

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Luka KRANJC

**VPLIV ŽGANIH PIJAČ NA PREŽIVETJE BAKTERIJ SEVA
Salmonella Enteritidis V MODELU ŽELODCA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF SPIRITS ON SURVIVAL OF *Salmonella* Enteritidis
STRAIN IN MODEL STOMACH**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v študentskem laboratoriju LŽ-3 na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je bil imenovan prof. dr. Peter Raspor, za somentorico doc. dr. Barbara Jeršek in za recenzenta prof. dr. Janez Hribar.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: prof. dr. Janez Hribar

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Luka Kranjc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.67+579.24:663.5:612.32(043)=163.6
KG protimikrobno delovanje/*Salmonella* Enteritidis/žgane pijače/alkoholne pijače/vodka/encian/*Gentiana lutea*/pelinkovec/*Artemisia absinthium*/model želodca/umetni želodčni sok/živila/otročka kašica/mleko/jogurt/majoneza/razdeto meso/oslič
AV KRANJC, Luka
SA RASPOR, Peter (mentor)/JERŠEK, Barbara (somentorica)/HRIBAR, Janez (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN VPLIV ŽGANIH PIJAČ NA PREŽIVETJE BAKTERIJ SEVA *Salmonella* Enteritidis V MODELU ŽELODCA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 66 str., 7 pregl., 15 sl., 14 pril., 53 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI V nalogi smo ugotavljali, kako vplivata dodatek žgane pijače in vrsta živila na preživetje bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM 146 v modelu želodca. Preizkusili smo protimikrobni učinek treh žganih pijač (vodka, encian, pelinkovec) v dveh različnih količinah (15 ml in 30 ml), ki sta predstavljali 0,03 in 0,06 l zaužite žgane pijače. Vpliv omenjenih žganih pijač smo preizkušali v modelu želodca s steriliziranim mlekom; dodatek 15 ml in 30 ml vodke smo preizkusili v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava z rižem in piščancem); dodatek 15 ml vodke pa v modelu želodca z drugimi živili (navadni jogurt, majoneza, file osliča, razdeto puranje meso, kašice za dojenčke (breskev in riž, krompir in špinača s smetano). Začetna koncentracija bakterij v modelu želodca je bila 10^6 CFU/ml. Koncentracijo preživelih bakterij smo določali z metodo štetja kolonij na gojišču in sicer 1, 15, 30, 60 in 120 minut po inokulaciji. Na podlagi rezultatov smo prišli do spoznanj, da testirane količine žganih pijač vodke, enciana in pelinkovca nimajo protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili. Ugotovili smo tudi, da je preživetje bakterij v modelu želodca odvisno predvsem od vrste živila in delovanja umetnega želodčnega soka. Umetni želodčni sok je vplival na zmanjšano preživetje bakterij v modelu želodca z majonezo, navadnim jogurtom in kašico za dojenčke (breskev, riž); v modelu želodca z ostalimi testiranimi živili pa umetni želodčni sok ni imel vpliva na zmanjšanje števila živih bakterij. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da uživanje žganih pijač (vodka, encian in pelinkovec) v testiranih količinah ne more zmanjšati koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdravega človeka in da lahko protimikrobno in bakteriostatično delovanje pripišemo predvsem umetnemu želodčnemu soku in lastnostim posameznih živil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.67+579.24:663.5:612.32(043)=163.6
- CX antimicrobial activity/*Salmonella* Enteritidis/spirits/alcoholic beverages/vodka/gentian-flavoured alcoholic drink/*Gentiana lutea*/wormwood liqueur/*Artemisia absinthium*/model stomach/synthetic gastric fluid/foods/baby meal/milk/yogurt/mayonnaise/minced meat/European hake
- AU KRANJC, Luka
- AA RASPOR, Peter (supervisor)/JERŠEK, Barbara (co-advisor)/HRIBAR, Janez (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2011
- TI EFFECT OF SPIRITS ON SURVIVAL OF *Salmonella* Enteritidis STRAIN IN MODEL STOMACH
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 66 p., 7 tab., 15 fig., 14 ann., 53 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the graduation thesis we investigated the effect of different spirits and foodstuff on the survival rate of *Salmonella* Enteritidis ŽM 146 strain in a model stomach. We tested the effect of three different spirits (vodka, gentian-flavored alcoholic drink, wormwood liqueur) in two different additions (15 ml and 30 ml), which represented 0.03 and 0.06 l of the ingested alcoholic beverage. The effect of the spirits mentioned above was tested in a model stomach containing sterilized milk; addition of 15 ml and 30 ml of vodka was tested in a model stomach containing baby meal (vegetables with rice and chicken); addition of 15 ml of vodka was tested in a model stomach containing other types of foodstuff (yogurt, mayonnaise, European hake fillets, minced turkey meat, baby meal – peach and rice, potatoes with spinach and cream). The concentration of viable cells in the model stomach was 10⁶ CFU/ml at the start of the experiment. The concentration of viable cells was monitored with the plate count technique, with samples tested 1, 15, 30, 60 and 120 minutes after inoculation. The results of the experiment showed us that addition of tested spirits does not affect survival of *S. Enteritidis* in a model stomach containing tested foodstuff and that the survival of *S. Enteritidis* depends mainly on the properties of the foodstuff and exposure to synthetic gastric fluid. The synthetic gastric fluid caused decrease in the survival of bacteria in the model stomach containing mayonnaise, yogurt and baby meal (peach and rice); in the model stomach containing other tested foodstuff the synthetic gastric fluid did not affect the survival of the bacteria. We concluded that the ingestion of spirits (vodka, gentian-flavored alcoholic drink and wormwood liqueur) in tested quantities cannot reduce the concentration of *S. Enteritidis* under minimum infectious dose of a healthy person and that the antimicrobial and bacteriostatic activity can be attributed mainly to the synthetic gastric fluid and properties of the foodstuff.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ČLOVEŠKI ŽELODEC	3
2.1.1 Fiziologija želodca.....	3
2.1.2 Vpliv bakterij na želodec	3
2.1.3 Vpliv želodčnega soka na patogene bakterije.....	4
2.1.4 Vpliv alkohola na prebavila.....	6
2.2 ALKOHOLNE PIJAČE	6
2.2.1 Etanol.....	6
2.2.2 Alkoholne pijače.....	6
2.2.3 Učinki uživanja alkoholnih pijač na človeški organizem.....	7
2.2.4 Protimikrobni učinek alkohola na mikroorganizme	8
2.2.5 Protimikrobni učinek alkoholnih pijač na mikroorganizme	8
2.3 RAZISKAVE NA MODELU ŽELODCA	10
2.3.1 Pregled različnih metod	10
2.3.2 Vpliv alkoholnih pijač na bakterije v modelu želodca	11
2.4 BAKTERIJE RODU <i>Salmonella</i>	12
2.4.1 Splošno	13
2.4.2 Salmoneloza	13
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 Bakterijski sev	15
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	15
3.1.3 Živila.....	16
3.1.4 Žgane pijače.....	17
3.1.5 Umetni želodčni sok	17
3.1.6 Rastopina pepsina.....	17
3.1.7 Druge kemikalije in dodatki	17
3.1.8 Laboratorijska oprema	18
3.2 METODE DELA	19
3.2.1 Revitalizacija bakterij	20
3.2.2 Priprava inokuluma	20

3.2.3 Metoda spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca	21
3.2.4 Statistična obdelava podatkov	22
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	24
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM.....	24
4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE ENCIAN V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM.....	26
4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE PELINKOVEC V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM	28
4.4 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (ZELENJAVA, RIŽ, PIŠČANEC).....	30
4.5 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (KROMPIR, ŠPINAČA, SMETANA).....	32
4.6 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (BRESKEV, RIŽ).....	33
4.7 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z NAVADNIM JOGURTOM.....	34
4.8 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z MAJONEZO	35
4.9 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z RAZDETIM PURANOM.....	36
4.10 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S FILEJEM OSLIČA	37
4.11 PRIMERJALNA ANALIZA REZULTATOV	38
4.11.1 Vpliv žganih pijač na preživetje bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis v modelu želodca s testiranimi živili	39
4.11.2 Vpliv žganih pijač z zeliščnim ekstraktom na preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v modelu želodca s testiranimi živili	39
4.11.3 Vpliv količine dodatka žgane pijače na preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v modelu želodca s testiranimi živili	40
4.11.4 Vpliv vrste živila na preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v modelu želodca.....	40
4.11.5 Vpliv časa izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi živili na preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i>	41
5 SKLEPI	42
6 POVZETEK.....	43
7 VIRI	45
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vpliv želodčnega soka na patogene bakterije.....	4
Preglednica 2: Fizikalne lastnosti etanola (Bakalinsky in Penner, 2003).....	6
Preglednica 3: Glavne skupine alkoholnih pijač (Bakalinsky in Penner, 2003)	7
Preglednica 4: Pozitivni učinki zmernega uživanja alkohola (do 30 g/dan) in negativni učinki prekomernega uživanja alkohola (Halsted, 2003)	7
Preglednica 5: Učinek alkoholnih pijač na patogene mikroorganizme	8
Preglednica 6: Pregled različnih modelov želodca.....	10
Preglednica 7: Število prijavljenih primerov salmoneloze v RS (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010, 2010).	14

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema eksperimentalnega dela	19
Slika 2: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml vodke.....	25
Slika 3: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml vodke.....	26
Slika 4: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml enciana	27
Slika 5: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml enciana	28
Slika 6: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml pelinkovca.....	29
Slika 7: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml pelinkovca.....	30
Slika 8: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) in 15 ml vodke	31
Slika 9: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) in 30 ml vodke	32
Slika 10: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (krompir, špinača, smetana) in 15 ml vodke	33
Slika 11: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (breskev, riž) in 15 ml vodke.....	34
Slika 12: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom navadnega jogurta in 15 ml vodke.....	35
Slika 13: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom majoneze in 15 ml vodke.....	36
Slika 14: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom razdetega purana in 15 ml vodke.....	37
Slika 15: Preživetje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom fileja osliča in 15 ml vodke	38

KAZALO PRILOG

- Priloga A-1: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-2: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-3: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml enciana, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-4: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml enciana, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-5: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml pelinkovca, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-6: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml pelinkovca, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-7: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-8: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ter dodatkom 30 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-9: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (krompir, špinaca, smetana) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-10: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (breskev, riž) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-11: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z navadnim jogurtom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca
- Priloga A-12: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z majonezo in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Priloga A-13: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z razdetim puranjim mesom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Priloga A-14: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s fileji osliča in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CFU	kolonijska enota (ang. colony forming unit)
<i>Cl. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HCl	klorovodikova kislina
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SGF	umetni želodčni sok (ang. synthetic gastric fluid)
TSA	gojišče triptični soja agar
TSB	gojišče triptični soja bujon
XLD	(angl. Xylose Lysine Desoxycholate gojišče)

1 UVOD

Tehnološki napredek je v zadnjih 50 letih omogočil čedalje večjo mobilnost tako ljudi kot tudi surovin. Dandanes lahko skoraj vsak posameznik potuje po svetu in se srečuje z različnimi kulturami. Potrebno pa se je zavedati, da ima napredek in čedalje večja povezanost tudi negativne posledice. Z nami in surovinami tako potujejo tudi drugi živi organizmi, ki so lahko človeku nevarni in so sposobni okužiti populacijo na čisto drugem delu sveta. Poleg tega lažje prihajajo v stik z drugimi mikroorganizmi, ki so lahko nosilci rezistence na določene protimikrobne snovi in jo lahko z različnimi mehanizmi prenosa pridobijo, možen pa je tudi prenos virulence na sicer neškodljive mikroorganizme. Zaradi širjenja rezistence je tako čedalje manj učinkovitih antibiotikov, zato bo potrebno iznajti nove načine spopadanja s patogenimi organizmi.

Med okužbami s patogenimi mikroorganizmi so med najpogostejšimi okužbe s hrano. Sem sodijo okužbe z bakterijami vrst *Aeromonas hydrophilia*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* in *Yersinia enterocolitica* (Gould, 2004).

Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da se v svetu vsako leto pojavi 16 milijonov primerov tifusne mrzlice, 1,3 milijarde primerov gastroenteritisa in 3 milijone smrti zaradi bakterij rodu *Salmonella*. Netifusno salmonelozo ali enterokolitis lahko povzroči vsaj 150 različnih sevov salmonele, med katerimi sta v ZDA najpogostejša *Salmonella* Enteritidis in *Salmonella* Typhimurium (Pui in sod., 2011). V Sloveniji je najbolj pogost sev *S. Enteritidis* (Milohnoja, 2003).

Salmoneloza je že nekaj let med desetimi najpogosteje prijavljenimi nalezljivimi boleznimi. Je najpogostejši povzročitelj gastroenterokolitisov pri nas (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010, 2010).

Tako *in vitro* raziskave kot tudi epidemiološke študije so pokazale, da lahko uživanje različnih alkoholnih pijač ob hrani, predvsem vina, zmanjša verjetnost za alimentarno infekcijo (Carneiro in sod., 2008; Fernandes in sod., 2007; Just in Daeschel, 2003; Bellido Blasco, 2002; Klontz, 1999).

V diplomski nalogi smo skušali ugotoviti, kako vpliva uživanje različnih žganih pijač (vodka, encian, pelinkovec) in različnih vrst živil na preživetje bakterij seva *Salmonella* Enteritidis v modelu želodca.

1.1 CILJI NALOGE

Namen oziroma cilji diplomske naloge so bili z bakterijami seva *Salmonella* Enteritidis:

- določiti protimikrobni učinek žganih pijač v modelu želodca s testiranimi živili,
- ugotoviti, ali obstajajo razlike v protimikrobnem učinku različnih žganih pijač,
- ugotoviti, ali obstajajo razlike v protimikrobnem učinku pri dodatku različnih količin žganih pijač,
- preveriti vpliv različnih živil na protimikrobno učinkovitost žganih pijač v modelu želodca,
- preveriti vpliv časa izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi živili na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Dodatek žgane pijače ima protimikrobni učinek na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili.
- Žgane pijače z zeliščnimi ekstrakti imajo v modelu želodca s testiranimi živili večjo protimikrobno aktivnost kot čisti žitni destilat.
- Količina dodane žgane pijače vpliva na zmanjšano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili.
- Vrsta živila vpliva na zmanjšano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca.
- Čas izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi živili vpliva na zmanjšano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*.

2 PREGLED OBJAV

V tem poglavju so znanja predstavljena v obsegu, potrebnem za razumevanje eksperimenta.

2.1 ČLOVEŠKI ŽELODEC

Želodec je najširši del prebavne cevi. Leži med požiralnikom in dvanajstnikom na zgornjem levem delu trebušne votline. Vsebino želodca zadržujeta dve mišici zapiralki (sfinktra), in sicer sfinkter požiralnika v zgornjem delu in želodčni vratar v spodnjem delu. Njegova velikost in oblika se pri živem človeku spreminjata in sta odvisni od polnitve, telesnega položaja, starosti in spola (Kobe, 2004).

2.1.1 Fiziologija želodca

Fiziološko se želodec deli na: želodčni svod (*fundus*), telo želodca (*corpus*) in želodčni vratar (*pylorus*). Steno želodca sestavljajo: seroza, mišični sloj (zunanj vzdolžni in notranji krožni), podsluznica in sluznica (Guyton in Hall, 2006).

Izločanje in gibanje želodca sta regulirana po nevroalni in po hormonalni poti (Guyton in Hall, 2006).

Želodec sodeluje v drugi fazi prebave, to je v fazi, ki sledi žvečenju. Grižljaj (*bolus*) vstopi v želodec skozi sfinkter požiralnika. V želodcu se nato izločijo proteaze in klorovodikova kislina, ki uniči ali inhibira bakterije ter aktivira proteaze (pretvorba pepsinogena v pepsin). Kontraksije mišičja stene želodca sodelujejo pri mehanski razgradnji in pretvorijo grižljaj v *himus* (delno prebavljena hrana). *Himus* se nato izloči skozi želodčnega vratarja v dvanajstnik. Čas zadrževanja hrane v želodcu je odvisen od sestave in količine obroka (Kutchai, 2006).

V sluznici želodca so žleze, ki izločajo želodčni sok. Želodčne žleze imajo vrat, telo in bazo. Klorovodikovo kislino izločajo parietalne celice, ki se nahajajo na telesu žleze. Na bazi so glavne celice, ki izločajo pepsinogen, in pa nevroendokrine celice, ki izločajo številne hormone, pomembne za uravnavanje prebave. Na žleznem vratu mukozne vratne celice izločajo sluz, ki preprečuje, da bi hrana, želodčna kislina in prebavni encimi poškodovali želodčno sluznico (Guyton in Hall, 2006).

2.1.2 Vpliv bakterij na želodec

Izločanje klorovodikove kisline v želodcu ima pomembno vlogo pri zaščiti telesa pred patogenimi organizmi, vnesenimi s hrano in pijačo. pH želodčnega soka je 1-2 in je smrtonosen za večino mikrobnih patogenov; uporaba antacidov in ostalih pripravkov za nevtralizacijo želodčne kisline poveča verjetnost okužbe. Razjeda na želodcu se pogosto zdravi z nižanjem ali eliminacijo izločanja želodčne kisline. Tako zdravljenje navadno izniči protibakterijski učinek želodčne kisline. Večina razjed na želodcu izhaja iz okužb z bakterijami vrste *Helicobacter pylori*. Tovrstno bolezen se običajno zdravi z antibiotiki, kar zmanjša potrebo po uporabi nevtralizacijskih pripravkov in možnost okužbe pacientov

s hrano ali pijačo. Veliko bakterijskih patogenov, kot so bakterije vrst *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in *Helicobacter pylori*, ima prilagoditvene mehanizme, ki jim omogočajo preživetje v neugodnih razmerah. Te bakterije tako lahko preživijo kislo okolje želodca in v črevesju povzročijo gastroenteritis (Smith, 2003).

2.1.3 Vpliv želodčnega soka na patogene bakterije

Tekočina, ki se izloča v želodcu, se imenuje želodčni sok. Vsebuje soli, vodo, HCl, pepsin, intrinzični faktor in sluz. Želodčni sok je mešanica različnih izločkov epitelnih celic, žlez celic mukoznega vratu in želodčnih žlez, vsebuje pa tudi manjšo količino sline. Po zaužitju obroka se količina izločenih snovi iz žlez poveča. Pri visoki hitrosti izločanja je sestava želodčnega soka podobna izotonični raztopini HCl (Kutchai, 2006).

Visoka vsebnost kisline v želodčnem soku uniči večino zaužitih mikroorganizmov. Posamezniki, ki imajo zaradi bolezni ali zaradi jemanja zdravil, ki inhibirajo izločanje HCl, počasnejše izločanje želodčne kisline, so bolj izpostavljeni okužbam s patogeni, ki jih užijejo s hrano (Kutchai, 2006).

Do sedaj je bilo opravljenih veliko raziskav *in vitro* o vplivu želodčnega soka na različne patogene mikroorganizme. Uporabljene so bile različne sestave sintetičnega želodčnega soka, s predhodno prilagoditvijo bakterij v različnih medijih ali brez predhodne prilagoditve, vse pa so izpostavile nizek pH kot glavno protimikrobno sredstvo. V preglednici 1 so predstavljeni izsledki različnih raziskav vpliva želodčnega soka na patogene mikroorganizme.

Preglednica 1: Vpliv želodčnega soka na patogene bakterije

Bakterije	Živilo	Učinek želodčnega soka	Vir
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listi solate, ki so bili predhodno obdelani z organskimi kislinami	Rezultati raziskave so pokazali, da se je pri živilu, ki je bilo obdelano z organskimi kislinami, inhibitorni učinek želodčnega soka povečal.	Samara in Koutsoumanis, 2009
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Jabolčni, korenčkov, paradižnikov in pomarančni sok z dodatkom ali brez dodatka kalcijevega laktata	Rezultati raziskave so pokazali, da bakterije vrste <i>E.coli</i> O157:H7 bolje prenašajo kisle razmere želodčnega soka, če so bile predhodno shranjene v katerem od sokov; če pa so bile v želodčnem soku izpostavljene kalcijevemu laktatu, pa se njihovo preživetje močno zmanjšalo.	Yuk in sod., 2008

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 1: Vpliv želodčnega soka na patogene bakterije

Bakterije	Živilo	Učinek želodčnega soka	Vir
Enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>	Jabolčni sok	Rezultati raziskave so pokazali, da sev <i>E. coli</i> O157:H7 veliko bolje prenese izpostavitve želodčnemu soku kot ostali sevi.	Bergholz in Whittam, 2006
<i>Salmonella</i> spp.	Jabolčni, paradižnikov in pomarančni sok	Rezultati raziskave so pokazali, da želodčni sok močno zmanjša preživetje bakterij <i>Salmonella</i> ; predhodna prilagoditev v jabolčnem soku pa nekoliko podaljša preživetje.	Yuk in Schneider, 2006
<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Escherichia coli</i>	-	Rezultati raziskave so pokazali, da nizek pH (pod 2,5), želodčni sok in pepsin delujejo protimikrobno na bakterije obeh vrst.	Zhu in sod., 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	Hrenovke, ki so bile predhodno obdelane z aditivi	Rezultati raziskave so pokazali, da želodčni sok inhibira <i>L. monocytogenes</i> , dodatek konzervansov pa inhibicijo dodatno pospeši.	Stopforth in sod., 2005
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Shigella flexneri</i>	Mleto goveje meso	Rezultati raziskave so pokazali, da želodčni sok močno vpliva na preživetje bakterije vrste <i>S. flexneri</i> , medtem ko ima na bakterije vrste <i>E. coli</i> O157:H7 omejen učinek.	Tamplin, 2005
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium	-	Rezultati raziskave so pokazali, da želodčni sok uniči bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> in <i>S. typhimurium</i> , medtem ko ima na bakterije vrste <i>E. coli</i> O157:H7 omejen učinek.	Roering in sod., 1999

Podobne raziskave so bile opravljene tudi o vplivu vina na mikroorganizme v modelu želodca, obravnavane pa so v poglavju Vpliv alkoholnih pijač na mikroorganizme v modelu želodca.

2.1.4 Vpliv alkohola na prebavila

Uživanje alkohola prispeva k razvoju gastroezofagalne refluksne bolezni, ne glede na zaužito količino in vrsto alkoholne pijače. Alkohol zmanjša pritisk na mišico zapiralko požiralnika in njeno gibanje. Fermentirane in nedestilirane alkoholne pijače zvišajo nivo gastrina in pospešijo izločanje kisline. Sukcinilna in maleinska kislina, ki sta pogosto prisotni v alkoholnih pijačah, ravno tako pospešita izločanje kisline. Majhne količine alkohola pospešijo praznjenje želodca, velike količine pa upočasnijo praznjenje in gibanje želodca. Alkohol ravno tako prispeva k nastanku površinskega gastritisa in kroničnega atrofičnega gastritisa. Uživanje alkoholnih pijač, predvsem vina, ima baktericidni učinek na bakterije vrste *Helicobacter pylori* in enteropatogene bakterije. Najbolj opazni spremembi delovanja želodca pri uživanju alkoholnih pijač sta driska in zmanjšana absorpcija hranil. Prekomerno uživanje alkohola je povezano tudi z več vrstami raka, med drugim raka v želodcu in raka na debelem črevesu. Raziskave so pokazale, da je vino v primerjavi z ostalimi alkoholnimi pijačami manj kancerogeno (Bujanda, 2000).

2.2 ALKOHOLNE PIJAČE

2.2.1 Etanol

Etanol je bistra, brezbarvna in vnetljiva tekočina, ki se lahko meša z vodo in mnogimi organskimi topili v vseh razmerjih. Je higroskopna in relativno nestrupena snov, ki ima pri laboratorijskih podganah LD_{50} $13,7 \text{ g kg}^{-1}$. Pri mešanju etanola in vode pride po ohladitvi raztopine do kontrakcije volumna. Pri tlaku 101,3 kPa tvori raztopina 95,6 % etanola in 4,4 % vode azeotropsko zmes, kar pomeni, da s preprosto destilacijo ne moremo doseči več kot 95,6 % etanola. V preglednici 2 so prikazane nekatere fizikalne lastnosti etanola (Bakalinsky in Penner, 2003).

Preglednica 2: Fizikalne lastnosti etanola (Bakalinsky in Penner, 2003)

Formula	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
Masa molekule (Da)	46,07
Točka vrelišča ($^{\circ}\text{C}$)	78,32
Točka zmrzlišča ($^{\circ}\text{C}$)	- 114,1
Gostota, d_A^{20} (g ml^{-1})	0,7893
Refrakcijski indeks, n_D^{20}	1,361
Viskoznost pri 20 $^{\circ}\text{C}$ (cP)	1,17
Dielektrična konstanta pri 20 $^{\circ}\text{C}$	25,7
Toplota zlivanja (J g^{-1})	104,6
Toplota uparjanja pri 78,32 $^{\circ}\text{C}$ (J g^{-1})	839,31

2.2.2 Alkoholne pijače

Najzgodnejši pisni viri potrjujejo, da so ljudje uživali alkohol (etanol ali etilni alkohol) že pred več tisoč leti. Do sedaj je bilo izumljenih in zabeleženih veliko število različnih alkoholnih pijač. Čeprav je bilo odkritje alkohola nedvomno splet naključij, je bil njegov mikrobn izvor dokazan pred več kot 120 leti z raziskavami Louisa Pasteurja. Mikrobn

fiziologi so do sedaj uspeli dokazati, da alkohol nastane skozi različne metabolne poti različnih mikrobnih vrst in vedno služi enakemu namenu: regeneraciji oksidirane kofaktorja, običajno oksidirane oblike nikotinamid adenin dinucleotida (NAD^+) (Bakalinsky in Penner, 2003).

Vse alkoholne pijače nastanejo neposredno ali posredno iz fermentiranih substratov. Substrat je lahko sadje, ki ima dovolj fermentabilnih sladkorjev, kislin in ostalih hranil; različna žita (pšenica, ječmen, riž); gomoljnice (krompir); mleko in deli rastlin (mezcal). Nastanejo lahko z alkoholno fermentacijo, mešano alkoholno-mlečnokislinsko fermentacijo ter z destilacijo fermentiranih substratov. Glavne skupine alkoholnih pijač so prikazane v preglednici 3 (Bakalinsky in Penner, 2003).

Preglednica 3: Glavne skupine alkoholnih pijač (Bakalinsky in Penner, 2003)

Postopek	Primer
Alkoholna fermentacija	Pivo, vino, sake
Mešana alkoholno-mlečnokislinska fermentacija	Kefir, kumis
Destilacija	Viski, vodka, rum, vinjak, tequila, likerji
Pijača z dodanim alkoholom	Portovec, sherry, vermut

2.2.3 Učinki uživanja alkoholnih pijač na človeški organizem

Alkohol je hkrati živilo, s hranilno vrednostjo $29,7 \text{ kJ g}^{-1}$ ($7,1 \text{ kcal g}^{-1}$), in droga, ki zaužita v velikih količinah povzroča zastrupitev, odvisnost in poškodbe organov. Kljub dobro znanim škodljivim lastnostim ima uživanje alkohola v zmernih količinah ($15\text{-}30 \text{ g/dan}$) na telo določen varovalen učinek. V tabeli so podani pozitivni učinki zmernega uživanja alkohola in negativni učinki prekomernega uživanja alkohola (Halsted, 2003). Pozitivni in negativni učinki zmernega in prekomernega uživanja alkohola so predstavljeni v preglednici 4.

Preglednica 4: Pozitivni učinki zmernega uživanja alkohola (do 30 g/dan) in negativni učinki prekomernega uživanja alkohola (Halsted, 2003)

Pozitivni učinki	Negativni učinki
<ul style="list-style-type: none">- Zaščita pred ishemično kardiovaskularno boleznijo- Izboljšan lipoproteinski profil- Povečana dejavnost aktivatorja tkivnega plazminogena- Flavonoidi v vinu nižajo oksidacijo LDL in adhezivnost trombocitov	<ul style="list-style-type: none">- Hipertenzija- Kardiomiopatija- Možganska kap- Pankreatitis- Anemija- Nevrološke bolezni- Rak na grlu, dojkah in debelem črevesu- Bolezni jeter- Podhranjenost in bolezni, ki so posledica pomanjkanja hranil

2.2.4 Protimikrobni učinek alkohola na mikroorganizme

Mehanizem in vpliv različnih koncentracij alkohola na mikroorganizme preučujejo predvsem medicinsko–sanitarne znanosti v kontekstu testiranja učinkovitosti različnih dezinfekcijskih sredstev. Kot razkužila se uporabljajo predvsem vodne raztopine etanola ali izopropanola. Optimalne koncentracije za uničenje mikroorganizmov so med 60 in 90 vol. %, če pa je koncentracija pod 50 %, njihovo delovanje močno pade. Etanol deluje na celično membrano in povzroči denaturacijo proteinov. Največji učinek ima v obliki vodne raztopine, saj prisotnost vode pospeši denaturacijo. Učinek delovanja je omejen na vegetativne oblike bakterij in na viruse z lipidnim ovojem, medtem ko je učinek na bakterijske spore zanemarljiv. Dokazano je bilo tudi, da alkohol uniči encim dehidrogenazo pri bakterijah vrste *E. coli* in da etanol podaljša fazo lag pri bakterijah vrste *Enterobacter aerogenes* (Ali in sod., 2001; Rutala, 1999).

2.2.5 Protimikrobni učinek alkoholnih pijač na mikroorganizme

Vpliv alkohola na preživetje mikroorganizmov je bil preizkušen z nekaterimi alkoholnimi pijačami, predvsem z vinom. V preglednici 5 so predstavljeni učinki nekaterih alkoholnih pijač na patogene mikroorganizme.

Preglednica 5: Učinek alkoholnih pijač na patogene mikroorganizme

Alkoholna pijača	Mikroorganizem	Učinek alkoholne pijače	Avtor
Vino	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis	Rezultati raziskave so pokazali, da ima vino največjo protimikrobno aktivnost, sledijo mu vino z odstranjenimi polifenoli, dealkoholizirano vino, raztopina etanola z nizkim pH, raztopina z nizkim pH; najnižjo protimikrobno aktivnost pa ima raztopina etanola.	Boban in sod., 2010
Vino	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis	Rezultati raziskave so pokazali, da vino kljub toplotni obdelavi obdrži protimikrobno aktivnost.	Boban in sod., 2010
Vino	<i>Campylobacter jejuni</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima že razredčeno vino protimikrobno aktivnost; prav tako same fenolne komponente; etanol v vinu ima omejeno protimikrobno aktivnost; pH pa na preživetje nima vpliva.	Ganan in sod., 2009
Vino	<i>Listeria monocytogenes</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da imajo polifenoli v vinu inhibitorni učinek na bakterijo <i>Listeria monocytogenes</i> .	Rodriguez Vaquero in sod., 2007

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 5: Učinek alkoholnih pijač na patogene mikroorganizme

Alkoholna pijača	Mikroorganizem	Učinek alkoholne pijače	Avtor
Vino	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da klarificirana vina niso imela protimikrobnega učinka, medtem ko so vsa koncentrirana vina (višja koncentracija polifenolov) pokazala na določen inhibitorski učinek (odvisen od vrste bakterije in sorte vina).	Rodriguez Vaquero in sod., 2007
Vino	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima pH največji prispevek pri inhibiciji obeh vrst bakterij; dokazan pa je tudi omejen učinek etanola, molekularnega žveplovega dioksida in titrabilne kislosti.	Waite in Daeschel, 2007
Vino	<i>Helicobacter pylori</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima vino z dodanimi polifenolnimi komponentami večjo inhibitorsko aktivnost kot vino brez dodatka polifenolov.	Lin in sod., 2005
Vodka	<i>Helicobacter pylori</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima vodka z dodanimi polifenolnimi komponentami večjo protimikrobno aktivnost kot vodka brez dodatka polifenolov	Lin in sod., 2005
Vino	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima vino protimikrobni učinek na vse testirane vrste bakterij; nekoliko nižjo protimikrobno aktivnost ima raztopina organskih kislin, najnižjo pa raztopina etanola z nizkim pH.	Moretro in Daeschel, 2004
Vino	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Rezultati raziskave <i>in vitro</i> so pokazali na protimikrobni učinek vina na vse testirane bakterije; raziskave <i>in vivo</i> domneve o protimikrobnem delovanju vina niso potrdile.	Sugita-Konishi in sod., 2001
Jabolčno vino	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i>	Rezultati raziskave so pokazali, da ima jabolčno vino določen inhibitorski učinek.	Roering in sod., 1999

Epidemiološke študije so pokazale na povezavo med resnostjo okužbe z bakterijami vrste *Salmonella* in količino zaužitega alkohola. Študije kažejo na zaščitni učinek alkohola pri zdravih osebah, ki so v času okužbe zaužile eno ali več alkoholnih pijač (Bellido-Blasco in sod., 2002; Klontz, 1999).

Bolj obsežne študije so bile opravljene z bakterijami vrste *Helicobacter pylori*, ki ravno tako kažejo na zaščitni učinek zmernega uživanja alkoholnih pijač pri zdravi populaciji (Kuepper-Nybelen in sod., 2005).

2.3 RAZISKAVE NA MODELU ŽELODCA

Na modelu želodca je bilo do sedaj opravljenih precej raziskav z različnimi metodami. Najbolj kompleksni modeli želodca in ostalih delov prebavil so bili uporabljeni pri raziskavah vpliva prebavil na preživetje probiotičnih bakterij, kjer so za simulacijo razmer uporabili različne izvedbe bioreaktorjev.

Raziskave vpliva želodca in drugih delov prebavil so bile opravljene tudi z različnimi patogenimi mikroorganizmi in z različnimi izvedbami modela želodca.

2.3.1 Pregled različnih metod

Primeri izvedb umetnega želodca za študijo vpliva razmer prebavnega trakta na patogene in probiotične mikroorganizme so opisani v preglednici 6.

Preglednica 6: Pregled različnih modelov želodca

Namen	Izvedba	Avtor
Preizkušanje modela simulacije prebave v želodcu	Računalniško voden bioreaktorski sistem, sestavljen iz termostatisirane vrečke za gnetilnik z dodanim živilom in peristaltičnimi črpalkami za dodajanje umetnih telesnih tekočin	Koseki in sod., 2011
Vpliv količine maščobe v hrenovkah na preživetje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i> med simulacijo prebave	Računalniško voden bioreaktorski sistem, sestavljen iz dveh erlenmajeric in peristaltičnih črpalk za dovajanje umetnih telesnih tekočin	Barmpalia-Davies in sod., 2009
Vpliv želodca in tankega čreva na preživetje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	Računalniško voden bioreaktorski sistem, sestavljen iz dveh erlenmajeric in peristaltičnih črpalk za dovajanje umetnih telesnih tekočin	Barmpalia-Davies in sod., 2008

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 6: Pregled različnih modelov želodca

Namen	Izvedba	Avtor
Študija preživetja probiotičnih kultur v modelu zgornjega dela prebavnega trakta	Sistem štirih povezanih bioreaktorjev, ki sestavljajo štiri različne dele prebavnega trakta	Botes in sod., 2008
Vpliv vina na preživetje bakterij vrste <i>Campylobacter jejuni</i> v modelu želodca	Vrečka za gnetilnik, napolnjena z umetnim želodčnim sokom, hrano za dojenčke, inokulumom in vinom	Carneiro in sod., 2008
Študija modela bioreaktorja za simulacijo preživetja probiotičnih kultur v želodcu in črevesu	Enotna bioreaktorska posoda za simulacijo želodca in črevesa	Sumeri in sod., 2008
Vpliv vina na preživetje bakterij vrste <i>Listeria innocua</i> v modelu želodca	Erlenmajerica, napolnjena z umetnim želodčnim sokom, hrano za dojenčke, inokulumom in vinom	Fernandes in sod., 2007
Vpliv želodca na preživetje bakterij vrste <i>Escherchia coli</i>	Vrečka za gnetilnik napolnjena z inokulumom in želodčnim sokom	Bergholz in Whittam, 2006
Model za študijo preživetja probiotičnih kultur v zgornjem delu prebavnega trakta	Računalniško voden bioreaktorski sistem, sestavljen iz dveh čaš in sistema peristaltičnih črpalk	Mainville in sod., 2005
Vpliv vina na preživetje bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in <i>Salmonella</i> spp. v modelu želodca	Vrečka za gnetilnik, napolnjena z umetnim želodčnim sokom, hrano za dojenčke, inokulumom in vinom	Just in Daeschel, 2003
Učinek prisotnosti laktobacilov na preživetje bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> in <i>Listeria monocytogenes</i> v modelu želodca in tankega čreva	Sistem štirih povezanih bioreaktorjev, ki predstavljajo štiri različne dele prebavnega trakta	Ganzle in sod., 1999

2.3.2 Vpliv alkoholnih pijač na bakterije v modelu želodca

O vplivu alkoholnih pijač na mikroorganizme na modelu želodca je bilo do sedaj opravljenih malo študij, vse pa so proučevale učinek vina na patogene mikroorganizme. V raziskavah so uporabljali različne izvedbe modela želodca – vrečke za gnetilnik (Just in Daeschel, 2003; Carneiro in sod., 2008) in erlenmajerice (Fernandes in sod., 2007). Uporabljali so tudi različne sestave sintetičnega želodčnega soka in različne mikroorganizme - *Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella* Typhimurium (Just in

Daeschel, 2003); *Listeria innocua* (Fernandes in sod., 2007); *Campylobacter jejuni* (Carneiro in sod., 2008). Vsi so za prehransko matrico uporabili industrijsko proizvedeno kašo za dojenčke. Vse raziskave so pokazale, da je inhibicija mikroorganizmov hitrejša ob prisotnosti vina.

Rezultati raziskave Carneira in sodelavcev (2008) so pokazali, da ima vino v modelu želodca z dodanim živilom izrazito protimikrobno delovanje na bakterije vrste *Campylobacter jejuni*, saj se je število živih celic po preteku 20 minut zmanjšalo za najmanj 2 log enoti, pri dodatku večje količine vina pa najmanj za 3 log enote.

Rezultati raziskave Fernandes in sodelavcev (2007) so pokazali, da ima vino v modelu želodca z dodanim živilom izrazito protimikrobno delovanje na bakterije vrste *Listeria innocua*, saj se je število živih celic po preteku 120 minut zmanjšalo za najmanj 2 log enoti. Protimikrobni učinek je bil bolj izrazit v modelu želodca z večjimi dodatki vina. Raziskava je tudi pokazala, da ima belo vino bolj izrazito protimikrobno delovanje kot rdeče vino.

Rezultati raziskave Justa in Daeschela (2003) so pokazali, da ima vino v modelu želodca z dodanim živilom protimikrobni učinek na bakterije vrste *Salmonella* Typhimurium, saj po preteku 120 minut živih celic niso več zaznali. Rezultati enake raziskave z bakterijami vrste *Escherichia coli* O157:H7 so pokazali, da dodatek vina v modelu nima vidnega vpliva na preživetje bakterij *E. coli* O157:H7. Izsledki raziskave so pokazali tudi, da je protimikrobno delovanje vina v večji meri posledica nizkega pH vina in prisotnosti organskih kislin.

V strokovni literaturi nismo zasledili raziskav, ki bi v modelu želodca preizkusile protimikrobno delovanje žganih pijač.

2.4 BAKTERIJE RODU *Salmonella*

Primarno življenjsko okolje bakterij rodu *Salmonella* je prebavni trakt ljudi in živali. Z izločenimi fekalijami ali preko različnih prenašalcev lahko pridejo v vodo in živila. So gramnegativne, gibljive, citokromoksidaza-negativne, katalaza-pozitivne in fakultativno anaerobne paličice (izjema je *S. Galinarum*, ki ni gibljiva vrsta). Kot edini vir ogljika izkoriščajo citrat iz triptofana, ne tvorijo pa indola. Nitrite reducirajo v nitrat. Glukozo navadno razgrajujejo brez oblikovanja plina, laktoze ne cepijo. Salmonele se razmnožujejo pri temperaturah med 7 in 47 °C, optimalno pri 37 °C (Adamič in sod., 2003).

V preteklosti so bile bakterije vrste *Salmonella* poimenovane po kraju, kjer so bile izolirane (npr. *Salmonella* London, *Salmonella* Indiana,...). Tovrstno nomenklaturu je zamenjala klasifikacija, ki temelji na fagotipizaciji (Pui in sod., 2011).

Epidemiološka klasifikacija bakterij vrste *Salmonella* je osnovana na preferenci seva do gostitelja. V prvo skupino spadajo sevi, ki lahko okužijo samo človeka (*S. Typhi*). V drugo skupino spadajo sevi, ki so prilagojeni na posamezno vrsto gostitelja, bolezenske znake pa lahko povzročijo tudi pri drugih gostiteljih (npr. *S. Pullorum* lahko okuži tudi druge vrste ptic). V tretjo skupino spadajo vsi ostali sevi. *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella*

Typhimurium in *Salmonella* Heidelberg spadajo med najpogosteje iz človeka izolirane seve (Pui in sod., 2011).

Kauffmann-Whiteova shema klasificira bakterije vrste *Salmonella* glede na 3 glavne antigenske determinante: flagelarni H antigen, somatski O antigen in kapsularni V antigen. To klasifikacijo je sprejelo Mednarodno združenje mikrobiologov leta 1934 (Pui in sod., 2011).

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) uporablja klasifikacijo, ki temelji na filogenetskih lastnostih seva. Filogenetsko drevo je osnovano na primerjavi 16S rRNA ali drugih sekvenc gena. Do sedaj je znanih 2463 različnih sevov bakterij vrste *Salmonella*, ki so na podlagi analize sekvence 16S rRNA razdeljene v 2 vrsti: *Salmonella enterica* (2443 sevov) in *Salmonella bongori* (20 sevov). Bakterije vrste *Salmonella enterica* so razdeljene na 6 podvrst, označenih z rimskimi številkami. Bakterije vrste *Salmonella enterica* podvrsta I so po večini izolirane iz toplokrvnih živali in predstavljajo več kot 99 % kliničnih izolatov, medtem ko so ostale podvrste bakterij *Salmonella enterica* in *Salmonella bongori* izolirane iz hladnokrvnih živali in predstavljajo manj kot 1 % kliničnih izolatov (Pui in sod., 2011).

2.4.1 Splošno

Temperatura nad 65 °C jih hitro uniči. Razmnožujejo se pri pH 4,5 do 9,0, pri čemer minimalno vrednost pH, ki še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline. Najhitreje se razmnožujejo v okolju z nevtralno vrednostjo pH. Minimalna a_w vrednost za rast je 0,94. Povzročajo alimentarne toksikoinfekcije in so najpogostejši povzročitelji tovrstnih obolenj v našem okolju (Adamič in sod., 2003).

Bakterije vrste *Salmonella* so v naravi pogoste in dobro preživijo v različnih vrstah hrane. Najpogostejše so okužbe s kontaminirano perutnino, jajci in mlečnimi izdelki. V zadnjih letih so vse pogostejše okužbe tudi s svežimi izdelki (sadje in zelenjava), pri katerih je zaradi modernih večstopenjskih postopkov pridelave in predelave hrane večja možnost kontaminacije. Pogostost okužb zaradi kontaminirane zelenjave in sadja je v zadnjih letih narasla in postala velik problem v razvitih državah. Epidemije salmoneloze so povezane z različnim sadjem in zelenjavo, med drugim z jabolki, mangom, solato, nepasteriziranim pomarančnim sokom, melonami, zeleno, paradižniki in petršiljem (Pui in sod., 2011).

2.4.2 Salmoneloza

Salmoneloza je zoonoza, ki spada med t.i. alimentarne infekcije, opisani pa so tudi primeri okužb preko hišnih ljubljencev. Večina ljudi preboli salmonelozo brez zapletov v nekaj dneh. Umrljivost je običajno zelo nizka (manj kot 1 %). Intenzivnost bolezni je odvisna od odpornosti organizma in količine zaužitih salmonel in serovara. Pri zelo majhnih otrocih je lahko zaradi dehidracije bolezen zelo resna, prav tako tudi pri starejših in kronično bolnih (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010, 2010).

Prvi simptomi salmonelozne infekcije z živili so ponavadi pokažejo 12-36 ur po zaužitju hrane. Navzea, bruhanje, krči v trebuhu in driska so simptomi, ki se nenadoma pojavijo in

stopnjujejo. Glavne simptome ponavadi spremljajo splošna oslabeledost, slabost mišic in žeja. Telesna temperatura je skoraj vedno povečana, običajno se pojavijo tudi motnje živčevja, ki se kažejo kot nemir in trganje v mišicah. Intenzivnost bolezni je odvisna od odpornosti organizma in količine zaužitih salmonel. Minimalna infektivna doza je pri zdravih ljudeh od 100.000 do 1.000.000 živih celic na gram živila, pri mladih in zelo starih pa med 100 in 1000 celic na gram živila. Če salmonela pride v organizem, in se ne razvije, lahko oseba postane klicenosec, in je kot taka potencialno nevarna za okolico (Milohnoja, 2003).

S. Typhi, *S. Paratyphi A* in *B* ne povzročajo alimentarnih toksikoinfekcij, temveč specifična kužna obolenja - tifus in paratifus, ki se pojavita le pri ljudeh (Milohnoja, 2003).

Primeri tifusne okužbe so v razvitih državah redki, medtem ko število okužb z netifusnimi sevi po svetu narašča. Mortaliteta tifusne vročice je v razvitem svetu med 5 in 30 %. Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da se z njo letno okuži med 16 in 17 milijonov ljudi s 600000 smrtnih primerov na leto. Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da je letno kar 1,3 milijarde primerov netifusne salmoneloze s 3 milijoni smrtnih primerov na leto (Pui in sod., 2011).

Salmoneloza je že nekaj let med desetimi najpogosteje prijavljenimi nalezljivimi boleznimi. Je najpogostejši povzročitelj gastroenterokolitov pri nas. V zadnjih 10 letih je bila v Sloveniji najvišja zabeležena incidenca leta 2003, ko je znašala 201/100.000 prebivalcev; v letu 2008 je incidenca znašala 58,98/100.000 prebivalcev. Največje število izbruhov salmonelnih gastroenterokolitov je bilo zabeleženih v letih 2003 in 2004 (28,31 izbruhov); v letu 2008 je bilo zabeleženih 7 izbruhov (leta 2007 13) (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010, 2010). V preglednici 4 je prikazano število prijavljenih primerov salmoneloze v Republiki Sloveniji med letoma 1998 in 2008.

Preglednica 7: Število prijavljenih primerov salmoneloze v RS (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010, 2010).

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Število prijav	1284	2088	1836	1721	2725	4005	3307	1519	1519	1345	1090

3 MATERIAL IN METODE

V tem poglavju so opisani vsi materiali, postopki priprave in metode dela, ki smo jih uporabili pri izvedbi eksperimenta.

3.1 MATERIAL

V tem poglavju so opisani materiali, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimenta in postopki njihove priprave.

3.1.1 Bakterijski sev

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili bakterije seva *Salmonella* Enteritidis ŽM 146, ki so bile izolirane na Veterinarski fakulteti iz mesa piščancev.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabljali gojišča TSA, TSB in XLD ter fiziološko raztopino.

Gojišče TSA (Tryptični soja agar)

Sestavine:

- 20 g gojišča TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid, CM0131, Anglija)
- 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 4122202, Italija)
- 1,25 g dikalijev hidrogenfosfat K_2HPO_4 (Kemika, 1116108, Hrvaška)
- 1,25 g D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška)

Priprava:

Zgoraj navedene sestavine smo natehtali v 1000 ml steklenico in raztopili v 500 ml destilirane vode. Nato smo gojišče 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C in ga aseptično razlili v petrijevke ali pa ga shranili pri 45 °C do uporabe. Ohlajene petrijevke z gojiščem smo do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

Tekoče gojišče TSB (Tryptični soja bujon)

Sestavine:

- 15 g gojišča TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid, CM0129, Anglija)

Priprava:

V 500 ml steklenico smo natehtali 15 g gojišča TSB in ga raztopili v 500 ml destilirane vode. Gojišče smo pred sterilizacijo s pipeto prenesli po 4 ml v epruvete in nato sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Ohlajene epruvete smo do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

Selektivno gojišče XLD

Sestavine:

- 28 g gojišča XLD (Xylose Lysine Desoxycholate, Biolife, 4022062, Italija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo raztopili 28 g gojišča XLD, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 100 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v petrijevke, kjer se je gojišče ohladilo in strdilo. Ohlajene petrijevke smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- osnovna raztopina KH_2PO_4 0,034 g/ml (Kemika, 11161, Hrvaška)

Priprava:

V 1000 ml bučko smo nalili 1,25 ml fiziološke raztopine s koncentracijo 0,034 g KH_2PO_4 /ml destilirane vode in dopolnili bučko z destilirano vodo do oznake. Nato smo bučko dobro premešali in vsebino prelili v pipetor. Tako smo napolnili epruvete z 9 ml fiziološke raztopine in jih sterilizirali 20 minut na 121 °C. Po sterilizaciji smo ohlajene epruvete do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.3 Živila

V eksperimentih smo uporabili različna živila in tako preverjali, kako različne sestave živil vplivajo na protimikrobni učinek žganih pijač.

Uporabili smo živila:

- Frutek - kašica iz breskev z rižem (Fructal, Slovenija)
- Kašica za dojenčke - Zelenjava z rižem in piščančjim mesom (HiPP, Nemčija)
- Kašica za dojenčke - Krompir in špinača s smetano (HiPP, Nemčija)
- Polno Alpsko mleko s 3,5 % mlečne maščobe (Ljubljanske mlekarne, Slovenija)
- Majoneza (Tina, Slovenija)
- Tekoči jogurt iz pasteriziranega mleka s 3,2 % mlečne maščobe (Ljubljanske mlekarne, Slovenija)
- Zamrznjeni fileji osliča (Delmar, Slovenija)

Priprava:

V čiste 250 ml stekleničke smo natehtali 150 g še zamrznjenih filejev osliča. Meso v stekleničkah smo nato 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri 115 °C. Po sterilizaciji smo stekleničke ohladili in shranili v hladilniku pri 4 °C

- Razdeto puranje meso (Perutnina Ptuj, Slovenija)

Priprava:

V čiste 250 ml stekleničke smo natehtali 150 g surovega razdetega puranjega mesa. Meso v stekleničkah smo nato 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri 115 °C. Po sterilizaciji smo stekleničke ohladili in shranili v hladilniku pri 4 °C

3.1.4 Žgane pijače

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili različne žgane pijače, pri katerih smo preverjali protimikrobni učinek na bakterije v modelu želodca.

Preverjali smo učinek naslednjih pijač:

- Vodka 2000 – 40 vol. % alkohola (Fructal, Slovenija)
- Encian – 40 vol. % alkohola (Fructal, Slovenija)
- Pelinkovec – 28 vol. % alkohola (Fructal, Slovenija)

3.1.5 Umetni želodčni sok

Sestava umetnega želodčnega soka je povzeta po raziskavi Carneira in sodelavcev (2008).

Sestavine:

- 2,03 g/l NaCl (Merck, 1.06404.1000, Nemčija)
- 0,6 g/l KH₂PO₄ (Merck, 1.04873.1000, Nemčija)
- 0,1 g/l CaCl₂ (Kemika, 1146609, Hrvaška)
- 0,3 g/l KCl (Kemika, 11209, Hrvaška)

Priprava:

V stekleno čašo smo prenesli zgoraj navedene količine NaCl, KH₂O₄, CaCl₂ in KCl, dodali 1000 ml destilirane vode in postavili na magnetni mešalnik ter počakali, da se kemikalije raztopijo. Nato smo s pomočjo pH-metra in dodatka raztopine 1 M HCl uravnali pH raztopine na pH vrednost 1,5. Raztopino smo nato prenesli v 1000 ml steklenico in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Tako pripravljeno raztopino smo ohladili in do začetka poskusa shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.6 Raztopina pepsina

Sestavine:

- Pepsin (Lekarna Ljubljana, Slovenija)

Priprava:

Raztopino pepsina smo pripravili tako, da smo 20 mg pepsina raztopili v 10 ml fiziološke raztopine in nato v aseptičnih razmerah raztopino filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,2 µm v sterilno epruveto za centrifugiranje. Epruveto smo nato zaprli in do začetka poskusa hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.7 Druge kemikalije in dodatki

- Absolutni etanol (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)
- Sterilna voda

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo prenesli 1000 ml vodovodne vode in sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Steklenico s sterilno vodo smo nato ohladili in do začetka poskusa hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.8 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo potrebovali naslednje aparate:

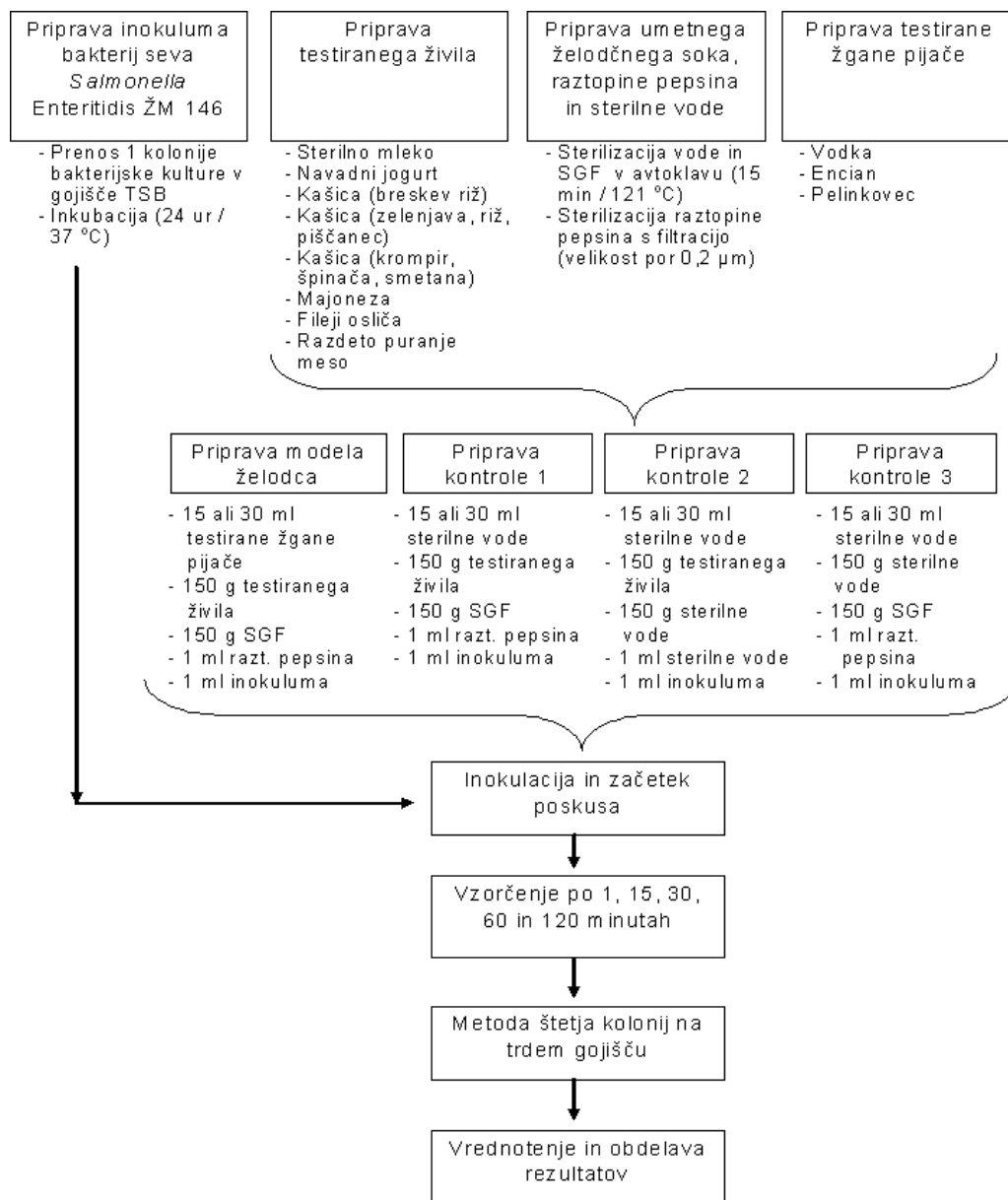
- Avtoklav (tip 500x700, Sutjeska, Jugoslavija)
- Avtoklav (tip 1-61-137, Sutjeska, Jugoslavija)
- Avtoklav (5075 ELVC, Tuttnauer, Združene države Amerike)
- Omaro za sušenje steklovine (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Zamrzovalnik (LTH, Slovenija)
- Digitalno tehtnico (PB1502-S, Mettler-Toledo, Švica)
- Digitalno tehtnico (E 12000 S, Sartorius, Nemčija)
- Digitalno tehtnico (TE 214 S, Sartorius, Nemčija)
- Digitalno tehtnico (KERN PFB 2000-2, Kern & Sohn GmbH, Nemčija)
- Inkubator (I – 115 C, Kambič, Slovenija)
- Inkubator (SP 190, Kambič, Slovenija)
- Gnetilnik (Stomacher tip 400 Pbi international, Seward, Anglija)
- Vrtinčnik (Yellowline, TTS 2, Slovenija)
- Vrtinčnik (VIBROMIX 104 EV, Tehtnica, Slovenija)
- Plinski gorilnik
- Stresalnik (Vibromix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija)
- pH meter (SevenMulti, Mettler-Toledo, Švica)
- Magnetni mešalnik (ROTAMIX 550 MMH, Tehtnica, Slovenija)
- Vodno kopel (WB – 30, Kambič, Slovenija)
- Pipetor (Eppendorf easypet, Nemčija)

Drobna oprema:

- Cepilne zanke
- Steklena palčka za opravljanje razmaza kulture
- Avtomatske pipete 200 µl, 1000 µl in 10 ml (Gilson, Francija)
- Nastavki za pipete 200 µl, 1000 µl in 10 ml (Gilson, Francija)
- Petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija)
- Steklene epruvete
- Stojala za smeti
- Avtoklavirne vreče za enkratno uporabo (Labortechnika Golias, Slovenija)
- Laboratorijske steklenice 100 ml, 250 ml in 1000 ml (Simax, Češka)
- Parafilm "M" (PM 992 American National Can, Amerika)
- Vrečke za gnetilnik s filtrom (Bag Page, Francija)
- Vrečke za gnetilnik (Labortechnika Golias, Slovenija)
- Merilnik časa
- Filter za enkratno uporabo z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius, 16534, Nemčija)
- Vrečke za smeti
- Sterilne epruvete za centrifugiranje
- Magnetna mešala
- Ostala steklovina

3.2 METODE DELA

Protimikrobno aktivnost žganih pijač smo določili z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca, in sicer tako, da smo iz modela želodca ob vnaprej določenih časovnih razmikih odzimali po 10 ml suspenzije in nato z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču določili število preživetih bakterij.



Slika 1: Shema eksperimentalnega dela

3.2.1 Revitalizacija bakterij

Sevi bakterij se hranijo v krio-epruветah v zamrzovalniku, zato moramo sev, preden ga lahko uporabimo, revitalizirati. Sev smo revitalizirali tako, da smo vsebino krio-epruветe odtajali na sobni temperaturi. Ko se je vsebina krio-epruветe odtajala, smo jo prelili v 4 ml gojišča TSB in inkubirali na stresalniku 24 ur pri 37 °C in 80 obratih/min. Nato smo s cepilno zanko kulturo precepili na gojišče TSA ter selektivno gojišče XLD. Gojišča smo nato inkubirali 24 ur na 37 °C. Ko je na selektivnem gojišču zrasla čista kultura, smo plošče shranili in jih uporabili za pripravo inokuluma. Za zagotavljanje preživelosti kulture, smo jo povprečno na 7 dni precepili na sveža gojišča.

3.2.2 Priprava inokuluma

Iz selektivnega gojišča, ki je bilo shranjeno v hladilniku, smo s cepilno zanko prenesli po eno kolonijo bakterij v 4 ml gojišča TSB, premešali na vrtničnem mešalniku ter inkubirali 24 ur pri 37 °C na stresalniku (80 obratov/min). Tako smo pripravili čisto kulturo bakterij v gojišču TSB. Na podlagi izkušenj smo domnevali, da po 24 urah v gojišču zraste do približno 10^8 CFU/ml bakterij.

Za določanje točnega števila bakterij v inokulumu smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. S to metodo smo določili število za delitev sposobnih celic na trdnem gojišču TSA (SIST EN ISO 4833, 2003).

Pri metodi štetja kolonij na trdnem gojišču smo aseptično odpipetirali 1 ml inokuluma in ga prenesli v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalniku. Na ta način smo dobili prvo razredčitev 10^{-1} . Postopek smo ponavljali do razredčitve 10^{-7} . Po homogenizaciji smo iz posamezne razredčitve odpipetirali po 0,1 ml na gojišče TSA. Nato smo inokulum s sterilno stekleno palčko razmazali po celem gojišču. Petrijevke smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo celic v inokulumu. Šteli smo samo tiste petrijevke, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij. Koncentracijo celic smo izračunali po enačbi (1).

$$N = \sum C / ((n_1 + 0,1n_2) \times R) \quad \dots(1)$$

Legenda:

$\sum C$...vsota vseh kolonij na števni plošči
 n_1 ...število gojišč prve upoštevane razredčitve
 n_2 ...število gojišč druge upoštevane razredčitve
 R ...faktor redčenja prve upoštevane razredčitve
 N ...koncentracija bakterij (CFU/ml)

Izkazalo se je, da izbrana kultura v 24 urah zraste do 10^9 CFU/ml. Zato smo aseptično prenesli 1 ml 24-urne kulture v gojišču TSB v model želodca in tako dobili predvideno koncentracijo kulture 10^6 CFU/ml. Točno koncentracijo bakterij v vsakem inokulumu smo določili z metodo štetja na ploščah.

3.2.3 Metoda spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca smo povzeli po raziskavah Carneira in sodelavcev (2008) ter Justa in Daeschela (2003), in jih prilagodili glede na vrsto testiranih alkoholnih pijač (žgane pijače) ter na sredstva, ki so bila na razpolago.

Uporabljeni material:

- Umetni želodčni sok
- Vrečke za gnetilnik
- Vrečke za gnetilnik s filtrom
- Fiziološka raztopina
- Gojišča (TSA, TSB, XLD)
- Sterilna voda
- Žgane pijače (Vodka 2000, Encian, Pelinkovec)
- Živila (Alpsko mleko, navadni jogurt, majoneza, kašica za dojenčke Frutek – breskev z rižem, kašica za dojenčke HiPP – zelenjava z rižem in piščancem, kašica za dojenčke HiPP – krompir in špinača s smetano, fileji osliča, razdeto puranje meso)
- 24-urna kultura seva *Salmonella* Enteritidis

Izvedba metode:

Model želodca je osnovan na osnovi fizioloških značilnosti želodca, upoštevajoč pH in volumen želodčnega soka ter čas prehoda hrane skozi želodec (Just in Daeschel, 2003; Malagelada in sod. 1976; Malagelada 1977; Scarr in sod. 1989).

Pri količini dodane žgane pijače smo se omejili na priporočila Inštituta za varovanje zdravja, to je 1 do 2 enoti alkohola na dan, kar odgovarja 0,3 dl oziroma 0,6 dl žgane pijače (Bajt, 2010).

Da smo ohranili razmerje med količino hrane, želodčnega soka in zaužite žgane pijače, je 15 ml žgane pijače v modelu želodca predstavljalo 0,03 l zaužite pijače, medtem ko je 30 ml žgane pijače v modelu želodca predstavljalo 0,06 l zaužite pijače (Carneiro in sod., 2008; Just in Daeschel, 2003).

Sestavo kontrol smo izbrali tako, da bi bil vpliv dodatka žgane pijače in vrste živila na preživetje bakterij kar se da jasen (Carneiro in sod., 2008).

Za vsak poskus smo vzeli 4 vrečke za gnetilnik. Umetni želodčni sok, sterilno živilo in sterilno vodo smo predhodno ogreli v vodni kopeli na 37 °C.

V prvo vrečko, ki je predstavljala model želodca z dodanim živilom in žgano pijačo, smo aseptično prenesli 150 g umetnega želodčnega soka, 1 ml raztopine pepsina, 150 g testiranega živila in 15 ml oz. 30 ml testirane žgane pijače.

V drugo vrečko, ki je predstavljala kontrolo 1, s katero smo želeli ločiti vpliv žgane pijače od vpliva želodčnega soka, smo aseptično prenesli 150 g umetnega želodčnega soka, 1 ml raztopine pepsina, 150 g testiranega živila in 15 ml oz. 30 ml sterilne vode namesto testirane žgane pijače.

V tretjo vrečko, ki je predstavljala kontrolo 2, s katero smo želeli ločiti vpliv živila od vpliva želodčnega soka, smo aseptično prenesli 150 g sterilne vode namesto umetnega želodčnega soka, 1 ml sterilne vode namesto raztopine pepsina, 150 g testiranega živila ter 15 ml oz. 30 ml sterilne vode, namesto testirane žgane pijače.

V četrto vrečko, ki je predstavljala kontrolo 3, s katero smo želeli preveriti učinek želodčnega soka, smo aseptično prenesli 150 g umetnega želodčnega soka, 1 ml raztopine pepsina, 150 g sterilne vode namesto testiranega živila ter 15 ml oz. 30 ml sterilne vode namesto testirane žgane pijače.

Vsebino sterilnih vrečk za gnetilnik smo nato homogenizirali s pomočjo gnetilnika 30 sekund pri najvišji hitrosti.

Nato smo v tako pripravljene vrečke za gnetilnik aseptično dodali 1 ml 24-urne kulture seva *Salmonella* Enteritidis, da smo dosegli začetno koncentracijo 10^6 CFU/ml, začeli meriti čas in homogenizirali vsebino vrečke v gnetilniku 30 sekund pri najvišji hitrosti. Iz vsake vrečke smo po preteku 1, 15, 30, 60 in 120 minut odvzeli po 10 ml suspenzije in prenesli v vrečko za gnetilnik, v katero smo nato dodali 90 ml fiziološke raztopine. Na ta način smo dobili prvo razredčitev 10^{-1} . Pred vsakim odvzemom smo model želodca in kontrole homogenizirali v gnetilniku 30 sekund pri najvišji hitrosti. V času med odvzemi so bile kontrole in model želodca shranjeni v inkubatorju pri 37 °C.

Vrečke za gnetilnik z 90 ml fiziološke raztopine in 10 ml suspenzije smo homogenizirali v gnetilniku in aseptično odpipetirali 1 ml tako razredčene suspenzije v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo nato premešali na vrtničnem mešalniku. Tako smo dobili drugo razredčitev 10^{-2} . Postopek smo ponavljali do razredčitve 10^{-5} . Po homogenizaciji smo iz posamezne razredčitve odpipetirali po 0,1 ml na gojišče TSA, pri izvedbi poskusa z navadnim jogurtom in majonezo pa smo uporabili selektivno gojišče XLD. Nato smo suspenzijo s sterilno stekleno palčko razmazali po celotnem gojišču. Postopek smo ponovili, da smo dobili rezultate v dveh paralelkah. Petrijevke smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo celic v modelu želodca ter kontrolah. Šteli smo samo tiste petrijevke, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij. Koncentracijo smo izračunali po enačbi (1).

3.2.4 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket Prism 5 (GraphPad Software, Version 5.0d, 2010). Z eksperimentalnim delom zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom Microsoft Office Excel (Microsoft, Version SP2 MSO, 2007).

Učinek žgane pijače na preživetje bakterij smo testirali s t-testom za odvisna vzorca (enačba 2) pri 5 % tveganju s primerjavo števila preživelih bakterij med modelom želodca in kontrolo 1 posameznega živila.

Učinek umetnega želodčnega soka pri posameznem živilu na preživetje bakterij smo testirali s t-testom za odvisna vzorca (enačba 2) pri 5 % tveganju s primerjavo števila preživelih bakterij med kontrolo 1 in kontrolo 2 posameznega živila.

Učinek različne količine dodatka na preživetje bakterij smo testirali s t-testom (enačba 2) za odvisna vzorca pri 5 % tveganju s primerjavo števila preživelih bakterij med modelom želodca z dodatkom 15 ml testirane žgane pijače in modelom želodca z dodatkom 30 ml testirane žgane pijače.

Vpliv časa izpostavljenosti modelu želodca na preživetje bakterij smo testirali s t-testom (enačba 2) za odvisna vzorca pri 5 % tveganju s primerjavo števila preživelih bakterij med modeli želodca vseh testiranih živil na začetku vzorčenja (po 1 minuti) in modeli želodca vseh testiranih živil na koncu vzorčenja (po 120 minutah).

$$t = \frac{\bar{X}_D - \mu_0}{s_D / \sqrt{n}} \quad \dots(2)$$

t – razlika med povprečjema dveh vzorcev

\bar{X}_D – povprečna vrednost vzorca

μ_0 – povprečna vrednost populacije

s_D – standardni odklon vzorca

n – število meritev v vzorcu

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca smo želeli potrditi domnevo, da imajo žgane pijače v modelu želodca s testiranimi živili protimikrobni učinek, ki je bolj izrazit pri večjih količinah dodatka žgane pijače in pri žganih pijačah z zeliščnimi ekstrakti, hkrati pa preveriti, kakšno vlogo imajo različne vrste živil na preživetje bakterij. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kako se koncentracija živih bakterij spreminja v odvisnosti od časa izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi živili.

Metoda spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca je eksperimentalna metoda, s katero se določa koncentracijo preživelih bakterij v odvisnosti od časa. Do sedaj je bila uporabljena predvsem za testiranje protimikrobnega vpliva vina in na različne patogene mikroorganizme (Carneiro in sod., 2008; Just in Daeschel, 2003).

Primerjali smo vpliv različnih žganih pijač na preživetje bakterij; vpliv dvojnega dodatka žgane pijače na preživetje bakterij; vpliv različnih vrst živil na preživetje bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ter hkrati spremljali spremembo koncentracije živih bakterij v odvisnosti od časa.

Meritve so bile opravljene v dveh ponovitvah, pri katerih smo suspenzijo na plošče z gojiščem prenesli v dveh paralelkah. Podatki na krivuljah predstavljajo povprečne vrednosti ponovitev.

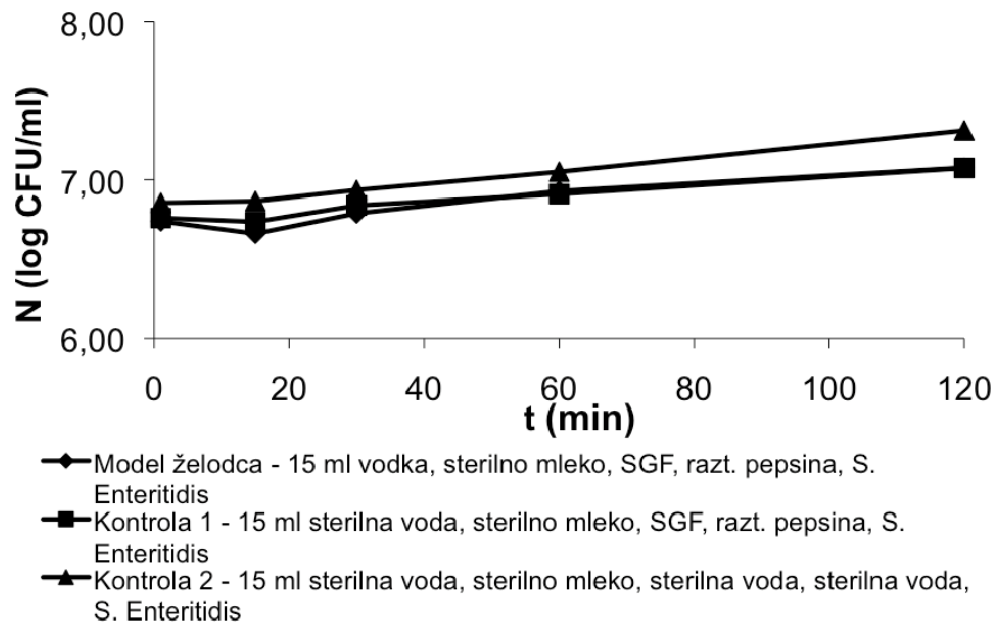
Z dobljenimi rezultati smo narisali rastno krivuljo, ki je vsebovala meritve v časih 1, 15, 30, 60 in 120 minut. Iz krivulj smo lahko razbrali, kako vpliva dodatek žgane pijače na preživetje bakterij v modelu želodca.

Pri bakterijah seva *S. Enteritidis* smo pri 10^6 CFU/ml preizkusili protimikrobni učinek 15 ml in 30 ml dodane testirane žgane pijače v modelu želodca s testiranimi živili. Dodatek 15 ml testirane žgane pijače predstavlja 0,03 l zaužite žgane pijače, dodatek 30 ml pa 0,06 l zaužite žgane pijače (Carneiro in sod., 2008). Količino dodatka smo izbrali na podlagi priporočil Inštituta za varovanje zdravja, ki priporoča, da se pri uživanju žganih pijač omejimo na uživanje 1 oz. 2 enot alkohola na dan (0,03 oz. 0,06 l žgane pijače na dan) (Bajt, 2010).

Odločili smo se, da zaradi boljše preglednosti rezultatov iz grafov izločimo rezultate kontrole 3, saj je zaradi agresivnosti umetnega želodčnega soka koncentracija živih bakterij pri vseh poskusih že po 1 minuti padla od 1 do 6 log enot, po 30 minutah pa živih celic nismo več zaznali.

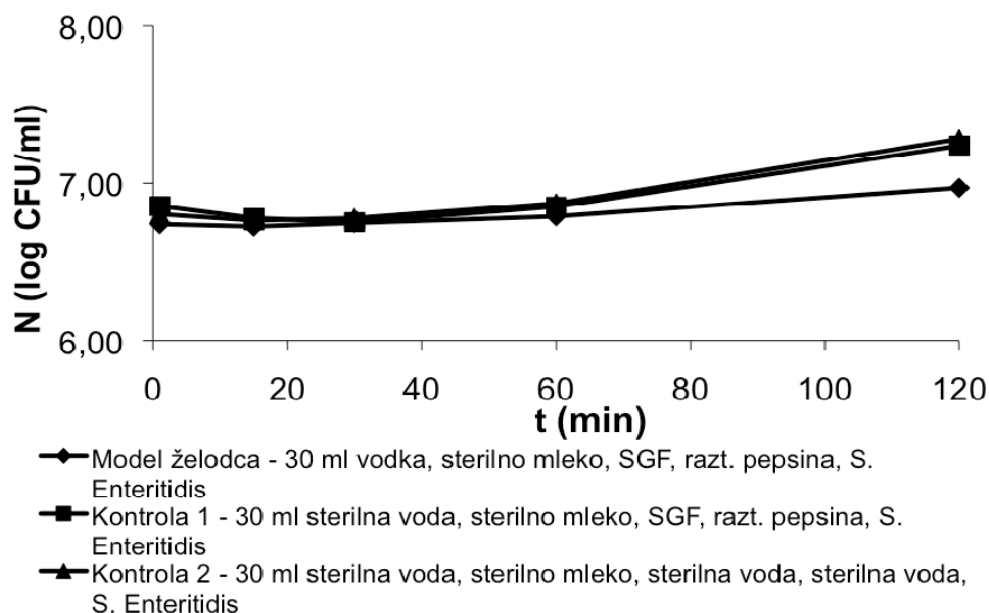
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM

Na sliki 2 in 3 ter v prilogi A-1 in A-2 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 in 30 ml vodke na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.



Slika 2: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml vodke

Na sliki 2 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,34 log enote in celo presegla 10^7 CFU/ml. Kontrola 1 (povečanje v povprečju za 0,31 log enote) nam je potrdila, da dodatek 15 ml vodke nima protimikrobnega učinka, saj se je bakterijska kultura obnašala zelo podobno kot v modelu želodca. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 2 povečala v povprečju za 0,46 log enote. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P > 0,05$).



Slika 3: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml vodke

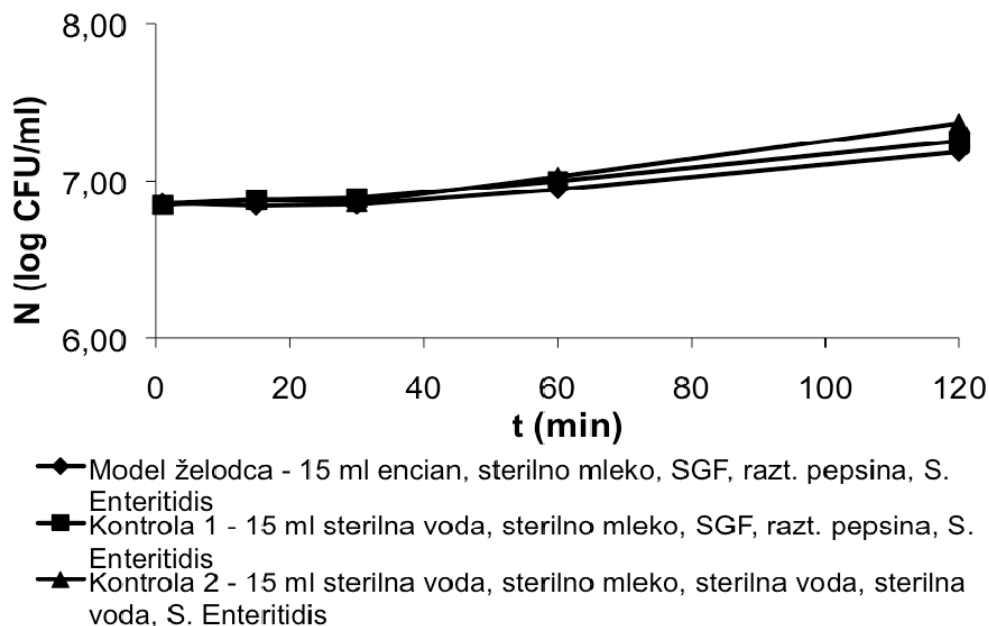
Na sliki 3 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,23 log enote. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 1 po 120 minutah povečala za 0,38 log enote in presegla 10^7 CFU/ml. Dodatek 30 ml vodke kaže na omejeno bakteriostatično delovanje, saj je opazna nekoliko počasnejša rast v primerjavi s kontrolo 1. Kontrola 2 (povečanje v povprečju za 0,48 log enote) kaže na enake lastnosti živila kot pri poskusu, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml vodke. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 30 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P > 0,05$).

Ko smo primerjali rezultate poskusa, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml vodke in poskus, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 30 ml vodke, smo opazili, da dodatek 15 ml ni imel protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM 146, medtem ko je dodatek 30 ml vodke vplival na nekoliko nižjo stopnjo rasti. Statistična primerjava protimikrobnega učinka obeh dodatkov je pokazala, da različna količina dodatka nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Tako dodatek 15 ml kot tudi dodatek 30 ml nista dosegla želenega rezultata, to je zmanjšanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE ENCIAN V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM

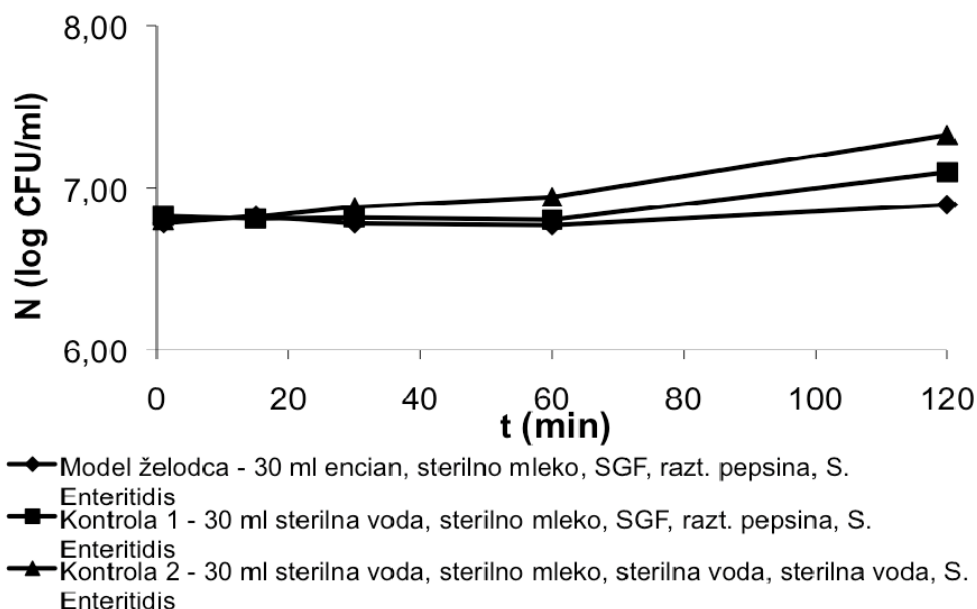
Na sliki 4 in 5 ter v prilogi A-3 in A-4 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 in 30 ml žgane pijače encian na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka, ter kontrole 1 in kontrole 2, s

katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.



Slika 4: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml enciana

Na sliki 4 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,32 log enote in celo presegla 10^7 CFU/ml. Kontrola 1 (povečanje v povprečju za 0,41 log enote) nam je potrdila, da dodatek 15 ml enciana nima protimikrobnega učinka. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 2 povečala v povprečju za 0,51 log enote. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml enciana nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P > 0,05$).



Slika 5: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml enciana

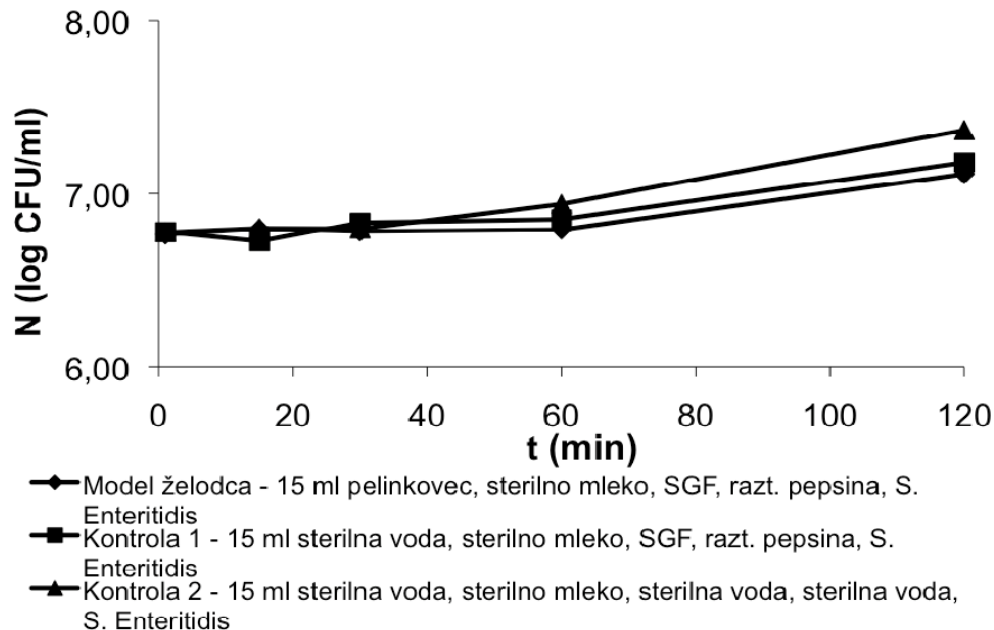
Na sliki 5 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,11 log enote. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 1 po 120 minutah povečala v povprečju za 0,27 log enote in preseгла 10^7 CFU/ml. Dodatek 30 ml enciana kaže na omejen bakteriostatični učinek, saj je opazna nekoliko počasnejša rast v primerjavi s kontrolo 1. Kontrola 2 (povečanje v povprečju za 0,53 log enote) kaže na enake lastnosti živila kot pri poskusu, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml enciana. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 30 ml enciana nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P > 0,05$).

Ko smo primerjali rezultate poskusa, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml enciana in poskus, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 30 ml enciana, smo opazili, da je imel dodatek 15 ml enciana v primerjavi s kontrolo 1 minimalni bakteriostatičen učinek na bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM 146, medtem ko je imel dodatek 30 ml enciana bolj izrazito bakteriostatično delovanje. Statistična primerjava protimikrobnega učinka obeh dodatkov je pokazala, da različna količina dodatka nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Tako dodatek 15 ml kot tudi dodatek 30 ml nista dosegla želenega rezultata, to je zmanjšanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE PELINKOVEC V MODELU ŽELODCA S STERILNIM MLEKOM

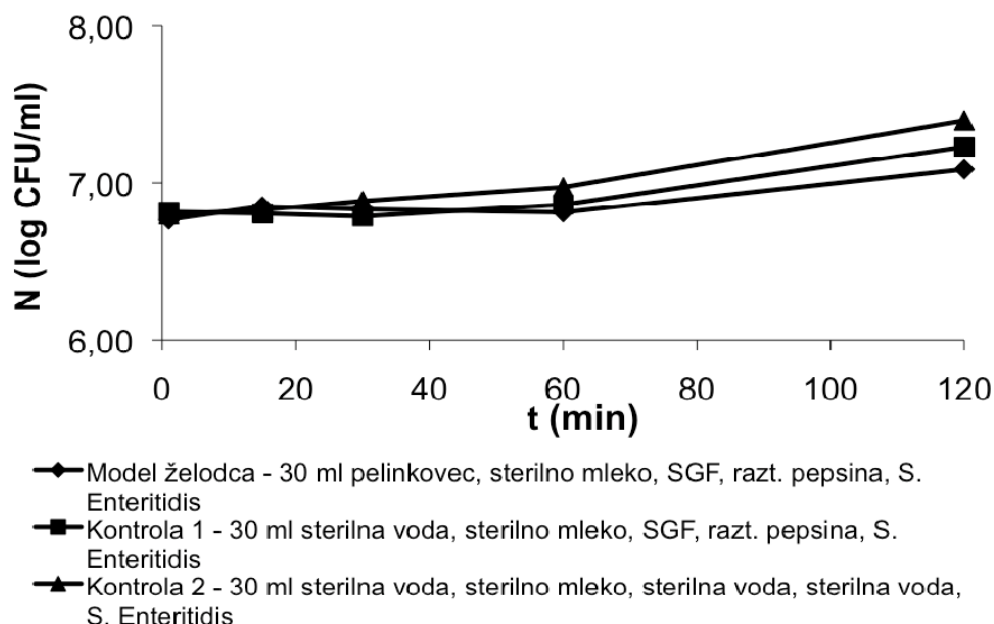
Na sliki 6 in 7 ter v prilogi A-5 in A-6 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 in 30 ml žgane pijače pelinkovec na bakterije seva *S.*

Enteritidis v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.



Slika 6: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 15 ml pelinkovca

Na sliki 6 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,35 log enote in celo presegla 10^7 CFU/ml. Kontrola 1 (povečanje v povprečju za 0,40 log enote) nam je potrdila, da dodatek 15 ml pelinkovca nima protimikrobnega učinka. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 2 povečala v povprečju za 0,59 log enote. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml pelinkovca nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P>0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 2 in kontrole 1 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P>0,05$).



Slika 7: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom sterilnega mleka in 30 ml pelinkovca

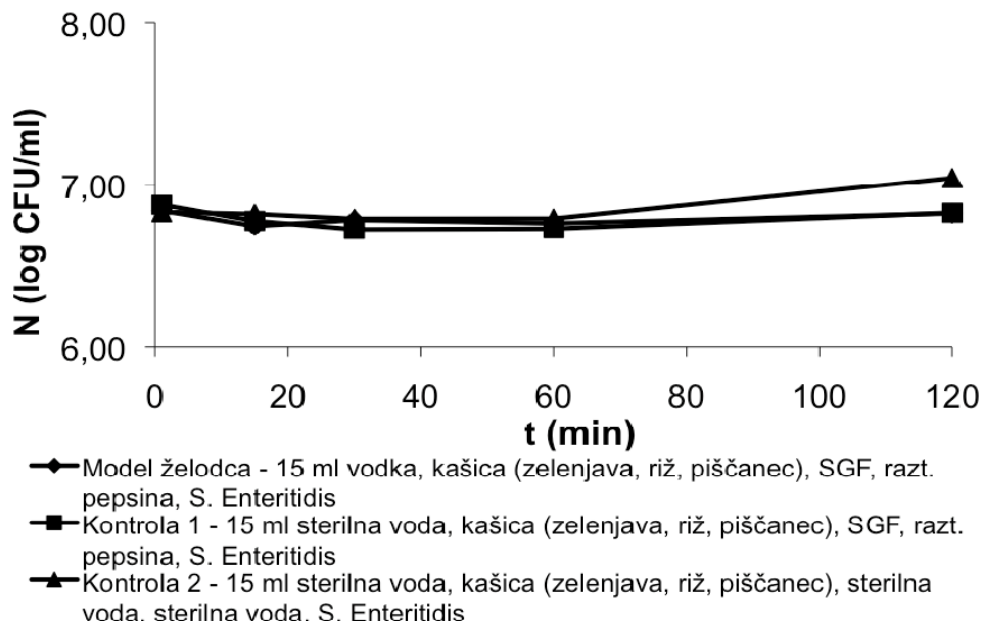
Na sliki 7 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,32 log enote. Koncentracija bakterij se je pri kontroli 1 po 120 minutah v povprečju povečala za 0,41 log enote in presegla 10^7 CFU/ml. Dodatek 30 ml pelinkovca kaže na omejen bakteriostatični učinek, saj je opazna nekoliko počasnejša rast v primerjavi s kontrolo 1. Kontrola 2 kaže na enake lastnosti živila kot pri poskusu, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml pelinkovca (povečanje v povprečju za 0,60 log enote). Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 30 ml pelinkovca nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s sterilnim mlekom ($P > 0,05$).

Ko smo primerjali rezultate poskusa, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 15 ml pelinkovca in poskus, pri katerem smo v model želodca z mlekom dodali 30 ml pelinkovca, smo opazili, da je imel dodatek 15 ml pelinkovca v primerjavi s kontrolo 1 minimalni bakteriostatični učinek na bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM 146, medtem ko je imel dodatek 30 ml pelinkovca zelo podobno bakteriostatično delovanje. Statistična primerjava protimikrobnega učinka obeh dodatkov je pokazala, da različna količina dodatka nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Tako dodatek 15 ml kot tudi dodatek 30 ml nista dosegla želenega rezultata, to je zmanjšanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.4 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (ZELENJAVA, RIŽ, PIŠČANEC)

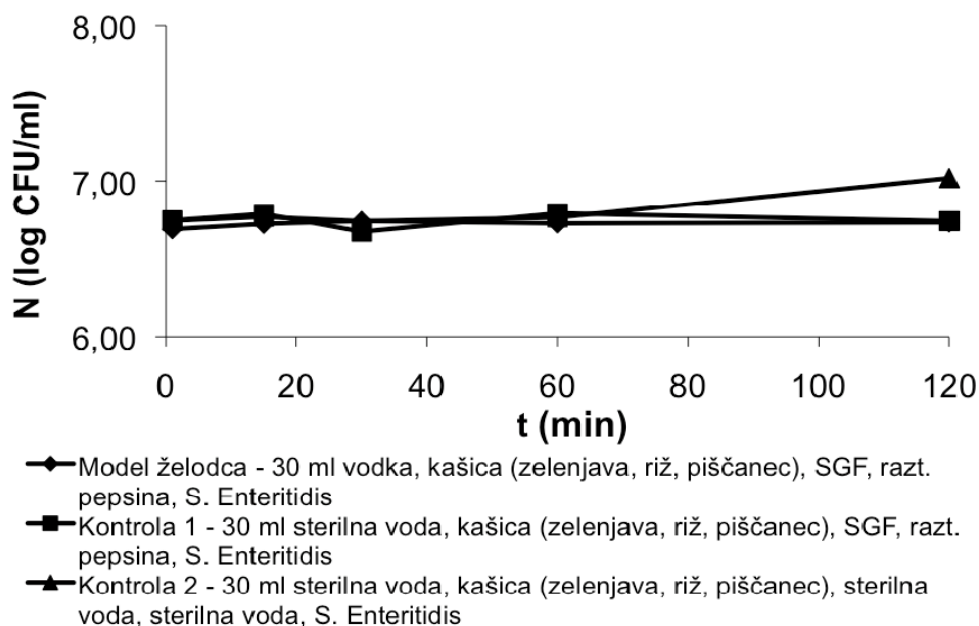
Na sliki 8 in 9 ter v prilogi A-7 in A-8 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 in 30 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S.*

Enteritidis v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec), ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.



Slika 8: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) in 15 ml vodke

Na sliki 8 vidimo, da je koncentracija bakterij po preteku 120 minut v modelu želodca in kontroli 1 ostala skoraj nespremenjena, medtem ko se je pri kontroli 2 v povprečju povečala za 0,21 log enote in presegla 10^7 CFU/ml. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da dodatek 15 ml vodke v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) nima protimikrobnega učinka. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P>0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ($P>0,05$).



Slika 9: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) in 30 ml vodke

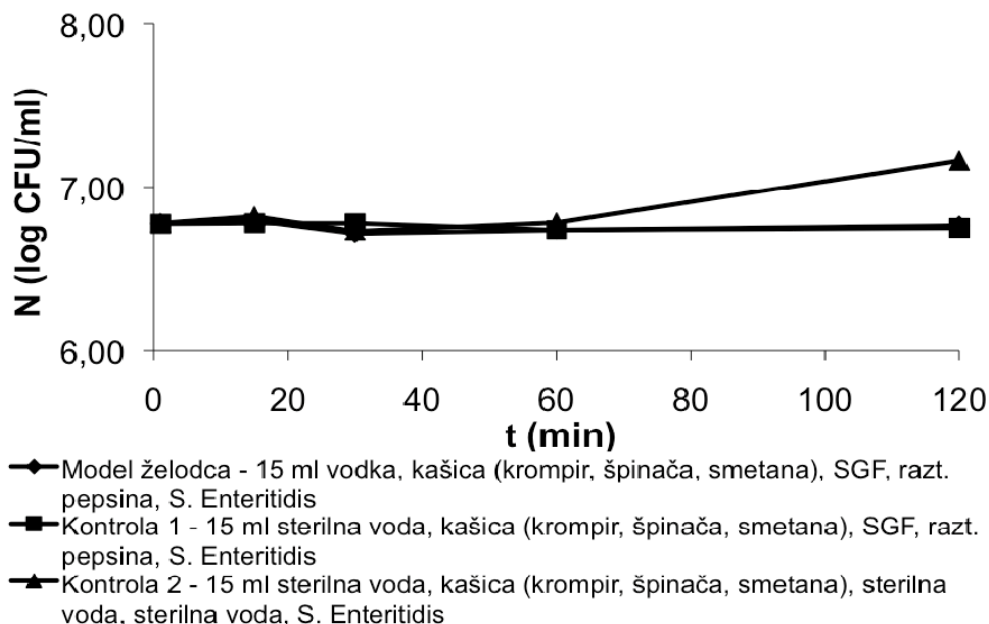
Na sliki 9 vidimo, da je koncentracija bakterij po preteku 120 minut v modelu želodca in kontroli 1 ostala skoraj nespremenjena, medtem ko se je pri kontroli 2 v povprečju povečala za 0,27 log enote in presegla 10^7 CFU/ml. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da dodatek 30 ml vodke v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) nima protimikrobnega učinka. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 30 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P>0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ($P>0,05$).

Ko smo primerjali rezultate poskusa, pri katerem smo v model želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) dodali 15 ml vodke in poskus, pri katerem smo v model želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) dodali 30 ml vodke, smo opazili, da niti dodatek 15 ml niti dodatek 30 ml vodke nista imela protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM 146. Statistična primerjava protimikrobnega učinka obeh dodatkov je pokazala, da različna količina dodatka nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P>0,05$). Tako dodatek 15 ml kot tudi dodatek 30 ml nista dosegla želenega rezultata, to je zmanjšanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.5 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (KROMPIR, ŠPINAČA, SMETANA)

Na sliki 10 ter v prilogi A-9 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (krompir, špinača, smetana), ter kontrole 1 in

kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.

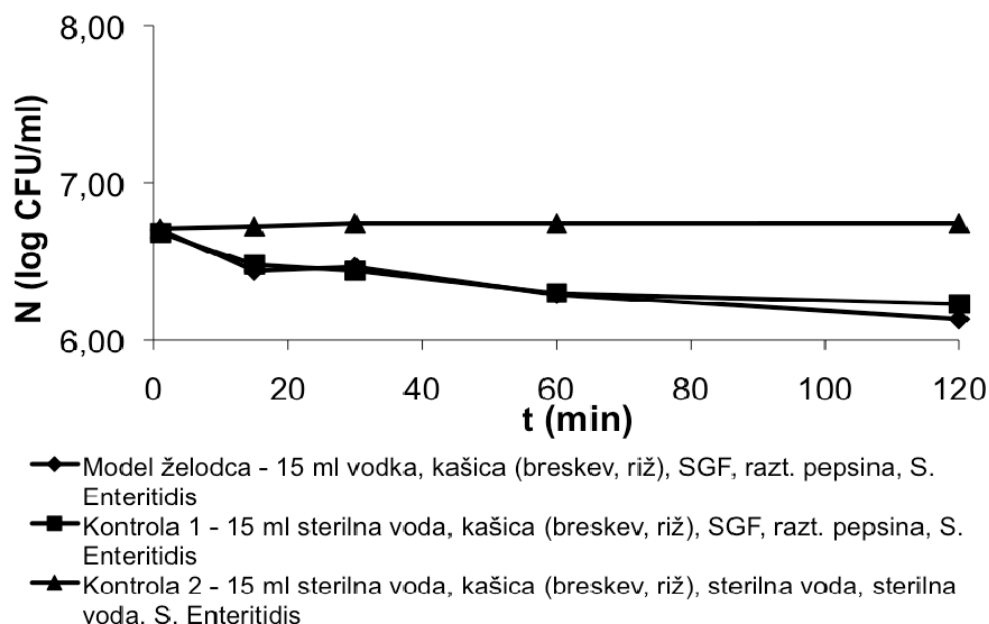


Slika 10: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (krompir, špinača, smetana) in 15 ml vodke

Na sliki 10 vidimo, da je koncentracija bakterij po preteku 120 minut v modelu želodca in kontroli 1 ostala skoraj nespremenjena, medtem ko se je pri kontroli 2 v povprečju povečala za 0,38 log enote in preseгла 10^7 CFU/ml. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da dodatek 15 ml vodke v modelu želodca s kašico za dojenčke (krompir, špinača, smetana) nima protimikrobnega učinka. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s kašico za dojenčke (krompir, špinača, smetana) ($P > 0,05$). Z dodatkom 15 ml vodke nismo dosegli želenega rezultata, to je znižanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.6 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S KAŠICO ZA DOJENČKE (BRESKEV, RIŽ)

Na sliki 11 ter v prilogi A-10 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (breskev, riž), ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.

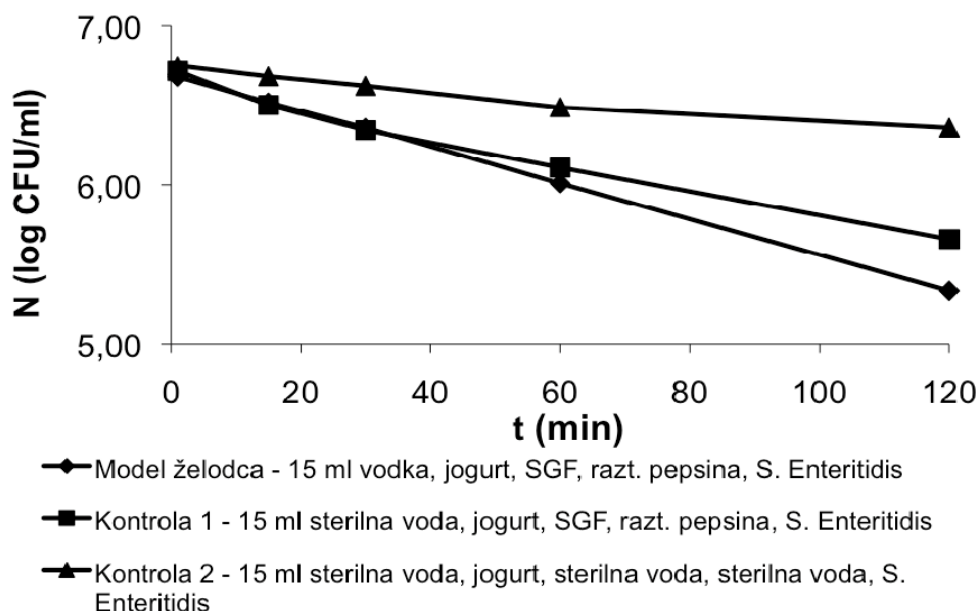


Slika 11: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom kašice za dojenčke (breskev, riž) in 15 ml vodke

Na sliki 11 vidimo, da je koncentracija bakterij po preteku 120 minut v modelu želodca padla v povprečju za 0,57 log enote, kontroli 1 za 0,45 log enote, medtem ko je pri kontroli 2 ostala skoraj nespremenjena. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da ima dodatek 15 ml vodke v modelu želodca s kašico (breskev, riž) minimalno protimikrobno delovanje, medtem ko se kombinacija otroške kašice (breskev, riž) ter umetnega želodčnega soka ravno tako izkaže s protimikrobnim delovanjem. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok vpliva na zmanjšanje števila preživelih bakterij v modelu želodca s kašico za dojenčke (breskev, riž) ($P < 0,05$). Kljub protimikrobnemu delovanju umetnega želodčnega soka v testiranem živilu nismo dosegli želenega rezultata, to je znižanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.7 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z NAVADNIM JOGURTOM

Na sliki 12 ter v prilogi A-11 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom navadnega jogurta, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.

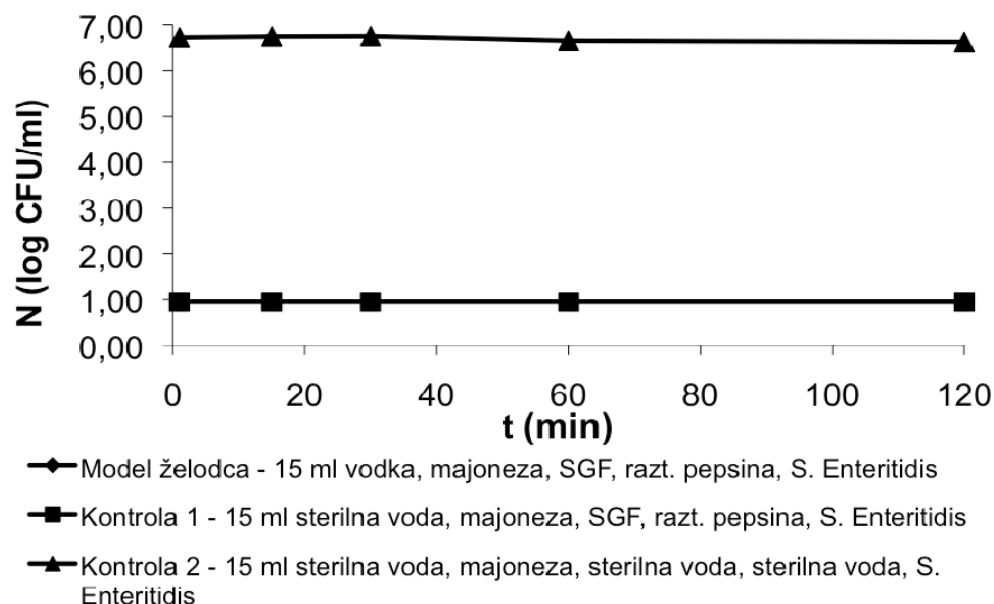


Slika 12: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom navadnega jogurta in 15 ml vodke

Na sliki 12 vidimo, da je koncentracija živih bakterij tekom vzorčenja padala in se je po preteku 120 minut v povprečju zmanjšala za 1,36 log enote, kontroli 1 za 1,06 log enote in kontroli 3 za 0,39 log enote. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da ima največji protimikrobni učinek model želodca z dodatkom 15 ml; sledi mu kontrola 1 s protimikrobnim delovanjem pa se izkaže tudi samo testirano živilo (kontrola 3). Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok vpliva na zmanjšanje števila preživelih bakterij v modelu želodca z navadnim jogurtom ($P < 0,05$). Kljub protimikrobnemu delovanju želodčnega soka, nismo dosegli želenega rezultata, to je znižanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.8 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z MAJONEZO

Na sliki 13 ter v prilogi A-12 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom kašice za majoneze, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.

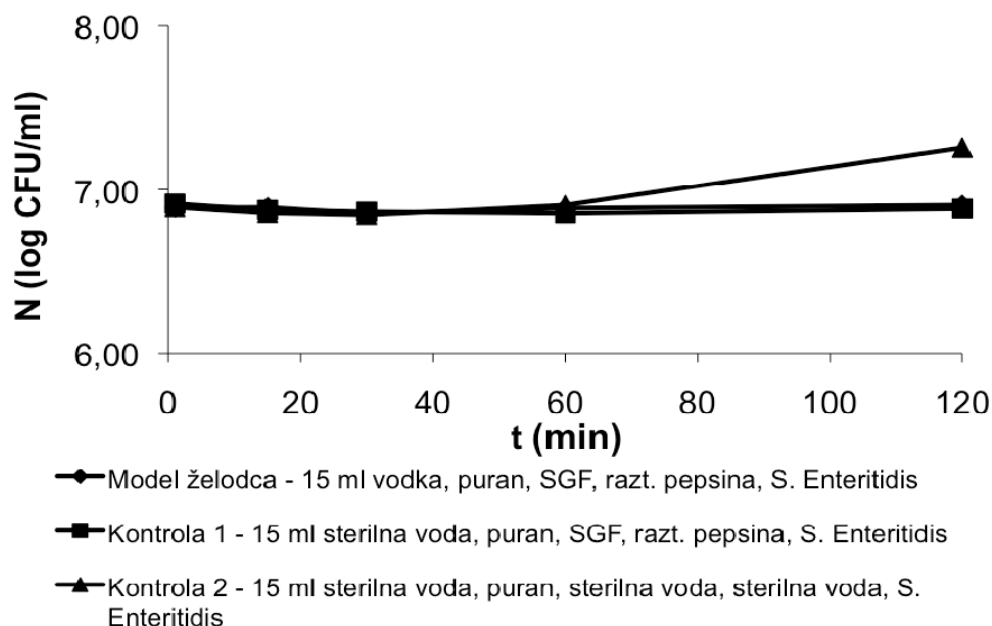


Slika 13: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom majoneze in 15 ml vodke

Na sliki 13 vidimo, da je koncentracija živih bakterij v modelu želodca in kontroli 1 padla pod mejo zaznave (manj kot 10 CFU/ml) že v času homogenizacije, medtem ko je v kontroli 2 po preteku 120 minut ostala skoraj nespremenjena. Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok vpliva na zmanjšanje števila preživelih bakterij v modelu želodca z majonezo ($P < 0,05$). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da kombinacija majoneze in umetnega želodčnega soka ustvari neugodno okolje za preživetje bakterij, medtem ko ima sama majoneza bakteriostatične lastnosti. Koncentracija živih bakterij je v modelu želodca padla pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe, vendar je kontrola 1 potrdila, da gre protimikrobni vpliv pripisati umetnemu želodčnemu soku in ne dodatku žgane pijače.

4.9 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA Z RAZDETIM PURANOM

Na sliki 14 ter v prilogi A-13 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom razdetega purana, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.

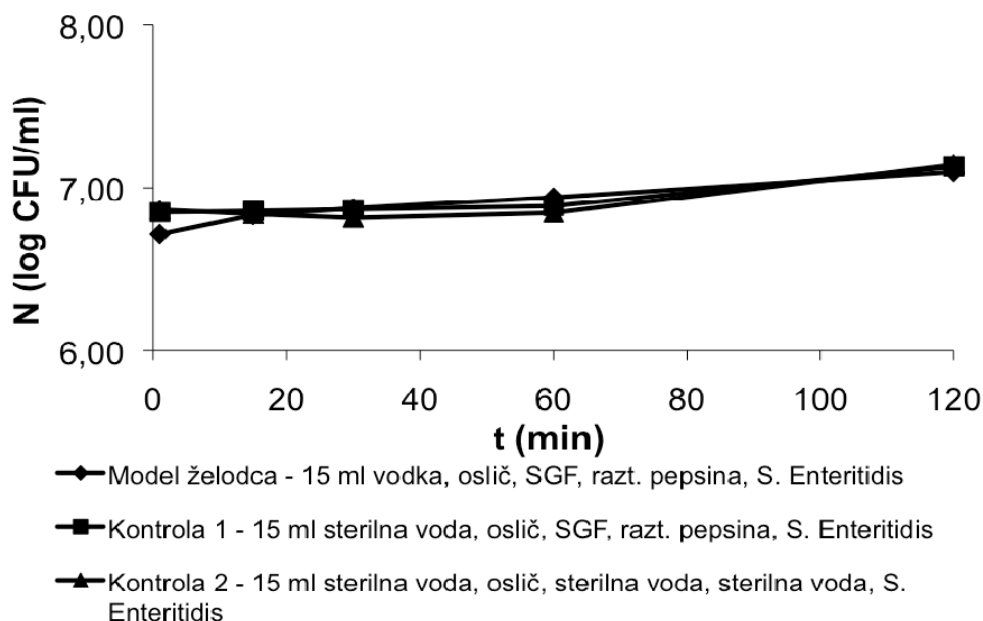


Slika 14: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom razdetega purana in 15 ml vodke

Na sliki 14 vidimo, da je koncentracija živih bakterij v modelu želodca in kontroli 1 po preteku 120 minut ostala skoraj nespremenjena, medtem ko se je v kontroli 2 v povprečju povečala za 0,36 log enote. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da dodatek 15 ml vodke v modelu želodca z razdetim puranom nima protimikrobnega učinka. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca z razdetim puranim mesom ($P > 0,05$). Z dodatkom 15 ml vodke nismo dosegli zelenega rezultata, to je znižanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.10 PROTIMIKROBNI UČINEK ŽGANE PIJAČE VODKA V MODELU ŽELODCA S FILEJEM OSLIČA

Na sliki 15 ter v prilogi A-14 so zbrani rezultati poskusa, v katerem smo preizkusili protimikrobni učinek 15 ml žgane pijače vodka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodatkom fileja osliča, ter kontrole 1 in kontrole 2, s katerima smo želeli ločiti vpliv žgane pijače, umetnega želodčnega soka in živila na preživetje bakterij.



Slika 15: Preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146 v modelu želodca z dodatkom fileja osliča in 15 ml vodke

Na sliki 15 vidimo, da se je v modelu želodca koncentracija živih bakterij po 120 minutah v povprečju povečala za 0,38 log enote in celo presegla 10^7 CFU/ml. Kontrola 1 nam je potrdila, da dodatek 15 ml vodke nima protimikrobnega učinka, saj se je bakterijska kultura obnašala zelo podobno kot v modelu želodca (povečanje v povprečju za 0,28 log enote). S pomočjo kontrole 2 smo ugotovili, da so fileji osliča ustvarili pogoje, ugodne za rast bakterij izbranega seva, saj so rezultati kontrole 2 (povečanje v povprečju za 0,28 log enote) zelo podobni rezultatom modela želodca kot tudi rezultatom kontrole 1. Statistična primerjava modela želodca in kontrole 1 je pokazala, da dodatek 15 ml vodke nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$). Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 je pokazala, da umetni želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca s fileji osliča ($P > 0,05$). Z dodatkom 15 ml vodke nismo dosegli želenega rezultata, to je znižanja koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdrave osebe.

4.11 PRIMERJALNA ANALIZA REZULTATOV

V diplomski nalogi smo na podlagi eksperimentalnega dela spoznali, da dodatek testiranih žganih pijač v količinah, ki jih priporoča Inštitut za varovanje zdravja, ne vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živali. Dodatek žgane pijače v testiranih količinah ni znižal koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdravega človeka. Ugotovili smo tudi, da je preživetje omenjenih bakterij odvisno od vrste živila in prisotnosti umetnega želodčnega soka.

Izkazalo se je tudi, da je koncentracija živih bakterij v kontroli 3, s katero smo preizkušali protimikrobni učinek umetnega želodčnega soka, pri vseh poskusih že po 1 minuti padla od 1 do 6 log enot, po 30 minutah pa živih celic nismo več zaznali. Sklepali smo, da nizek

pH želodčnega soka ustvari zelo neugodne pogoje za rast bakterij seva *S. Enteritidis*. Rezultati raziskav Zhuja in sodelavcev (2006) ter Cotterja in sodelavcev (2001) so potrdili, da ima želodčni sok izrazito protimikrobno delovanje na različne vrste patogenih mikroorganizmov.

4.11.1 Vpliv žganih pijač na preživetje bakterij seva *Salmonella* Enteritidis v modelu želodca s testiranimi živili

Protimikrobni vpliv žganih pijač smo določali v modelu želodca, ki je bil do sedaj preizkušen predvsem za testiranje protimikrobne učinkovitosti vina in različnih protimikrobnih snovi (Carneiro in sod., 2008, Just in Daeschel, 2003).

V modelu želodca smo uporabili koncentracijo 10^6 CFU/ml bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM 146. Koncentracijo smo izbrali na podlagi podatkov, ki navajajo 10^5 - 10^6 CFU/ml kot minimalno infektivno dozo pri zdravem človeku (Milohnoja, 2003). Rezultati raziskav Carneira in sodelavcev (2008) ter Justa in Daeschela (2003), opravljenih v modelu želodca z različnimi bakterijskimi vrstami, so pokazali na sinergistično protimikrobno delovanje vina in umetnega želodčnega soka.

Statistična primerjava podatkov modela želodca in kontrole 1, s katerima smo želeli ločiti protimikrobni vpliv žgane pijače in umetnega želodčnega soka, je za vsakega od opisanih poskusov pokazala, da dodatek testiranih žganih pijač nima protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM 146.

Ko smo naše rezultate primerjali z rezultati raziskav Carneira in sodelavcev (2008) ter Justa in Daeschela (2003), ki so za alkoholno pijačo v modelu želodca uporabili vino, smo ugotovili, da gre bolj izrazit protimikrobni vpliv vina pripisati večjemu volumnu zaužite pijače, nizkemu pH, prisotnosti fenolnih snovi in organskih kislin v vinu.

4.11.2 Vpliv žganih pijač z zeliščnim ekstraktom na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili

Rezultati raziskav Rodriguez Vaquera in sodelavcev (2007) ter Lina in sodelavcev (2005) so pokazali, da imajo različne alkoholne pijače (vino, vodka) z dodanimi ekstrakti in višjo vsebnostjo antioksidantov, večjo protimikrobno aktivnost kot enake alkoholne pijače brez dodatka omenjenih snovi.

Na podlagi omenjenih raziskav smo sklepali, da bomo podobne rezultate dosegli tudi v modelu želodca. Eksperiment smo zasnovali tako, da smo namesto vodke uporabili žgano pijačo encian, ki vsebuje ekstrakt rastline *Gentiana lutea*, in žgano pijačo pelinkovec, ki vsebuje ekstrakt rastline *Artemisia absinthium*, za živilo pa uporabili sterilno mleko.

Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da dodatek testiranih žganih pijač nima značilnega vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili, zato smo na podlagi teh rezultatov sklepali, da žgani pijači encian in pelinkovec v modelu želodca s sterilnim mlekom nimata večje protimikrobne aktivnosti kot čisti žitni destilat – vodka.

Naše ugotovitve so se razlikovale od raziskav Rodriguez Vaquera in sodelavcev (2007) ter Lina in sodelavcev (2005). Odstopanje smo pripisali različnim metodam dela in uporabi različnih bakterijskih vrst, saj je naša raziskava potekala v modelu želodca z bakterijami seva *S. Enteritidis*, medtem ko so v omenjeni raziskavi uporabili metodo difuzije v agarju z bakterijami vrste *Listeria monocytogenes* oziroma *Helicobacter pylori*.

4.11.3 Vpliv količine dodatka žgane pijače na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili

Rezultati raziskav Carneira in sodelavcev (2008), ki so v modelu želodca preizkusili protimikrobno delovanje vina, so pokazali, da ima dodatek vina v večjih količinah izrazitejše protimikrobno delovanje na patogene bakterije kot ga ima manjša količina dodatka.

Na podlagi omenjene raziskave smo sklepali, da lahko podobne rezultate dosežemo tudi s bakterijami seva *S. Enteritidis* in žganimi pijačami vodka, encian in pelinkovec.

V modelu želodca s sterilnim mlekom smo preizkusili protimikrobno delovanje 15 in 30 ml žganih pijač vodka, encian in pelinkovec; v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) pa protimikrobno delovanje 15 in 30 ml žgane pijače vodka.

Dodatek 15 ml vodke predstavlja 0,03 l zaužite žgane pijače, dodatek 30 ml pa 0,06 l zaužite žgane pijače (Carneiro in sod., 2008). Količino dodatka smo izbrali na podlagi priporočil Inštituta za varovanje zdravja, ki priporoča, da se pri uživanju žganih pijač omejimo na uživanje 1 oz. 2 enot alkohola na dan (0,03 oz. 0,06 l žgane pijače na dan) (Bajt, 2010).

Statistična primerjava podatkov je pokazala, da dodatek večje količine (30 ml) katerekoli izmed testiranih žganih pijač (vodka, encian, pelinkovec) v modelu želodca z mlekom nima vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v primerjavi z manjšo količino dodatka (15 ml) omenjenih pijač ($P > 0,05$).

Statistična primerjava podatkov je pokazala, da dodatek večje količine (30 ml) vodke v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) nima vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v primerjavi z manjšo količino dodatka (15 ml) omenjene pijače ($P > 0,05$).

Ko smo primerjali rezultate našega poskusa z rezultati poskusov Carneira in sodelavcev (2008), ki so za alkoholno pijačo uporabili vino, smo ugotovili, da gre večji protimikrobni vpliv vina pripisati večjemu volumnu zaužite pijače, nizkemu pH, prisotnosti fenolnih snovi in organskih kislin v vinu.

4.11.4 Vpliv vrste živila na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca

Živila so raznolik življenjski prostor mikroorganizmov. Dejavnike okolja, ki vplivajo na preživelost in rast mikroorganizmov v živilih, delimo na notranje (intrinzične), zunanje (ekstrinzične), procesne in implicitne (Smole Možina in Bem, 2003).

S poskusom v modelu želodca smo skušali ugotoviti predvsem vpliv intrinzičnih dejavnikov živil na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*.

V modelu želodca smo preizkusili lastnosti naslednjih živil: sterilno mleko, navadni jogurt, kašica za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec), kašica za dojenčke (krompir, špinača, smetana), kašica za dojenčke (breskev, riž), majoneza, fileji osliča in razdeto puranje meso.

Rezultati eksperimentalnega dela so delno potrdili domnevo, da sestava živila vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca.

Statistična primerjava rezultatov kontrole 1 in kontrole 2 posameznega živila je pokazala, da ima umetni želodčni sok protimikrobno delovanje v modelu želodca z navadnim jogurtom, otroško kašico (breskev, riž) in majonezo, saj se je število preživelih bakterij v omenjenih živilih značilno zmanjšalo, medtem ko je analiza rezultatov ostalih testiranih živil pokazala, da želodčni sok nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca.

Izkazalo se je tudi, da ima navadni jogurt brez dodanega umetnega želodčnega soka protimikrobne lastnosti (prisotnost mlečne kisline, nizek pH, interakcije z drugimi mikroorganizmi); majoneza (mikrostruktura živila, nizek pH, prisotnost organskih kislin, NaCl) in kašica za dojenčke (breskev, riž) (nizek pH in nizka a_w vrednost, prisotnost organskih kislin) pa bakteriostatske lastnosti (Smole Možina in Bem, 2003).

4.11.5 Vpliv časa izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi živilom na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*

Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da čas izpostavljenosti modelu želodca ne vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*, in da lahko protimikrobno delovanje pripišemo lastnostim posameznega živila in umetnemu želodčnemu soku.

Statistična primerjava števila bakterij v modelih želodca vseh testiranih živil na začetku poskusa in števila bakterij v modelih želodca vseh testiranih živil na koncu poskusa je pokazala, da čas izpostavljenosti modelu želodca nima vpliva na preživetje bakterij v modelu želodca ($P > 0,05$).

Naše ugotovitve so se razlikovale od izsledkov raziskav Carneira in sodelavcev (2008) ter Justa in Daeschela (2003), ki so pokazale, da daljši kot je čas izpostavljenosti modelu želodca z dodanim živilom, nižja je koncentracija živih bakterij. Odstopanje smo pripisali uporabi različnih bakterijskih vrst in sevov, saj smo v našem poskusu uporabili bakterije seva *S. Enteritidis*, medtem ko so v omenjenih raziskavah uporabili bakterije vrste *Campylobacter jejuni* oz. bakterije seva *Salmonella* Typhimurium.

5 SKLEPI

V eksperimentalnem delu naloge smo raziskovali protimikrobni učinek različnih žganih pijač na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z dodanim živilom. Pri tem smo uporabljali različne količine dodatkov komercialno proizvedenih žganih pijač, in sicer vodke, enciana in pelinkovca, ter primerjali njihovo učinkovitost. Zanimalo nas je tudi, kako na preživetje bakterij v modelu želodca vplivajo različne vrste živil ter čas izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi žvili.

Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti žganih pijač smo uporabili metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca. Za ovrednotenje učinkovitosti žganih pijač smo določili spremembo koncentracije živih bakterij. Na podlagi rezultatov smo opisali vpliv žgane pijače, vrste žgane pijače, količine dodatka žgane pijače, vrste živila in vpliv časa izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi žvili.

Na podlagi eksperimentalnega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- Dodatek žgane pijače nima protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi žvili.
- Žgane pijače z zeliščnimi ekstrakti nimajo večjega protimikrobnega učinka kot čisti žitni destilat (vodka) na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi žvili.
- Količina dodane žgane pijače nima vpliva na preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi žvili.
- Vrsta živila vpliva na zmanjšano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z majonezo, kašico za dojenčke (breskev, riž) in navadnim jogurtom; v modelu želodca z ostalimi testiranimi žvili umetni želodčni sok nima vpliva na zmanjšano preživetje bakterij.
- Čas izpostavljenosti modelu želodca s testiranimi žvili nima vpliva na zmanjšano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis*.

6 POVZETEK

Med okužbami s patogenimi mikroorganizmi so najpogostejše okužbe s hrano (Gould, 2004). Sodobni potrošnik želi vedno manj predelano hrano, ki pa predstavlja boljše okolje za razvoj mikroorganizmov. Ena izmed možnosti spoprijemanja s patogenimi mikroorganizmi je uporaba tradicionalnih načinov predelave in uživanja hrane. Mehanizem delovanja alkohola je precej dobro raziskan, zato smo želeli z eksperimentom v modelu želodca potrditi domnevo, da ima uživanje žganih pijač v želodcu sinergistični protimikrobni učinek na bakterije seva *Salmonella* Enteritidis.

Želodec je organ prebavnega trakta, delovanje katerega je nadzorovano po hormonalni in nevralni poti (Guyton in Hall, 2006). Delovanje tako kompleksnega organa je izjemno težko ponazoriti, približajo se mu lahko le redki biorektorski sistemi.

Izkazalo se je, da je živilo v večini primerov nevtraliziralo umetni želodčni sok, kar v telesu preprečujejo različni mehanizmi, zato bi se rezultati v bolj kompleksnem modelu želodca morda razlikovali. Poleg klorovodikove kisline, ki predstavlja največjo oviro za preživetje mikroorganizmov v želodcu, obstajajo v želodcu še druge protimikrobne snovi (kot je npr. nitrit v slini, ki v kislem okolju želodca tvori dušikovo (III) kislino) (Xu, Xu in Verstraete, 2001), ki jih v našem eksperimentu nismo upoštevali.

Tekom izdelave diplomske naloge smo prišli do spoznanj, da testirane količine žganih pijač vodke, enciana in pelinkovca nimajo protimikrobnega učinka na bakterije seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s testiranimi živili. Ugotovili smo tudi, da je preživetje bakterij v modelu želodca odvisno predvsem od vrste živila in prisotnosti umetnega želodčnega soka.

Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da umetni želodčni sok vpliva na zmanjšano preživetje bakterij v modelu želodca z majonezo, navadnim jogurtom in kašico za dojenčke (breskev, riž); v modelu želodca z ostalimi testiranimi živili pa umetni želodčni sok nima vpliva na zmanjšanje števila živih bakterij. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da uživanje žganih pijač, in sicer vodke, enciana in pelinkovca, v testiranih količinah ne more zmanjšati koncentracije živih bakterij pod minimalno infektivno dozo zdravega človeka, in da lahko protimikrobno in bakteriostatično delovanje pripišemo predvsem umetnemu želodčnemu soku in lastnostim posameznih živil.

Rezultati raziskav Carneira in sodelavcev (2008) ter Justa in Daeschela (2003) so pokazali, da ima vino v modelu želodca izrazit protimikrobni učinek, vendar predvsem zaradi večje zaužite količine v primerjavi z žganimi pijačami, nizkega pH, visoke vsebnosti organskih kislin in fenolnih snovi.

Spoznanja, do katerih smo prišli z eksperimentalnim delom, so lahko pomembna za posameznike, ki morajo zaradi zdravstvenih razlogov jemati zdravila, ki zmanjšujejo količino izločene klorovodikove kisline v želodcu (npr. inhibitorji protonske črpalke), saj je zaradi zdravil normalno izločanje želodčnega soka onemogočeno (Smith, 2003).

Raziskovalno področje je zaradi pogostosti alimentarnih infekcij zelo zanimivo za nadaljne raziskave. S kompleksnejšimi izvedbami modela želodca (in ostalih delov prebavnega trakta) bi veljalo preizkusiti vpliv različnih živil in protimikrobnih sredstev na preživetje različnih vrst patogenov v tem okolju.

7 VIRI

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-47

Ali Y., Dolan M.J., Fendler E.J., Larson E.L. 2001. Alcohols. V: Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 229-255

Bajt M. 2010. Uživanje alkohola in njegova škodljivost v nosečnosti. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja RS: 1 str.

http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=12&pi=5&_5_id=45&_5_PageIndex=0&_5_groupId=180&_5_newsCategory=&_5_action>ShowNewsFull&pl=12-5.0. (23.6.2011)

Bakalinsky A.T., Penner M.H. 2003. Alcohol: Properties and determination. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 1., 2nd ed. Caballero B., Finglas P.C., Trugo L.C. (eds.). London, Academic Press: 107-111

Barmपालia-Davis I.M., Geornaras I., Kendal P.A., Sofos J.N. 2008. Differences in survival among 13 *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. Applied and Environmental Microbiology, 74, 17: 5563-5567

Barmपालia-Davis I.M., Geornaras I., Kendal P.A., Sofos J.N. 2009. Effect of fat content on survival of *Listeria monocytogenes* during simulated digestion of inoculated beef frankfurters stored at 7 °C. Food Microbiology, 26: 483-490

Bellido-Blasco J.B., Arnedo-Pena A., Cordero-Cutillas E., Canos-Cabedo M., Herrero-Carot C., Safont-Adsuar L. 2002. The protective effect of alcoholic beverages on the occurrence of a *Salmonella* food-borne outbreak. Epidemiology, 13: 228-230

Bergholz T.M., Whittam T.S. 2006. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. Journal of Applied Microbiology, 102: 352-362

Boban N., Tonkic M., Budimir D., Modun D., Sutlovic D., Punda-Polic V., Boban M. 2010. Antimicrobial effects of wine: Separating the role of polyphenols, pH, ethanol and other wine components. Journal of Food Science, 75, 5: 322-326

Boban N., Tonkic M., Modun D., Budimir D., Mundic I., Sutlovic D., Punda-Polic V., Boban M. 2010. Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. Food Control, 21: 1161-1165

Botes M., van Reenen C.A., Dicks L.M.T. 2008. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model

with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 362-370

Bujanda L. 2000. The effect of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 12: 3374-3382

Carneiro A., Couto J.A., Mena C., Quiroz J., Hogg T. 2008. Activity of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 19: 800-805

Cotter P.D., Gahan C.G.M., Hill C. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology*, 40, 2: 465-475

Fernandes J., Gomes F., Couto J.A., Hogg T. 2007. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control*, 18: 1477-1483

Ganan M., Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa A.V. 2009. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 20: 739-742

Ganzle M.G., Hertel C., van der Vossen J.M.B.M., Hammes W.P. 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 21-35

Guyton A.C., Hall J.E. 2006. *Gastrointestinal physiology*. V: Textbook of medical physiology. 11th ed. Guyton A.C., Hall J.E. (eds.). Philadelphia, Elsevier Saunders: 769-823

Gould G.W. 2004. Microbiological and other aspects of food safety. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10

Halsted C.H. 2003. Alcohol: Metabolism, beneficial effects, and toxicology. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 1., 2nd ed. Caballero B., Finglas P.C., Trugo L.C. (eds.). London, Academic Press: 111 -118

Just J.R., Daeschel M.A. 2003. Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in a model stomach system. *Journal of Food Science*, 66, 1: 285-290

Klontz K.C. 1999. Does imbibing alcohol protect against enteric pathogens? *Epidemiology*, 10, 3: 207-208

Kobe V., Dekleva A., Lenart I.F., Širca A., Velepčič M. 2004. Anatomija: skripta za študente medicine. Del 4, Drobje, koža. Predelana in dopolnjena 6. izdaja. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 158 str.

Koseki S., Mizuno Y., Sotome I. 2011. Modeling pathogen survival during simulated gastric digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3: 1021-1032

Kuepper-Nybelen J., Thefeld W., Rothenbacher D., Brenner H. 2005. Patterns of alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: results of a population-based study from Germany among 6545 adults. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21: 57-64

Kutchai H.C. 2006. Digestive system. V: Berne and Levy principles of physiology. 4th ed. Levy M.N., Koepfen B.M., Stanton B.A. (eds.). Philadelphia, Elsevier Mosby: 427-494

Lin Y.T., Vatter D., Labbe R.G., Shetty K. 2005. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*, 40: 2059-2065

Mainville I., Arcand Y., Farnworth E.R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 287-296

Malagelada J.R. 1977. Quantification of gastric solid-liquid discrimination during digestion of ordinary meals. *Gastroenterology*, 72, 6: 1264-1267

Malagelada J.R., Longstreth G.F., Summerskill W.H.J., Go V.L.W. 1976. Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology*, 70, 2: 203-210

Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije povzročene z živili živalskega izvora. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-141

Moretto T., Daeschel M. 2004. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 69, 9: 251-257

Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010. 2010. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 142 str.
www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Program_monitoringa_zoonoz_za_leto_2010.pdf (januar 2010)

Pui C.F., Wong W.C., Chai L.C., Tunung R., Jeyaletchumi P., Noor Hidayah M.S., Ubong A., Farinazleen M.G., Cheah Y.K., Son R. 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18: 465-473

Rodriguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101

Rodriguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nedra M.C. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 587-593

Roering A.M., Luchansky J.B., Ihnot A.M., Ansay S.E., Kaspar C.W., Ingham S.C. 1999. Comparative survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 263-269

Rutala W.A. 1999. Selection and use of disinfectants in healthcare. V: *Hospital epidemiology and infection control*. 2nd ed. Mayhall C.G. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1161-1187

Samara A., Koutsoumanis K.P. 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 1-7

Scarr M., Maltby J.R., Jani K., Sutherland L.R. 1989. Volume and acidity of residual gastric fluid after oral fluid ingestion before elective ambulatory surgery. *Canadian Medical Association Journal*, 141: 1151-1154

SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krmil – Horizontalna metoda za štetje mikroorganizmov – Štetje kolonij pri 30 °C. 2003: 2 str.

Smith J.L. 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection*, 66, 7: 1292-1303

Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-86

Stopforth J.D., Yoon Y., Barmgalia I.M., Samelis J., Skandamis P.N., Sofos J.N. 2005. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 309-319

Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y., Iwamoto T., Kondo K. 2001. Wine has activity against entero-pathogenic bacteria *in vitro* but not *in vivo*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 4: 954-957

Sumeri I., Arike L., Adamberg K., Paalme T. 2008. Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 317-324

Tamplin M.L. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human gastric fluid. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1: 320-325

Waite J.G., Daeschel M.A. 2007. Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science*, 72, 7: 286-291

Yuk H.G., Jo S.C., Seo H.K., Park S.M., Lee S.C. 2008. Effect of storage in juice with or without pulp and/or calcium lactate on the subsequent survival of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 198-203

Xu J., Xu X., Verstraete W. 2001. The bacterial effect and chemical reactions of acidified nitrate under conditions simulating the stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 523-529

Yuk H.G., Schneider K.R. 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology*, 23: 694-700

Zhu K., Hart A.C., Sales D., Roberts N.B. 2006. Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 1265-1270

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Rasporju se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč, vodenje ter spodbudo pri delu in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi za priložnost dodatnega izobraževanja in za hitre rešitve vseh nejasnosti, ki so se pojavile tekom izdelave diplomske naloge.

Somentorici doc. dr. Barbari Jeršek se iskreno zahvaljujem za vso pomoč, podporo in potrpežljivost ter za odgovore na nešteta vprašanja, ki sem jih zastavil med izdelavo diplomske naloge.

Recenzentu prof. dr. Janezu Hribarju se zahvaljujem za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Mileni Žabkar in Saši Piskernik.

Za pregled naloge in urejanje virov se zahvaljujem Lini Burkan Makivić.

Za velikodušno donacijo otroške kašice Frutek se zahvaljujem gospe Jerici Pelicon in podjetju Fructal d.d.

Za veliko mero potrpežljivosti in nenehno podporo pri študiju ter dragocene nasvete pri pisanju diplomske naloge se zahvaljujem moji puncu Poloni Novak.

Za neomajno podporo pri študiju se zahvaljujem svojim staršem.

Za vso pomoč in nepozabna študijska leta se zahvaljujem tudi sošolcem, prijateljem in vsem tistim, ki jih nisem uspel omeniti.

PRILOGE

Priloga A-1: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,74 ± 0,09	6,76 ± 0,14	6,86 ± 0,14	5,61
15	6,66 ± 0,17	6,74 ± 0,20	6,87 ± 0,25	2,15
30	6,79 ± 0,21	6,84 ± 0,21	6,94 ± 0,30	0,95* ± 0
60	6,93 ± 0,35	6,91 ± 0,19	7,05 ± 0,32	0,95* ± 0
120	7,07 ± 0,14	7,07 ± 0,10	7,31 ± 0,19	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-2: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,74 ± 0,04	6,85 ± 0,2	6,80 ± 0	6,04
15	6,72 ± 0,09	6,78 ± 0	6,76 ± 0,03	0,95* ± 0
30	6,75 ± 0,05	6,75 ± 0,02	6,78 ± 0,03	0,95* ± 0
60	6,79 ± 0	6,85 ± 0,03	7,87 ± 0,03	0,95* ± 0
120	6,97 ± 0,01	7,24 ± 0,09	7,28 ± 0,19	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-3: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml enciana, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,86 ± 0,01	6,85 ± 0,04	6,86 ± 0,05	2,60
15	6,84 ± 0,12	6,88 ± 0	6,88 ± 0,14	1,56
30	6,85 ± 0,03	6,89 ± 0,02	6,87 ± 0,17	0,95* ± 0
60	6,95 ± 0,13	7,00 ± 0,11	7,03 ± 0,17	0,95* ± 0
120	7,18 ± 0,10	7,25 ± 0,03	7,37 ± 0,09	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-4: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml enciana, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,78 ± 0,03	6,83 ± 0,03	6,80 ± 0,02	3,36
15	6,83 ± 0	6,81 ± 0,02	6,82 ± 0,01	0,95* ± 0
30	6,78 ± 0,05	6,82 ± 0,01	6,88 ± 0,05	0,95* ± 0
60	6,77 ± 0,10	6,80 ± 0,02	6,94 ± 0,07	0,95* ± 0
120	6,90 ± 0,15	7,10 ± 0,15	7,33 ± 0,17	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-5: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s sterilnim mlekom in dodatkom 15 ml pelinkovca, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,76 ± 0,02	6,78 ± 0,03	6,78 ± 0,06	4,48
15	6,80 ± 0,02	6,72 ± 0,01	6,80 ± 0,02	0,95* ± 0
30	6,78 ± 0,09	6,83 ± 0,09	6,80 ± 0,10	0,95* ± 0
60	6,79 ± 0,04	6,85 ± 0	6,94 ± 0,02	0,95* ± 0
120	7,11 ± 0,05	7,18 ± 0,14	7,37 ± 0,09	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-6: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca sterilnim mlekom in dodatkom 30 ml pelinkovca, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,77 ± 0,02	6,82 ± 0,01	6,80 ± 0,02	4,00
15	6,85 ± 0,08	6,81 ± 0,03	6,83 ± 0	0,95* ± 0
30	6,83 ± 0	6,79 ± 0,06	6,89 ± 0,05	0,95* ± 0
60	6,81 ± 0,03	6,86 ± 0,11	6,97 ± 0,03	0,95* ± 0
120	7,09 ± 0,17	7,23 ± 0,04	7,39 ± 0,07	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-7: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,84 ± 0,09	6,88 ± 0,13	6,83 ± 0,05	3,96
15	6,75 ± 0,05	6,78 ± 0,02	6,82 ± 0,07	3,63
30	6,78 ± 0,15	6,73 ± 0,10	6,79 ± 0,09	0,95* ± 0
60	6,76 ± 0,02	6,73 ± 0,06	6,79 ± 0,02	0,95* ± 0
120	6,82 ± 0,06	6,83 ± 0,11	7,04 ± 0	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-8: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (zelenjava, riž, piščanec) ter dodatkom 30 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,69 ± 0,06	6,75 ± 0,07	6,75 ± 0,09	5,59 ± 0,02
15	6,73 ± 0,13	6,79 ± 0,06	6,77 ± 0,21	2,08
30	6,74 ± 0,12	6,68 ± 0,01	6,74 ± 0,02	0,95* ± 0
60	6,73 ± 0,18	6,79 ± 0,10	6,77 ± 0,14	0,95* ± 0
120	6,74 ± 0,09	6,74 ± 0,12	7,02 ± 0,08	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-9: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (krompir, špinaca, smetana) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,78 ± 0,07	6,78 ± 0,05	6,78 ± 0,08	3,67 ± 3,35
15	6,80 ± 0	6,78 ± 0,04	6,82 ± 0,01	2,20 ± 1,44
30	6,72 ± 0,06	6,78 ± 0,05	6,73 ± 0,03	0,95* ± 0
60	6,74 ± 0,06	6,74 ± 0,06	6,78 ± 0,03	0,95* ± 0
120	6,77 ± 0,05	6,75 ± 0,11	7,16 ± 0,02	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-10: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s kašico za dojenčke (breskev, riž) ter dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,70 ± 0,04	6,68 ± 0,05	6,71 ± 0,02	5,94 ± 0,80
15	6,44 ± 0,03	6,48 ± 0,02	6,72 ± 0,01	0,95* ± 0
30	6,46 ± 0	6,44 ± 0,01	6,74 ± 0,02	0,95* ± 0
60	6,29 ± 0,05	6,30 ± 0,09	6,74 ± 0,02	0,95* ± 0
120	6,13 ± 0,02	6,23 ± 0,07	6,74 ± 0,01	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-11: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z navadnim jogurtom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,68 ± 0,06	6,72 ± 0,04	6,75 ± 0,07	5,27 ± 0,33
15	6,52 ± 0	6,50 ± 0,08	6,68 ± 0,08	0,95* ± 0
30	6,36 ± 0,08	6,34 ± 0,12	6,62 ± 0,04	0,95* ± 0
60	6,01 ± 0,10	6,11 ± 0,10	6,49 ± 0,08	0,95* ± 0
120	5,34 ± 0,31	5,66 ± 0,02	6,36 ± 0,15	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-12: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z majonezo in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	0,95* ± 0	0,95* ± 0	6,73 ± 0,01	5,83 ± 0,88
15	0,95* ± 0	0,95* ± 0	6,75 ± 0,02	0,95* ± 0
30	0,95* ± 0	0,95* ± 0	6,76 ± 0,01	0,95* ± 0
60	0,95* ± 0	0,95* ± 0	6,66 ± 0,03	0,95* ± 0
120	0,95* ± 0	0,95* ± 0	6,63 ± 0,07	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-13: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca z razdetim puranjim mesom in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,89 ± 0,02	6,91 ± 0,2	6,89 ± 0,04	4,35 ± 1,03
15	6,89 ± 0,02	6,88 ± 0,12	6,86 ± 0,11	0,95* ± 0
30	6,85 ± 0,03	6,87 ± 0,05	6,84 ± 0,08	0,95* ± 0
60	6,89 ± 0,01	6,85 ± 0,01	6,91 ± 0,03	0,95* ± 0
120	6,91 ± 0,01	6,88 ± 0,03	7,25 ± 0,03	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml

Priloga A-14: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* v modelu želodca s fileji osliča in dodatkom 15 ml vodke, določena z metodo spremljanja protimikrobne aktivnosti alkoholnih pijač v modelu želodca

Čas (min.)	Koncentracija živih bakterij N (log CFU/ml)			
	Model želodca	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
1	6,72 ± 0,11	6,85 ± 0,08	6,87 ± 0,02	4,93 ± 0,25
15	6,83 ± 0,01	6,86 ± 0,06	6,84 ± 0,10	1,81
30	6,87 ± 0,02	6,87 ± 0,04	6,82 ± 0,01	0,95* ± 0
60	6,94 ± 0,02	6,89 ± 0,08	7,85 ± 0,05	0,95* ± 0
120	7,10 ± 0,02	7,13 ± 0,02	7,14 ± 0,09	0,95* ± 0

* manj kot 10 CFU/ml