graf 9. Rezultati meritev antimikrobne učinkovitosti bakra (Cu) in nerjavnega jekla (SS) samih, in v kombinaciji z 0,10% TCS ter 5% evgenolom.	56

Seznam organigramov

Organigram 1. Poti prenosa mikroorganizmov v zdravstvenem okolju (Petti s sod., 2013).....	20
Organigram 2. Krog bolnišničnih okužb in vloga antimikrobnih površin (Page s sod., 2009)	27
Organigram 3. Potek praktičnega dela raziskave.....	36

Okrajšave uporabljene v tej raziskavi

BO	bolnišnične okužbe
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization

TCS	Tryptone Sodium Chloride (Triclosan)
OPZ	Okužbe, povezane z zdravstveno oskrbo
PZ	protimikrobna zdravila
BAC	benzalkonijev klorid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
EEA	European Economic Area
EU	European Union
HAI	Health associated infections
EHEC	enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>
EPS	ekspandirani polistiren
VSE	vancomycin sensitivna <i>Enterococci</i>
VRE	vancomycin rezistentna <i>Enterococci</i>
MREC	multiantibiotično rezistentna <i>Escherichia coli</i>
MRPA	multiantibiotično rezistentna <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
I3C	indol-3-karbinol
CBD	kanabidiol
THC	tetrahidrokanabinol
PVC	polivinil klorid
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ASTM International	American Society for Testing and Materials
ENR	enoil-acil protein reduktaza
ETEC	enterotoksigenirani sev E.coli
EPEC	enteropatogeni sev E.coli
HUS	hemolitični uremični sindrom
EIEC	enteroinvazivni sev E. coli
EAEC	enteroadherentni sev E. coli
Cu	baker
SS	stainless steel

POVZETEK

Bolnišnične okužbe (BO) predstavljajo največji delež okužb, povezanih z zdravstvom in veljajo za enega izmed večjih javno zdravstvenih problemov v svetu, Evropi in Sloveniji. Trenutno se proti BO borimo predvsem z večjo higieno rok ter z uporabo biocidov, ki pa imajo lahko nevarne učinke tako na paciente, kot tudi na zdravstvene delavce. V raziskovalni nalogi smo iskali manj nevarno alternativo, ki so jo predstavljale tri naravne učinkovine in sicer, evgenol, indol-3-karbinol in karvon. Njihovo antimikrobno in antioksidativno učinkovitost smo primerjali s trenutno zelo razširjenim biocidom triklosanom. Ugotovili smo, da ima evgenol primerljivo antimikrobno učinkovitost kot triklosan, poleg tega pa je še izjemno močan antioksidant. V nalogi smo preučevali učinek dveh koncentracij evgenola in sicer 0,5% ter 5,0% (posamično in v mešanici z karvonom in I3C), ter ugotovili, da evgenol že v koncentraciji 0,5% lahko predstavlja učinkovito antimikrobno zaščito tudi na nerjavnih površinah jekla, prav tako pa poveča antimikrobni učinek bakra. Zaradi intenzivnega vonja evgenola ter njegove zmožnosti inhibicije encimov, predlagamo, da se evgenol kot antimikrobno sredstvo preuči v obliki ustreznega polimernega nanosa, ki bo preprečil stik s pacientom obenem pa onemogočil rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

Število besed: 185

ZAHVALA

Predvsem bi se rada zahvalila mentoricama za podporo in usmerjanje v celotnem poteku raziskovalne naloge. Zahvaljujem se jima za pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju in teoretičnemu delu, pri iskanju literature in predstavitvi rezultatov. Zahvaljujem se laborantki, ki je pomagala pri pripravi kemikalij za eksperimentalno delo. Prav tako se zahvaljujem šoli, ki je poskrbela za opremo, kemikalije in prostor za eksperimentalno delo. Zahvaljujem se tudi svoji družini, ki me je ves čas podpirala pri raziskovalnem delu.

1 UVOD

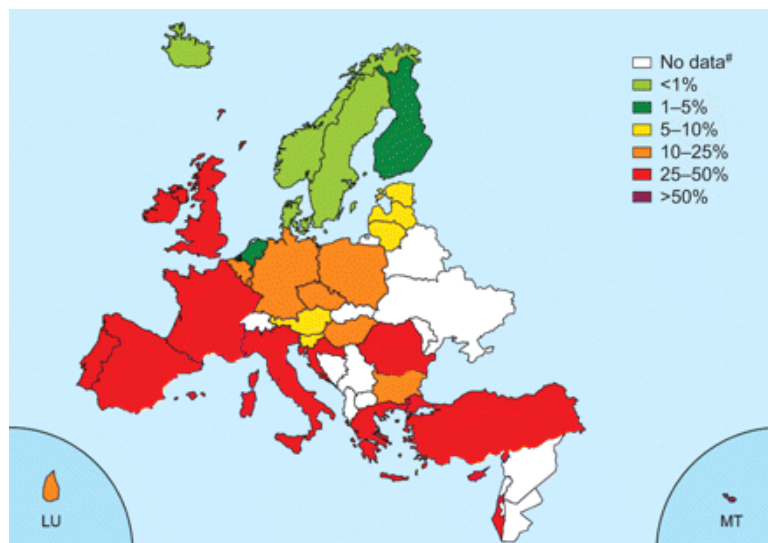
Bolnišnična okužba (v nadaljevanju BO) je okužba, ki nastane pri bolniku v povezavi z izvajanjem zdravstvene dejavnosti in bolnik ni bil v inkubaciji za to bolezen že pred tem (Kramar, 2013). Nastane zaradi izpostavljenosti bolnika postopkom diagnostike, zdravljenja, zdravstvene nege in rehabilitacije v bolnišnicah. Bolnišnične okužbe veljajo za enega večjih javno zdravstvenih problemov v svetu, Evropi in tudi v Sloveniji (NIJZ, 2015). Zadnja slovenska nacionalna raziskava¹, ki je bila narejena na tem področju (2011)² je pokazala, da je bilo na dan raziskave med vsemi bolniki v slovenskih bolnišnicah 6,4% pacientov, ki so imeli BO ali so bili še vedno na zdravljenju zaradi nje (IVZ, 2010). Najpogostejše BO so bile okužbe sečil (19,4%), dihal (18,9%), okužbe kirurških ran (16,7%) in okužbe krvi (8,8%). Povzročitelj okužb je bil uspešno identificiran v 56% (Klavs s sod., 2013). Med njimi je bila na prvem mestu *E. coli*, sledita *Enterococcus spp.* in *E. aeruginosa* (Kolman s sod., 2013)³.

Med bolnišničnimi okužbami je najbolj znana okužba z MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), ki velja za prototip multi-rezistentnih bolnišničnih patogenov. Ti povzročajo okužbe pri bolnikih z visokim tveganjem (Pantost in Venditti, 2009). Kolikšna je razširjenost tega patogena v Evropi in Turčiji vidimo na sliki 1.

¹ Tretja slovenska nacionalna presečna raziskava bolnišničnih okužb.

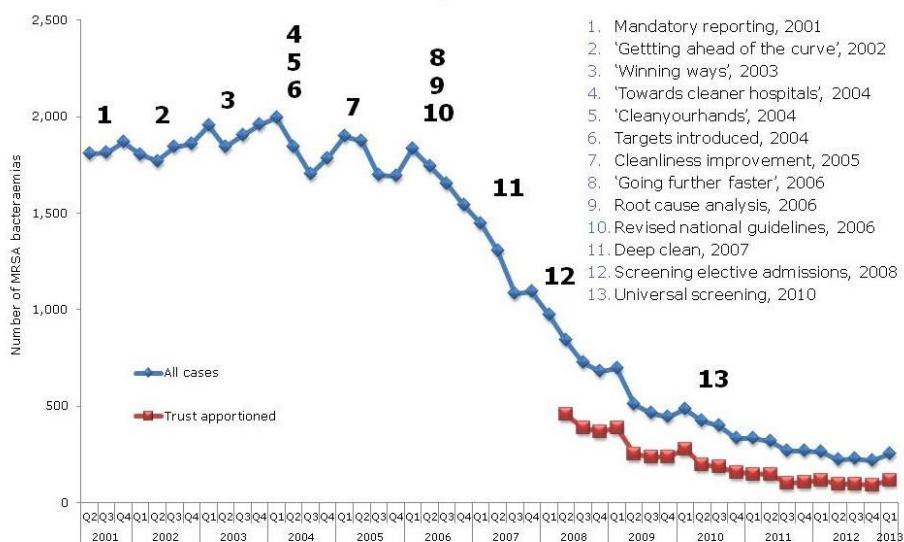
² Raziskava je potekala od maja do novembra 2011 (opomba avtorice).

³ Primerjava z Evropo pokaže, da se Slovenija glede BO giblje v evropskem poprečju; na dan vseevropske raziskave v letu 2011 je v povprečju 6,0% bolnikov imelo BO ali so bili še vedno na zdravljenju zaradi nje (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).



Slika 1. Delež meticilin-odpornega *Staphylococcus aureus* (MRSA) izoliran iz okužene krvi, Evropa, 2007 (Pantost in Venditti, 2009).

MRSA ima izjemno prilagodljivost, tako v smislu pridobivanja novih virulentnih lastnosti kot determinant odpornosti na antibiotike. Predstavlja najpomembnejši vzrok za okužbe v dializnih centrih. Odkrita je bila tudi pri hišnih živalih in pri živalih namenjeni prehrani ljudi (Wertheim s sod., 2005). MRSA in drugih bolnišničnih okužb ni mogoče popolnoma preprečiti, lahko pa uspešno znižamo njihovo pogostost⁴. Dokaz za to so Angleži, ki so okužbe od 2001 do 2013 uspeli znižati za več kot 90% (Otter, 2015).

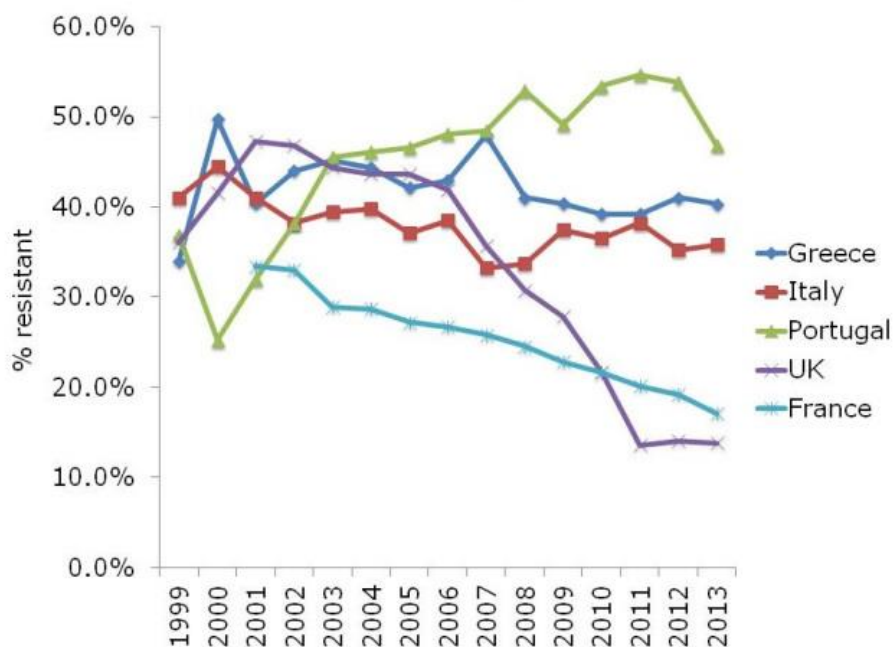


Graf 1. Znižanje bolnišničnih okužb z MRSA v Veliki Britaniji (Otter, 2015).

⁴ Osnovni namen preprečevanja bolnišničnih okužb ni zgolj v zagotavljanju varne zdravstvene oskrbe bolnikov, temveč tudi zagotavljanju varnosti pri opravljanju zdravstvene aktivnosti zdravstvenim delavcem (opomba avtorice).

Otter ta izrazit upad ne pripisuje večji skrbi za higieno rok med bolnišničnim osebjem, ampak povečanemu nadzoru nad okužbami.⁵ Neuspeh večine evropskih držav (graf 2) pripisuje predvsem preveliki uporabi antibiotikov, pomankanju sob za izolacijo bolnikov ter slabim nadzorom nad okužbami.

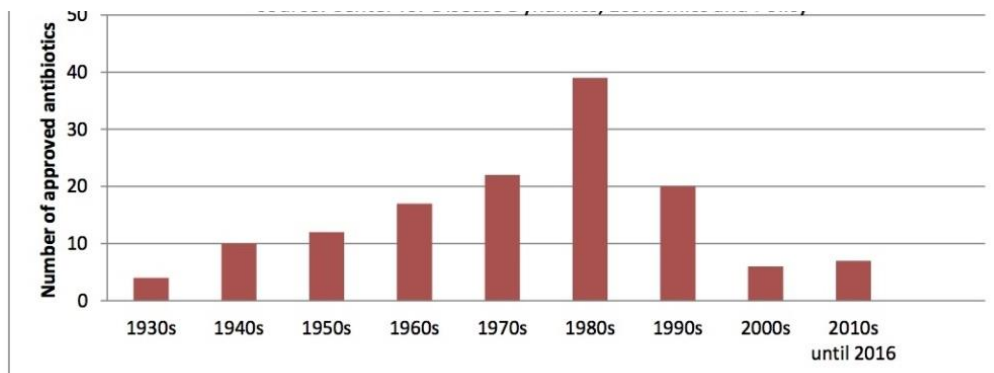
MRSA ni edini patogen, ki je problematičen z vidika visoke rezistence na antibiotike. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO; World Health Organization) je v letu 2017 objavila listo patogenov, ki so odporni na antibiotike in zanje nujno potrebujemo ustrezno obrambo. Najbolj kritični so: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacteriaceae* (WHO, 2017). Vsi so odporni na karbapeneme, skupino betalaktamskih antibiotikov s širokim spektrom protibakterijskega delovanja (Papp-Wallace s sod., 2011).



Graf 2. Stopnja odpornosti na meticilin pri invazivnih okužbah *S. aureus* (EARS-Net, 2014).

Boj s patogenimi organizmi ima več razsežnosti. Poleg razvoja novih antibiotikov, uporabe bakteriofagov, aktivnih (politično podprtih) ukrepov (primer Velike Britanije) in genske manipulacije, so nov obet tudi **aktivne protimikrobne površine materialov**, ki so še posebej uporabne v zdravstvu ter razvoj novih, manj okoljsko škodljivih biocidov, saj razvoj novih antibiotikov ne kaže optimističnih napovedi (graf 3)).

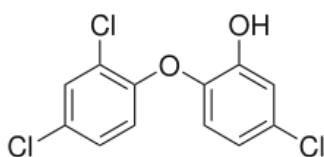
⁵ Skupine za nadzor okužb so se podvojile. Usposabljanje za obvladovanje okužb je postalo del obveznih uvajalnih programov (opomba avtorice).



Graf 3. Število novih antibiotikov na trgu po letih (Busch in Guidi, 2017)

1.1 Namen naloge

V nalogi bomo poskušali najti odgovor na vprašanje ali katera od treh naravnih učinkovin (evgenol, indol-3-karbinol, karvon), ki jih adsorbiramo na površino nerjavnega materiala, lahko učinkovito prepreči razvoj mikroorganizmov. Rezultate bomo primerjali s trenutno uveljavljenimi biocidnimi čistili, ki jih uporabljamo za dezinfekcijo zdravstvenih aparatov, pripomočkov ter tudi umivanje rok in so pripravljene na osnovi triklosana⁶, C₁₂H₇Cl₃O₂, (5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol).



Slika 2. Strukturna formula triklosana (Boyce in Pittet, 2002)

Razlog za tovrstno raziskavo so rezultati raziskav Dhillona s sod. (2017), Vlahoviča (2015), Poola (2002), Združenja za preudarno rabo antibiotikov (2011) (Alliance for the Prudent Use of Antibiotics), Levyija s sod. (1999), McBaina s sod. (2004), Glassereja (2004) in Latcha s sod. (2005), ki ugotavljajo, da smo triklosanu dejansko vsakodnevno izpostavljeni, saj je sestavni del mil, šamponov in vsaj še 100 ostalih pripomočkov za osebno higieno, najdemo pa ga tudi v pesticidih. Je glavno čistilo za kirurške pripomočke. Različne študije ugotavljajo, da ima veliko škodljivih stranskih učinkov. Vlahovič (2015) ugotavlja, da lahko imajo že zelo nizke koncentracije (0,1%) negativen vpliv na človeka (hormonski motilec, niža telesno temperaturo in na osrednji živčni sistem deluje kot antidepresiv); Shena s sod. (2008) navaja fotoalergijski kontaktni dermatitis in visoko stopnjo biokamulacije (lipofilna snov). Fiss s sod. (2007) pa opozarja na okoljski vidik uporabe triklosana, saj se ga preko vodovodnega in kanalizacijskega sistema kar 95% izloči

⁶ Snov v različnih izdelkih nastopa pod različnimi imeni. Poleg triklosana je lahko še: Irgasan DP 300, Lexol 300, Ster-Zac, Cloxifenolum, BioFresh in Microban (opomba avtorice).

v okolje. Raziskava opravljena v Švici (Glasser, 2004) je pokazala, da triklosan predstavlja enega glavnih kloriranih bisfenolov v njihovih rekah in jezerih ter povzroča odpornost bakterij na antibiotike (glej poglavje 2.5 te naloge). Problematična je tudi povezava z možnostjo tvorbe dioksinov (Fiss s sod., 2007).

Evgenol, indol-3-karbinol in karvon, tri naravne učinkovine, so v predhodnih raziskavah že bile eksperimentalno preizkušene (Marchese s sod., 2017, Sung s sod., 2007 in CBD, 2018; Varda in Kirbus, 2017) in so pokazale visoko protimikrobno učinkovitost, vendar glede na dostopne in pregledane literaturne vire še nikoli primerjane s triklosanom.

1.2 Raziskovalno vprašanje

Kako učinkoviti so evgenol, indol-3-karbinol in R-karvon v preprečevanju razvoja (*E.Coli*, *Bacillus cereus* in gliv kvasovk), če jih nanese na nerjavno površino jekla ločeno ali v kombinaciji, v primerjavi s triklosanom (TCS)?

1.3 Hipoteze

Hipoteza 1. Površina nerjavnega jekla nima protimikrobnega delovanja.

Hipoteza 2. Površina nerjavnega jekla, prekrita z raztopino evgenola, indol-3-karbinola in karvona izkazuje protimikrobno delovanje.

Hipoteza 3. Površina bakra izkazuje sposobnost protimikrobnega delovanja, vendar se njegova učinkovitost poveča, če na površino nanese raztopino evgenola, indol-3-karbinola in karvona.

Hipoteza 4. Evgenol bo imel primerljive protimikrobne učinke kot triklosan (TCS).

Hipoteza 5. Indol-3-karbinol in karvon (2-metil-5-(1-metiletenil)-cikloheksen-1-on) bosta imela nižjo protimikrobno učinkovitost kot evgenol.

Hipoteza 6. Protimikrobna učinkovitost preučevanih snovi je povezana z njihovo koncentracijo.

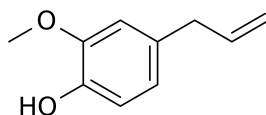
Hipoteza 7. Najboljšo antioksidacijsko učinkovitost med vsemi preučevanimi snovmi bo izkazal evgenol.

1.3.1 Razlage hipotez

Mehanizem protimikrobnega delovanja **TCS** temelji na inhibiciji sinteze bakterijskih maščobnih kislin in sicer tako, da inhibira delovanje encima enoil reduktaze, ki sodeluje pri sintezi maščobnih kislin. Ker so

maščobne kisline nujne za gradnjo celičnih membran, so ključne tudi pri reprodukciji bakterij. TCS ima v nizkih koncentracijah bakteriostatično (zavira rast bakterij), pri višjih pa bakteriocidno delovanje (uniči bakterije) (Fang s sod., 2010). Russel (2003) je postavil hipotezo, da se spremeni permeabilnost membran. Opazil je tudi, da se rast najbolj odpornih bakterij bistveno upočasni, vendar to ne velja za sev *E.coli*, ki je že razvila rezistenco na TCS. Stalna izpostavljenost triklosanu odpornost samo še povečuje. Visoko stopnjo rezistence danes kaže tudi *P. aeruginosa* (Chuanchen s sod., 2001) ter MRSA, kjer so zaznali povečano proizvodnjo mutiranega encima *FabI* (Heath s sod., 2001).

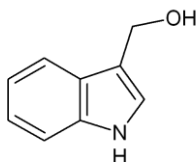
Mehanizem antimikrobnega delovanja **evgenola** temelji na inhibiciji rasti mikroorganizmov s povečanjem občutljivosti fosfolipidnega dvosloja, kar vpliva na večjo prepustnost celične membrane (Golčer, 2015).



Slika 3. Strukturna formula evgenola (Jadhav s sod., 2004)

Vendar je potrebno omeniti, da evgenol lahko deluje tudi toksično za jetra, v kolikor pride do zažitja več kot 5 mL (IFRA, 2011-12).

V študiji (Sung, 2007) so z uporabo mikrodilucije NCCLS testa za mikrosulacijo ovrednotili aktivnost indol-3-karbinola (**I3C**) glede na patogene mikroorganizme pri ljudeh, vključno s klinično izoliranimi bakterijami, odpornimi proti antibiotikom. Da bi razumeli protiglivični način delovanja I3C, so spremljali spremembo dinamike membrane z uporabo fluorescenčnih eksperimentov proti *C. albicans*. Rezultati kažejo, da lahko I3C izvaja protiglivično aktivnost tako, da moti delovanje celične membrane. Ta študija kaže, da ima I3C precejšnje protimikrobno delovanje, ki ga je treba dodatno raziskati za klinično uporabo (Sung, 2007).

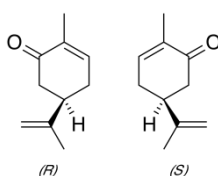


Slika 4. Strukturna formula I3C (Sung, 2007)

Raziskave kažejo, da ima I3C tudi antikancergene lastnosti (Dashwood s sod. 1989).

Eden glavnih učinkov rastlinskih ekstraktov, ki med drugim vsebujejo tudi **karvon**, je inhibitorno delovanje na patogene mikroorganizme (Tomažin s sod., 2015). V raziskavi, Mcgeady, Weasley in Logan (2002) je

karvon, *R*-enantiomera, pokazal protimikrobno aktivnost na bakterije vrste *C. krusei* (0.625 mg/mL). Karvoni, ki so pokazali aktivnost proti *C. albicans* v tej študiji so tako *R*-karvon kot *S*-karvon, z izmerjenimi MIC / MFC z vrednostmi za 0,312 mg/ml in 0,625 mg/ml. Jirovetz s sod., (2003) navaja, da so eterična olja, bogata s karvonom zavirala rast teh glivic in da je karvon zaviral preoblikovanje *C. albicans* v njegovo patogeno obliko.



Slika 5. Strukturni formuli obeh enantiomerov karvona (Laska s sod., 1999)

Aktivne protimikrobne površine, ki so trenutno v uporabi niso učinkovite proti vsem mikroorganizmom in imajo še druge pomanjkljivosti. Premazi, ki vsebujejo srebro, se zlahka obrabijo, pri čemer ni vidnih znakov, ki bi pokazali kdaj se protimikrobni učinek zmanjša in so tudi zelo dragi. Baker in njegove zlitine dolgujejo svoj protimikrobni učinek sproščanju kovinskih ionov v okolje in vedno več je mikroorganizmov, ki so že razvili visoko stopnjo odpornosti, npr. *E. coli*. Materiali iz nerjavnega jekla so zato dobra izbira, saj jih je enostavno čistiti in razkuževati. Predstavljajo najbolj inerten material med omenjenimi, ki ga je mogoče sterilizirati⁷ na več načinov, vendar samo toplotno ni dovolj. In tukaj se pojavi problem. Za učinkovit boj proti razvoju mikrobov, ki razvijajo odpornost na antibiotike, so potrebne nove biocidne raztopine, ki nimajo negativnega vpliva na okolje ali pa je le ta bistveno manjši kot trenutno uporabljeni biocidi (glej poglavje 2.5).

1.4 Metode dela

V nalogi bomo najprej preko študija ustrezne literature predstavili zadnja spoznanja v zvezi z bolnišničnimi okužbami ter načine obvladovanja le teh v Evropi in Sloveniji. Sledil bo pregled najučinkovitejših protimikrobnih površin, primernih za uporabo v zdravstvu in izvedba praktičnega dela, kjer bomo upoštevali predpisani protokol za protimikrobni test površinske učinkovitosti kemikalij. Protimikrobni potencial ekstraktov na gram-pozitivne (preučevali bomo *Bacillus cereus*) in gram-negativne bakterije (preučevali

⁷ S sterilizacijo lahko uničimo vse mikroorganizme, tudi bakterijske spore, vendar vedno obstaja možnost ponovne kontaminacije, zato je zelo pomembno, da se v bolnišnični oskrbi uporabljajo materiali, ki lahko zavirajo ponovno okužbo (opomba avtorice).

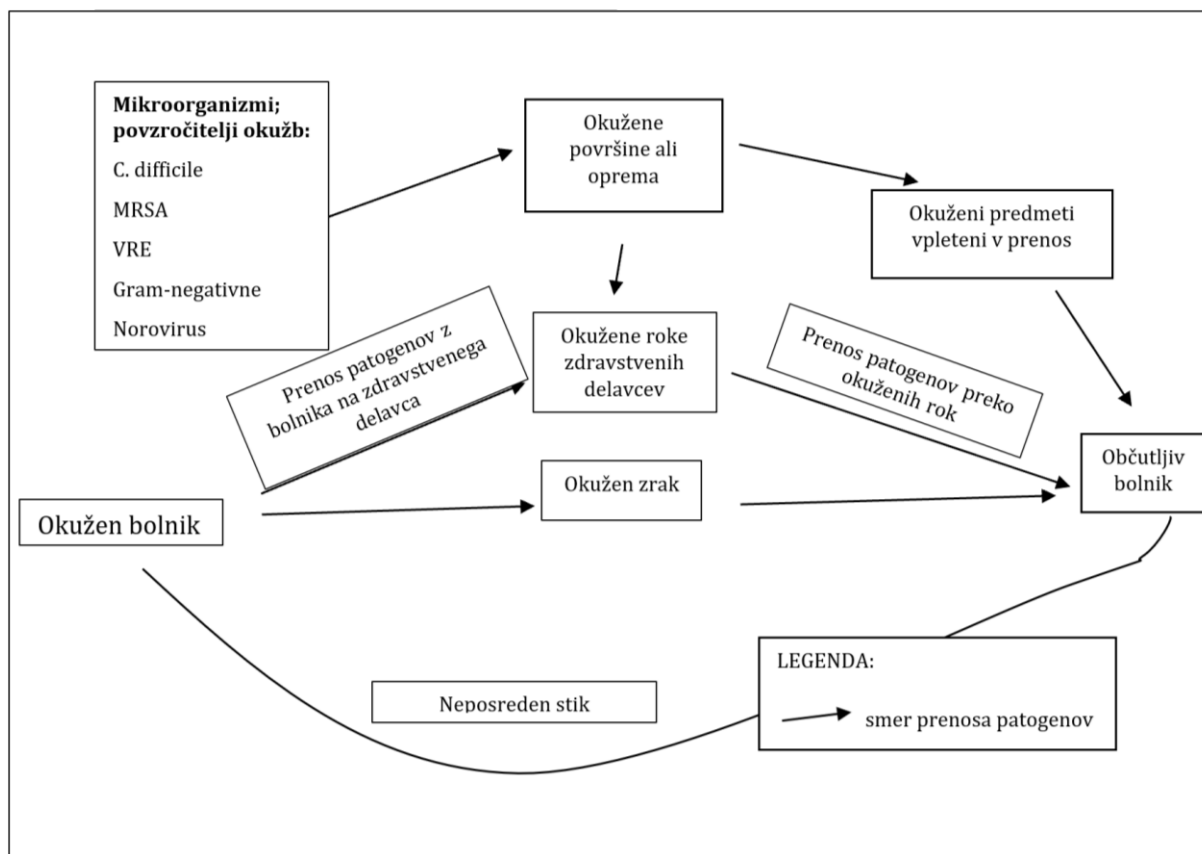
bomo *E. coli*) ter plesni (preučevali bomo glive kvasovke) bomo določali z difuzijskim antibiogramom na agarju.⁸

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Okužbe povezane z zdravstveno oskrbo

Okužbe, povezane z zdravstvom (OPZ), so bolezni oz. patološke spremembe, do katerih je prišlo pri bolnikovi izpostavitvi zdravstveni oskrbi. Največji delež okužb povezanih z zdravstvom predstavljajo bolnišnične okužbe, saj praviloma prizadanejo najranljivejše skupine bolnikov. Glede na podatke svetovne zdravstvene organizacije (WHO) veljajo za najpogostejši neželeni dogodek v zdravstveni oskrbi. Po njihovih podatkih (2011) na vsakih 100 hospitaliziranih bolnikov v razvitih državah sedem bolnikov pridobi bolnišnično okužbo (BO), v nerazvitih pa vsak deseti bolnik. Poleg visokih finančnih stroškov, bolnišnične okužbe podaljšujejo hospitalizacijo ter prispevajo k smrtnosti bolnikov in k trajni invalidnosti (Lejko Zupanc, 2013). V razvitih deželah bolnišnične okužbe prizadanejo približno eno tretjino bolnikov intenzivne terapije, v manj razvitih deželah pa je številčnost okužb dva - do trikrat večja. Okužbam, povezanim z zdravstvom, so najbolj izpostavljeni imunsko oslabei bolniki, število teh pa se s staranjem prebivalstva veča. Najbolj so ogroženi bolniki s hematološkimi boleznimi ter bolniki po presaditvi organov, matičnih celic in revmatološki bolniki ter ostali bolniki, zdravljeni v intenzivnih enotah (Lejko Zupanc, 2013). Ker je Slovenija država z negativnimi naravnim prirastom (-0,1) in glede na demografsko sliko med starejšimi v Evropski uniji (povprečna starost je trenutno 43,3 leta (NIJZ, 2018)), se bomo s temi težavami vse pogostejše srečevali. K veliki pogostosti BO prispeva tudi počasen razvoj novih protimikrobnih zdravil (PZ). Do okužb, povezanih z zdravstvom lahko pride neposredno - z zdravnikovim stikom z bolnikom ali posredno - preko okuženih površin ali zdravstvenih delavcev (Petti, s sod., 2013).

⁸ Optimalno bi bilo s pomočjo metode Broth Dilution Assay (BDA), kjer detekcijo izvedemo s pomočjo spektrofotometrično pri karakteristični valovni dolžini 550 nm. Druga tehnika je metoda pretočne citometrije, ki na osnovi sipanja monokromatske laserske svetlobe in sledeče fluorescence poleg podatka o številu mikrobnih celic v suspenziji nudi tudi vpogled v njihovo velikost, zrnatost in celo biokemijske ter morfološke lastnosti (opomba avtorice).



Organigram 1. Poti prenosa mikroorganizmov v zdravstvenem okolju (Petti s sod., 2013)

Kot vidimo iz organigrama 1, so roke, s predhodnimi kontaminanti, najpogostejši izvor okužb v zdravstvenih ustanovah in so vodilne pri prenosu in širjenju okužb, zato mnogi menijo, da higiena rok predstavlja najpomembnejši način preprečevanja okužb (Prosen in Perme, 2013). Za higiensko razkuževanje rok se v bolnišnicah uporabljajo antiseptiki z dozatorjem oziroma v razdelilcu na komolčno doziranje, ki deluje hitro na problemsko floro, saj vsebuje baktericid, virucid, fungicid in tuberkulocid ter ustreza zahtevam evropskega standarda za higiensko razkuževanje rok (Kumperščak Duh, 2018). Takšno sredstvo je npr. Skinman Soft, ki poleg topila propan-2-ola vsebuje še benzalkonijev klorid, kationsko aktivno snov, ki deluje kot bakteriocidni antiseptik (ECO LAB, 2005), (slika 6).

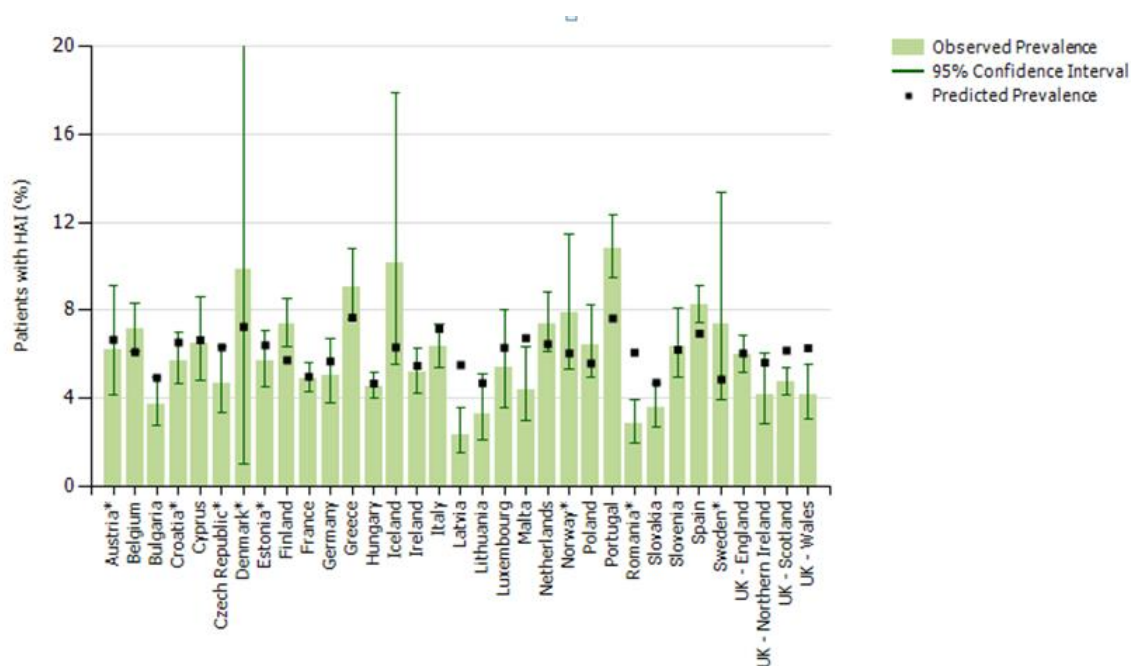


Slika 6. Skinman Soft N (ECO LAB, 2018)

Podpačeva (2018) je v raziskavi, kjer je preučevala sposobnost prilagoditve izbranih sevov listerij⁹ na benzalkonijev klorid (BAC), ugotovila, da je prišlo do razvoja proti BAC odpornega seva- *L. monocytogenes* TM 500, medtem ko je pri drugih prilagojenih sevih listerij minimalna inhibitorna koncentracija BAC ostala močno povišana glede na minimalno inhibitorno koncentracijo neprilagojenih sevov. V laboratorijskih razmerah so pri 50 % testiranih sevov listerij dobili močno zmanjšano občutljivost na BAC, kar je zelo zaskrbljujoč rezultat, ki nakazuje, da mehanizem prilagoditve in razvoja odpornosti listerij še ni pojasnjen.

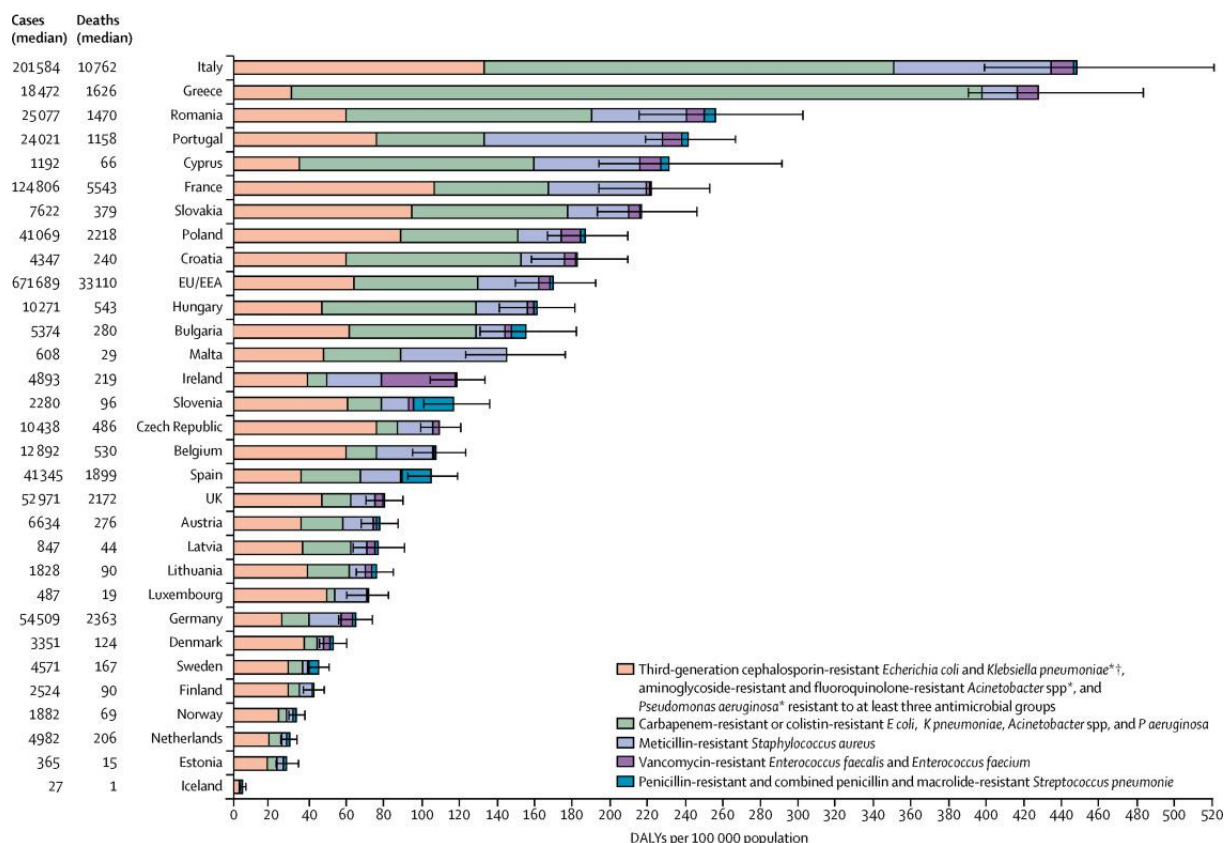
Za Evropo so v Evropskem centru za preprečevanje in obvladovanje bolezni, (ECDC; European Centre For Disease Prevention And Control, 2008) ugotovili, da vsak dvajseti hospitalizirani bolnik dobi BO, kar pomeni 4,1 milijona bolnikov in 37.000 smrti povezanih s tovrstnimi okužbami letno (Suetens, 2015). Zato so vse države članice Evropske Unije (EU), po priporočilih Evropske skupnosti (2009), dolžne izdelati nacionalno strategijo za preprečevanje in obvladovanje BO. Ta vključuje povečanje števila zaposlenih, ki delujejo na tem področju, zagotavljanje kakovostne mikrobiološke obravnave in še mnogih drugih ukrepov s katerimi bi zmanjšali obolenja in možne smrti zaradi BO (Lejko Zupanc, 2013).

⁹ Listerije so rod grampozitivnih paličastih bakterij, ki šteje 6 vrst. Rod je poimenovan po angleškem kirurgu Josephu Listru (Podpac, 2018).



Slika 7. Opazovana razširjenost preprečevanja okužb s 95% intervalom zaupanja v letih 2011-2012 (ECDC, 2018)

Novejša študija (ECDC, 2015) ocenjuje, da približno 33000 ljudi vsako leto umre kot neposredna posledica okužbe zaradi bakterij, odpornih na antibiotike, in da je breme teh okužb primerljivo z gripo, tuberkulozo in okužbami HIV skupaj. Študija navaja podatke, da je 75% bremena posledica okužb, povezanih z zdravstveno oskrbo. Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) sodeluje z več združenji, med drugim tudi z EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), ki nadzira antimikrobno odpornost. V sodelovanje z organizacijo je vključena tudi Slovenija (Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ), Medicinska fakulteta v Ljubljani ter Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano) (Lejko Zupanc, 2013). Iz podatkov EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), zbranih med 1. januarjem 2015 in 31. decembrom 2015, so ocenili 671 689 okužb z bakterijami, odpornimi na antibiotike, od tega kar 63-65% povezanih z zdravstvenim varstvom. Te okužbe so predstavljale 33110 primerov smrti in 874541 primerov invalidnosti. Na sliki 8 je predstavljena obremenitev za EU in za evropsko ekonomsko območje (EEA), ki je bila najvišja pri dojenčkih, starih manj kot 1 leto in osebah, starih 65 let ali več (Cassini s sod., 2018).

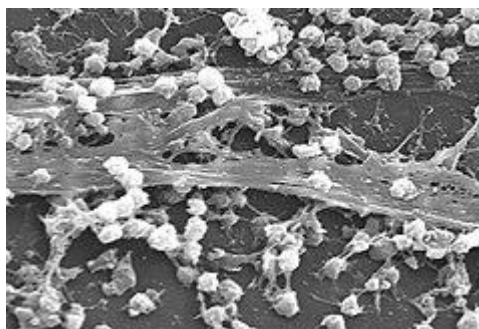


Slika 8. Prevalenca okužb z bakterijami, odpornimi na antibiotike v EU in EEA, 2015 (ECDC, 2015)

V tretji Slovenski nacionalni presečni raziskavi bolnišničnih okužb so bili vključeni vsi bolniki, ki so bili na izbrani dan v oktobru 2011 hospitalizirani v vseh 21 slovenskih bolnišnicah za akutno oskrbo. PZ so bila predpisana 1761 bolnikom, oz. 31,3% (od skupno 5628 bolnikov), kar je nižje kot povprečje v primerljivi evropski presečni raziskavi, kjer je bila prevalenca 35,5%. Prevalenca rabe PZ je bila najvišja v intenzivni terapiji (77,3%), najnižja pa v psihiatriji (2,1%). Raba PZ v enotah intenzivne terapije odstopa od evropskega povprečja, kjer je prevalenca rabe 70,3%. Z raziskavo smo dobili tudi podatke o faktorjih tveganja za bolnišnične okužbe. Bolniki stari nad 80 let so v dvakrat večji nevarnosti pred BO kot bolniki mlajši od 50 let. Najpogostejše predpisan antibiotik je bil amoksisicilin s klavulansko kislino, najpogostejše okužbe, ki so jih zdravili z antibiotiki, pa okužbe dihal. Najpogostejše bolnišnične okužbe so bile okužbe sečil (prevalenca 1,4 %), dihal (prevalenca 1,3 %) ter okužbe kirurških ran (prevalenca 1,2 %). Rezultati opozarjajo na problematiko prevelikega predpisovanja antibiotikov (v enotah intenzivne terapije), karbapenemov in predolgo trajanje kirurške profilakse pri 55,6% bolnikov. Delež bolnikov, z najmanj eno BO na dan raziskave, in tistih, ki so bili še vedno zdravljeni zaradi BO na dan raziskave, je bil relativno visok (6,4 %), medtem ko je bilo izmerjeno povprečje za Evropo 6,0 % (Klavs s sod., 2013).

2.1.1 Problematika biofilmov

Preprečevanje okužb, povezanih z zdravstvom, vključuje dobro higieno rok (dezinfekcija), sterilizacijo materialov, ki se uporabljajo v stiku z bolnikom in uporaba antimikrobnih površin. Pri antimikrobnih površinah je zelo pomembno, da ne omogočajo nastanek biofilmov, t.j. skupkov mikroorganizmov in njihovih zunajceličnih produktov, ki delujejo kot vezni člen med biogeno ali abiogeno podlago (Characklis in Marshall, 2000). Biofilmi predstavljajo urejene in funkcionalne združbe populacij bakterij oz. nekakšen biološki sistem in omogočajo preživetje mikrobnih celic tudi v težkih pogojih. Vgrajene celice so do 1000-krat manj občutljive za večino antibiotikov in drugih biocidov, kot posamezne (Otter s sod., 2015). Ocena Pinatrichve (2010) je, da biofilmi povzročajo 65% bolnišničnih okužb. Najpogosteje so biofilmi omejeni na vlažne podlage, kot so medicinski instrumenti ter medicinska oprema, preživijo pa tudi na suhih površinah. Antibiotični geni, ki se lahko izmenjujejo med bakterijami v biofilmih, dodatno povečajo nastanek multi-odpornih vrst bakterij. Takšen primer je enterohemoragična *Escherichia coli* (EHEC) (Pinatrich, 2010). Ključna stopnja razvoja biofilma je pritrditev mikroorganizmov na podlago, kar omogoča pritrjenim celicam združevanje v biofilme. S povezovanjem se zagotovi preživetje ter lažje razmnoževanje med organizmi. Če je podlaga antimikrobno učinkovita do tega pojava ne pride. Po (neločljivi) pritrditvi na podlago, nekateri mikroorganizmi ustvarijo zaščitne plasti iz eksopolisaharidov (EPS), ki so sposobni zadrževanja hranilnih snovi, potrebnih za vzdrževanje in širjenje biofilmov, ter vlogo zaščite mikroorganizmov pred zunanjimi vplivi. Vendar EPS še vedno predstavlja izmenjavo hranilnih snovi in plinov z okoljem (Otter s sod., 2015).



Slika 9. Razvoj biofilma na katetru (Marshall, 1992)

2.2 Sterilizacija

Sterilizacija je postopek, ki uniči mikroorganizme in odporne bakterijske spore. Sterilni morajo biti predmeti, ki vstopajo v bolnikov krvni obtok, saj pridejo v stik s sterilnimi tkivi ali sterilnimi telesnimi votlinami (Gabrovšek, 1999). Za uspešno sterilizacijo potrebujemo: sredstvo, ki uniči mikroorganizme

(biocid), uspešen stik s sredstvom, ki uničuje mikroorganizme, dovolj dolgotrajen stik, možnost zaščite predmeta pred ponovno kontaminacijo in možnost nadzora uspešnosti sterilizacije (Petrovčič, 2013-14).

Zelo pomembno je, da so predmeti, ki jih steriliziramo, predhodno dobro očiščeni, saj je uspeh sterilizacije odvisen od izhodnega števila bakterij. Vlažna in suha toplota lahko uničita mikroorganizme. Pri določeni temperaturi, ki je odvisna od odpornosti mikroorganizma prihaja do kemičnih in fizikalnih sprememb ter denaturacije beljakovin in nukleinskih kislin v mikroorganizmih. Te spremembe so hitrejšje v nasičeni vlagi in počasneje v suhi toploti (Petrovčič, 2013-14). Zato je parna sterilizacija najboljša in najzanesljivejša metoda sterilizacije (121°C, tlaku 1,2 bara in času izpostavljenosti 18-20 minut ali 134°C, tlaku 2,1 bara in času izpostavljenosti 5 minut), vendar zaradi možnosti rekontaminacije to ni dovolj (Švarc, 2001).

2.3 Antimikrobna učinkovitost evgenola, indol-3-karbinola in karvona

Evgenol, 1-hidroksi-2-metoksi-4propenilbenzen, je naravno prisoten v eteričnih oljih (do 95 %) več rastlin, ki pripadajo družinam *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* in *Myristicaceae*. Je eden glavnih sestavin muškatnega oreha (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, *Myrtaceae*) in se v veliki meri uporablja v hrani in kozmetiki kot aromatično sredstvo (Pub Chem, 2004). Številni znanstveni dokazi (Trajano s sod., 2010; Fu s sod., 2007; Moon s sod., 2011; Evrendilek, 2015; Marchese s sod. 2017) potrjujejo trditve tradicionalne medicine, da evgenol blagodejno vpliva na zdravje ljudi. Ti učinki so večinoma povezani z antioksidativnimi, protivnetnimi in protibolečinskimi dejavnostmi. V kliničkih je najpomembnejša učinkovina evgenol (do 15 %), ki je močan anestetik z antiseptičnim (protibolečinskim) delovanjem, zaradi česar so klinički tudi uspešni pri uničevanju bakterij in preprečujejo infekcijo (Novak, 2014). Evgenol je v študijah pokazal odlično antimikrobno aktivnost proti glivam¹⁰ in širokemu spektru gram-negativnih in gram-pozitivnih bakterij (Marchese s sod. 2017; Krmelj in Thaler, 2018). Evgenol lahko vpliva na delovanje mikroorganizmov na različne načine. Običajno deluje zaviralno na prepustnost bakterijskih membran (*E. coli*, *S. aureus*, *Candida spp* in druge) in tvorbo bakterijskega in glivičnega biofilma (Marchese s sod., 2017). Evgenol v kombinaciji z nekaterimi drugimi čistimi snovmi, pridobljenimi iz rastlinskih materialov (timol, cinamaldehyd, karvakrol, linalool in mentol), kaže sinergistični učinek proti pomembnim patogenom, ki so odporni proti antibiotikom (Evrendilek, 2015).

Indol-3-karbinol (I3C) je naravno prisotna sestavina rastlin iz družine križnic. Sung in Lee (2007) sta ovrednotila aktivnost I3C glede na patogene mikroorganizme pri ljudeh, vključno s klinično izoliranimi

¹⁰ V študije so bile vključene: različni sevi *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *A. niger* (opomba avtorice).

bakterijami, odpornimi na antibiotike (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigeli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin sensitivna ali rezistentna *Enterococci* (VSE ali VRE), multiantibiotično reusitenta *Escherichia coli* (MREC), in multiantibiotično resistanta *Pseudomonas aeruginosa* (MRPA) ter *Candida albicans*. Rezultati so pokazali, da ima I3C širok spekter protimikrobnih aktivnosti. Protiglivično aktivnost izvaja na način, da ovira delovanje celičnih membran in reagira s fosfolipidnim slojem membran bakterijskih celic.

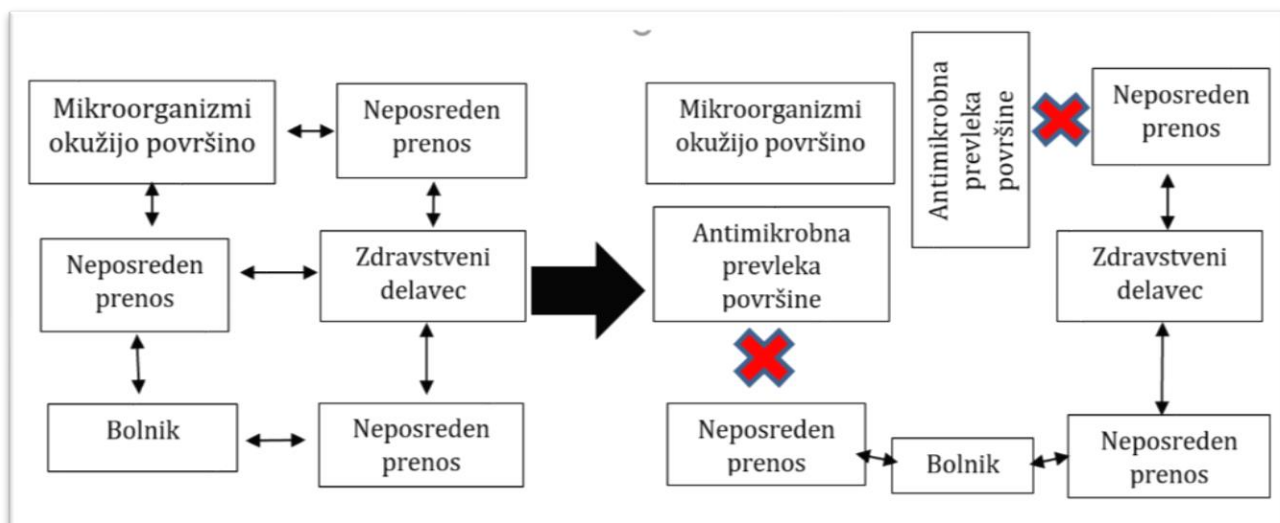
Karvon spada med terpene in je monoterpenski keton. Terpeni so najpogostejše sestavine eteričnih olj in pogoste sestavine smol (Simonsen, 1953). Terpeni lahko imajo antibakterijske, protivnetne, antianksiozne, protibolečinske in pomirjevalne učinke ter lahko delujejo tudi antikancerogeno. V kombinaciji s kanabinoidi, kot sta kanabidiol (CBD) in tetrahidrokanabinol (THC), pa pride do t.i. sinergičnega učinka in se lahko učinkovitost njihovega delovanja še poveča (Zakič, 2018).

R-karvon je glavna učinkovina v semenih kumine (50-70%); S-karvon najdemo v eteričnem olju mete (51%). Molekuli sta enantiomeri, ki v stiku z drugimi kiralnimi molekulami izkazujejo različne biološke lastnosti (Bloom, 2018).

2.4 Antimikrobne površine

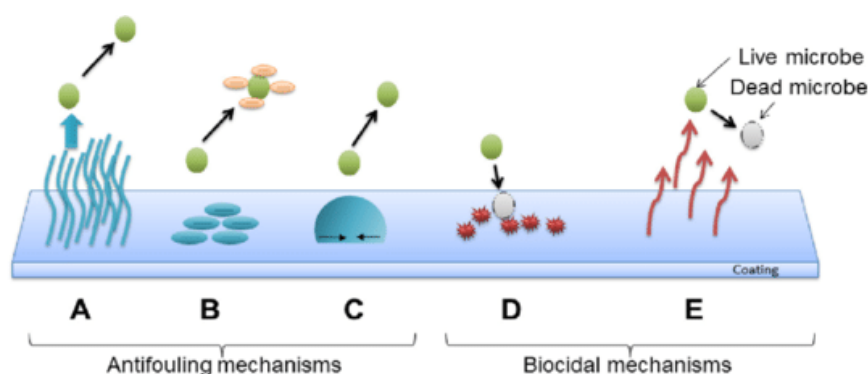
Alternativo dezinfekciji, kot načinu preprečevanja razvoja biofilmov in s tem okužb, povezanih z zdravstvom, predstavljajo antimikrobne površine, ki so impregnirane z biocidom, ki omejuje rast bakterij, jih odbija oziroma uniči. Antimikrobne površine pogosto vsebujejo naslednje biocide: srebro, baker, antibakterijske amonijeve spojine, aktivne kloride in triklosan. Njihova skupna značilnost je, da se sproščajo v okolico, kjer ubijejo mikrobe. Biocidov ne enačimo z antibiotiki, saj se ne uporabljajo v zdravstvene namene. Antimikrobne površine imajo pomembno vlogo v zmanjšanju prenosa mikroorganizmov med površinami in bolniki (Kramer in Assadian, 2014).

Organigram 2 prikazuje prenos bolnišničnih okužb med posameznimi členi. Mikroorganizmi lahko neposredno prehajajo od površin do medicinskih delavcev ter bolnikov. Antimikrobne površine na desni strani slike prikazujejo sposobnost nadzora nad širjenjem mikroorganizmov. Rdeči križci predstavljajo želen učinek antimikrobnih površin, ki preprečujejo prenos mikroorganizmov ter prekinajo krog prenosa BO.



Organigram 2. Krog bolnišničnih okužb in vloga antimikrobnih površin (Page s sod., 2009)

Delovanje antimikrobnih površin je prikazano na sliki 10.



Slika 10. Delovanje antimikrobnih površin (Singha s sod., 2016)

Antimikrobni mehanizmi prikazani na sliki 10, so (Singha s sod., 2016):

- (A) Izključno sterično odbijanje: polimeri, ki so pritrjeni na površino premazov, zagotavljajo fizične ovire za beljakovine, celice in mikrobe.
- (B) Elektrostatično odbijanje: naboji na premazih preprečujejo pritrditev mikrobov.
- (C) Nizka površinska energija: zmanjšanje zunanje mikrobne adhezije z uporabo nizkoenergijskih površin.
- (D) Sproščanje biocidov: premazi sproščajo biocide, kot so srebrovi ioni in dušikovi oksidi, in uničujejo mikrobe.
- (E) Kontaktna aktivnost: polimerni premazi ne sproščajo biocidov, ampak ubijejo multi-odporne mikrobe ob stiku s podlago.

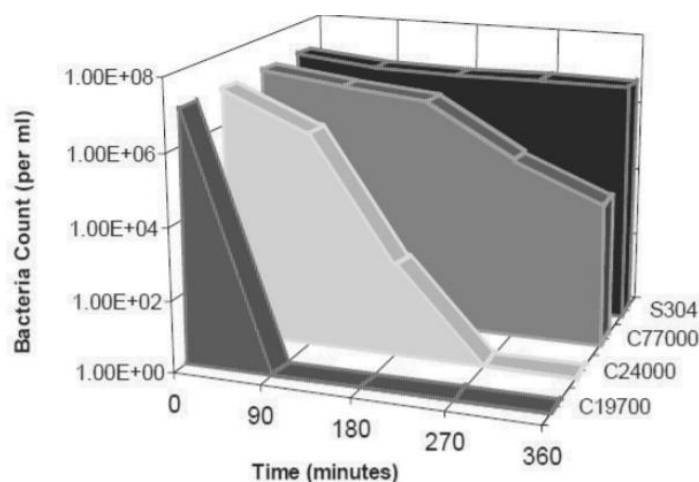
2.4.1 Anorganski antimikrobni materiali

Baker, *Cu*, je dobro poznan antimikrobni material. Njegovo uporabnost so poznali že stari Egipčani ($\approx$ 1500 let pr. n. št), saj so ga uporabljali za sterilizacijo pitne vode in pri celjenju ran (Sun, 2015). Analiza rezultatov preiskav (Konieczny in Rdzawski, 2010), predstavljenih v več kot 350 znanstvenih publikacijah in poročilih, vključno s 312 znanstvenimi publikacijami, kaže na protimikrobno delovanje bakra in njegovih zlitin, še posebej na: *Cobacillus*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *poliovirus*.

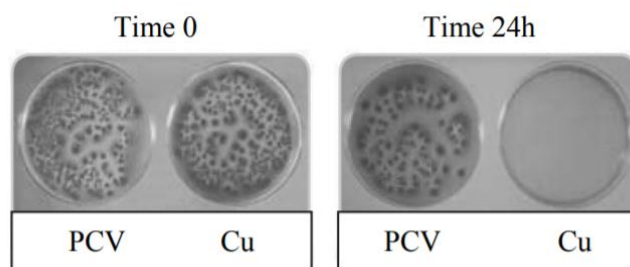
Baker je esencialni element v sledovih in ima v encimskih reakcijah vlogo donatorja ali akceptorja elektrona, s spremembo oksidacijskega stanja iz Cu (I) v Cu (II) in obratno. Ta lastnost baker uvršča med elemente z visokim elektrokemijskim potencialom (Lewis in Keevil, 2004). V kolikor pride stik z vodikovim peroksidom (celičnim metabolitom), poteče reakcija, kjer nastajajo hidroksilni radikali ($\text{OH}\cdot$)



Hidroksilni radikal lahko povzroči oksidacijo proteinov in lipidov (Yoshida s sod., 1993). Bakrovi (II) ioni pa lahko povzročijo odstranitev $-\text{SH}$ skupin iz aminokislin (npr. cisteina). Zahvaljujoč elektrokemičnemu potencialu prostih bakrovih ionov, le ti močno vplivajo na bakterijske beljakovine, kar lahko vodi do njihovega uničenja. Potrebno je omeniti, da so antibakterijski mehanizmi zelo kompleksni (tako znotraj celic, kot v medceličnih prostorih). Raziskave Noyce s sod. (2010) so pokazale, da baker lahko zavira razvoj MRSA, ki se ne odziva več na vse E-laktamske antibiotike (penicilini, ampicilini, cefalosporini), (slika 11).

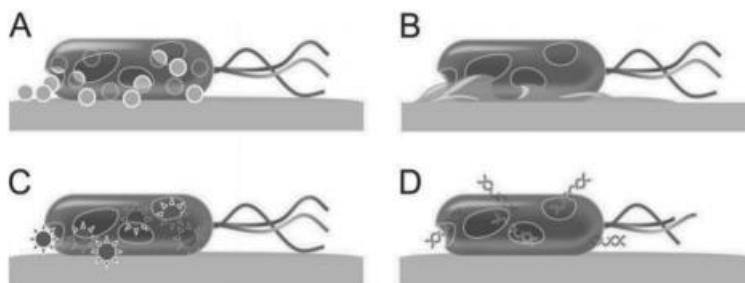


Slika 11. Preživetje methicillin-odpornih *Staphylococcus aureus* (MRSA) na treh bakrenih zlitinah: C19700 (99% Cu), C24000 (80% Cu), C77000 (55% Cu) in neerjavnem jeklu (S304) pri sobni temperaturi (Noyce s sod., 2010)



Slika 12. Opazovanje bakterijskih kolonij *Escherichia coli* v času 24 h ur v kontaktu z bakrovimi ioni in PVC (Schoenen in Schlomer, 1989)

Shematično sta delovanje bakrovih ionov dobro predstavila Schoenen in Schlomer (slika 12), ki sta opazovala odziv bakterijskih kolonij na uporabo polivinil klorida (PVC) in bakra (Cu).



Slika 13. Antibakterioidno delovanje bakra; (A) baker se raztopi na površini in povzroči poškodbe bakterijske celice; (B) zaradi poškodb celične membrane, pride do izgube membranskega potenciala in citoplazemske vsebnosti (C) bakrovi ioni stimulirajo razvoj reaktivnih kisikovih oblik, ki povzročajo nadaljnje poškodbe celic in pripeljejo do degradacije (D) genoma in plazmidne DNA (Grass s sod., 2011)

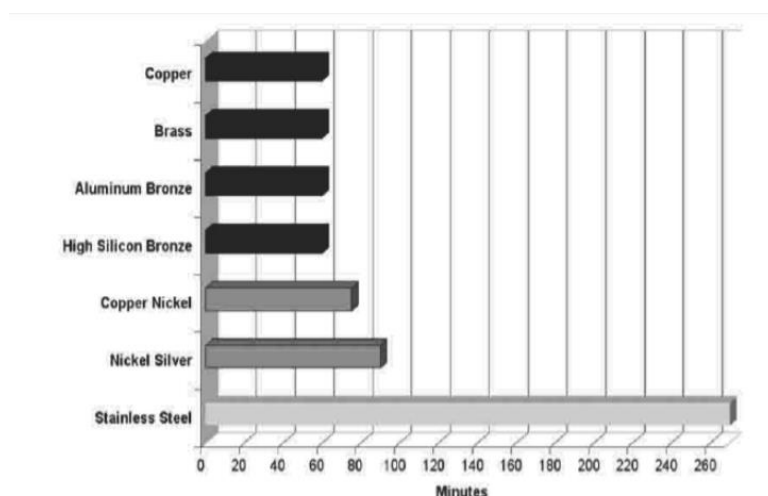
Danes antimikrobno delovanje bakra izkoriščamo predvsem v kmetijstvu (baktericidi in fungicidi za zaščito sadja in zelenjave) (Cuprablau, 2013). V vodovodnih napeljavah preprečuje okužbe, uporablja pa se tudi v bazenski tehniki kjer nadzoruje rast alg (Jewell, 2017). Kot vidimo na sliki 14, je baker našel tudi svoje mesto na bolniških posteljah (BRC CREW, 2014).



Slika 14. Uporaba bakra na bolnišničnih posteljah (BRC CREW, 2014)

V primerjavi z nerjavečim jeklom, je baker mehkejši in občutljivejši na obrabo. Z uporabo bakra in bakrovih zlitin na stikalih za luči, ročajih za vrata, vodovodnih pipah, je bilo dokazano zmanjšanje kolonij mikroorganizmov v bolnišnicah (ISSF, 2015). Po podatkih raziskave, ki je potekala od julija 2010 do junija 2011, so površine iz bakra znižale bolnišnične okužbe za 58 % (Sun, 2015).

Srebro, Ag, je drugi prehodni kovinski element z velikim protimikrobnim potencialom. V 18. stoletju so srebrov nitrat (AgNO_3) uporabljali za zdravljenje razjed, danes pa ga uporabljajo v prevlekah za rane pri oskrbovanju opeklin ter razjed (Alarcon, 2015). Protimikrobno je aktiven v obliki ionov ali nanostrukturah (Plušcec, 2015). Razni medicinski pripomočki, kot so katetri, endotrahealne tube in kirurške maske so lahko prevlečene z biocidi (npr. srebrovi nanodelci) da preprečijo širjenje patogenov. Nies (1999) ugotavlja, da so srebrovi kationi za bakterije bolj toksični kot bakovi kationi, vendar je srebro nestabilno pri oksidacijskem stanju Ag^{+2} . Rezultati preiskav, ki so jih opravili Mikolay in sod. (2010) s srebrom oplemenitenimi površinami, temu nasprotujejo, saj število uničenih bakterij ni bilo tolikšno kot pri bakru in bakrovih zlitinah. Mikolay s sod. (2010) je raziskavo delal pri pogojih, ki običajno vladajo v bolnicah (temperatura, vlažnost). Njegove izsledke potrjuje raziskava delana na bakteriji *Listeria monocytogenes* (Mikolay s sod., 2010).

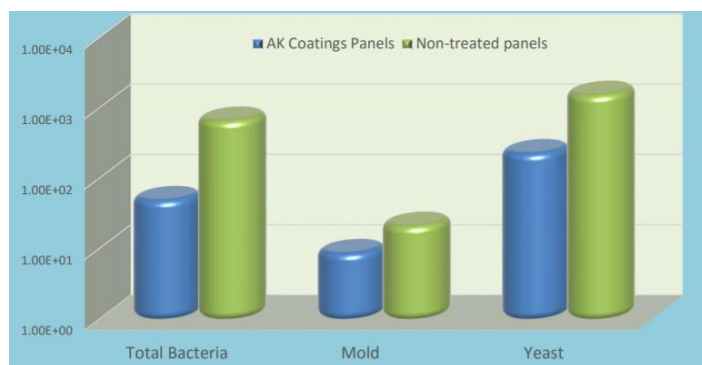


Slika 15. Življenjska doba bakterije *Listeria monocytogenes* na izbranih bakrovih zlitinah, srebru in nerjavnem jeklu (Mikolay s sod. (2010))

Učinkovite protimikrobne lastnosti in nizka toksičnost uvrščajo srebrove nanodelce med ene izmed najbolj uporabljenih nanomaterialov v izdelkih. Vendar so poročanja znanstvenikov o razviti rezistenci bakterij na srebrove ione vse pogostejša. Slednje še posebej velja za gram-negativne bacile in bakterije *Salmonella enterica serovar Typhimurium* pri oskrbovanju opeklin (Losasso, 2014). Premazi, ki vsebujejo srebro, se zlahka obrabijo, pri čemer ni vidnih znakov, ki bi pokazali kdaj se protimikrobni učinek zmanjša in so tudi

zelo dragi. Najhitreje se obrabijo, če je prevleka nanescena s sprejem. Za visoko učinkovitost premaza je potrebna tudi visoka koncentracija; 39–78 µg/mL srebrnih ionov. Prevleke iz srebra nanašajo na kovinske in druge površine (med drugim tudi na nerjaveče jeklo). Najdemo jih na primer v hladilnikih ter v prezračevalnih kanalih (ISSF, 2015).

Nerjavno jeklo je zaradi enostavnega čiščenja zelo primerno za bolnišnično uporabo. Uporaba nerjavečega jekla je bolj razširjena tudi zato, ker površine prekrte z bakrom ali srebrom, če niso zaščitene, korodirajo. Vendar nerjavno jeklo samo po sebi še nima protimikrobnih učinkov, zato so potrebni površinski protimikrobni premazi, ki običajno vsebujejo srebro, TiO₂ in Zn. Srebrne ione premešajo z TiO₂ (ali Zn) v dobro dispergirani premaz, ki ga potem s posebnimi aditivi, kot so mehčalci in omočilna dispergirna sredstva, nanesejo na površine nerjavnega jekla. Študija primera (bolnica Helford Clinical Research Hospital, kalifornija, ZDA) je pokazala, da so takšni premazi učinkoviti tudi po desetih letih uporabe. Po desetih letih redne uporabe so protimikrobne površine našteali približno 14-krat manj bakterij na golih vzorcih (slika 16). Najboljši učinki so bili zabeleženi pri bakteriji *E. aerogenes* (Maxwell in Gerba, 2014).



Slika 16. Učinkovitost protimikrobnih nerjavnih površin pri zatiranju bakterij, plesni in kvasovk (Maxwell in Gerba, 2014).

Protimikrobne zaščite se danes pojavljajo na številnih materialih, med katerimi vse bolj vidno mesto zavzemajo tudi različni polimeri. Bolj kot protimikrobne zaščite na različnih površinah, pa so celem svetu še vedno uporabljajo biocidi, med katerimi bomo izpostavili snov, ki se kot aktivna učinkovina navaja največkrat, to je triklosan¹¹. Prvič je bil uporabljen leta 1972, danes pa ga najdemo v številnih komercialnih produktih, predstavljenih v preglednici 1 (Birosova, Mikulasova, 2009).

2.5 Triklosan

¹¹ Trgovska imena so še: Irgasan® and Irgacare® (Ciba Specialty Chemical Products, 2018). Največkrat ga najdemo v obliki raztopine Microban®,

Triclosan (TCS) deluje bakteristatično na veliko število vrst gram-pozitivnih in gram-negativnih nesporulacijskih bakterij, nekatere kvasovke (Schweizer, 2001) in tudi na *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii* (McLeod s sod., 2001). Pri nizkih koncentracijah deluje bakteriostatično (ustavi rast mikroorganizmov), pri višjih koncentracijah pa baktericidno (ubija mikroorganizme). Najbolj občutljivi organizmi na TCS so stafilokoki, streptokoki, mikobakterije, *Escherichia coli* in *Proteus spp.* (proti kateremu je triklosan učinkovit pri koncentracijah, ki segajo od 0,01 mg/L do 0,1 mg/L). Tudi Meticilin-odporni sevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) so občutljivi na triklosan (Al-Doori s sod., 2003) v razponu od 0,1–2 mg/L. Tuširanje ali kopanje z 2% triklosanom se je izkazalo kot učinkovit način za dekolonizacijo bolnikov, katerih koža je okužena z MRSA (Tuffnel s sod., 1987). Enterokoki so veliko manj občutljivi kot stafilokoki, na *Pseudomonas aeruginosa* in *Clostridium difficile* pa sploh ne deluje (Russell, 2003).

Triklosan deluje tako, da blokira aktivno mesto encima enoil-acilnega proteina reduktaze (ENR), ki je bistven encim za sintezo maščobnih kislin v bakterijah (Levy, 1999). Z blokiranjem aktivnega mesta TCS zavira delovanje encima in tako prepreči sintezo maščobnih kislin, ki so potrebne za izgradnjo celičnih membran in za razmnoževanje. Ker ljudje ENR encima nimamo, naj bi bil triklosan za nas neškodljiv. TCS je zelo močan zaviralec sinteze maščobnih kislin, za učinkovito protibakterijsko delovanje pa je potrebna le majhna količina (Glasser, 2004). V preglednici 1 so navedeni produkti v katerih najdemo triklosan.

Preglednica 1. Produkti, ki vsebujejo triclosan (Glasser, 2004)

MILA: Provon® Soap; Clearasil® Daily Face Wash; Dermatologica® Skin Purifying Wipes; Clean & Clear Oil Free Foaming Facial Cleanser; DermaKleen™ Antibacterial Lotion Soap; Naturade Aloe Vera 80® Antibacterial Soap; CVS Antibacterial Soap, pHisoderm Antibacterial Skin Cleanser, Dawn® Complete Antibacterial Dish Liquid, Ajax® Antibacterial Dish Liquid.
ZOBNE PASTE: Colgate Total®; Breeze™ Triclosan Mouthwash; Reach® Antibacterial Toothbrush; Janina Diamond Whitening Toothpaste
KOZMETIKA: Supre® Café Bronzer™; TotalSkinCare Makeup Kit; Garden Botanika® Powder Foundation; Mavala Lip Base; Jason Natural Cosmetics; Blemish Cover Stick; Movate® Skin Litening Cream HQ; Paul Mitchell Detangler Comb, Revlon ColorStay LipSHINE Lipcolor Plus Gloss, Dazzle
DEODORANT: Old Spice High Endurance Stick Deodorant, Right Guard Sport Deodorant Queen Helene® Tea Trea Oil Deodorant and Aloe Deodorant; Nature De France Le Stick Natural Stick

Deodorant; DeCleur Deodorant Stick; Epoch® Deodorant with Citrisomes; X Air Maximum Strength Deodorant
OSTALI PRODUKTI ZA OSEBNO HIGIENO Gillette® Complete Skin Care MultiGel Aerosol Shave Gel; Murad Acne Complex® Kit, ®; Diabet-x™ Cream; T.Taio™ sponges and wipes, Aveeno Therapeutic Shave Gel.
PRVA POMOČ: SyDERMA® Skin Protectant plus First Aid Antiseptic; Solarcaine® First Aid Medicated Spray; Nexcare™ First Aid, Skin Crack Care; First Aid/Burn Cream; HealWell® Night Splint; Splint 11-1X1: Universal Cervical Collar with Microban
KUHINJSKA POSODA: Farberware® Microban Steakknife Set and Cutting Boards; Franklin Machine Products FMP Ice Cream Scoop SZ 20 Microban; Hobart Semi-Automatic Slicer; Chix® Food Service Wipes with Microban; Compact Web Foot® Wet Mop Heads
RAČUNALNIŠKA OPREMA Fellowes Cordless Microban Keyboard and Microban Mouse Pad
OBLAČILA IN OBUTEV: Teva® Sandals; Merrell Shoes; Sabatier Chef's Apron; Dickies Socks; Biofresh® socks
OTROŠKE IGRAČE: Playskool®: Stack _n Scoop Whale, Rockin' Radio, Hourglass, Sounds Around Driver, Roll _n Rattle Ball, Animal Sounds Phone, Busy Beads Pal, Pop _n Spin Top, Lights _n Surprise Laptop
DRUGO: Bionare® Cool Mist Humidifier; Microban® All Weather Reinforced Hose; Thomasville® Furniture; Deciguard AB Ear Plugs; Bauer® 5000 Helmet; Aquatic Whirlpools; Miller Paint Interior Paint; QVC® Collapsible 40-Can Cooler; Holmes Foot Buddy™ Foot Warmer, Blue Mountain Wall Coverings, California Paints®, EHC AMRail Escalator Handrails, Dupont™ Air Filters, Durelle™ Carpet Cushions, Advanta One Laminate Floors, San Luis Blankets, J Cloth® towels, JERMEX mops

TCS je eter z nizko topnostjo v vodi (0,01 g/L). V pH območju 4-9 je odporen na hidrolizo, vendar je podvržen fotolizi, z razpolovnim časom 41 min. Fotolitično inducirana hidroliza eterske vezi lahko pripelje do nastanka 2,4-diklorofenola ter 4-klorofenola (Reiss s sod., 2002; Fang s sod., 2010), pri višjih

vrednostih pH pa lahko pride tudi do ciklizacije in nastanka 2,8-diklorodibenzo-p-diokisna (Sanches-Prado s sod., 2006). Vse navede spojine sodijo med kancerogene snovi.

TCS ni akutno toksičen za sesalce, vendar *in vitro* študije kažejo, da lahko vpliva na metabolični sistem in hormonsko ravnovesje (Rita s sod., 2008), saj kaže intrinzično¹² estrogeno in androgeno aktivnost. Estrogene učinke izkazuje z izpodrivanjem estradiola, androgensko pa doseže z izpodrivanjem testosterona na androgeni receptor (Reiss s sod., 2002). Klinična študija (Cullinan s sod., 2012), ki je trajala 4 leta, pri ljudeh, ki so uporabljali zobno kremo z 0,3% TCS, je pokazala, da se raven ščitničnih hormonov v primerjavi s placebom ni spremenila. Zato je danes najbolj skrb vzbujajoče dejstvo, da so bakterije z mutacijo gena *fabI* že razvile rezistentnost na TCS (ni več učinka na enoil transferazo), kar preko mehanizma ko-rezistence pomeni razvoj rezistentnosti tudi na antibiotike (Birosova in Mikulasova, 2009). Dokazano je bilo, da je sev bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki je bil izpostavljen TCS, sočasno razvil odpornost na različne antibiotike (tudi ciprofloksacin) (Birosova in Mikulasova, 2009).

2.6 Protokol protimikrobnega testa površinske učinkovitosti

Pred testiranjem kemikalij moramo za testirane kemikalije vedeti naslednje (OECD, 2011):

1. Fizikalne lastnosti snovi, njihovo trgovsko ime ali identifikacijsko številko, številko serije, datum njihovega nastanka in datum prejema kemikalije v laboratorij.
2. Kemijske lastnosti snovi in morebitne (relativne) koncentracije mikrobiocidnih snovi.
3. Rok uporabnosti in pogoji shranjevanja snovi.
4. Navodila o razredčevanju snovi na raven testiranja; v kolikor ni zapisano drugače, se za redčenje uporablja trda voda.
5. Navodila o pripravi suspenzij.
6. Priporočena temperatura in kontaktni čas testiranja.
7. Merilo učinkovitosti snovi.
8. Navodila za nevtralizacijo snovi.
9. Navodila za uporabo snovi, da pridobimo oceno o mikrobiocidni aktivnosti

V praktičnem delu naloge, smo sledili protokolu Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) za protimikrobno delovanje in učinkovitost protimikrobnih sredstev. Test je bil oblikovan kot obnovljen nekdanji standard Ameriškega

¹² Lastnost molekule učinkovine, da po vezavi na receptor sproži določen biokemični odziv (SSKJ, 2018).

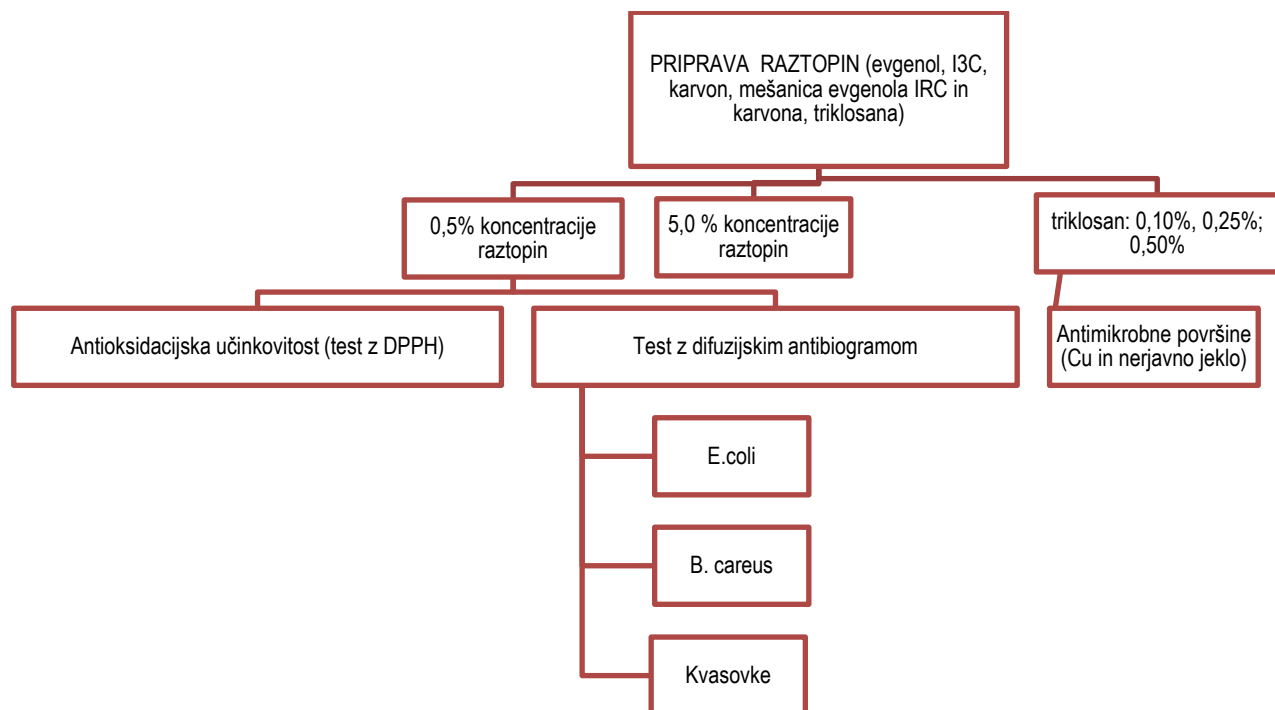
združenja za testiranje in materiale (American Society for Testing and Materials; ASTM International (2006)), z mednarodnim sodelovanjem članov OECD (OECD, 2011). Metodo sestavlja sedem zaporednih korakov (OECD, 2011):

1. Priprava gojišč (YEPD, LB) z agarjem
2. Priprava testnih organizmov in inokuluma
3. Razmaz bakterij na pripravljena gojišča z agarjem in sušenje ob gorilniku.
4. Nanos diskov
5. Izpostavljenost posušenega inokuluma testni snovi
6. Nevtralizacija testne učinkovine in antimikrobno delovanje prepojenih diskov na organizme v inkubatorju pri 37°C
7. Ocenjevanje učinkovitosti testne snovi

Metoda je v celoti kvantitativna in se izvaja v zaprtem prostoru, da bi se izognili izgubi organizmov. Uporaba diskov, premera 1 cm, omogoča prepojitev diskov v sorazmerno majhnih količinah testne učinkovine. Razmaz bakterij po petrijevki opravimo pri vseh petrijevkah z 200 µl odpipetirane količine bakterij. Vsak disk, nanešen na bakterijski razmaz, prejme enako količino učinkovine, in sicer 10 µl. Zmanjšanje števila živih preskusnih organizmov po izpostavljenosti preiskusni snovi se izračuna glede na povprečje premerov inhibicijskih con (OECD, 2011).

3 PRAKTIČNI DEL

Praktično delo je shematično predstavljeno na organigramu 3.



Organigram 3. Potek praktičnega dela raziskave

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

✓ Eugenol, (Sigma-Aldrich, 100%)	✓ Etanol, za razkuževanje (Sigma-Aldrich, 100%)	✓ Antibiotika – 30µg Streptomycin, 50 µg Chloramphenicol (Bioanalyse)
✓ Indol-3-karbinol, (Sigma-Aldrich, 100%)	✓ Pepton (Titan Biotech Proteose Pepton)	✓ Agar-agar (MSK Specialist Ingredients)
✓ Karvon, (Sigma-Aldrich, 100%)	✓ Tripton (Titan Biotech Tryptone)	✓ Destilirana voda (Šampionka)
✓ Propan-2-ol (Fluka, 99,5%)	✓ Kvasni ekstrakt (Instant kvas, Podravka)	✓ Glukoza (Fluka)
✓ DDPH* (Sigma-Aldrich, 100%)		✓ NaCl (Fluka)
✓ Triklosan (Sigma-Aldrich, PHR 100%)		

3.1.2 Laboratorijska oprema

Brezprašna komora, Iskra PIO MC 12-1, Inkubator (Binder, BD53), Avtoklav (CertoClav – Tisch Autoclav), Gorilnik (Kefo, Slovenija), Vibracijski mešalnik (Phoenix Instrument RS-VA 10), Pipete (3 mL in 1 mL), Avtomatske pipete (LLG Labware) z nastavki za 200 µl in 10 µl (Biologix), Plastične petrijevke, diski iz filter papirja, premera 55 mm (Macherey-Nagel), Analitska tehtnica (Kern), ploščice iz nerjavnega jekla 1x1 cm, kovanci iz bakra, premera 1 cm, steklene epruvete, spatula drigalski (Kefo), Spektrofotometer VIS plus (Vernier), Kivete (Kefo).

Vsi uporabljeni laboratorijski pripomočki, so bili predhodno sterilizirani (sprani z absolutnim alkoholom, etanolom) in sušeni na plamenu gorilnika.



Slika 17. Delovno okolje (lasten vir)

3.2 Difuzijski antibiogram

V nalogi smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma, s katero ugotavljamo občutljivost določenega seva na različne antibiotike. Na gojišče nanesemo mikroorganizem tako, da je rast enakomerna¹³. Vsako gojišče lahko pripravimo kot tekoče, trdno ali poltrdno glede na količino dodanih snovi, ki povzročajo strjevanje gojišča. Običajno je to agar¹⁴, redkeje želatina ali silikagel. Pomembna lastnost agarja je odpornost proti encimski razgradnji (Turk, 2012).

Po nanosu mikroorganizma na gojišče položimo sterilne diske iz filter papirja premera 55 mm in nanje nanesemo testne raztopine ter jih inkubiramo pri temperaturi 37,4 °C, 24 h. Testne raztopine difundirajo na gojišče in v primeru antimikrobne aktivnosti se okoli diskov pojavijo področja, na katerih bakterije ne uspevajo; imenujemo jih inhibicijske cone (Cimerman, Zajec, 2012). Večja kot je inhibicijska cona,¹⁵ učinkoviteje sredstvo preprečuje rast MO. Če pa inhibicijska cona ne nastane, antibiotik oz. sredstvo, ki ga preučujemo, na bakterijo ne deluje. Takrat govorimo o rezistenci oziroma odpornosti bakterij na določeno snov. Antibiotik sicer deluje na bakterije bakteriostatično, vendar v določenem času lahko

¹³ Opravimo razmaz bakterij enakomerno po petrijevki (opomba avtorice).

¹⁴ Agar-agar je polisaharid iz galaktoze in galakturonske kisline, ki ga pridobivajo iz določenih vrst rdečih morskih alg (opomba avtorice).

¹⁵ Antibiotiki delujejo na bakterije tako, da preprečujejo sintezo beljakovin, bakterijske celične stene, nukleinskih kislin, ter sinteze citoplazmatske membrane (Vidmar, 2011).

začnejo (mutirane) bakterije izločati encime, ki razgradijo antibiotik, ter se začnejo razmnoževati. V inhibicijski coni se pojavijo kolonije (Cimerman, Zajec, 2012).

Glede na premer inhibicijske cone lahko (po navodilih proizvajalca diskov) določimo, ali je sev odporen, intermediaren ali občutljiv za antibiotike, ki jih preizkušamo. Ker cona inhibicije ni odvisna le od učinkovitosti antibiotika, pač pa tudi od drugih dejavnikov (npr. debeline gojišča), je pomembno, da je metoda standardizirana, saj so samo na ta način rezultati primerljivi v daljšem časovnem obdobju ali med laboratoriji (Turk 2012).

Negativno kontrolo smo opravili z nanosom diskov iz filter papirja na izbrane kulture, brez nanosa antimikrobne učinkovine. Prav tako smo opravili tudi negativno kontrolo bakra in nerjavnega jekla, z nanosom delcev kovin na izbrani kulturi *B. Cereus* in *S. Cerevisiae*. S tem smo želeli ugotoviti kakšno antimikrobno učinkovitost imajo kovine same po sebi, brez antimikrobnega premaza.

V raziskavi sta pozitivno kontrolo predstavljala antibiotika Chloramphenicol¹⁶ in Streptomycin¹⁷ ter topilo propan-2-ol s katerim so bile pripravljene vse testne raztopine.

3.2.1 Opis mikroorganizmov uporabljenih v raziskavi

Bakterija *Escherichia coli* je del normalne črevesne flore pri človeku in tudi pri ostalih sesalcih, lahko pa je patogena tako znotraj kot tudi izven gastrointestinalnega trakta. Spada v red *Escherichia* (ešerihij), družino *Enterobacteriaceae* (enterobakterije), red *Enterobacteriales* in razred *Gammaproteobacteria*. Enterobakterije so Gram-negativne, gibljive in nesporogene (Schlegel, Zaborosch, 1993). Pojavlja se samostojno ali v parih v hitro rastočih tekočih kulturah. Je kratka bakterija, z bički po celotni površini (Money, 2016). Tako kot vse enterobakterije, je tudi *E. coli* oksidaza-negativna, gram-negativna, katalaza-pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija kar pomeni, da načeloma živi v okolju brez kisika, vendar se v okolju s kisikom vede kot aerobna bakterija, fermentira glukozo in lahko sprošča energijo z reduciranjem nitratov in nitritov (Harvey, 2007). Raste lahko na preprostem sintetičnem mediju, ki mora vsebovati mineralne soli, ogljikove hidrate in amonijeve soli (Schlegel, Zaborsch, 1993)¹⁸. Ugodno gojišče

¹⁶ Chloramphenicol je bakteriostatična antibiotska učinkovina (Fallagas, 2008).

¹⁷ Streptomycin je antibiotik, ki ga izolirajo iz bakterije *Streptomyces griseus* (Zhu, 2001).

¹⁸ Poznamo več različnih patogenih sevov *E. coli*. To so: enterotoksigenirani sev *E. coli* (ETEC), ki povzroča drisko in se zdravi z antibiotiki, enteropatogeni sev *E. coli* (EPEC), ki povzroča dolgotrajno drisko, predvsem pri dojenčkih, zdravi se z antibiotiki, enterohemoragični sev *E. coli* (EHEC), ki povzroča drisko s krvavitvami, hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom (HUS). Slednji se ne zdravi z antibiotiki, saj lahko še poveča možnost HUS. Naslednji, enteroinvazivni sev *E. coli* (EIEC), povzroča drisko s krvavitvami, pri zdravljenju pa je pomembno, da telesu povrnemo izgubljeno tekočino in uravnotežimo

za *E. coli* je glukozno ali laktozno-peptonsko. *E. coli* začne rasti po tem, ko je bila v inkubatorju 24 ur. Pri našem delu smo uporabili nepatogeni sev *E. coli*, ki se uporablja v raziskovalnih študijah, saj je varen za uporabo. Priporoča ga ameriško ministrstvo za kmetijstvo (USDA Food Safety and Inspection Service) (ATCC, 2016).

Bacillus cereus je sporogena, gram-pozitivna, gibljiva, paličasta bakterija, ki pripada rodu *Bacillus*, družini *Bacillaceae*, redu *Bacillales* in razredu *Bacilli*. Bakterija je široko razširjena v naravi, predvsem v prsti, kjer živi kot saprofit. Najdemo jo tudi v prahu in v nekaterih rastlinah (Savini, 2016) ter v različnih ekstremnih življenjskih okoljih, kot so: morski mulj, gejzirji, pa tudi človeški in živalski iztrebki (NIJZ, 2013). Njen življenjski cikel sestavljajo doba kalitve, doba rasti in doba sporulacije. Med drugim lahko *Bacillus cereus* povzroča pljučnice, obolenja centralnega živčevja, infekcije ran po operacijah in gangreno (Savini, 2016).¹⁹ Maksimalna koncentracija fiziološke raztopine, pri kateri *B. cereus* še raste, je 7,5 %. Optimalni pogoj za njeno rast je aerobno okolje, ker pa je *B. cereus* fakultativno aerobna bakterija, lahko raste tudi v anaerobnem okolju (Savini, 2013).

Kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) so nesporogene enocelične glive, ki pripadajo vrsti *Cerevisiae*, rodu *Saccharomyces*, družini *Saccharomycetaceae*, redu *Endomycetales*, deblu *Ascomycota* in kraljestvu *Fungi* (glive), (Schaechter, 2009). So aerobni organizmi, okrogle oblike. Na površju ustvarjajo t.i. popke (Money, 2016). Njihova velikost je odvisna od vrste in od pogojev, v katerih živijo. Tako so nekatere vrste velike od 2-3 µm, druge pa od 20-50 µm. Poznanih in opisanih je približno 1000 vrst, med katerimi so najbolj poznane kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* (to so kvasovke, ki se uporabljajo v gospodinjstvu za peko in pridelavo piva in vina (Money, 2016)). Za gojitev kultur gliv kvasovk v laboratoriju, moramo ustvariti medij YEPD, ki vsebuje pepton, dekstrozo, agar in kvasni ekstrakt. Optimalni pogoj za njihovo rast je toplo, sladko, aerobno okolje, pri temperaturi med 20 in 30°C (Money, 2016). Minimalna temperatura, pri kateri glive kvasovke še rastejo, je 20°C, najvišja pa okoli 50°C. Optimalen pH okolja, v katerem rastejo, je med 4,5 in 6,5. Nekatere kvasovke sicer uspevajo v okolju z malo vode, a je za njihovo rast in metabolizem boljše okolje, v katerem je vode veliko. Pri temperaturi 30°C se celice delijo vsako 1-2 uri, tako da v enem dnevu iz vsake kvasovke nastane približno 4000 novih celic (Money, 2016). Ker je njihova rast počasna, jih za rast inkubiramo 48 ur.

elektrolite. Najdemo ga le pri človeku. Enteroadherentni sev *E. coli* (EAEC) povzroča dolgotrajno drisko pri otrocih in bolnikih okuženih z virusom HIV. Zdravljenje poteka enako kot pri sevu EIEC (Harvey, 2007).

¹⁹ Skupine ljudi, pri katerih je večja možnost za okužbo z *B. cereus*, so: nosečnice, novorojenčki in otroci, starostniki, kronični bolniki in imunsko oslabiljene osebe (NIJZ, 2013). Optimalna temperatura za mezofitske seve je 37°C, ne rastejo pa pri temperaturi, ki je nižja od 10°C. Medtem pa je pri fiziotropskih sevih ravno obratno, saj ti pri temperaturi 37°C rastejo najslabše (Savini, 2013).

3.2.2 Priprava testnih organizmov

Za preverjanje protimikrobne aktivnosti smo uporabili nepatogen sev bakterije *E. coli*, grampozitivne bakterije *B. cereus* in kvasovke *S. cerevisiae*. Prekonočne kulture vseh uporabljenih mikroorganizmov smo pripravili en dan prej z inokulacijo kulture vsakega od mikroorganizmov v tekoče gojišče (*E. coli* in *B. cereus* v tekoči LB medij, *S. cerevisiae* v tekoči YEPD medij).

Za **gojišče LB** smo potrebovali (Bidovec, 2014) 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl in do oznake 1 L, dolili destilirano vodo).

Za trdno gojišče, smo na 1 L gojišča dodali 15 g agar-agar.

Za pripravo tekočega gojišča kvasovk, smo uporabili hranilni medij **YPEP**. Pripravili smo ga po standardnem receptu (Imperl, 2016): 2,5 g kvasnega ekstrakta, 5 g glukoze, 5 g peptona in do oznake 250 mL dolijemo destilirano vodo.



Slika 18. Priprava gojišč (STEMforYouth, 2018)

Inokulirana gojišča smo inkubirali 24 ur (*E. coli* in *B. cereus* pri 37 °C, *S. cerevisiae* pri 30°C). Pripravljeno prekonočno kulturo smo uporabili za pripravo difuzijskih antibiogramov.

3.2.3 Priprava difuzijskih antibiogramov

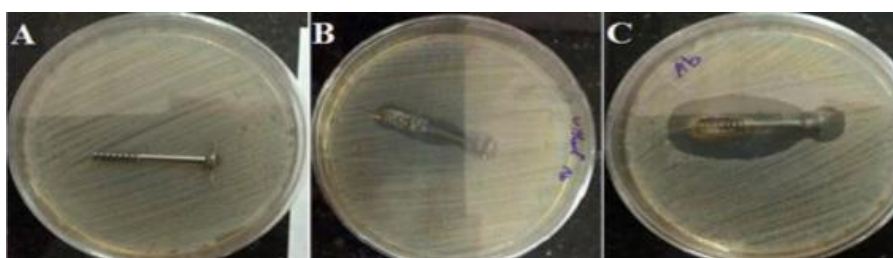
Vsebinsko tekočih gojišč organizmov (*E. coli*, *B. cereus* in *S. cerevisiae*), pripravljenih v epruvetah, po inkubaciji in pred uporabo premešamo na vibracijskem mešalu. Suspenzijo je treba mešati 10 do 30 sekund, oziroma dokler se resuspendira, vendar ne več kot 60 sekund, da se celice enakomerno porazdelijo (OECD, 2011). Z avtomatsko pipeto odpipetiramo 200 ml tekoče raztopine z bakterijami in vsebino previdno nanesimo na sredino pripravljenih petrijevk. Pri nanosu bakterij pazimo, da se s konico pipete ne dotaknemo delovne površine ali vsebine petrijevke, saj bi tako poškodovali agar v petrijevki, rezultati pa ne bi bili natančni. Opravimo bakterijski razmaz s spatulo drigalski (za konfluentno rast bakterij, ki jo pred vsako uporabo potopimo v etanol in jo nesemo preko plamena gorilnika, da zagotovimo

sterilnost). Petrijevke polovično pokrijemo s pokrovom in jih za 10 sekund postavimo ob gorilnik, da ne bi bila vsebina preveč tekoča.

V posušene petrijevke, z uporabo kovinske pincete, ki jo prav tako potopimo v etanol in prenesemo čez plamen, nanese 5 diskov, premera 55 mm. Nanje z avtomatsko pipeto nanese 10 µl učinkovine, tako, da pipeto držimo pravokotno na površino in vsebino iztisnemo na posamezen disk. Pri pozitivni kontroli nanese diske, prepojene z antibiotiki (50 µg Chloramphenicol in 30 µg Streptomycin). Pri negativni kontroli, pa ne nanašamo nobene učinkovine. Inokulirana gojišča bakterij *E. coli* in *B. cereus*, smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, kvasovk, *S. cerevisiae*, pa 48 ur pri 30°C.

3.2.4 Priprava antibiogramov s sterilnimi nerjavnimi površinami

Pri raziskavi smo uporabili nerjavni testni površini bakra in nerjavnega jekla. Za baker smo uporabili kovance, premera 1 cm, ki smo jih najprej temeljito zbrusili z brusnim papirjem. Zbrusili smo tudi koščke nerjavnega jekla dolžine 1x1 cm, da smo zagotovili ravno podlago za nanos učinkovin. Vse delce kovin smo všili v filter papir ter jih sterilizirali v avtoklavu (30 min pri 120°C). Za ta postopek smo se odločili zato, ker le tako lahko preverimo antimikrobno učinkovitost kovin v kombinaciji z izbrano učinkovino. Nato smo ponovili postopek nanosa organizmov (poglavje 3.2.3). Všitke s kovinami, smo namočili v posamezno preučevano raztopino, da se je filter papir prepojil.²⁰ Odvečno tekočino smo iztisnili ob steno čaše in všitek nanесли na sredino petrijevke. Pri negativni kontroli, všitkov nismo potopili v nobeno raztopino, temveč smo jih nanесли neposredno na bakterijski razmaz.



Slika 19. Primer metode antimikrobnega testa s kovino (Sadri, 2017)

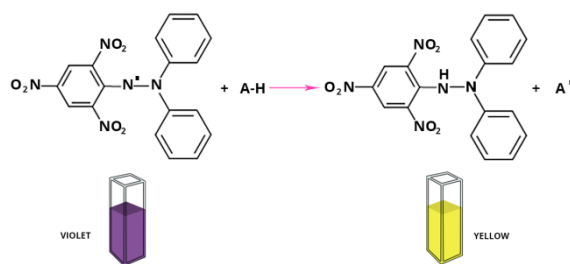
Inokulirana gojišča bakterij *E. coli* in *B. cereus*, smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, kvasovk, *S. cerevisiae*, pa 48 ur pri 30°C.

3.3 Antioksidativna aktivnost preiskovanih snovi

Za določanje antioksidativne aktivnosti smo uporabili radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH·). Metoda temelji na spektrofotometrični meritvi spremembe koncentracije DPPH·, ki se kot rezultat reakcije z

²⁰ Izmerili smo, da vsak všitek prejme okoli 140 µl učinkovine (ob tej količini je všitek prepojen).

antioksidantom zmanjša (Podlogar, 2017). Rezultat redukcije DPPH· je sprememba barve iz rožnato-vijolične v rumeno.



Slika 20. Delovanje radikala DPPH (CHIMACTIV, 2016)

Po kalibraciji spektrometra s propan-2-olom smo pripravili raztopino DPPH· s koncentracijo 0,0040 mol/L in ji posneli VIS spekter. Ker je bila absorbanca previsoka, smo raztopino razredčili na 0.0005 mol/L. Odčitali smo valovno dolžino, kjer je absorbanca najvišja ($\lambda_{\max} = 515,3 \text{ nm}$) ter nato pri tej valovni dolžini merili absorbance preiskovanih snovi skupaj z DPPH radikalom. V vsako kiveto smo dali 3,0 mL raztopine DPPH· in 0,5 mL vzorca. Sledilo je merjenje postopnega spreminjanja absorbance po času.

Odstotek inhibicije DPPH (v %) za posamezne preiskovane snovi smo izračunali po formuli (Podlogar, 2007):

$$\% \text{ Inhibicija DPPH} = [(A_0 - A') / A_0] \times 100$$

Pri kateri velja:

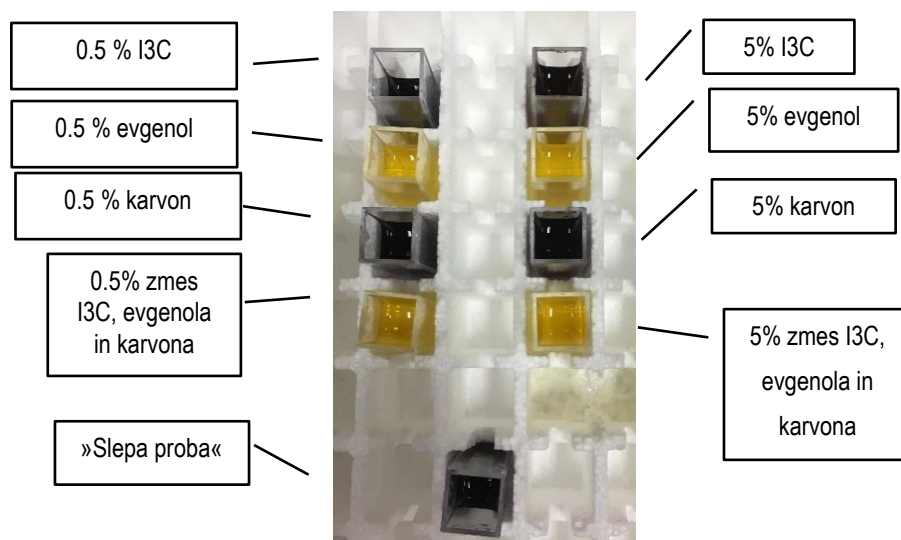
A_0 ... začetna absorbanca slepega vzorca

A' ... absorbanca vzorcev po določenih časovnih intervalih

4 REZULTATI TESTIRANJA

4.1 Antioksidacijska učinkovitost preiskovanih snovi

Pred preverjanjem antioksidacijske učinkovitosti preiskovanih snovi, smo pripravili raztopino DPPH·, koncentracije 0.5 mmol/L. V kiveto smo odpipetirali 3,0 mL DPPH in s spektrofotometrom določili začetno absorbanco slepega vzorca, ki se v časovnih intervalih (0, 1, 5, 10 min), ni spreminjala in je znašala 1,8. Postopek smo ponovili še s preiskovanim raztopinami, tako, da smo 3 mL DPPH dodali 0,5 mL preiskovane tekočine.

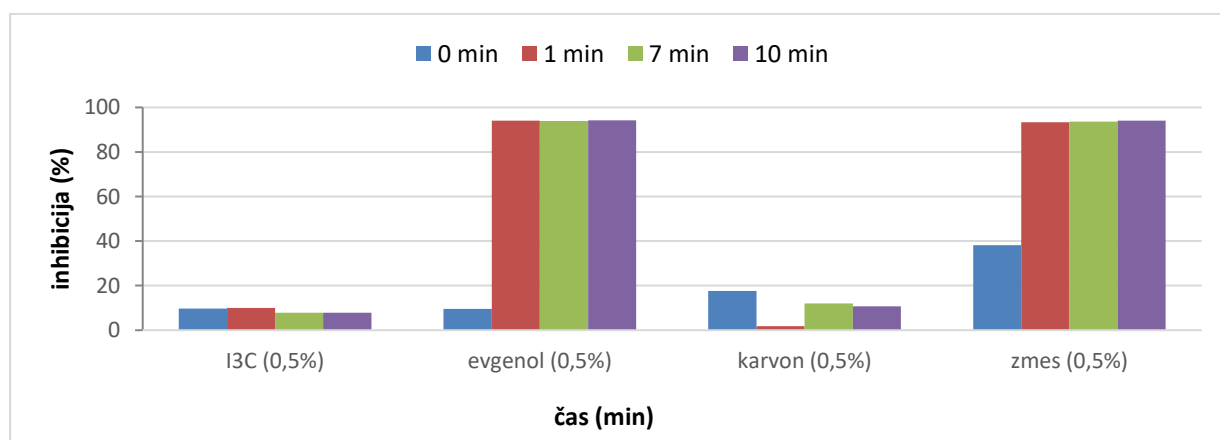


Slika 21. Rezultati vzorcev I3C, evgenola, karvona in mešanice I3C, evgenola in karvona ter »slepe proba« po 10 min (lasten vir)

Kot vidimo na Preglednici 2, je največjo antioksidacijsko aktivnost pokazal 0,5% eugenol (94,16 % po 10 min) in prav tako 0,5% zmes vseh treh učinkovin (94,07 % po 10 min), ki vsebuje eugenol, I3C in karvon.

Preglednica 2. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije) za 0,5% in koncentracije I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)

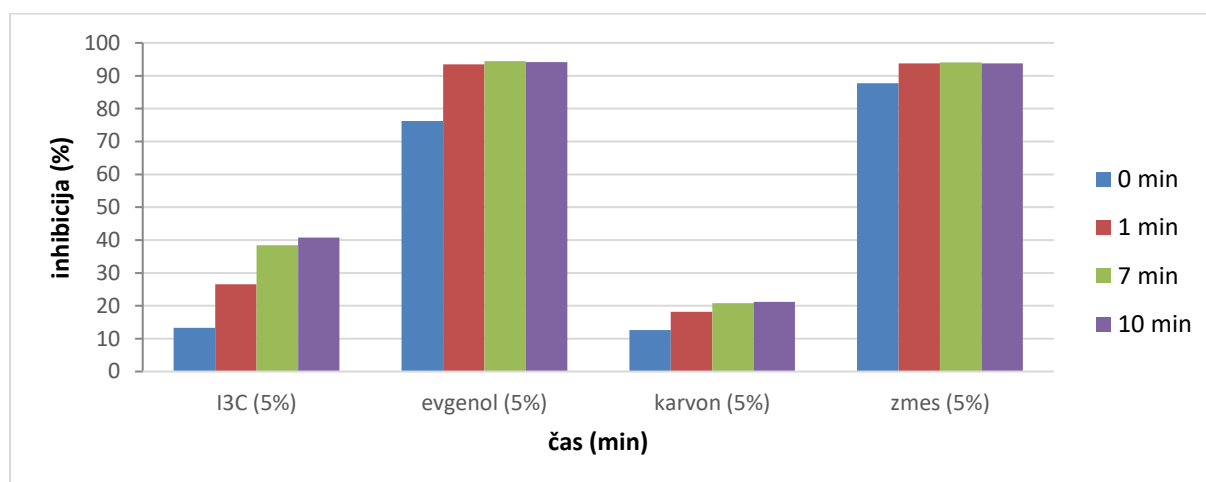
čas (min) $\pm 0,1$	0,5% I3C (%) inhibicije DPPH)	0,5% eugenol (%) inhibicije DPPH)	0,5% karvon (%) inhibicije DPPH)	0,5% zmes (%) inhibicije DPPH)
0,0	9,766	9,506	17,662	38,123
1,0	10,052	94,010	1,823	93,334
7,0	7,873	93,899	11,992	93,691
10,0	7,868	94,164	10,683	94,007



Graf 4. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 0,5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)

Preglednica 3. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije) 5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)

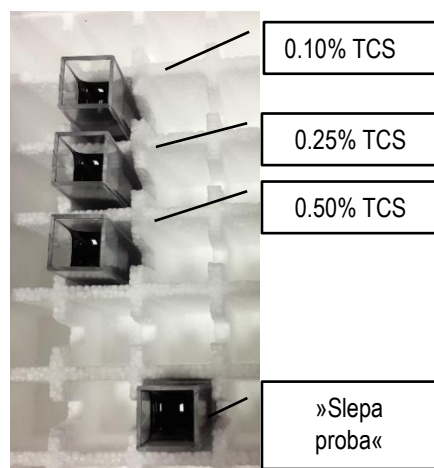
čas (min) $\pm 0,1$	5% I3C (% inhibicije DPPH)	5% evgenol (% inhibicije DPPH)	5% karvon (% inhibicije DPPH)	5% zmes (% inhibicije DPPH)
0,0	13,316	76,217	12,643	87,720
1,0	26,510	93,437	18,177	93,802
7,0	38,477	94,421	20,803	94,004
10,0	40,803	94,164	21,209	93,799



Graf 5. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 5% raztopin I3C, evgenola, karvona in zmesi (I3C, evgenola in karvona)

4.2 Antioksidacijska učinkovitost triklosana

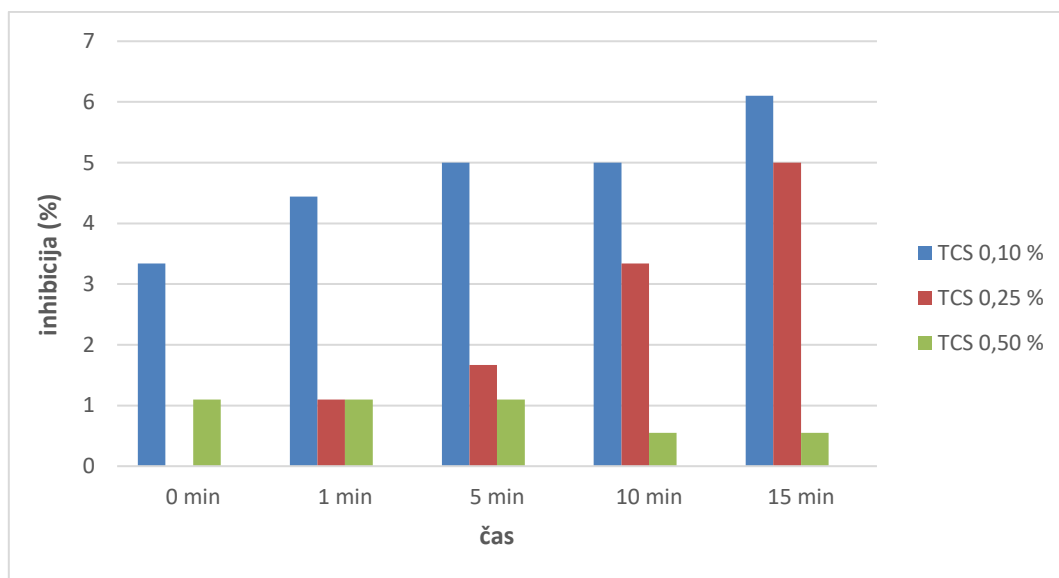
Antioksidacijsko učinkovitost triklosana smo preučevali pri naslednjih koncentracijah: 0,10%, 0,25% in 0,50%. Kot vidimo iz slike 18 je bil test antioksidacijske učinkovitosti z DPPH le delno pozitiven. Zdi se, da nizke koncentracije TCS še kažejo šibko antioksidacijsko učinkovitost, vendar ta po 10 min ne preseže 6%, kar je zelo nizko in v območju eksperimentalne napake.



Slika 22. Rezultati vzorcev 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS ter »slepa proba« po koncu testiranja (po 10 min) (lasten vir)

Preglednica 4. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS izražene v odstotni vrednosti inhibicije

čas (min) ± 0,1	0,10% TCS (% inhibicije DPPH)	0,25% TCS (% inhibicije DPPH)	0,50% TCS (% inhibicije DPPH)
0	3,34	0,0	1,10
1	4,44	1,10	1,10
5	5,00	1,67	1,10
10	5,00	3,34	0,55
15	6,10	5,00	0,55



Graf 6. Rezultati antioksidacijske učinkovitosti (izražene v odstotni vrednosti inhibicije v časovnih intervalih) 0,10%, 0,25% in 0,50% raztopin triklosana

4.3 Antimikrobna učinkovitost preiskovanih snovi

Inhibicijske cone, oziroma njihove premere, nastale po delovanju antimikrobnih učinkovin na bakterije smo izmerili z uporabo kljunastega merila, pri čemer smo upoštevali napako $\pm 0,01$ mm (vse meritve so zapisane v relativnih napakah). Za natančnost meritev, pri merjenju, petrijevke postavimo na črn papir. Izmerimo premere vseh inhibicijskih con, ki predstavljajo pravilne oblike kroga. Nato izračunamo povprečno vrednost vseh meritev (vključno z napakami) za posamezno petrijevko.

Antimikrobnost kovin (bakra in nerjavnega jekla) smo preverili z nanosom steriliziranih kovin neposredno na bakterijski razmaz (negativna kontrola) in z namakanjem steriliziranih delcev v antimikrobno učinkoviti raztopini (0,10% TCS in 5% evgenola). Za namakanje ploščic v učinkovinah smo se odločili, saj se delci kovin, obdani s filter papirjem, tako bolje prepojijo z učinkovino. Izmerili smo, da vsak delec kovine prejme okoli 140 μ L učinkovine. Zaradi najboljših rezultatov antimikrobne učinkovitosti 5% eugenola in 0,10% triklosana na zaviranje rasti bakterij, smo se odločili, da jih naneseemo tudi na delce bakra ter nerjavnega jekla, ter preverimo antimikrobnost kovin v kombinaciji z omenjenimi raztopinami

4.3.1 Antimikrobna učinkovitost za glive kvasovke *S. cerevisiae*

Preglednica 5. Rezultati antimikrobne učinkovitosti preiskanih snovi na kulturo *S. cerevisiae*

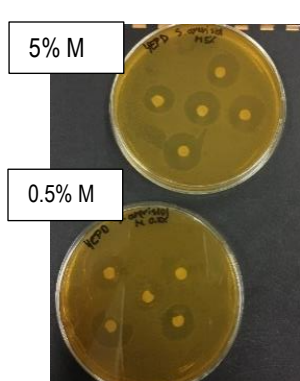
	0,5% I3C (mm)	0,5% evgenol (mm)	0,5% (+) karvon (mm)	0,5% mešanica I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola z antibiotikom <i>Chloramphenicol</i> (mm)
S. cerevisiae	11,66 (1 $\pm$ 0,0008)	14,93 (1 $\pm$ 0,0007)	14,38 (1 $\pm$ 0,0007)	18,57 (1 $\pm$ 0,0006)	0	24,22 (1 $\pm$ 0,0004)

Preglednica 6. Rezultati antimikrobne učinkovitosti preiskanih snovi na kulturo *S. cerevisiae*

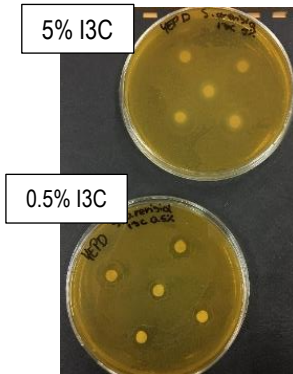
	5,0% I3C (mm)	5,0% evgenol (mm)	5,0% (+) karvon (mm)	5,0% zmes I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola z antibiotikom <i>Streptomycin</i> (mm)
S. cerevisiae	13,03 (1 $\pm$ 0,0007)	16,72 (1 $\pm$ 0,0006)	16,03 (1 $\pm$ 0,0006)	18,81 (1 $\pm$ 0,0005)	0	18,43 (1 $\pm$ 0,0005)

Po rezultatih difuzijskih antibiogramov pri glivah kvasovkah (*S. cerevisiae*), je največjo antimikrobno učinkovitost izmed testiranih naravnih učinkovin, glede na povprečje premerov inhibicijskih con, pri obeh preizkušeni koncentracijah pokazal evgenol (14,93 (1 $\pm$ 0,0007) mm pri 0.5% in 16,72 ($\pm$ 0,0006) mm pri 5%) in zmes evgenola, karvona in I3C (18,57 (1 $\pm$ 0,0006) mm pri 0,5% in 18,81(1 $\pm$ 0,0005) mm pri 5%)).

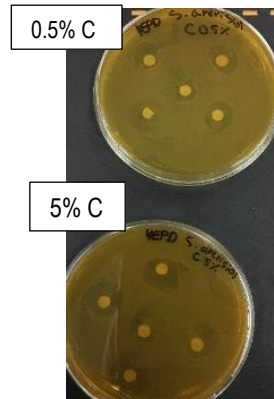
Visoka antimikrobno učinkovitost je bila opažena tudi pri pozitivni kontroli z antibiotiki; Chloramphenicol (24,22 (1±0,0004) mm) in Streptomycin (18,43 (1±0,0005) mm).



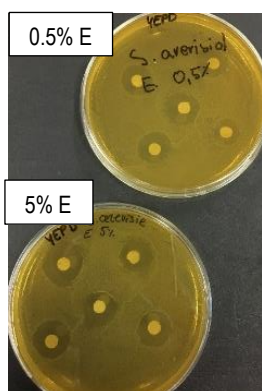
Slika 23. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice (M) na *S. cerevisiae* (lasten vir)



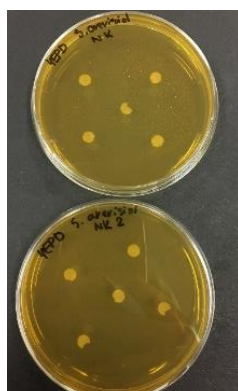
Slika 24. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% I3C, na *S. cerevisiae* (lasten vir)



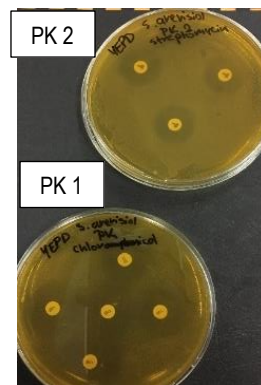
Slika 25. Antimikrobne učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na *S. cerevisiae* (lasten vir)



Slika 26. Antimikrobna učinkovitost 5% in 0,5% evgenola (E) na *S. cerevisiae* (lasten vir)



Slika 27. Antimikrobna učinkovitost negativnih kontrol na *S. cerevisiae* (lasten vir)

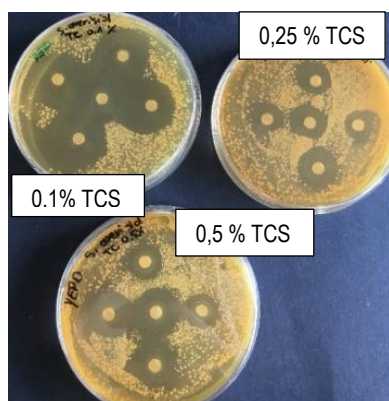


Slika 28. Antimikrobna učinkovitost antibiotikov (Chloramphenicol (PK 1) in Streptomycin (PK 2)) na *S. cerevisiae* (lasten vir)

Najvišjo antimikrobno učinkovitost, izmed vseh preizkušenih učinkovin, je pokazal triklosan. Zanimivo je, da je največjo učinkovitost proti bakterijam pokazal v najnižji koncentraciji, pri 0.10 % (Preglednica 7).

Preglednica 7. Antimikrobna učinkovitost 0,10 %, 0,25 % in 0,50 % TCS na *S. Cerevisiae*

	0,10% TCS (mm)	0,25% TCS (mm)	0,5% TCS (mm)
<i>S. cerevisiae</i>	27,8 (1±0,0004)	17,14 (1±0,0006)	18,54(1±0,0006)



Slika 29. Antimikrobna učinkovitost 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS na *S. cerevisiae* (lasten vir)

4.3.2 Antimikrobna učinkovitost za *E. coli*

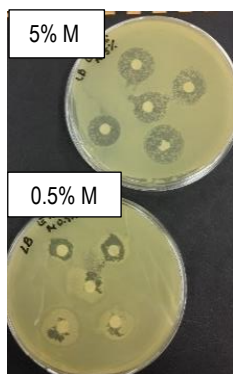
Rezultati meritev z bakterijo *E. coli* (preglednici 8 in 9), so največjo antimikrobno učinkovitost pokazali pri 5% raztopini evgenola (19,44 ($1 \pm 0,0005$) mm), sledi 0,5% koncentracija evgenola, (14,16 ($1 \pm 0,0007$) mm) kjer smo opazili nepravilno obliko inhibicijskih con, ki jih je bilo težko pravilno izmeriti. Cone so že prerasle bakterije, saj so najverjetneje že razvile odpornost na antibiotik. Dobra učinkovitost je bila opažena tudi pri pozitivni kontroli z antibiotikom Chloramphenicolom (15,77($1 \pm 0,0006$) mm), pri kontroli z antibiotikom Streptomycinom, pa so bili vidni le obrisi nastalih, a že z bakterijami preraslih inhibicijskih con.

Preglednica 8. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 0.5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo *E. coli*

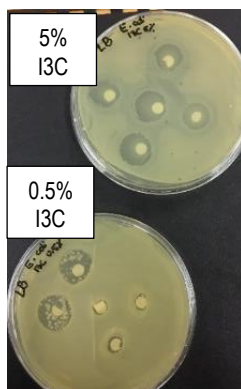
	0,5% I3C (mm)	0,5% evgenol (mm)	0,5% (+) karvone (mm)	0,5% mešanica I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola s <i>Chloramphenicolom</i> (mm)
<i>E. coli</i>	13,42($1 \pm 0,0006$)	14,16 ($1 \pm$ 0,0007)	14,04 ($1 \pm 0,0007$)	13,46 ($1 \pm 0,0006$)	0	15,77 ($1 \pm 0,0006$)

Preglednica 9. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo *E. coli*

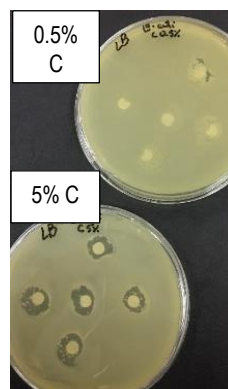
	5,0% I3C (mm)	5,0% evgenol (mm)	5,0% (+) karvon (mm)	5,0% mešanica I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola s <i>Streptomycinom</i> (mm)
<i>E. coli</i>	14,26 ($1 \pm$ 0,0007)	19,44 ($1 \pm 0,0005$)	13,68 ($1 \pm 0,0007$)	17,68 ($1 \pm 0,0006$)	0	29,12 ($1 \pm 0,0003$)



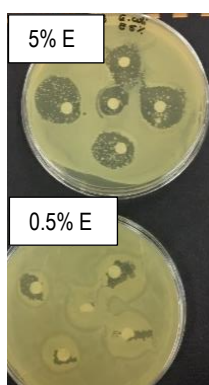
Slika 30. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice učinkovin (M) I3C, evgenola in karvona na *E. coli* (lasten vir)



Slika 31. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% I3C na *E. coli* (lasten vir)



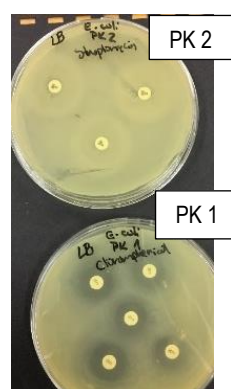
Slika 32. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na *E. coli* (lasten vir)



Slika 33. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% evgenola (E) na *E. coli* (lasten vir)



Slika 34. Negativna kontrola na *E. coli* (lasten vir)

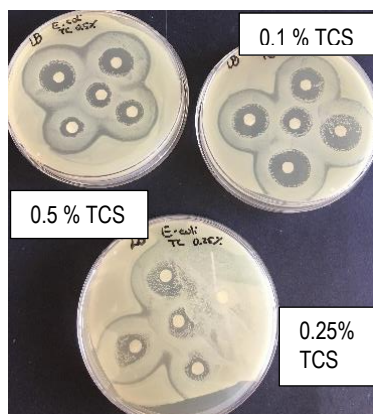


Slika 35. Pozitivna kontrola z antibiotikoma Chloramphenicol (PK 1) in Streptomycin (PK 2) na *E. coli* (lasten vir)

Triklosan je prav tako kot na glive kvasovke, tudi na bakterije *E.coli*, pokazal dobro antimikrobno učinkovitost; največjo (izmed testiranih 0,10%, 0,25% in 0,50% koncentracij) pri najnižji koncentraciji, in sicer pri 0,10% koncentraciji je bil izmerjen povprečni premer $16,92(1 \pm 0,0006)$ mm.

Preglednica 10. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% koncentracij TCS na *E. coli*

	0,10% TCS (mm)	0,25% TCS (mm)	0,50% TCS (mm)
<i>E. coli</i>	16,92 ($1 \pm 0,0006$)	10,44 ($1 \pm 0,0009$)	12,95 ($1 \pm 0,0006$)



Slika 36. Antimikrobna učinkovitost TCS (pri koncentracijah 0,10%, 0,25% in 0,50%) na *E. coli* (lasten vir)

4.3.3 Antimikrobna učinkovitost na *B. cereus*

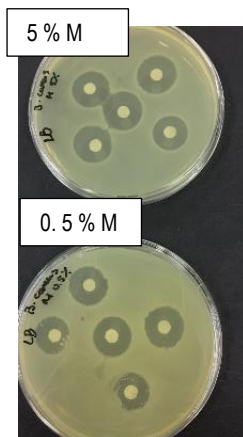
Antimikrobna učinkovitost testiranih naravnih učinkovin, je bila na izbrane bakterije *B. cereus* najbolj vidna pri 0,5% (19,06 mm) in 5% (17,11 mm) koncentraciji evgenola ter pri obeh zmesih I3C, evgenola in karvona (15,91 mm pri 0,5% in 16,95 mm pri 5 % koncentraciji). Višja antimikrobnost na *B. cereus* je bila opažena le pri pozitivni kontroli z antibiotikom Streptomycin in sicer 22,89 ($1 \pm 0,0004$) mm premera.

Preglednica 11. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 0,5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo *B. cereus*

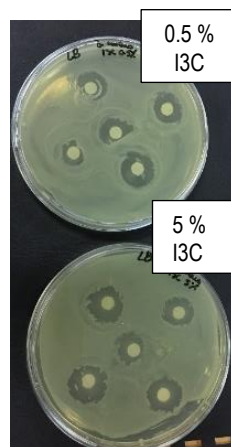
	0,5% I3C (mm)	0,5% evgenol (mm)	0,5% (+) karvone (mm)	0,5% mešanica I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola s <i>Chloramphenicolom</i> (mm)
<i>B. cereus</i>	14,33 ($1 \pm 0,0007$)	19,06 ($1 \pm 0,0005$)	0	15,91 ($1 \pm 0,0006$)	0	15,8 ($1 \pm 0,0006$)

Preglednica 12. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 0,5% koncentracij preiskanih snovi na kulturo *B. cereus*

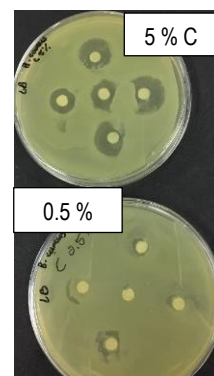
	5,0% I3C (mm)	5,0% evgenol (mm)	5,0% (+) karvon (mm)	5,0% mešanica I3C, evgenola in karvona (mm)	negativna kontrola (mm)	pozitivna kontrola s <i>Streptomycinom</i> (mm)
<i>B. cereus</i>	13,91 ($1 \pm 0,0007$)	17,11 ($1 \pm 0,0006$)	14,77	16,95 ($1 \pm 0,0006$)	0	22,89 ($1 \pm 0,0004$)



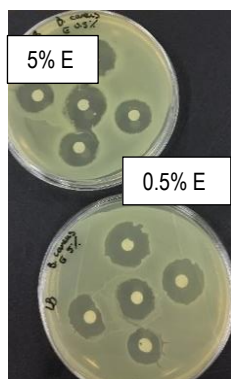
Slika 37. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% mešanice (M) I3C, evgenola in karvona na *B. cereus* (lasten vir)



Slika 38. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% I3C na *B. cereus* (lasten vir)



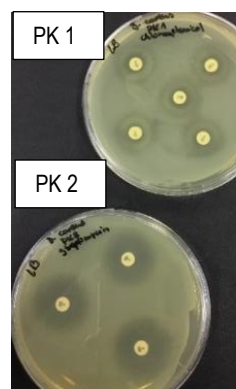
Slika 39. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% karvona (C) na *B. cereus* (lasten vir)



Slika 40. Antimikrobna učinkovitost 0,5% in 5% evgenola (E) na *B. cereus* (lasten vir)



Slika 41. Negativni kontroli na *B. cereus* (lasten vir)



Slika 42. Pozitivni kontroli z antibiotikoma Chloramphenicol (PK1) in Streptomycin (PK2) na *B. cereus* (lasten vir)

Kot vidimo iz slike 42, pozitivna kontrola s propan-2-olom ni dala merljivih rezultatov, torej lahko sklepamo, da ima alkohol propan-2-ol zelo nizko antimikrobno delovanje.

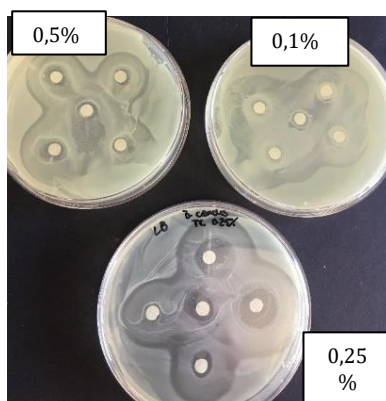


Slika 43. Antimikrobna učinkovitost propan-2-ola na *E. coli* in *B. cereus* (lasten vir)

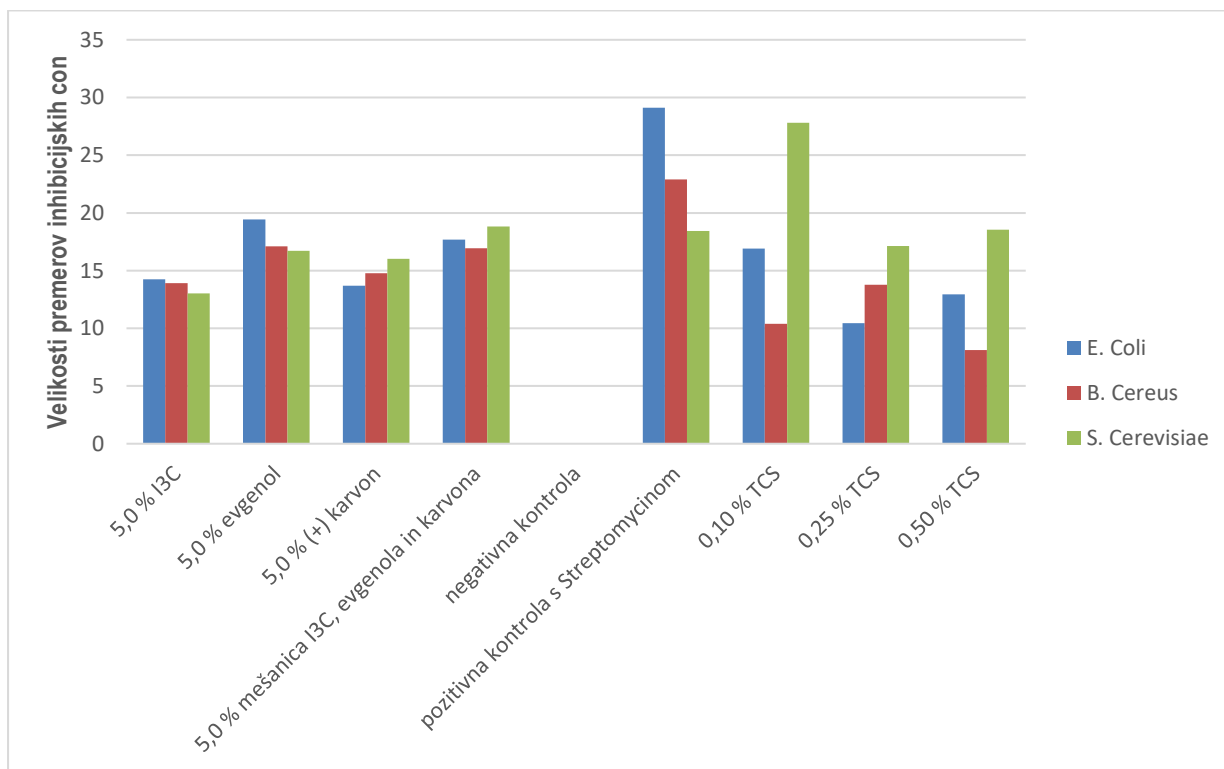
Antimikrobna aktivnost triklosana na *B. cereus* je bila najvišja pri 0,25% koncentraciji TCS, to je 13,78 ($1\pm0,0008$) mm premera, vendar pa je tudi pri 0,10% koncentraciji bila velika; znašala je 10,4 ($1\pm0,0009$) mm. Vzrok za manjšo antimikrobnost 0,10% koncentracije od ostalih dveh, lahko pripišemo hitri rezistentnosti bakterij.

Preglednica 13. Rezultati antimikrobne učinkovitosti 0,10%, 0,25% in 0,50% koncentracij TCS na *B. Cereus*

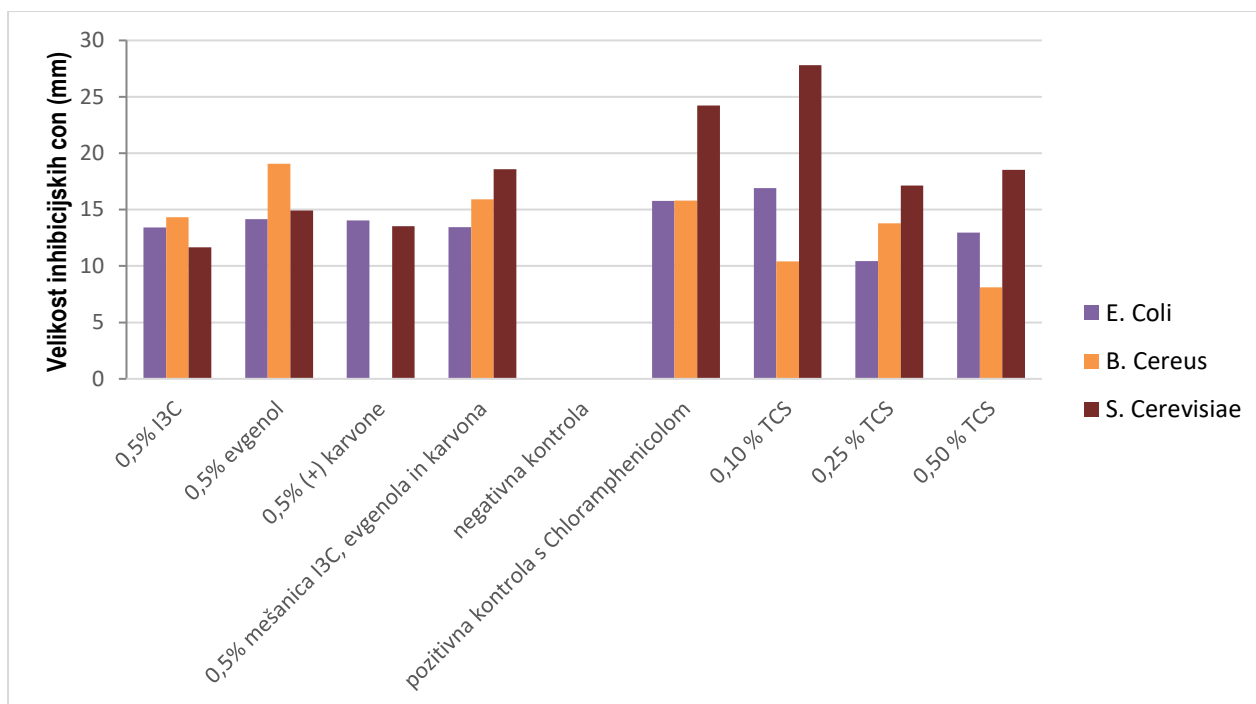
	0,10% TCS (mm)	0,25% TCS (mm)	0,50% TCS (mm)
<i>B. cereus</i>	10,4 ($1\pm0,0009$)	13,78 ($1\pm0,0008$)	8,11 ($1\pm0,0001$)



Slika 44. Antimikrobna učinkovitost 0,10%, 0,25% in 0,50% TCS na *B. cereus* (lasten vir)



Graf 7. Rezultati premerov inhibicijskih con 5,0 % koncentracij učinkovin, negativne ter pozitivne kontrole in 0,10%, 0,25% ter 0,50% koncentracij triklosana

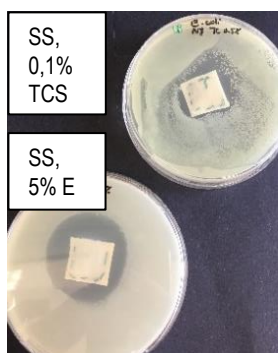


Graf 8. Rezultati premerov inhibicijskih con 0,5% koncentracij učinkovin, negativne ter pozitivne kontrole in 0,10%, 0,25% ter 0,50% koncentracij triklosana

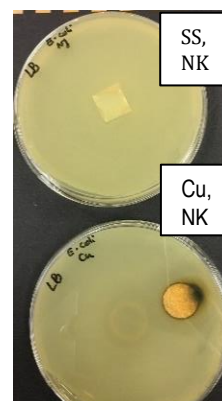
4.4 Antimikrobna učinkovitost bakra in jekla z nanešenimi aktivnimi učinkovinami

Preglednica 14. Rezultati antimikrobne učinkovitosti bakra (Cu) in nerjavnega jekla (SS) z nanešenimi (0,5% in 5%) aktivnimi učinkovinami na izbrane kulture

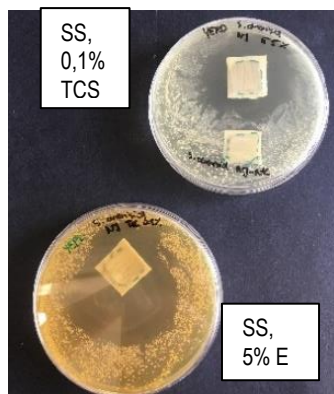
	Cu negativna kontrola (mm)	Cu 0,10% TCS (mm)	Cu 5% eugenol (mm)	SS negativna kontrola (mm)	SS 0,10% TCS (mm)	SS 5% eugenol (mm)
<i>E. coli</i>	0	41,87 (1±0,0003)	47,59 (1±0,0002)	0	28,09 (1±0,0003)	38,96 (1±0,0003)
<i>B. cereus</i>	27,92 (1±0,0004)	29,58 (1±0,0004)	43,77 (1±0,0002)	0	23,25 (1±0,0004)	39,14 (1±0,0003)
<i>S. cerevisiae</i>	25,67 (1±0,0004)	58,71 (1±0,0002)	64,43 (1±0,0002)	0	56,88 (1±0,0002)	57,33 (1±0,0002)



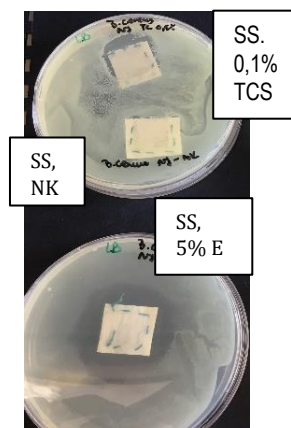
Slika 45. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5 % raztopino eugenola in 0,10 % raztopino TCS, na *E. coli* (lasten vir)



Slika 46. Negativni kontroli (NK) z bakrom in nerjavnim jeklom, na *E. coli* (lasten vir)



Slika 47. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5 % raztopino evgenola (E) in 0,10 % raztopino TCS, na *S. cerevisiae* (lasten vir)

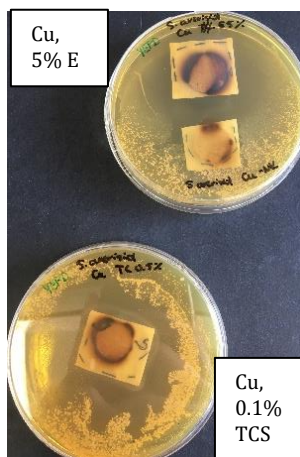


Slika 48. Antimikrobna učinkovitost nerjavnega jekla pomočenega v 5 % raztopino evgenola in 0,10 % raztopino TCS ter negativna kontrola nerjavnega jekla, na *B. cereus* (lasten vir)

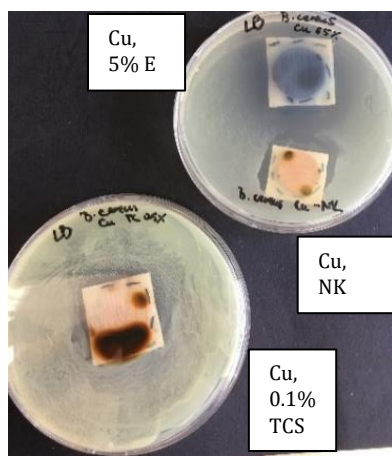
Zgornje slike prikazujejo antimikrobno učinkovitost nerjavnega jekla na izbrani vrsti bakterij (*E. coli* in *B. cereus*) ter na glive kvasovke (*S. cerevisiae*). V sklopu teh meritev, je največjo antimikrobnost dokazal delec nerjavnega jekla s 5% evgenolom in sicer na *B. cereus* (57,33 (1±0,0002)mm), podoben rezultat pa je na isto vrsto bakterije pokazal tudi 0,10% TC (s premerom inhibicijske cone 56,88(1±0,0002) mm).

Po rezultatih (Preglednica 14) opravljenih meritev z bakrom, je slednji, v primerjavi z nerjavnim jeklom, bolj antimikrobno učinkovit. Podatki kažejo na učinkovitost proti razvoju bakterij predvsem v kombinaciji z aktivnim 5% evgenolom (največji izmerjen premer: 64,43(1±0,0002) mm pri *S. cerevisiae*) in 0,10% TCS (največji izmerjen premer: 58,71(1±0,0002) mm pri *S. cerevisiae*).

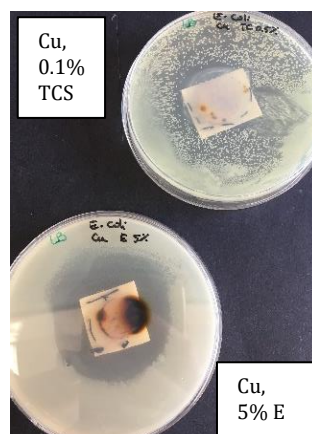
Nizka učinkovitost bakra z 0,10% TCS na *B. cereus* (slika 48), je lahko posledica neučinkovitosti TCS na tovrstne bakterije, oziroma hitra rezistentnost bakterij na to učinkovino. Slednja je bila opažena tudi pri delovanju bakra z 0,10% TCS na *E. coli* (slika 49), kjer vidimo preraščenost nastale inhibicijske cone z bakterijami (izmerjen premer je 41,87(1±0,0003) mm).



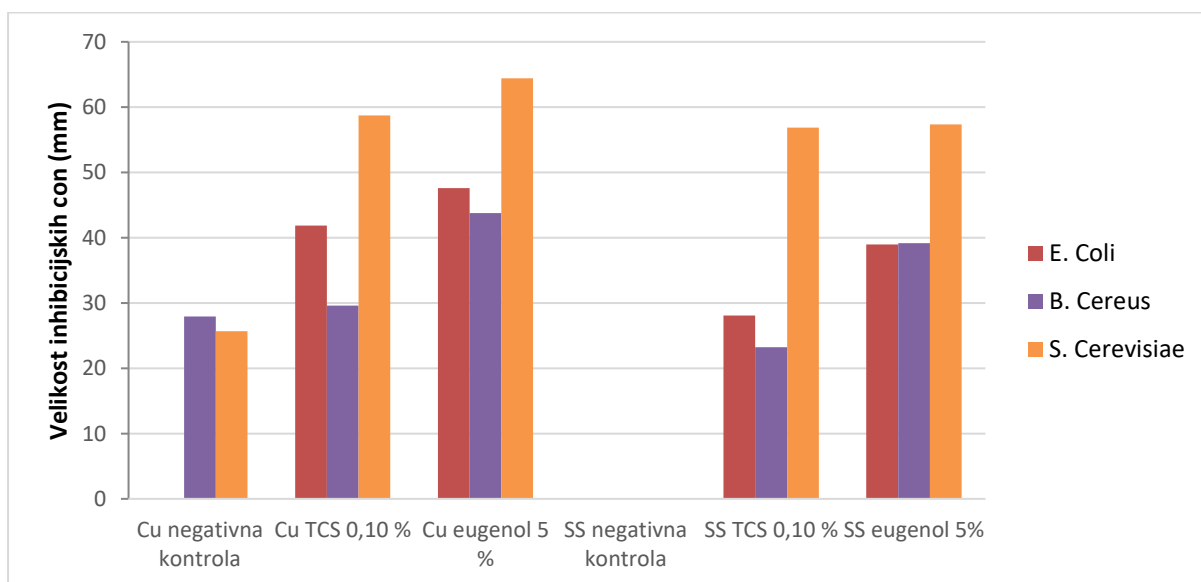
Slika 49. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 0,10% raztopino TCS in v 5% raztopino eugenola (E), na *E. coli* (lasten vir)



Slika 50. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 0,10% raztopino TCS in v 5% raztopino eugenola, ter negativna kontrola (NK) na *E. coli* (lasten vir)



Slika 51. Antimikrobna učinkovitost bakra, pomočenega v 5% raztopino eugenola in v 0,10% raztopino TCS, na *E. coli* (lasten vir)



Graf 9. Rezultati meritev antimikrobne učinkovitosti bakra (Cu) in nerjavnega jekla (SS) samih, in v kombinaciji z 0,10% TCS ter 5% evgenolom.

5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo primerjali anitimikrobno in antioksidativno učinkovitost triklosana z naravnimi učinkovinami, to je z evgenolom, indol-3-karbinolom in karvonom. Njihovo antimikrobno učinkovitost smo preverili tudi na nerjavnih površinah; jekla in bakra.

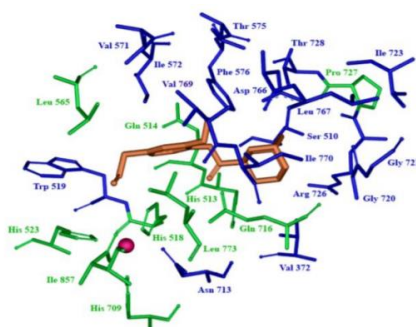
5.1 Antimikrobna učinkovitost preiskovanih snovi

Rezultati difuzijskih antibiogramov kažejo, da je bila na vseh preiskovanih organizmih (*E. coli*, *B. cereus* in *S. cerevisiae*), učinkovitost evgenola in zmesi učinkovin, ki je vsebovala evgenol, pri obeh izbranih

koncentracijah, najvišja (graf 7, 8). Rezultati se skladajo z znanstvenimi študijami Marchese s sod. (2017) in Krmelj in Thaler (2018), kjer je evgenol pokazal odlično antimikrobno aktivnost proti različnim sevom gliv vrste *Calbina* (*C. Albicans*, *C. Parapsilosis*, *C. Krusei*, *C. Tropicalis* in *A. Niger*) ter vrstam gram-negativnih in gram-pozitivnih bakterij.

Kot smo predvidevali v hipotezi 1, se je izkazalo, da je učinkovitost antimikrobnega delovanja preučevanih snovi odvisno od njihove koncentracije. Pri višjih koncentracijah so bile inhibicijske cone večje, kar pomeni, da je preiskovana snov izkazovala višjo učinkovitost. Tukaj opazimo prvo razliko med izbranimi naravnimi učinkovinami in TCS. Pri TCS se je izkazalo, da je najvišja antimikrobna učinkovitost bila dosežena že pri najnižji preučevani koncentraciji, to je 0,1%. Izbrana koncentracija je bila določena na osnovi Glasserjeve (2004) študije, kjer je bilo ugotovljeno, da je za učinkovito antimikrobno delovanje TCS potrebna že majhna količina, to je 0,10%, vendar ta študija ne navaja ali se učinkovitost še povečuje nad to koncentracijo. Naša raziskava nakazuje, da koncentracije TCS, ki presegajo 0,10%, niso bolj učinkovite v antimikrobnem delovanju.

Če primerjamo delovanje evgenola (predstavljeno v poglavju 1.3.1), ki temelji na inhibiciji rasti MO zaradi povečane občutljivosti fosfolipidnega dvosloja, kar vpliva na večjo prepustnost celične membrane (Golčer, 2015) in mehanizem delovanja TCS, ki temelji na inhibiciji sinteze maščobnih kislin, ugotovljamo, da princip delovanja niti ni tako zelo različen. Zaradi povečane celične prepustnosti membran (delovanje na fosfolipidni sloj) je tudi delovanje evgenola povezano z encimsko inhibicijo. To hipotezo deloma potrjuje tudi študija, ki je bila narejena na estrih evgenola in je merila lipooksigenazno aktivnost evgenola. Dokazali so, da se estri evgenola uspešno zasidrajo v aktivno mesto encima lipooksigenaze in inhibirajo njegovo delovanje.



Slika 52. Sidranje estra evgenola v encimsko mesto lipooksigenaze (Sadeghian s sod., 2008)

TCS z blokiranjem aktivnega mesta encima, prepreči sintezo maščobnih kislin, ki so nujne za izgradnjo celičnih membran in razmnoževanje (Fang s sod. 2010). V večini primerov, TCS deluje na bakterije bakteristatično (zavira njihovo rast) ne pa tudi bakteriocidno (uničenje bakterij). Zaradi tega, bakterije sčasoma razvijejo odpornost nanj in ta ni več učinkovit. Odpornost bakterij na TCS je najbolj vidna pri

antibiogramih TCS za bakterije *E. coli*. Slednje je v svoji raziskavi opazil že Russel (2003), ki opozarja, da stalna izpostavljenost TCS, odpornost samo še povečuje. V raziskavi Birosove in Mikulasove (2009), je sev bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki je bil izpostavljen TCS, sočasno razvil odpornost še na druge antibiotike. To je lahko problematično, saj se TCS, prisoten v vsakodnevno uporabljenih izdelkih (Preglednica 1), preko kanalizacije in vodovodov v kar 95% izloča v vodotoke (Fiss s sod., 2007). Ob vezavi s kisikom, tvori dioksine, ki so v večjih koncentracijah smrtno nevarni za večino živali (NIJZ, 2011). Odpornosti organizmov na TCS pred pričetkom raziskave nismo pričakovali, smo pa predvidevali podobnost v učinkovitosti antimikrobnega delovanja evgenola in triklosana (hipoteza 2). Največje odstopanje učinkovitosti evgenola (v obeh preučevanih koncentracijah) je bilo opaženo pri antibiogramih, opravljenih za bakterije *B. cereus*, kjer je učinkovitost 5 % evgenola skoraj dvakrat večja od učinkovitosti 0,10% TCS.

Drugi preiskovani naravni učinkovini, I3C in karvon, sta glede na podatke (graf 7 in 8), prav tako pokazali dobro antimikrobno učinkovitost na preizkušene organizme, vendar le kratkotrajne učinke. Bakterije so v večini primerov prekrile nastale inhibicijske cone, tako da so bili rezultati težje merljivi kot pri evgenolu. S tem je bila potrjena tretja hipoteza. 0,5% karvon, na bakterije *B. cereus*, ni dal merljivih rezultatov (slika 38), vendar to še ne pomeni, da ni antimikrobno učinkovit. Zaključimo lahko, da bi za enak učinek, kot ga je izkazal evgenol, potrebovali višjo koncentracijo karvona.

5.2 Antimikrobna učinkovitost bakra in nerjavnega jekla z nanešenimi aktivnimi učinkovinami

Opravljeni negativni kontroli z nerjavnim jeklom, na *E. coli*, *B. cereus* in *S. cerevisiae*, sta pokazali, da nerjavno jeklo samo po sebi nima antimikrobnega učinka in s tem smo potrdili četrto hipotezo. Povsem drugače pa je, če na površino nanesemo mešanico preučevanih snovi. Antimikrobna zaščita je delovala zelo učinkovito (slika 47 in 48) in s tem smo potrdili hipotezo 5.

Baker je, v nasprotju z nerjavnim jeklom, brez nanešenih učinkovin izkazal antimikrobno učinkovitost, vendar se je ta povečala ob nanosu antimikrobnih učinkovin, kar potrjuje šesto hipotezo.

Najvišji antimikrobni učinek, sta pri metodi difuzijskega antibiograma, pokazali koncentraciji 0,10% TCS in 5% evgenola, zato smo ju izbrali kot testni snovi za preizkus učinkovitosti antimikrobne zaščite pri bakru oz. jeklu, nanesli smo 5% evgenol in za primerjavo 0,10% TCS. Meritve kažejo, da je 5% precej bolj učinkovit, vendar bi za potrditev tega sklepa potrebovali več ponovitev in preizkuse z več različnimi koncentracijami.²¹

²¹ Dobro bi bilo preveriti tudi antimikrobno učinkovitost nerjavnega jekla in bakra pri enakih koncentracijah TCS in evgenola.

5.3 Antioksidacijska učinkovitost preiskovanih snovi in triklosana

Antioksidativnost naravne učinkovine evgenola in zmesi, ki vsebuje evgenol, se je med preiskovanimi snovmi izkazala za najvišjo (graf 5), kar potrjuje hipotezo sedem. Antioksidativnost evgenola je le ena od njegovih ključnih lastnosti. Ima še antipierično, antiseptično, virustatično, antitumotno, insekticidno ter antidepresivno delovanje. Evgenolovi pripravki se zato že uporabljajo v stomatologiji (anestetik, dentalni cement, votilnski vložek), v kombinaciji s cinkovim oksidom pa kot kirurške obveze (Kamatou s sod., 2012). Kot antioksidant zavira oziroma celo prepreči oksidacijo molekul, pri kateri se sproščajo prosti radikali, ki v telesu sprožijo verižne radikalske reakcije, posledice teh pa so lahko poškodbe celic (Halliwell, 1995).

V nasprotju pa TCS, ki se je izkazal kot zelo uspešen pri antimikrobnem testu, ne kaže antioksidacijskih lastnosti oz. je le-ta izjemno nizka.

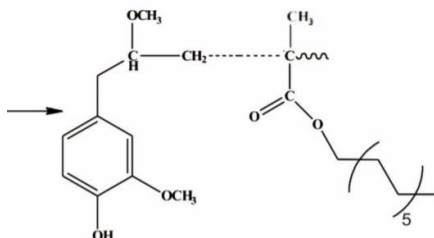
6 ZAKLJUČKI

Za biocid triklosan, ki je glavna aktivna učinkovina številnih antimikrobnih zmesi, raziskave navajajo negativne vplive na okolje in na zdravje ljudi ter tudi naraščajočo rezistentnost bakterij. Podvržen je fotolizi, kjer se lahko tvorijo tudi dioksini, ki so kancerogeni (Vončina, 2013). Primerjalna študija antimikrobnega delovanja treh naravnih učinkovin - evgenola, indol-3-karbinola in karvona s triklosanom je pokazala, da je učinek antimikrobnega delovanja evgenola na bakteriji *E. coli* in *B. cereus*, v obeh preučevanih koncentracijah (0,5% in 5,0%) presegel antimikrobno učinkovitost TCS. Na tej osnovi lahko zaključimo, da je evgenol snov, ki bi lahko predstavljala dobro alternativo triklosanu.

V nalogi smo antimikrobno učinkovitost preverjali tudi kot z nanosom na dva pogosto uporabljena kovinska materiala v zdravstvu, to je baker in nerjavno jeklo. V obeh primerih so bili rezultati zelo pozitivni, kar pomeni, da bi evgenol lahko bil uporabljen tudi kot antimikrobna zaščita na kovinskih predmetih, s katerimi bolniki prihajajo v stik v bolnišnicah. Slednje bi lahko v kombinaciji z drugimi ustreznimi metodami bistveno znižalo število bolnišničnih okužb.

Optimalno bi bilo, če bi evgenol lahko ustrezno polimerizirali in s tem prekrili tiste površine, ki so največkrat vzrok bolnišničnih okužb, saj ima evgenol v tekoči obliki zelo močan vonj in bi kot tak lahko deloval iritirajoče. Ker evgenol inhibira encim monoamino oksidazo, visoke koncentracije evgenola lahko negativno vplivajo na bolnike, ki že uživajo določene antidepresive, opioide in direktne simatikomimetike. Prav tako bi direkten stik z evgenolom lahko pomenil težave pri pacientih, ki imajo antikoagulantno terapijo (npr. hemofilijo) (Awasthi s sod., 2008). Zato menimo, da je smislenost nadaljnjih raziskav le v iskanju ustreznega polimera evgenola, ki bo prav tako izkazoval antimikrobno učinkovitost.

Naš predlog je preizkus uporabe kopolimera evgenola z lauril metakrilatom (prav tako materialom, ki se uporablja v zobozdravstvu za t.i. bele plombe), katerega sinteza je bila prvič objavljena lani, 2018 (Fajrin s sod.)



Slika 53. Kopolimer evgenola in metakrilata (Fajrin s sod., 2018)

Evgenola ni težko izolirati. Merkačeva (2016) je uspešno izolirala eterično olje cvetov dišečega klinčevca, kjer je s postopkom frakcionirne destilacije in kolonske kromatografije uspela sintetizirati 98 % evgenol, z metodo alkalne ekstrakcije pa 100%, čisti evgenol. Ker gre za obnovljiv naravni material, predvidevamo, da stroški izolacije evgenola, ne bi presegali stroškov sinteze triklosana.

To nalogo lahko razumemo kot preliminarno študijo možnosti uporabe naravnih učinkovin v boju proti bolnišničnim okužbam in vedno večji rezistenci MO proti klasičnim biocidom in antibiotikom. Preliminarno zato, ker na osnovi rezultatov poskusov lahko zaključimo, da ima izmed preučevanih snovi največji potencial evgenol, vendar ga je pred aktivno uporabo potrebno preizkusiti še na seve patogenih MO, ki so največkrat vzrok BO; določiti je potrebno prave odmerke oz. koncentracije in ga preizkusiti v funkciji površinske zaščite za kirurške instrumente in druge instrumente, ki se uporabljajo v zdravstvu. Kopolimer z metakrilatom se zdi ena od možnih opcij, ki bi jih lahko preizkusili v nadaljevanju, saj s patogenimi MO v šoli ne nameravamo eksperimentirati.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Za boj proti mikroorganizmom, ki povzročajo bolnišnične okužbe, so trenutno v rabi različni biocidi. Med uporabljenimi biocidi je pogost triklosan, ki ima škodljive vplive tako na človeka, kot tudi na okolje. Številni bakterije so že razvile odpornost na triklosan, zato smo v nalogi raziskali antimikrobno učinkovitost treh naravnih učinkovin: evgenola, indol-3-karbinola in karvona, ter zmesi teh učinkovin in jih primerjali s triklosanom. Rezultati antibiogramov so pokazali bistveno višjo antimikrobno učinkovitost evgenola ter zmesi preučevanih naravnih učinkovin kot jo je izkazoval triklosan. Ta rezultat so podprli tudi testi antioksidativnosti, kar kaže na možnost uporabe evgenola kot antimikrobnega sredstva. Pri izdelavi naloge, smo poskrbeli za minimalno količino odpadkov, ter neškodljivim vplivom na okolje. Z uporabo zaščitnih sredstev, smo se zavarovali pred kemikalijami in z delom v laminariju, onemogočili raznos bakterij po prostoru. Razsikava ima potencial širše družbene uporabe.

8 UPORABLJENA LITERATURA

8.1 Članki

Al-Doori, Z., Morrison, D., Edwards, G. et al. (2003). Susceptibility of MRSA to triclosan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, let. 51, str. 185–186.

Awasthi s sod. (2008). Eugenol derivates as Future Potential Drugs. *Journal of pharmacy Research*. 1; 215-220.

Birosova L., Mikulasova M. (2009). Development of triclosan and antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*, let. 58, str. 436-441.

Boyce, J., M., Pittet, D., (2002). Healthcare Infection Control Practices Advisory, Committee.; HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task, Force. "Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America". *Morbidity and Mortality Weekly Report*, let. 51, št. 16, str. 1–45.

Chuanchen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T. et al. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxb mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, let. 45, str. 428–430

Campbell L., Zirwas M. J. (2006). Triclosan. *Dermatitis*, let.17, str 204-207.

Cowan, M., Abshire K., Houk, S., Evans, M. S., (2002). Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *J and Microbial Biotechnology*, let. 30, str. 102–106

Cullinan M. P., Palmer J. E., Carle A. D., West M. J., Seymour G. J. (2012). Long term use of triclosan toothpaste and thyroid function. *Sci total environ*, februar, let. 416, str. 75-79.

Dashwood, Rod H.; Arbogast, D.N.; Fong, A.T.; Pereira, C.; Hendricks, J.D.; Bailey, G.S. (1989). "Quantitative inter-relationships between aflatoxin B1 carcinogen dose, indole-3-carbinol anti-carcinogen dose, target organ DNA adduction and final tumor response". *Carcinogenesis*, let. 10, št. 1, str. 175–181.

Dhillon, G., P., Kaur, S., Pulicharla R., Kaur Brar S., Cledón M., Verma, M., Surampalli R., (2015). Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *Int J Environ Res Public Health*, let.,12, št. 5, str. 5657–5684.

ECO LAB (2005). Varnostni list za Skinman Soft N, str. 1-5.

Fang J., et. al., Stingley, R., L., Beland, F., A., Harrouk, W., Lumpkins, D., L., Howard, P., (2010). Occurrence, Efficacy, Metabolism and Toxicity of Triclosan. *Journal of Environmental Science and Health*, september, let. 28, št. 3, str. 147-171.

Fiss E.M., Rule K.L., Vikesland P.J., (2007). Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan-containing antibacterial products. *Environ Sci Technol.*, let. 41, št. 7, str. 2387-94

Fu Y, Zu Y, Chen L, et al. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res* 21:989–94

Gabrovšek, M. univ. dipl. ing. (1999). Dezinfekcija in sterilizacija v zdravstvu. *Obzor Zdr. N.*, let. 33, str. 263-267.

Glasser, A. (2004). Triclosan, the ubiquitous antibacterial agent. Pesticides and You. Beyond Pesticides. *National Coalition Against the Misuse of Pesticide*, let., 24, št., 3,12.

Grass, G., Rensing, C., Solioz, M. (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied Environmental Microbiology*, let. 77, št. 5, str. 1541-1547.

Goga, A., Hasić, S., Bećirović, Š., Čavar, S. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts of *Nigella sativa* L. *Bulletin of the Chemists and Technologists*, let. 39, str. 15-19.

Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant. *Biochem Soc. Symp.*, št. 61, str. 73-101.

Heath, R. J., White, S. W. & Rock, C. O. (2001). Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, let. 40, str. 467-97.

Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije; IVZ (2010). Zdravje v Sloveniji, str. 95.

International Stainless Steel Forum, (2015). Stainless Steel in Hygienic Applications; Copper and its alloys. Str. 5-7.

Jadhav, B. K.; Khandelwal, K. R.; Ketkar, A. R.; Pisal, S. S. (2004). "Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, let. 30, št. 2, str. 195-203.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Shafi, P. M., Abraham, G. T. (2003). Analysis of the essential oil of the roots of the medicinal plant *kaempferia galanga* l. from South-India. *Acta Pharma Turc*, let. 43, št. 2, str. 4107-4110.

Klavs, I., Bufon Lužnik, T., Škerl, M. et al. (2001). Prevalance of and risk factors for hospital-acquired infections in Slovenia-results of the first national survey. *J Hosp Infect*, let. 54, št. 2, str. 149-157.

Klavs, I., Kolman, J., Lejko-Zupanc, T., Kotnik-Kevorkijan B., Korošec, A., Serdt M., Mreža SNPRBO, (2013). Prevalenca bolnišničnih okužb v slovenskih bolnišnicah za akutno oskrbo. *Med razgledi*, let. 25, št. 6, str. 11-16.

Konieczny, A., Rdzawski, Z. (2012). Antibacterial properties of copper and its alloys. *Materials Science and Engineering*, let. 56, št. 2, str. 53-60.

Kolman, J., Lejko-Zupanc, T., Kotnik-Kevorkijan B., Klavs, I., Korošec, A., Serdt M., Mreža SNPRBO, (2013). Prevalenca proti antibiotikom odpornih povzročiteljev bolnišničnih okužb v slovenskih bolnišnicah za akutno oskrbo. *Med razgledi*, let. 25, št. 6, str. 25.

Kramar, Z. (2013). Bolnišnične okužbe in Pivač, S. eds. Izbrane intervencije zdravstvene nege- teoretične in praktične osnove za visokošolski študij zdravstvene nege. *Jesenice: Visoka šola za zdravstveno nego*, let. 2013, str. 32-39.

Kumperščak Duh mag. farm. spec. (2018). Antiseptiki in razkužila v lekarniški praksi. Javni zdravstveni zavod Mariborske lekarnе, str. 139.

Laska, M.; Liesen, A.; Teubner, P., (1999). "Enantioselectivity of odor perception in squirrel monkeys and humans". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, let. 277, št. 4, str. R1098-R1103.

Lejko Zupanc, T., (2013). Okužbe, povezane z zdravstvom. Globalni pogled na problematiko okužb, povezanih z zdravstvom. *Medicinski razgledi*, 5. Baničevi dnevi, let. 52, št. 6, str. 5-10.

Levy, C. W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S. et al. (1999). Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 398, str. 383-4.

Lewis, A., Keevil, C. W. (2004). Antibacterial properties of alloys and its alloys in HVAC&R systems. International Copper Association. World Academy of Materials and Manufacturing Engineering. *International Scientific Journal*, avgust, let. 56, št. 2, str. 53-60.

Losasso, C., Belluco, S., Cibi, V., Zavagnin, P., Mičetić, I., Gallochio, F., Zanella, M., Bregoli, L., Biancotto, G., Ricci, A., (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol.*, let. 26, št. 5, str. 227.

Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Erdogan, O. I., Daglia, M., Fazel Nabavi, S., Izadi, M., Abdollahi, M., Mohammad Nabavi, S., Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, marec, let. 43, št. 6, str. 668-669.

Marshall K. (1992). »Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces«. *ASM News* 37, str. 778-789.

McLeod, DR., Muench, S.P., Rafferty, J.B. et al. (2001). Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan FabI. *International Journal of Parasitology*, let. 31, str. 109–113.

Mcgeady, D.L., Wansley D. L., Logan, D. A. (2002). Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. *J Nat Prod*, let. 65, št. 7, str. 953-955.

Michels, H. T., Wilks S. A., Noyce, J. O., Keevil, C. W. (2005). Copper Alloys for Human Infectious Disease Control. *Proceedings of the Materials Science and Technology Conference, Pittsburgh*, str. 1-11.

Mikolay, A., Huggett, S., Tikana, L., Grass G., Braun J., Nies D. H. (2010). Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Applied Microbiology and Biotechnology*, let. 87, str. 1875-1879.

Moon SE, Kim HY, Cha JD. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch Oral Bio*, let. 56, str. 907–916.

Muzlovič, I., Tomič, V., Beović, B., Strle, F., Čižman, M., Tomažič, J., eds. (2009). Okužbe, povezane z zdravstveno oskrbo. Pristop Svetovne zdravstvene organizacije, inštitucij Evropske skupnosti in Slovenije. Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja Klinični Center, Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo, Medicinska fakulteta, str. 35–41.

Muzlovič I., (2002). Bolnišnične okužbe v enoti intenzivnega zdravljenja, 11. Mednarodni simpozij intenzivne medicine. Slovensko združenje za intenzivno medicino, Klinični center Ljubljana, str. 11–18.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, let. 51, št. 6, str. 730-750.

Noyce, J., O., Keevil, C. W., Weaver, L., Michels, H., T., (2010). Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, let. 109, št. 6., str. 2200-2205.

Otter, J. A., Vickery A., Walcker J. T., DeLancey Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberg S. D., Salkeld J. A. G., Chewinsk, J., Yezli, S., Edgeworth, J. D. (2015). Surface – attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *The Healthcare Infection Society, Elsevier Ltd*, let. 89, št. 1, str. 16-27.

Ojeil, M., (2014). *Biocide impregnated surface materials for use in clinical areas – under what conditions do they work?* Cardiff University; Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: doktorska disertacija.

Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD, (2011). Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Quantitative Method for Evaluating Bactericidal Efficacy of Biocides Used on Hard Surfaces, str. 1-23.

Pantosti, A., Venditti, M. (2009). What is MRSA? *European Respiratory Journal*, let. 34, št. 5, str. 1190 – 1197.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011). "Carbapenems: past, present, and future". *Chemotherapy*, let. 55, št. 11, str. 4943–60.

Page, K., Wilson, M. and Parkin, I.P. (2009) Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *Journal of Materials Chemistry*, let. 19, št. 23, str. 3819-3831.

Prosen, M., Perme J. (2013). Higiena rok in nadzor higiene rok v povezavi s preprečevanjem okužb, povezanih z zdravstvom. *Med razgledi*, 5. Baničevi dnevi, let. 52, št. 6, str. 161-165.

Petti, S., Messano, G.A., Polimeni A., Dancer, S. J. (2013). Effect of Cleaning and Disinfection on Naturally Contaminated Clinical Contact Surfaces, *Acta Stomatologica Naissi*, let. 29, št. 67, str. 1265-1272.

Reiss R., Mackay N., Habig C., Griffin J. (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, november, let. 21, št. 11, str. 2483-2492.

Rita A., Silva M., Nogueira J. M. F. (2008). New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta*, let. 74, str. 1498-1500.

Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, let. 52, str. 750–763.

Sanchez-Prado L., Llompart M., et al (2006). Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, junij, let. 65, št. 8, str. 1338-1347.

Sandri, M. et. al., Pashmforosh, N., Samadieh, S., (2017). Implants modified with polymeric nanofibers coating containing the antibiotic vancomycin. Department of Biochemistry and Biophysics, Education and Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran. *Nanomed Res J*, let. 2, št. 4, str. 208-215.

Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, let. 202, str. 1–7.

Schoenen, D., Schlomer, G., (1989). Microbial contamination of water by pipe and tube materials. 3. Behaviour of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zentralbl Hyg mweltmed*, let. 188, str. 475- 480 (in German).

Schena, D., Papagrigoraki, A., Girolomoni, G. Sensitizing (2008). Potential of triclosan and triclosan-based skin care products in patients with chronic eczema. *Dermatol Ther.*, let. 21, št. 2, str. 35-38.

Sung, W. S., & Lee, D. G. (2007). In Vitro Antimicrobial Activity and the Mode of Action of Indole-3-Carbinol against Human Pathogenic Microorganisms. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, let. 30, št. 10, str. 1865–1869.

Tilton, S. C.; Hendricks, J. D.; Orner, G. A.; Pereira, C. B.; Bailey, G. S.; Williams, D. E. (2007). "Gene expression analysis during tumor enhancement by the dietary phytochemical, 3,3'-diindolylmethane, in rainbow trout". *Carcinogenesis*, let. 28, št. 7, str. 1589–1598.

Tomažin, U., Rezar, V., Voljč, M., Korošec, T., Šegula, B., Salobir, J., (2015). Rastlinske bioaktivne snovi v prehrani prašičev. Kmetijski inštitut Slovenije, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, str. 5-11.

Trajano, V., N., Lima, E., O., Souza, E., L., Travassos, A., E., R., (2010). Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. *Food Sci Technol* let. 30, str. 1001–1006.

Tuffnell, D.J., Croton, R.S., Hemingway, D.M., Hartley M.N., Wake P.N., Garvey R.J., (1987). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; the role of antiseptics in the control of an outbreak. *J Hosp Infect.*, november, let. 10, št. str. 255-259.

Vidmar, D., (2011). Bakterije in antibiotiki. Ko naš imunski sistem potrebuje pomoč *Dr. 24, jan. 2011*.

Yoshida Y., Furuta, S., Niki, E., (1993). Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, let. 1210, št. 1, str. 81-88.

Zupanc T. L., Klavs I., Kolman J., Kotnik–Kevorkijan B., Korošec A., Serdt M (2013). Okužbe, povezane z zdravstvom. 5. Baničevi dnevi, november, let. 52, št. 6, str. 5-28.

8.2 Knjige

- Alarcon E. I., Griffith M., Udekwu I., (2015). Silver Nanoparticle Applications. In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices. Str., 47-48.
- Characklis W., Marshall K. (2000). Nonculturable microorganisms in the environment. Washington, ASM Press, str. 113-31.
- Evrendilek GA. (2015). Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. Int J Food Microbiol, let. 202, str. 35–41.
- Harvey A., R. (2007). Microbiology, str. 111-112.
- Money, N. P. (2016). Fungi: A Very Short Introduction. Oxford University Press, str. 11-13, 39-41.
- Savini, V. (2016). The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Elsevier, str. 4-5.
- Schlegel G., H., Zaborosch, C. (1993). *General Microbiology*, str. 312-318.
- Siedenbiedel, F., Tiller, J. C. (2013). Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. Polymers 2012, let. 4, št. 1, str. 46-71.
- Simonsen, J. L. (1953). The Terpenes 1 (2. izd.). Cambridge: Cambridge University Press, str. 394–408.

8.3 Druga gradiva

- Alliance for the Prudent Use of Antibiotics; APUA, (2011). Science of resistance: Antibacterial agents [on-line]. Dostopno na: <https://apua.org/antibacterial-agents/> (povzeto: 3.1.2019).
- American Type Culture Collection; ATCC (2016). Non-pathogenic Escherichia coli Surrogate Indicators Panel. The Essentials of Life Science Research Globally Delivered™, [on-line]. Dostopno na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/search?q=Non-pathogenic%20Escherichia%20coli%20Surrogate%20Indicators%20Panel&sort=relevancy> (povzeto 3. 2. 2019).
- Busch, J., Guidi, L. (2017). Bacteria On The Rise: The Fight Against Antibiotic Resistance [on-line]. Dostopno na: <http://science-union.org/articlelist/2017/3/8/bacteria-on-the-rise-the-fight-against-antibiotic-resistance> (citirano 3.1. 2019).
- BRC CREW (2014). Copper Bed Rails Kill Hospital-Related Infections on Contact. [on-line]. Dostopno na: <https://www.sciencealert.com/copper-bed-rails-kill-hospital-related-infections-on-contact> (povzeto 5.1. 2018)
- Bidovec, B. (2014). Fiziološki odziv bakterije Escherichia coli v različno viskoznih gojiščih: diplomsko delo. Ljubljana: B. Bidovec.
- Bloom, J. (2014). Carvone: One Molecule, Two Different Scents And Flavors. American Council on Science and Helath, [on-line]. Dostopno na: <https://www.acsh.org/news/2018/08/01/carvone-one-molecule-two-different-scents-and-flavors-13255> (povzeto 5.1.2019).
- Cassini A. MD, Diaz Hogberg L. PhD, D. Plachouras PhD, Quattrocchi A. PhD, Hoxha A. MSC, Skov Simonsen G. PhD et. al (2018). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis [on-line]. Dostopno na: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(18\)30605-4/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(18)30605-4/fulltext#%20) (povzeto 15.1.2019).
- CHIMACTIV (2016). Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH° test, [on-line]. Dostopno na: <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> (povzeto 8. 1. 2019).
- Cimerman, A., Zajec, A., (2013). Učinek netreskovega soka na ušesne bakterije: projektno delo. BIC Ljubljana, GVŠ Ljubljana.

Cuprablau, Z., (2013). Bakrovi fungicidi. Cinkarna, Metalurško-kemična industrija Celje [on-line]. Dostopno na: <http://www.cinkarna.si/si/izdelki/agro-izdelki/996> (5. 1. 2019).

ECO LAB (2018). Skinman Soft N [on-line]. Dostopno na: <https://www.moja-lekarna.com/skinman-soft-n-1000-ml> (povzeto 5.1.2019).

European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARS-Net, (2014) [on-line]. Dostopno na: <https://reflectionsipc.files.wordpress.com/2014/12/ears-net-2014-mrsa.jpg> (citirano 5.1.2019).

European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC (2013). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals [on-line]. Dostopno na: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/> (citirano 6.1.2019).

European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC (2007). Surveillance of healthcare-associated infections Europe, [on-line]. Dostopno na: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/120215_SUR_HAI_2007.pdf (citirano 3.1.2019)

European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of surgical site infections in European hospitals – HAISSI protocol* (2012). Version 1.02 [on-line]. Dostopno na: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/120215_TED_SSI_protocol.pdf (citirano 2.1. 2019).

European Centre for Disease Prevention and Control (2012). Observed prevalence of HAIs with 95% confidence intervals and predicted prevalence of HAI in acute care hospitals based on patient case-mix and hospital characteristics, by country [on-line]. Dostopno na: <https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/prevalence-hais-and-antimicrobial-use/observed> (citirano 23.12.2018)

European Centre for Disease Prevention and Control (2017). Healthcare-associated infections in European hospitals [on-line]. Dostopno na: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-european-hospitals> (citirano 3.1. 2019)

European Centre for Disease Prevention and Control (2018). 33000 people die every year due to infections with antibiotic-resistant bacteria [on-line]. Dostopno na: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/33000-people-die-every-year-due-infections-antibiotic-resistant-bacteria> (povzeto 4.1.2019)

European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Burden of Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in DALYs, EU & European Economic Area [on-line]. Dostopno na: <https://www.eurekalert.org/multimedia/pub/185190.php> (povzeto 5.1.2019)

Fayrin s sod (2018). Materials Science and Engineering 349 (2018) 012003 doi:10.1088/1757-899X/349/1/012003

Fiala Novak, P., mag. farm. (2014). Zdravila; Zdravila brez recepta; Zobobol. *Pomurske lekarnе*, [on-line]. Dostopno na: <http://www.pomurske-lekarnе.si/tocka-zdravja/zobobol> (povzeto 15.1. 2019).

Golčer, M. (2015). Funkcionalizacija celuloznih vlaken s formulacijo eugenola in hitozana v različnih strukturnih oblikah: magistrsko delo. Maribor: M. Golčer.

Imperl, J., (2016). Bioremediacija s kromom (VI) onesnaženih odpadnih vod s pomočjo kvasovk: *raziskovalna naloga*. Maribor, J. Imperl.

Jewell, J., (2017). How to Add Copper Sulfate to Pools. Dostopno na: <https://www.hunker.com/13417954/how-to-add-copper-sulfate-to-pools> (povzeto 5. 1. 2019).

"IFRA" (2011-12) [on-line]. Dostopno na: www.ifraorg.org (povzeto 5.1.2019). Archived from the original on 2011-12-30.

Kamatou, G. s sod. (2012). Eugenol- from the remote Maluku Islands to international Market place; A review of a remarkable and versatile Molecule. *Molecules*, let. 17, str. 6953- 6981.

Klavs I., Kolman, J., Lejko Zupanc, T., Kotnik Kevorkijan, B., Korošec, A., Serdt, M., SNHPS Network (2016). The prevalence of and risk factors for healthcare-associated infections in Slovenia: results of the second national survey. Zdrav Var 2016.

Klavs I., Kolman, J., Lejko Zupanc, T., Kotnik Kevorkijan, B., Korošec, A., Serdt, M. Mreža SNHPS (2013). Prevalenca bolnišničnih okužbe v slovenskih bolnišnicah za akutno oskrbo. Med razgledi, let. 52, št.6, str. 11-16.

Kramer, A. Assadian O. (2014). Survival of Microorganisms on Inanimate Surfaces [on-line]. Dostopno na: https://www.researchgate.net/publication/283999635_Survival_of_Microorganisms_on_Inanimate_Surfaces (povzeto 3. 1. 2019)

Krmelj, L., Kos Thaler, N., (2018). *Primerjava antimikrobne učinkovitosti eteričnega olja črne kumine (Nigella sativa L.) z aktivnimi učinkovinami in eteričnim oljem navadne kumine (Carum carvi L.): raziskovalna naloga*. Maribor, II.gimnazija Maribor.

Latch DE, Packer JL, Stender BL, VanOverbeke JV, Arnold WA, and McNeil K (2005). Aqueous photochemistry of triclosan: Formation of 2,4-dichlorophenol, 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin, and oligomerization products. Environmental Toxicology and Chemistry, marec, let. 24, št. 3, str. 517-525 [on-line]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15779749> (povzeto 4. 1. 2019).

Lončar, S. Et. al. (2012). Ščepec rešitve, Zamolčane zdravilne moči začimb [on-line]. Dostopno na: http://old.seniorji.info/MOJE_ZDRAVJE_Klincki.html (povzeto 2. 2. 2019).

Maxwell, S., Gerba, P.C. (2014). AK coatings evaluation of air ducts in the Helford clinical research hospital at city of Hope after 10 years service, Department of Soil, Water and Environmental Science University of Arizona Tucson, Arizona [on-line]. Dostopno na: <https://www.aksteel.com/sites/default/files/2018-11/agion-hospital-case-study.pdf> (citirano 5. 1. 2018)

Maillard M. N. CHIMACTIV: Determination of the activity of an antioxidant by the DDPH' assay [on-line]. Dostopno na: <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> (citirano 17. 1. 2019)

McBain, A. J., Ledder, R. G., Sreenivasan, P. et al. (2004). Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53, DOI:10.1093/jac/dkh168. [on-line]. Dostopno na: <https://academic.oup.com/jac/article/53/5/772/747129> (povzeto 5. 1. 2019).

Merkač, M. (2016). *Primerjava komercialno dostopnega in izoliranega eteričnega olja cvetov dišečega klinčevca (Syzygium aromaticum), izolacija evgenola in sinteza: diplomska naloga*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; program kozmetologija.

Moj CBD (2018). Vse o terpenih [on-line]. Dostopno na: <https://mojcbd.si/vse-o-terpenih/> (citirano 20.1.2019).

Muzlovič, I., Jereb M. (2011). Bolnišnične okužbe v slovenskih intenzivnih enotah: SLOPIC – Slovenska raziskava.

Nacionalni inštitut za javno zdravje; NIJZ (2011). Dioksini – vprašanja in odgovori, [on-line]. Dostopno na: <http://www.nijz.si/sl/dioksini-vprasanja-in-odgovori> (povzeto 31. 1. 2019).

Nacionalni inštitut za javno zdravje; NIJZ (2015). Nalezljive bolezni; AMR in bolnišnične okužbe; Bolnišnične okužbe [on-line]. Dostopno na: <http://www.nijz.si/sl/bolnisnicne-okuzbe> (povzeto 8. 1. 2019)

Nacionalni inštitut za javno zdravje; NIJZ, (2013). Bacillus cereus (Bacillus cereus, B. cereus) v živilih [on-line]. Dostopno na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/bcereus_04082015.pdf (povzeto 15. 1. 2019).

Petrovčič, M. (2013-14). Higiena, varovanje in zdravje okolja – izobraževanje odraslih [on-line]. Skripta, dostopno na: <http://www.odraslih.com/uporabnik/file/SKRIPTA%20VZO%20MP%202013-2014.pdf> (17. 1. 2019).

Pintarič, Š. Obstoječnost biofilmov, Inštitut z sanitno inženirstvo (2010) [on-line]. Dostopno na: <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-DBODKMEW> (citirano: 25. 12. 2018)

Plušec, S., (2015). *Vpliv koncentracije in načina sinteze na velikost srebrnih nanodelcev, njihovo protimikrobno učinkovitost in uspešnost vključitve v hidrogel: raziskovalna naloga*. Maribor, II. Gimnazija Maribor.

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, 55S–64S [on-line]. Dostopno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x> (povzeto: 2. 1. 2019)

Podpač, M., (2018). *Prilagoditev listerij na benzalkonijev klorid: magistrsko delo*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za šivilstvo.

Podlogar, A., (2007). *Preservation of antioxidative properties of red wines: diplomska naloga*. Univerza v Ljubljani.

Pub Chem (2004). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3314, [on-line]. Dostopno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/eugenol> (povzeto 18.1.2019).

Sadeghian, H. Seyedi, M.S. (2008). Design and synthesis of eugenol derivatives as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 16: 890-901

Schaechter, M., 2009. *Encyclopedia of Microbiology* [e-knjiga]. Izdaja 3. The Boulevard: Elsevier [on-line]. Dostopno na: https://books.google.si/books?id=rLhdW5YzuO4C&printsec=frontcover&hl=sl&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&q&f=false (povzeto: 25.01.2018).

Singha P., Locklin, J., Handa, H. (2016). A Review of the Recent Advances in Antimicrobial Coatings for Urinary Catheters. [on-line]. Dostopno na: https://www.researchgate.net/figure/Antimicrobial-Mechanisms-A-Exclusion-Steric-repulsion-Polymers-attached-to-coating_fig2_311334717 (povzeto 5.1.2019).

Sung, W.S., Lee, D. G., (2007). In vitro antimicrobial activity and the mode of action of indole-3-carbinol against pathogenic microorganisms, US National Library of Medicine, National Institutes of Health [on-line]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917252> (povzeto: 7. 1. 2019).

Suetens, C., European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC (2015). Healthcare-associated infections in special patient groups: European perspective. ECDC Annual Epidemiological Report 2008 and Monnet DL, ECDC (preliminary estimate). Symposium zum Internationalen Tag der Händehygiene, Vienna, 5/5/2015, p. 3-5.

Sun, H., L., (2015). The bacteria-fighting super element that's making a comeback in hospitals: copper. *Health&Science. The Washington Post* [on-line]. Dostopno na: https://www.washingtonpost.com/national/health-science/the-bacteria-fighting-super-element-making-a-return-to-hospitals-copper/2015/09/20/19251704-5beb-11e5-8e9e-dce8a2a2a679_story.html?noredirect=on&utm_term=.26f3e9de1fc3 (povzeto 5. 1. 2019).

STEMforyouth – mikroorganizmi v/na vsakodnevni predmetih in difuzijski antibiogram [on-line]. Dostopno na: <http://www.stem4youth.eu/video/stemforyouth-mikroorganizmi-v-na-vsakodnevni-predmetih-difuzijski-antibiogram/> (citirano 2. 2. 2019).

Švarc, A., (2001). Sterilizacija. Avtoklav. Medeno srce, [on-line]. Dostopno na: <http://www.medenosrce.net/predmeti/mikrobiologija/288-seminarij/52-sterilizacija> (povzeto 12.1.2019).

Turk M., (2012). Mikrobiologija. Gradivo za vaje za študente Univerze v Ljubljani, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, program 1. stopnje Biokemija.

The Organisation for Economic Co-Operation and Development (2013). Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology. Guidance Document on Quantitative Methods for Evaluating the Activity of Microbicides Used On Hard Non-Porous Surfaces. *Series On Testing And Assessment*, št. 187 *Series On Biocides*, št. 6.

Varda, N., Kirbus, K., (2017). Učinkovitost ekstrakta nageljnovih žbic proti plesnim in glivicam: raziskovalna naloga. Maribor, II. Gimnazija Maribor.

Vlahovič, S. (2015). *Ugotavljanje vpliva triklosanin triklokarbana na adhezijo celic raka dojke in človeške endotelijske venske celice: magistrska naloga*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

Vončina, E., (2013). Analitika nevarnih snovi v okolju. Dioksini v okolju. [Elektronski vir] : zapiski predavanj, 1. izdaja. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, [on-line]. Dostopno na: https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/analitika_nevarnih_spojini_ernest_voncina.pdf (povzeto 2.2.2019).

Wertheim H, Melles D, Vos M, et al., (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, let. 5, str. 751–762 [on-line]. Dostopno na: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(05\)70295-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(05)70295-4/fulltext)

World Health Organization; WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [on-line]. Dostopno na: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (citirano 3.1. 2019).

Zakić R., (2018). Vse o terpenih. *Moj CBD*, [on-line]. Dostopno na: <https://mojcbd.si/vse-o-terpenih/> (povzeto 18.1.2019).