

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Andreja PETAN

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE RASTLINSKIH FENOLNIH
IZVLEČKOV NA ANTIBIOTSKO ODPORNE IN OBČUTLJIVE
SEVE BAKTERIJ RODOV *Campylobacter* IN *Staphylococcus***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT PHENOLIC EXTRACTS
AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT AND SENSITIVE *Campylobacter*
AND *Staphylococcus* spp.**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija živilske tehnologije. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina, za somentorico dr. Anja Klančnik in za recenzenta prof. dr. Peter Raspor.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: dr. Anja KLANČNIK

Recenzent: prof. dr. Peter RASPOR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr.

Član: prof. dr.

Član: prof. dr.

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Petan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 579.24/.26:547.9+547.56(043)=163.6
 KG protimikrobne snovi/rastlinski izvlečki/fenolne spojine/izvlečki grozdnih kožic/vinska trta/izvlečki zelišč/*Campylobacter*/*Staphylococcus aureus*/odpornost proti antibiotikom/membranske izlivne črpalke/inhibitorji izlivnih črpalk/cmeABC
 AV PETAN, Andreja
 SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/KLANČNIK, Anja (somentorica)/RASPOR, Peter (recenzent)
 KZ SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2012
 IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE RASTLINSKIH FENOLNIH IZVLEČKOV NA ANTIBIOTSKO ODPORNE IN OBČUTLJIVE SEVE BAKTERIJ RODOV *Campylobacter* IN *Staphylococcus*
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XII, 57 str., 21 pregl., 18 sl., 6 pril., 66 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Namen diplomskega dela je določitev protimikrobnega delovanja rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene seve bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus* ter ovrednotiti mehanizme odpornosti kampilobaktrov z uporabo inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk ter seva *C. jejuni* z mutacijo v genu *cmeB* in mikrodilucijsko metodo testiranja odpornosti. Testirani izvlečki grozdnih kožic belih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.) so se izkazali za učinkovitejše zaviralce rasti v primerjavi z izvlečki rdečih sort, saj so bile njihove minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) nižje za kampilobakte in stafilokoke. Protimikrobna učinkovitost izvlečkov zelišč je bila boljša kot učinkovitost izvlečkov grozdnih kožic, oboji pa so delovali primerljivo proti po Gramu pozitivnim (*Staphylococcus*) in po Gramu negativnim (*Campylobacter*) bakterijam. Večkratno odporni sevi proti antibiotikom niso pokazali večje odpornosti proti testiranim izvlečkom kot za antibiotike občutljivi sevi. Membranska izlivna črpalka CmeABC je vpletena v odpornost bakterij *C. jejuni* proti antibiotikom in naravnim protimikrobnim snovem. Aktivno vlogo črpalke CmeABC smo potrdili preko vpliva mutacije v genu *cmeB* na občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168 na rastlinske fenolne izvlečke ter z uporabo inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (EPs). Dodatek znanih kemijskih inhibitorjev, 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP) ter fenilalanin-arginin β -naftilamida (PA β N), je zmanjšal MIK antibiotikoma eritromicinu in ciprofloksacinu ter etidijevemu bromidu. Potencialna naravna inhibitorja, izvlečka listja vinske trte (ILVT) in rožmarina (V40), nista pokazala modulatornega delovanja, saj nismo potrdili povečane občutljivosti testiranih sevov proti eritromicinu, ciprofloksacinu ter etidijevemu bromidu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24/.26:547.9+547.56(043)=163.6
 CX antimicrobials/plant extracts/phenolics/extracts of grape skins/grapevine/extracts of herbs/*Campylobacter*/*Staphylococcus aureus*/antibiotic-resistance/efflux pumps/efflux pump inhibitors/cmeABC
 AU PETAN, Andreja
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/KLANČNIK, Anja (coadvisor)/RASPOR, Peter (reviewer)
 PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2012
 TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT PHENOLIC EXTRACTS AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT AND SENSITIVE *Campylobacter* AND *Staphylococcus* spp.
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XII, 57 p., 21 tab., 18 fig., 6 ann., 66 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The aim of this work was to determine the antimicrobial activity of plant phenolic extracts against pathogenic bacteria *Campylobacter* and *Staphylococcus* and also to evaluate mechanisms of resistant *Campylobacter* with the use of inhibitors of efflux pumps and *C. jejuni* with mutation in *cmeB* gene. The antimicrobial activity was screened by broth microdilution test using Gram-positive (*Staphylococcus*) and Gram-negative (*Campylobacter*) bacteria. The extracts from white grape skins (*Vitis vinifera* L.) have been proven to be more efficient in comparison with the extract of red grape skins, as the MICs (minimum inhibitory concentrations) were lower on *Campylobacter* and *Staphylococcus*. It was determined that the extracts of herbs had better antimicrobial activity than grape skin extracts. Multi-drug resistant bacteria in comparison with sensitive bacteria did not show higher resistance against antimicrobial activity of plant phenolic extracts. The membrane efflux pump CmeABC of *C. jejuni* has an impact on resistance to antibiotics and plant phenolic extract. This active role of CmeABC was confirmed by changed resistance of the mutant strain NCTC 11168 *cmeB* on plant phenolic extracts and with the use of inhibitors of efflux pumps (EPIs). Addition of well known chemical inhibitors Phe-Arg-βnaphthylamide (PAβN) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) decreased the MIC of antibiotics erythromycin, ciprofloxacin and also ethidium bromide. However, the potential inhibitors, the extract of wine leaves (ILVT) and rosemary leaves (V40) have not been confirmed as modulatory active compound.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
 1 UVOD	 1
1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE RASTLINSKIH FENOLNIH IZVLEČKOV	3
2.1.1 Fenolne spojine v rastlinah	3
2.1.1.1 Fenolne spojine vinske trte.....	6
2.1.1.2 Fenolne spojine zelišč	8
2.2 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM	9
2.3 ROD <i>Campylobacter</i>	10
2.3.1 Značilnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	10
2.3.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz.....	11
2.3.3 Odpornost kampilobaktrov proti protimikrobnim snovem	12
2.3.3.1 Odpornost proti rastlinskim fenolnim izvlečkom.....	12
2.3.3.2 Odpornost proti antibiotikom	13
2.4 ROD <i>Staphylococcus</i>	16
2.4.1 Značilnosti bakterij <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4.2 Epidemiologija in patogeneza stafilokoknih zastrupitev s hrano	16
2.4.3 Odpornost stafilokokov proti protimikrobnim snovem.....	17
2.4.3.1 Odpornost proti rastlinskim fenolnim izvlečkom.....	17
2.4.3.2 Odpornost proti antibiotikom	17
2.5 DOLOČANJE PROTIMIKROBNEGA IN MODULATORNEGA DELOVANJA .	18
2.5.1 Metode določanja protimikrobnega delovanja rastlinskih fenolnih izvlečkov	18
2.5.2 Metode določanja modulatorne aktivnosti.....	18
 3 MATERIALI IN METODE	 20
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 Rastlinski izvlečki	22

3.1.1.1	Izvečki grozdnih kožic vinske trte	22
3.1.1.2	Zelišča	23
3.1.2	Priprava raztopin antibiotikov	23
3.1.2.1	Eritromicin	24
3.1.2.2	Ciprofloksacin	24
3.1.2.3	Etidijev bromid	24
3.1.3	Priprava raztopin inhibitorjev	24
3.1.3.1	Inhibitor PAβN	24
3.1.3.2	Inhibitor NMP	24
3.1.3.3	V40	25
3.1.3.4	ILVT	25
3.1.4	Delovni mikroorganizmi	25
3.1.4.1	<i>Campylobacter</i>	25
3.1.4.2	<i>S. aureus</i>	26
3.1.5	Reagenti	28
3.1.6	Mikrobiološka gojišča	28
3.1.7	Druge kemikalije in dodatki	28
3.1.8	Laboratorijski pribor in oprema	28
3.2	METODE DELA	29
3.2.1	Revitalizacija bakterij	29
3.2.1.1	Revitalizacija bakterij <i>Campylobacter</i>	29
3.2.1.2	Revitalizacija bakterij <i>S. aureus</i>	29
3.2.2	Namnoževanje biomase in priprava inokuluma	30
3.2.2.1	Namnoževanje biomase in priprava inokuluma bakterij <i>Campylobacter</i> ...	30
3.2.2.2	Metoda štetja kolonij	30
3.2.2.3	Namnoževanje biomase in priprava inokuluma bakterij <i>S. aureus</i>	31
3.2.3	Metode razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči	31
3.2.3.1	Določanje MIK fenolnih izvlečkov pri bakterijah rodu <i>Campylobacter</i> z reagentom BacTiter-Glo TM	32
3.2.3.2	Vrednotenje modulatorne vloge izvlečkov	32
3.2.3.3	Določanje vpliva mutacij <i>cmeB</i>	33
3.2.3.4	Določanje vpliva inhibitorjev	33
3.2.3.5	Določanje MIK fenolnih za stafilokoke z barvilom INT	33
3.2.3.6	Statistična oddelava podatkov	33
4	REZULTATI	34
4.1	PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST FENOLNIH IZVLEČKOV, IZRAŽENA KOT MIK	34
4.1.1	Vpliv izvora in vsebnosti fenolnih snovi	34
4.1.1.1	Učinkovitost izvlečkov kožic grozdnih jagod pri kampilobakterih	34
4.1.1.2	Učinkovitost izvlečkov zelišč pri kampilobaktirih	35
4.1.1.3	Učinkovitost izvlečkov kožic grozdnih jagod pri stafilokokih	36

4.1.1.4	Učinkovitost izvlečkov zelišč pri stafilokokih	36
4.1.2	Primerjava učinkovitosti delovanja fenolnih izvlečkov proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam	37
4.1.3	Učinkovitost delovanja proti humanim in živilskim sevom ter proti antibiotsko odpornim in občutljivim sevom	37
4.2	VREDNOTENJE POTENCIALNE MODULATORNE VLOGE FENOLNIH IZVLEČKOV	38
4.2.1	Testiranje seva z mutacijo <i>cmeB</i>	39
4.2.1.1	Testiranje seva z izvlečki kožic grozdnih jagod.....	39
4.2.1.2	Testiranje seva z izvlečki zelišč	40
4.2.2	Učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk	40
4.2.2.1	Učinek kemijskih inhibitorjev PAβN in NMP	40
4.2.2.2	Učinek potencialnih naravnih inhibitorjev	42
4.2.3	Kombiniran vpliv mutacije v genu <i>cmeB</i> in inhibitorjev.....	43
4.2.3.1	Testiranje seva <i>cmeB</i> z antibiotiki z in brez inhibitorjev	43
4.2.3.2	Testiranje seva z mutacijo <i>cmeB</i> z antibiotiki in izvlečki kot inhibitorji.....	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.1.1	Protimikrobno delovanje fenolnih izvlečkov kožic grozdnih jagod in izbranih zelišč	46
5.1.1.1	Učinkovitost glede na vsebnost fenolnih spojin in izvor izvlečkov	47
5.1.1.2	Učinkovitost delovanja glede na rod bakterij.....	48
5.1.1.3	Učinkovitost delovanja fenolnih izvlečkov glede na izvor bakterij ter občutljivost/večratno odpornost sevov proti antibiotikom.....	48
5.1.2	Mehanizmi odpornosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	49
5.1.2.1	Uporaba seva z mutacijo <i>cmeB</i>	49
5.1.2.2	Uporaba inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk	49
5.2	SKLEPI.....	51
6	POVZETEK.....	52
7	VIRI	53

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997).....	4
Preglednica 2:	Seznam uporabljenih izvlečkov v eksperimentalnem delu naloge.	22
Preglednica 3:	Seznam uporabljenih zeliščnih izvlečkov pri eksperimentalnem delu naloge.	23
Preglednica 4:	Bakterijski sevi rodu <i>Campylobacter</i> , uporabljeni pri eksperimentu.	26
Preglednica 5:	Bakterijski sevi rodu <i>S. aureus</i> , uporabljeni pri eksperimentu.....	26
Preglednica 6:	Seznam uporabljenih gojišč, uporabljenih za kultivacijo sevov	27
Preglednica 7:	Seznam uporabljenih reagentov.....	28
Preglednica 8:	Vrednosti MIK (%) izvlečkov kožic grozdnih jagod za kampilobakte.....	35
Preglednica 9:	Vrednosti MIK (%) izvlečkov zelišč za kampilobakte.	35
Preglednica 10:	Vrednosti MIK (%) izvlečkov kožic grozdnih jagod za stafilokoke.	36
Preglednica 11:	Vrednosti MIK (%) izvlečkov zelišč za stafilokoke.....	37
Preglednica 12:	Primerjava učinkovitosti izvlečkov na kampilobakte različnega izvora.	38
Preglednica 13:	Primerjava učinkovitosti izvlečkov na stafilokoke različnega izvora.....	38
Preglednica 14:	Vrednosti MIK (µg/ml) za eritromicin, ciprofloksacin in etidijev bromid za kampilobakte.....	39
Preglednica 15:	Vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod za seve <i>C.</i> <i>jejuni</i> NCTC 11168 in <i>cmeB</i>	40
Preglednica 16:	Vrednosti MIK izvlečkov zelišč za seve <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 in <i>cmeB</i>	40
Preglednica 17:	Vrednosti MIK (µg/ml) antibiotikov v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN (20µg/ml) ali NMP (100 µg/ml).....	41
Preglednica 18:	Vrednosti MIK (µg/ml) antibiotikov na izbrane seve z in brez dodatka izvlečkov ILVT in V40 kot inhibitorjev.....	42
Preglednica 19:	Rezultati testiranja sinergističnega delovanja fenolnih izvlečkov.	43
Preglednica 20:	Vrednosti MIK (µg/ml) antibiotikov in znanih inhibitorjev v primerjavi z <i>cmeB</i> in <i>C. jejuni</i> NCTC 11168.	44
Preglednica 21:	Vrednosti MIK (µg/ml) antibiotikov in izvlečkov kot inhibitorji v primerjavi z <i>cmeB</i> in <i>C. jejuni</i> NCTC 11168.	44

KAZALO SLIK

Slika 1:	Osnovna strukturna formula flavonoidov (Cadenas in Packer, 2002).	4
Slika 2:	Kemijska strukturna formula galne kisline (Spigno in sod., 2010).....	6
Slika 3:	Prečni prerez in prikaz sestave rdeče grozdne jagode; A: epikarp (jagodna kožica), B: mezokarp (grozdni sok) in C: endokarp (pečki) (Pinelo in sod., 2006).	7
Slika 4:	Uporabljena zelišča pri eksperimentalnem delu: a) črnika, b) melisa, c) origano, č) laški smilj, d) žajbelj, e) meta, f) rožmarin, g) zeleni čaj, h) gornik, i) timijan (Greiner in Weber, 2007).	9
Slika 5:	Fotografija celice <i>Campylobacter jejuni</i> , posneta s transmissijskim elektronskim mikroskopom (Klančnik in sod., 2010)	10
Slika 6:	Bakterije <i>C. jejuni</i> lahko prehajajo v epitelne celice in pri tem tvorijo toksine (Bibek in Arun, 2008).	12
Slika 7:	Model tridelne membranske izlivne črpalke po Gramu negativnih bakterij (Pagès, 2010).	14
Slika 8:	Možni načini delovanja inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (Pagès in sod., 2010).	15
Slika 9:	Kemijska strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN (Piddock in sod., 2010).....	15
Slika 10:	Kemijska strukturna formula NMP (Piddock in sod., 2010).	16
Slika 11:	Fotografija celic <i>S. aureus</i> (Bigongiari, 2011).....	16
Slika 12:	Shematski potek določanja MIK fenolnih rastlinskih izvlečkov za izbrane seve bakterij rodu <i>Campylobacter</i> in <i>Staphylococcus</i>	20
Slika 13:	Shematski prikaz določitve vpliva inhibitorjev ter mutacije <i>cmeB</i> na povišano odpornost kampilobaktrov.....	21
Slika 14:	Razmaz do posamezne kolonije bakterij <i>Campylobacter</i> na gojišču Columbia.....	29
Slika 15:	Razmaz do posamezne kolonije bakterij rodu <i>S. aureus</i> na gojišču MHA.	30
Slika 16:	Nacepitev sevov <i>Campylobacter</i> na gojišče AHB (za določitev koncentracije celic v tekočem gojišču MHB).....	31
Slika 17:	Shematični prikaz razporeditev vzorcev na mikrotitrski plošči; koncentracija rastlinskih izvlečkov pada od leve proti desni; število NC je odvisno od števila vseh uporabljenih vzorcev na mikrotitrski plošči.	32
Slika 18:	Primerjava delovanja fenolnih izvlečkov na kampilobaktri in stafilokoke (modra: kampilobaktri; roza: stafilokoke).....	37

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Prikaz odčitanih rezultatov merjenja in grafični prikaz določitve vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod na testiran sev *C. jejuni* K49/4 z merjenjem bioluminiscence
- Priloga A2: Prikaz odčitanih rezultatov merjenja in grafični prikaz določitve vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod na testiran sev *C. jejuni* K49/4 z merjenjem fluorescence
- Priloga B: Vrednosti MIK (mgGAE/ml) izvlečkov kožic za kampilobakte
- Priloga C: Vrednost MIK (mgGAE/ml) izvlečkov zelišč za kampilobakte
- Priloga D: Vrednosti MIK (mgGAE/ml) izvlečkov kožic za stafilokoke
- Priloga E: Vrednost MIK (mgGAE/ml) izvlečkov zelišč za stafilokoke

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHB	trdno modificirano gojišče (ang. Abeyta – Hunt-Bark agar – AHB)
ATP	adenozin trifosfat
ATCC	oznaka sevov iz zbirke American Type Culture Collection
BHI	gojišče (ang. Brain Heart Infusion)
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CFU	število kolonijskih enot (ang. colony forming units)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
EPI	inhibitorji membranskih izlivnih črpalk (ang. efflux pump inhibitor)
EtOH	etanol
EtBr	etidijev bromid
G+	Gram pozitivne bakterije
G-	Gram negativne bakterije
GAE	ekvivalent galne kisline
GRAS	oznaka za snovi, ki se dodajajo hrani in so splošno sprejete kot varne (angl. generally recognized as safe)
HLR	visoko odporni sevi (ang. high level resistant)
ILVT	izvleček listov vinske trte
INT	bakterijski rastni indikator: p-iodo-nitro-tetrazolium violet
LLR	nizko odporni sevi (ang. low level resistant)
MDR	mnogokratna odpornost proti antibiotikom (ang. multidrug resistance)
mgGAE/ml	mg fenolnih spojin, izraženih kot ekvivalent galne kisline, na ml gojišča
MHA	gojišče (ang. Mueller Hinton Agar)
MHB	gojišče (ang. Mueller Hinton Broth)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NCTC	oznaka sevov iz zbirke National Collection of Type Cultures
NMP	1-(1-naftilmetil)-piperazin
PAβN	fenilalanin-arginin β-naftilamid
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)

RFU	relativne enote fluorescence (ang. relative fluoresce units)
RLU	relativne enote luminescence (ang. relative luminiscence units)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
S	občutljivi sevi (ang. sensitive)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TTC	bakterijski rastni indikator: 2,3,5 trifenil-tetrazolijev klorid
µg	mikrogram (10^{-6} g)
V40	ekstrakt rožmarina (VivOX 40)
ŽMJ	oznaka sevov iz zbirke Laboratorija za živilsko mkirobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* so znane povzročiteljice zoonoze kampilobakterioze pri ljudeh v razvitem svetu in deželah v razvoju (Gousia in sod., 2011). Najpogostejši vzrok okužbe je neposredna ali navzkrižna kontaminacija živil, predvsem neprimerno toplotno obdelanega piščančjega mesa, nepasteriziranega mleka ali kontaminirane pitne vode (Cody in sod., 2010).

Patogene bakterije rodu *Staphylococcus* lahko povzročajo bolnišnične okužbe in zastrupitve s hrano (Lindsay in Holden, 2007). Velikokrat pride do okužbe preko hrane zaradi neprimerne higiene zaposlenih v kuhinjskih obratih. Tveganje predstavljajo predvsem proteinska živila, ki niso bila dovolj toplotno obdelana (na primer mleko, siri, meso, solate) ali gotove jedi, shranjene pri temperaturah od 10 do 60 °C (FDA, 2012).

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih sestavin, med katerimi je največ fenolnih spojin in njihovih oksigeniranih derivatov (Cowan, 1999; Klančnik in sod., 2009b). Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki pomembno vplivajo na morfološke ter fiziološke lastnosti rastlin. Delujejo antioksidativno, protivnetno, antialergijsko, antimutageno in antikarcenogeno. Zaradi teh lastnosti so fenolni izvlečki rastlin predmet številnih raziskav in lahko predstavljajo alternativno izbiro tudi v boju zoper bakterije (Klančnik in sod., 2009a). Rastlinski izvlečki imajo status varnih dodatkov (GRAS) in so zato lahko primerno nadomestilo tradicionalnim konzervansom. Jagodna kožice vinske trte (*Vitis Vinifera* L.) ali njihovi fenolni izvlečki so še neizkoriščen vir fenolnih komponent (Trošt in sod., 2011), ki bi jih lahko uporabljali v živilstvu za izboljšanje varnosti in stabilnosti živil (Katalinić in sod., 2011). Uporaba zelišč dopolnjuje dnevno prehrano kot obogatitev senzoričnih lastnosti jedi. Znani so tudi nekateri terapevtski učinki zelišč ter vsebovanje spojin, ki delujejo protimikrobno (Cowan, 1999).

Velika problema pogoste kontaminacije živil in vode sta pojav ter razširjenost večkratno odpornih bakterijskih sevov. Najpogosteje se pri zdravljenju humanih okužb ter v veterini uporabljajo antibiotiki iz skupine makrolidov, fluorokinolonov in tetraciklinov, vse več pa je poročil o odpornosti na ta protimikrobna zdravila (Cowan, 1999; Pagès in sod., 2010). Pri kampilobaktrijah so bili opisani mehanizmi odpornosti na makrolide in fluorokinolone in sicer naj bi imele glavno vlogo mutacije v tarčnih genih in aktivnost izlivnih črpalk (Payot in sod., 2006). Raziskave potrjujejo, da postajajo izlivne črpalke, ki izčrpavajo strukturno različne snovi iz celice, vedno bolj pomembne pri razvoju in posredovanju odpornosti (Piddock in sod., 2010). Pri patogenih sevih in sevih večkratno odpornih na antibiotike ima ključno vlogo membranska izlivna črpalka cmeABC (Pagès in sod., 2010). Vloga izlivnih črpalk pri odpornosti na rastlinske fenolne komponente ter vloga inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (EPI) pri protimikrobni aktivnosti rastlinskih fenolnih izvlečkov še ni raziskana.

1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Cilji diplomske naloge so bili:

- a) določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) pripravljenih rastlinskih izvlečkov (izraženo v ekvivalentih galne kisline) pri izbranih sevih obeh patogenih rodov *Campylobacter* in *Staphylococcus* z namenom:
 - primerjati učinkovitost delovanja glede na vsebnost fenolnih spojin in izvor izvlečka;
 - primerjati učinkovitost delovanja proti po Gramu pozitivnim (*Staphylococcus*) in po Gramu negativnim bakterijam (*Campylobacter*);
 - primerjati učinkovitost delovanja proti humanim in živilskim sevom ter proti odpornim in občutljivim sevom na antibiotike;
- b) ovrednotiti mehanizem odpornosti z uporabo znanih kemijskih (PAβN, NMP) in potencialnih rastlinskih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk ter seva z mutacijo v genu *cmeB*, odgovornem za delovanje izlivne črpalke CmeABC.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo:

- a) protimikrobno delovanje izvlečka je odvisno od izvora (sestave) in vsebnosti skupnih fenolnih spojin v preiskovanem izvlečku;
- b) rastlinski fenolni izvlečki imajo boljši protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije;
- c) rastlinski fenolni izvlečki uspešno inhibirajo tudi seve, večkratno odporne proti antibiotikom;
- d) dodatek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk ter mutacije na genu izlivne črpalke CmeABC vplivajo na občutljivost kampilobaktrov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE RASTLINSKIH FENOLNIH IZVLEČKOV

Od same surovine, priprave, skladiščenja, prodaje pa vse do priprave gotovih jedi so živila izpostavljena različnim dejavnikom tveganja za kontaminacijo z mikroorganizmi. Posledici sta lahko mikrobiološki kvar hrane in širjenje bakterijskih okužb s hrano. Z dodatkom kemijskih konzervansov živilom podaljšamo obstojnost z omejitvijo rasti in razmnoževanja mikroorganizmov (Tajkarimi in sod., 2010). Zanimanje za naravna protimikrobna sredstva je vse večje. Sodobne prehranske in potrošniške smernice stremijo k t.i. zelenemu potrošništvu, torej uporabi naravnih, učinkovitih in varnih dodatkov brez stranskih učinkov na človeka in okolje (Burt, 2004; Piskernik in sod., 2011).

Rastline so bogat vir protimikrobnih spojin (Cowan, 1999; Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009c) in imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih sestavin. Med temi so najštevilčnejše in najpomembnejše fenolne spojine ter njihovi oksigenirani derivati. Rastlino ščitijo pred napadi virusov, bakterij, plesni, insektov in rastlinojedih organizmov ter povečujejo odpornost pred škodljivimi UV-žarki, ki sprožajo nastanek prostih radikalov (Vrhovšek, 2001; Gibbons, 2008). Protimikrobne snovi se akumulirajo predvsem v epidermalnem tkivu rastlin in pod stresnimi pogoji nastane nešteto kombinacij majhnih molekul (molekulska masa < 500). Te molekule delujejo antibiotično in so poznane kot fitoaleksini (Hemaiswarya in sod., 2008).

Sintetizirana količina fenolov v rastlinah je genotipsko pogojena (sorta), lahko pa se razlikuje tudi glede na geografsko lego (svetloba, temperatura), stopnje zrelosti in vsebnost ogljikovih hidratov, mineralov ter količine vode v celici (Abram in Simčič, 1997; Klančnik in sod., 2009b). Protimikrobna učinkovitost ter spekter delovanja rastlinskih izvlečkov so odvisni od vrste, strukture prisotnih spojin ter njihovega deleža v rastlini. Če je prisotnih več aktivnih komponent, je potrebno upoštevati tudi morebitno sinergistično delovanje (Klančnik in sod., 2009b). Učinkovitost rastlinskih fenolnih izvlečkov na inhibitorno delovanje mikroorganizmov je odvisna od priprave vzorcev, izbire ekstrakcijskih metod, načina koncentriranja ter same izbire mikrobiološke metode. Cowan (1999) navaja, da se za ekstrakcijo različnih fenolnih skupin lahko uporabljajo različna topila: vodo, etanol, metanol, kloroform, diklorometanol, eter in aceton, ki iz izvlečkov ekstrahirajo različne kemijske sestavine. Za določene izvlečke je protimikrobna aktivnost že dokazana, sam mehanizem delovanja na bakterije pa še ni povsem pojasnjen (Piskernik in sod., 2011; Tajkarimi in sod., 2010).

2.1.1 Fenolne spojine v rastlinah

Fenolne spojine so glavni sekundarni metaboliti rastlin ter derivati pentoza fosfatne, šikimatne ali fenilpropanoidne poti v rastlinah. V rastlinah jih je od 1 do 2 %, v zrelih plodovih okoli 8,5 % ter imajo pomembno fiziološko in morfološko vlogo. So kemično reaktivne snovi. Njihova osnova je benzenov obroč, na katerega je vezana ena ali več

hidroksilnih skupin, ki ima ključno vlogo pri antioksidativnem delovanju (Balasundram in sod., 2006). V naravi se običajno nahajajo spojine z več hidroksilnimi skupinami, zato se je uveljavilo drugo ime – polifenoli. Fenolne spojine delimo po številu ogljikovih atomov v molekuli (preglednica 1) (Abram in Simčič, 1997).

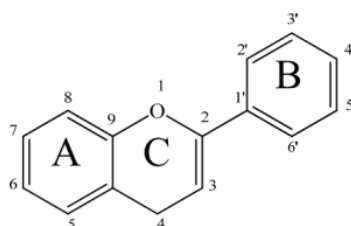
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997).

Število C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C ₆	Enostavni fenoli
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	Fenilacetne kisline
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline
		Fenilpropeni
		Kumarini
		Izokumarini
		Kromoni
10	C ₆ C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni
		Antraktinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani
		Neolignani
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi
N	(C ₆ C ₃) _n	Lignini
N	(C ₆) _n	Melanini
N	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	Kondenzirani tanini

Fenolne spojine so lahko vodotopne, najdemo jih pretežno v vakuoli, poleg njih pa obstajajo tudi polimerizirane topne (tanini) ter netopne oblike (lignini) (Macheix in sod., 1990). Fenolne spojine delimo v dve osnovni skupini: flavonoidi in neflavonoidi.

○ Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz petnajstih ogljikovih atomov in z osnovno strukturno formulo C₆C₃C₆, t. i. 2-fenilbenzopiran oziroma flavon (slika 1).



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Cadenas in Packer, 2002).

Flavonoidi se med seboj razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega obroča in različnih substituentih na obročih (Cadenas in Packer 2002). So ubikvitarne spojine v fotosintetskih celicah in obsegajo nad osem tisoč različnih komponent (Balasundram in sod., 2006). Flavonoidi so sposobni prekiniti že sprožene peroksidacijske procese tako, da odstranjujejo peroksidne in hidroksilne radikale. Njihova sposobnost vezave na zunajcelične proteine ter bakterijsko celično steno pa jim omogoča protimikrobno aktivnost (Cowan, 1999). Podskupine flavonoidov so flavon-3-oli, proantocianidini, antocianidini in flavonoli.

- Flavon-3-oli (oziroma flavanoli), proantocianidini

Proantocianidini nastanejo s polimerizacijo flavan-3-olov in so lahko: dimeri (skupine proantocianidini B: B1, B2, B3, B4), trimeri (proantocianidini skupine C: C1, C2) ali tetrameri. Najpogostejše podskupine so katehini, epikatehini, galokatehini ter epigalokatehini.

- Antocianidini

Vodotopni antocianidini so najpomembnejše fenolne komponente, ki tvorijo pigmente večine rastlin; modre, vijolične, rdeče. Modri odtenek narašča glede na število hidroksi skupin, rdeči pa s številom metoksi skupin. Antioksidativno lastnost jim omogoča OH-skupina na drugem (B) obroču. Glavna antocianidina sta malvidin in peonin, ki imata eno samo prosto OH-skupino antocianidinov z dvema ali tremi prostimi hidroksilnimi skupinami. Na B-obroču so prisotni v manjših količinah, vendar imajo večjo antioksidativno lastnost.

- Flavanoli

Za to skupino fenolov je značilna nasičena C3-veriga s hidroksilnimi skupinami (Cadenas in Packer, 2002).

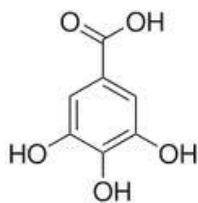
○ Ne flavonoidi

Neobarvane fenolne spojine lahko pripomorejo k intenziteti in stabilnosti barve (na primer rdeča vina). Nekatere komponente (na primer resveratrol) imajo močno biološko aktivnost. Med ne flavonoide prištevamo fenolne kisline, hlapne fenole, stilbene ter razne spojine (na primer lignani).

- Fenolne kisline

Fenolne kisline so poznane kot močni antioksidanti, katerih protimikrobna aktivnost narašča s stopnjo hidroksilacije. Ločimo jih v dve podskupini: hidroksibenzojske kisline in hidroksicimetne kisline.

Hidroksibenzojske kisline so derivati benzojske kisline. Mednje sodijo galna kislina, gentiska kislina, protokatehujska kislina, siringinska kislina, salicilna kislina in vanilinska kislina (Cadenas in Packer, 2002).



Slika 2: Kemijska strukturna formula galne kisline (Spigno in sod., 2010).

Galna kislina (3,4,5-trihidroksi benzojska kislina) in njeni estri vsebujejo tri proste hidroksi skupine, zaradi česar ji pripisujejo močan antioksidativni učinek. Fenolne OH-skupine so donorji vodikovih ionov, fenolati pa elektronov. Galna kislina (slika 2) se nahaja v skoraj vseh rastlinah in jo uporabljajo kot standard pri določanju količin fenolnih snovi v rastlini (Spigno in sod., 2010). Galna kislina je lahko prosta molekula ali vezana na tanine. Znana je njena protibakterijska in protiglivična učinkovitost ter je glavna sestavina številnih antioksidativnih in protimikrobnih prehranskih dodatkov.

Hidroksicimetne kisline imajo C_6-C_3 obliko skeleta in sodijo med fenilpropanoide. Derivati so lahko tako v *cis* kot *trans* konfiguracijski obliki, slednja je bolj stabilna in razširjena. Njihova antimikrobna aktivnost je posledica skupine $CH=CH-COOH$, ki poveča sposobnost oddajanja vodika. Mednje uvrščamo kavno, ferulno, p-kumarinsko in sinapinsko kislino (Balasundram in sod., 2006).

- Hlapni fenoli

Hlapni fenoli so prisotni v manjših koncentracijah kot ostali fenoli, vendar imajo velik vpliv na senzorične lastnosti. Najpomembnejša predstavnika sta vinil in etil fenol.

- Stilbeni

Tretja podskupina neflavonoidov so stilbeni, ki so pomembna skupina fenolov tudi v grozdju (Katalinič in sod., 2011).

2.1.1.1 Fenolne spojine vinske trte

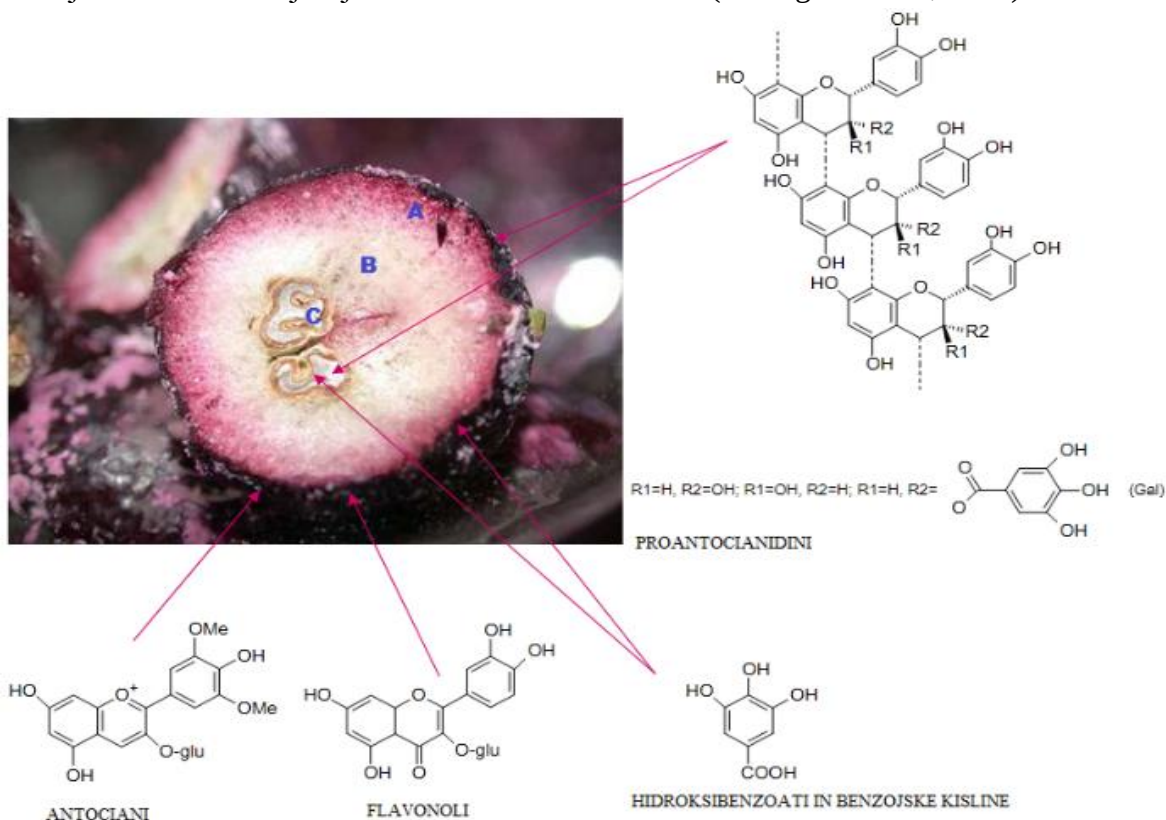
Vinska trta, *Vitis vinifera* L., je termofilna vzpenjavka in sodi med najstarejše gojene rastline na svetu. Sodi v družino *Vitaceae* ali *Ampelideae*, ki zajema enajst rodov in okoli 600 vrst. K povečanemu zanimanju za preučevanje zdravih učinkov grozdja je prispevalo dejstvo, da vsebuje vino bioaktivne substance (Bartolome in sod., 2006). Grozdje prispeva k doprinosu esencialnih elementov v telo, deluje protivirusno in antibakterijsko ter ima pozitivne učinke pri preventivi proti nekaterim vrstam bolezni, na primer proti kariovaskularnim boleznim (Vrhovšek, 2001; Bartolome in sod., 2006).

Plod vinske trte (grozdna jagoda) je sestavljen iz jagodne kože, mesa s sokom in pečk (slika 3). V koži se nahajajo barvne in aromatične snovi, njihova sinteza pa je pogojena s svetlobo. Največjo koncentracijo fenolnih snovi najdemo v pečkah, nekoliko manj pa v jagodni koži. Najmanj fenolov je v grozdnem soku oziroma v peclju (Pinelo in sod., 2006). Grozdne kože in pečki so bogat vir flavonoidnih in neflavonoidnih polifenolnih snovi, ki se med maceracijo in/ali fermentacijo le delno ekstrahirajo (Trošt in sod., 2011).

Prevladujoče fenolne komponente v grozdnih kožicah so estri hidroksicimetnih kislin, monomeri in dimeri flavon-3-olov (katehin, epikatehin, prozcianidin), antocianini – glikozilirani antocianidini (delfinidin, cianidin, malvidin, penonidin, petunidin), stilbeni (*cis* in *trans* rezveratrol) in flavonoli (kvercetin glukozid) (Monages in sod., 2006).

V listih vinske trte najdemo fenolne kisline (3-hidroksibenzojska kislina, kavna kislina, galna kislina, vanilinska kislina), flavonoide (katehin, epikatehin, apigenin, miricetin, kvercetin, rutin, antocianini, kamferol) in stilbene (*trans*-resveratrol ter derivati resveratrola) (Monages in sod., 2006; Katalinić in sod., 2011). V diplomski nalogi sem uporabila izvleček listov vinske trte (ILVT), ki so bili nabrani meseca maja v eksperimentalnem vinogradu v Dalmaciji na Hrvaškem. Izvleček vsebuje visoko vrednost flavon-3-olov, flavonolov (predvsem kvercetina in njegovih derivatov) ter resveratrol (Katalinić in sod., 2011).

Grozдне tropine (grozdne kožice, pečki, peclji), pridobljene po maceraciji in fermentaciji rdečega grozdja so glavni stranski produkt v proizvodnji rdečih vin. Pri proizvodnji belih vin pa predstavljajo stranski produkt nefermentirane grozdne kožice in pečke, ki so bogat vir fenolnih komponent. Grozdne kožice in listi vinske trte so poceni dostopen vir fenolnih komponent, ki bi jih lahko izkoriščali kot naravni vir protimikrobnih snovi za podaljšanje obstojnosti ter za izboljšanje senzoričnih lastnosti živil (Monages in sod., 2006).



Slika 3: Prečni prerez in prikaz sestave rdeče grozdne jagode; A: epikarp (jagodna kožica), B: mezokarp (grozdni sok) in C: endokarp (pečki) (Pinelo in sod., 2006).

2.1.1.2 Fenolne spojine zelišč

Za zelišča in dišavnice je značilno, da ne tvorijo opornega lesa in da so lahko enoletnice, dvoletnice, večletnice ali trajnice. Njihove sestavne dele (korenine, steblo, liste, cvetove plodove) lahko uporabljamo sveže ali posušene.

Vse več raziskav se ukvarja z dokazovanjem protimikrobnih učinkov zelišč. Tajkarimi s sodelavci (2010) navaja, da zelišča in začimbe vsebujejo od 0,05 do 0,1 % eteričnih olj, ki imajo tudi dobro protimikrobno delovanje. Mnoge učinkovine so že bile izolirane in določene, veliko pa jih ostaja še neraziskanih (Piskernik in sod., 2011). V diplomski nalogi smo uporabili izvlečke desetih zelišč: črnike, smilja, zelenega čaja, gornika, melise, mete, origana, rožmarina, timijana in žajblja.

Črnika (*Nigella sativa*) sodi v družino Ranunculaceae ali zlatičevke (slika 4a) in dobro uspeva na apnenčasti podlagi v sredozemskem podnebjju. Zimzeleni usnjasti listi ščitijo drevo pred sušo, metanolnemu izvlečku listov pa so dokazali dobro protimikrobno aktivnost (Gulluce in sod., 2004).

Laški smilj (v nadaljevanju smilj) (*Helichrysum italicum*) uvrščamo v družino Asteraceae ali nebinovke (slika 4č). Izvlečki delujejo inhibitorno na bakterije rodu *S. aureus* (Nostro in sod., 2000).

Zeleni čaj (*Camellia sinensis*) sodi v družino Theaceae ali čajevke (slika 4g). Pridobimo ga iz nabranih listov čajevca, ki so med pridelavo minimalno izpostavljeni oksidaciji. Zeleni čaj deluje antiseptično pri vnetem grlu in dlesnih, njegovo protimikrobno delovanje pa so dokazali pri bakterijah vrste *S. aureus* (Hamilton-Miller, 1995).

Zimzeleni gornik (*Arctostaphylos uva-ursi*) sodi v družino Ericaceae ali vresnice (slika 4h). Glavna protibakterijska učinkovina je hidrokinon, ki nastane iz arbutina v alkalnem okolju. Dykes je s sodelavci (2003) testiral protimikrobni učinek listnih izvlečkov, katerim so dokazali boljše protimikrobno delovanje pri po Gramu pozitivnih bakterijah.

Meliso (*Melissa officinalis* L.), meto (*Mentha spicata* L.), origano (*Origanum vulgare*), rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), timijan (*Thymus vulgaris*) in žajbelj (*Salvia officinalis*) uvrščamo v družino Lamiaceae ali ustnatice.

Eterična olja melise (slika 4b) izkazujejo dobro protimikrobno aktivnost, kar je z eksperimenti dokazala Mimica-Dukić s sodelavci (2003). Protimikrobne snovi v eteričnih oljih mete (slika 4e) pa je potrdil Sartoratto s sodelavci (2004). Meta ima širok spekter protimikrobnega delovanja in deluje inhibitorno tako na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije (Tajkarimi in sod., 2010).

Zelnata trajnica origano (slika 4c) uspeva v toplejših podnebjih in na suhih rastiščih. Nepogrešljiva začimba v kuhinji vsebuje glavni protimikrobni spojini v listih in cvetovih. Spojini karvakrol in timol učinkujeta protimikrobno na po Gramu pozitivne in na po Gramu negativne bakterije (Tajkarimi in sod., 2010).

Listi žajblja (slika 4d) vsebujejo tujon, 1,8-kinole, kamfor in borneol. Vsebujejo tudi triterpenoide, oleanolno kislino, betulin, ursolno kislino (slednja se nahaja tudi v origanu, timijanu in rožmarinu) (Horiuchi in sod., 2007, Tajkarimi in sod., 2010).

Rožmarin (slika 4f) se uporablja kot funkcionalna začimba. Pri določenih oblikah izvlečkov rožmarina so dokazali antioksidativne lastnosti in protimikrobno delovanje na bakterije rodu *Campylobacter* (Piskernik s sod., 2011) in druge (Klančnik in sod., 2009c). Učinkovitost je bila odvisna predvsem od vsebnosti karnozolne kisline (Klančnik s sod., 2010a).

Eterična olja timijana (slika 4i) delujejo protimikrobno. Najpomembnejši protimikrobni komponenti v listih timijana sta timol in karvakrol (Tajkarimi in sod., 2010).



Slika 4: Uporabljena zelišča pri eksperimentalnem delu: a) črnika, b) melisa, c) origano, č) laški smilj, d) žajbelj, e) meta, f) rožmarin, g) zeleni čaj, h) gornik, i) timijan (Greiner in Weber, 2007).

2.2 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

Odkritje antibiotikov je omogočilo nov pristop zdravljenja infekcijskih bolezni. Antibiotik je vsaka snov, ki uniči bakterijsko celico ali prepreči njeno rast (Yim, 2007). Uporabljajo se v humani medicini, v veterini in v kmetijstvu. Njihovo delovanje na bakterijske celice vključuje različne mehanizme: preprečevanje sinteze nukleinskih kislin, preprečevanje sinteze proteinov, oviranje encimskega sistema ter delovanje na bakterijsko celično steno in/ali membrano (Yim, 2007). Vse večja uporaba antibiotikov pa je prispevala k povišani odpornosti nekaterih bakterijskih sevov proti posameznim ali več vrstam antibiotikov.

Bakterijska odpornost je lahko fenotipskega in/ali genotipskega značaja. Glede na izvor ločimo prirojeno (intrinzična) in pridobljeno odpornost. Prirojena odpornost je značilna za določeno vrsto, rod ali skupino in je vnaprej predvidljiva. Pridobljena odpornost je posledica spremenjene celične fiziologije in strukture ter je nastala zaradi genetske spremembe (spontane mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena) ali pridobitve novega genetskega materiala (najpogosteje s konjugacijo ali transformacijo). Pridobljena odpornost je značilna za posamezne bakterijske seve neke vrste ali rodu. Glede na tip pa razlikujemo navzkrižno ter večkratno odpornost. Navzkrižna odpornost je odpornost na

kemijsko sorodne protimikrobne snovi z enakim mehanizmom odpornosti (Sefton, 2002). Večkratna odpornost bakterije pomeni odpornost na kemijsko nesorodne snovi z različnimi mehanizmi odpornosti.

Pri zdravljenju bakterijskih zoonoz se pogosto uporabljajo antibiotiki iz skupine makrolidov (eritromicin), fluorokinolonov (ciprofloksacin) ali tetraciklinov (tetraciklin) (Smole Možina in sod., 2011). V literaturi pa zasledimo vse več raziskav o naraščajoči odpornosti bakterij na ta zdravila, k čemur je prispevala pretirana in nesmotrna uporaba antibiotikov v veterinarski in humani medicini (Gousia in sod., 2011). V prehrambeni verigi imajo velik vpliv na širjenje mikrobnih patogenov in njihovih odpornejših oblik sodobni, masovni načini priprave hrane. K temu sodi tudi pridelava rastlin in prireja živali, kjer se pojavlja možnost izmenjave genetskega materiala mikroorganizmov. Na splošno pa velja, da so po Gramu negativne bakterije odpornejše na protimikrobno delovanje kot po Gramu pozitivne bakterije.

Razvoj bakterijske odpornosti je lahko posledica genetskih sprememb ali delovanje t. i. negenetskih mehanizmov. Prisotnost točkovnih mutacij prispeva k visoki odpornosti na antibiotik eritromicin (Payot in sod., 2006). Med negenetske mehanizme pa sodi aktivnost nespecifičnih membranskih izlivnih črpalk (Zhang in sod., 2010). Pri nekaterih visoko odpornih sevih (na primer sevi HLR na eritromicin) so dokazali sinergistično delovanje obeh mehanizmov.

2.3 ROD *Campylobacter*

2.3.1 Značilnosti bakterij rodu *Campylobacter*

Bakterije rodu *Campylobacter* so termofilne, nesporogene in patogene bakterije, ki povzročajo gastroenteritis pri človeku. So tanke, spiralne bakterije, ki pod vplivom okoljskih stresov lahko dobijo kokoidno obliko. Njihovi polarni bički (najpogosteje je prisoten en sam biček) jim omogoča mobilnost (slika 5). V širino merijo od 0,2 do 0,5 μm , v dolžino pa od 1 do 8 μm (Garénaux in sod., 2008). Po zgradbi celične stene jih uvrščamo med po Gramu negativne bakterije.



Slika 5: Fotografija celice *Campylobacter jejuni*, posneta s transmissijskim elektronskim mikroskopom (Klančnik in sod., 2010)

Kampilobakter sodi med mikroaerofilne bakterije, kar pomeni, da potrebuje manjše koncentracije kisika (od 5 do 10 %). Ostali pogoji za rast so: v atmosferi zagotovljenih 10 % ogljikovega dioksida; optimalna vrednost pH od 6,5 do 7,5 ter temperaturno območje od 37 do 41,5 °C. V neugodnih razmerah preidejo celice v živo, vendar nekultivabilno stanje VBNC (ang: viable but non culturable). To fiziološko stanje je prisotno pri mnogih patogenih mikroorganizmih in pomeni, da celica ostane infektivna, vendar ni sposobna rasti na standardnih gojiščih (Garénaux in sod., 2008).

Vandamme s sodelavci (1991) je pričel uporabljati za uvrstitev sevov in vrst molekularne tehnike, kot je DNA-rRNA hibridizacijo ter imunološke analize. Z analizo sekvenc 16S ribosomske RNK so razdelili vrste v tri homologne skupine. V družino *Campylobacteraceae* sodita dva rodova, *Arcobacter* in *Campylobacter*. Danes vključuje rod *Campylobacter* šestnajst vrst in šest podvrst, od tega jih je večina za ljudi patogenih (Collado in Figueras, 2011).

2.3.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz

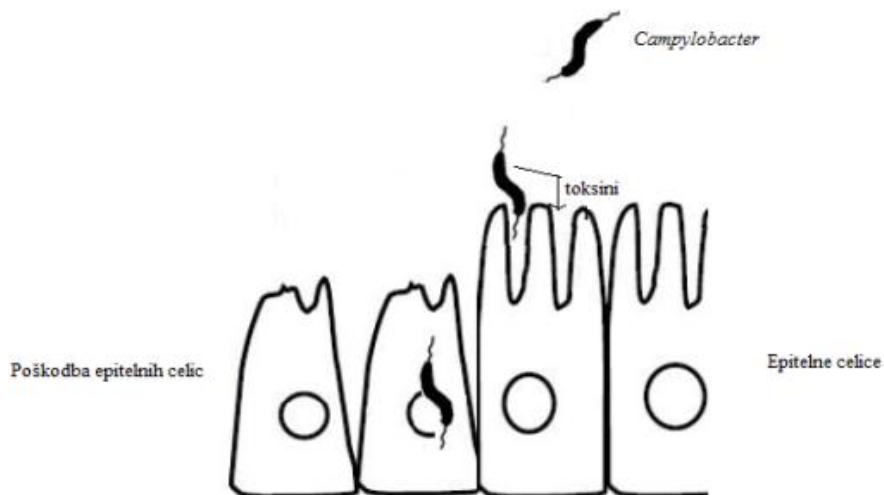
Kampilobakter povzroča eno izmed najpomembnejših bakterijskih okužb, ki se prenaša s hrano in sodi med glavne vzroke enteritisa pri ljudeh, tako v razvitem svetu kot v državah v razvoju. V večini primerov gre za okužbo z vrsto *C. jejuni*, v ostalih primerih pa za *C. coli* (Zhang in sod., 2010). Kampilobakterioze se v razvitih državah običajno pojavljajo kot sporadične okužbe (IVZ, 2011).

V naravi najdemo bakterije rodu *Campylobacter* v skoraj vseh toplokrvnih udomačenih in divjih živali; v perutnini, svinjah, govedu, ovcah, pri psih in mačkah. Najpogostejši vir okužbe za človeka so nezadostno toplotno obdelani meso, mesni izdelki in surovo mleko. Med vsemi viri je glavni povzročitelj prenosa bolezni na človeka perutninsko meso. V samem živilu se bakterija ne razmnožuje, lahko pa ohrani svojo patogenost. Inkubacijska doba je od enega do sedmih dni.

Da kampilobakter ogrozi zdravje človeka, mora preživeti različne stresne dejavnike okolja, napasti imunski sistem in izraziti svoje virulentne dejavnike (Garénaux in sod., 2008). Infekcijska doza je samo 500 celic (Bibek in Arun, 2008). Vnetja so običajno omejena na črevesje in jih lahko povzročijo le gibljivi organizmi. Le tako se lahko pritrdijo in vdrejo v črevesno sluznico, kar privede do poškodbe mukoznega sloja in vnetja (slika 6). Kampilobaktri izdelujejo citotoksine in/ali toplotno občutljive enterotoksine. Enterotoksini se vežejo na celične receptorje ter vstopijo v celico, kjer povečajo količino znotrajceličnega AMP in s tem porušijo ravnovesje pretokov ionov, kar posledično povzroči močno diarejo. V primeru prodora skozi črevesno steno v limfne vozle povzroči obolenja zunaj črevesja, kot so meningitis, vnetje sečnih poti, artritis, Guillain-Berre sindrom (Cody in sod., 2010).

Simptomi obolenja so kratkotrajna diareja (lahko krvava), bolečine v trebuhu, slabo počutje, bruhanje ter morebitno povišanja telesne temperature (Bibek in Arun, 2008). V večini primerov simptomi minejo zelo kmalu (trajajo do enega tedna). Pomembno je, da

bolnik zaužije zadostne količine vode in elektrolitov. Če je driska krvava ali traja več kot en teden, se poslužujemo zdravljenja z antibiotiki, v prvi vrsti se uporablja eritromicin.



Slika 6: Bakterije *C. jejuni* lahko prehajajo v epitelne celice in pri tem tvorijo toksine (Bibek in Arun, 2008).

2.3.3 Odpornost kampilobaktrov proti protimikrobnim snovem

Znan je trend naraščanja odpornosti kampilobaktrov proti protimikrobnim snovem (Smole Možina in sod., 2011). Za odpornost sevov je odgovornih več različnih mehanizmov. Točkaste mutacije v specifičnih tarčnih genih so odgovorne za odpornost proti specifičnim antibiotikom. Delovanje membranskih izlivnih črpalk pa pripomore k odpornosti na strukturno različne protimikrobne snovi (Zhang in Jeon, 2009). Membranske izlivne črpalke pripomorejo k aktivnemu prenosu protimikrobnih snovi iz celice in s tem posledično do povišane odpornosti sevov. Izlivne črpalke so nespecifične (Smole Možina in sod., 2011), saj izločajo veliko število snovi; antibiotike, fluorokinolone, nekatera barvila (etidijev bromid), detergente (sodium dodecil sulfat SDS), razkužila in žolčne kisline (Zhang in Jeon, 2009). Delimo jih v pet skupin, in sicer glede na aminokislinsko zaporedje (Gibbons in sod., 2008). Pri bakterijah rodu *Campylobacter* so dosedaj dokazali vpliv izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF, ki sodita v skupino RND-izlivnih črpalk (ang. resistant nodulation division). Črpalke med sabo vzajemno sodelujeta (Zhang in Jeon, 2009). Prav tako naj bi sinergistično delovali tudi aktivnost membranskih izlivnih črpalk in mutacije na genu 23S rRNK.

2.3.3.1 Odpornost proti rastlinskim fenolnim izvlečkom

Raziskave, usmerjene v dokazovanje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih izvlečkov na kampilobakte, so vse bolj v ospredju. Dokazani so že protimikrobni učinki izvlečka rožmarina. Na te izvlečke je kampilobakter bolj občutljiv kot na ostale po Gramu negativne bakterije (Piskernik in sod., 2011). Študije so pokazale protimikroben vpliv številnih fenolnih benzaldehidov in benzojskih kislin proti *C. jejuni* (Friedman in sod., 2003). Zeleni in črni čaj prav tako vsebujeta spojine, ki inhibirajo rast *C. jejuni* (Tajkarimi in sod., 2010). *C. jejuni* je na protimikrobno delovanje snovi rastlinskega izvora bolj občutljiv kot ostali patogeni mikroorganizmi (Tajkarimi in sod., 2010).

2.3.3.2 Odpornost proti antibiotikom

Odpornost kampilobaktrov proti makrolidnim in fluorokinonolskim antibiotikom povzroča veliko skrb, saj se antibiotiki iz teh skupin uporabljajo pri zdravljanju kampilobakterioz. Bakterije *C. coli* pogosteje razvijejo odpornost proti številnim antibiotikom, kot pa sevi vrste *C. jejuni* (Tambur in sod., 2010). Ugotovljeno je bilo, da so izolati različno odporni na antibiotike.

Smole Možina s sodelavci (2011) navaja zbrane podatke o odpornosti na antibiotike *C. jejuni* piščančjih, humanih in živalskih izolatov. Ugotavlja, da imajo sevi z večkratno odpornostjo na antibiotike višjo prevalenco pri izolatih iz živilske verige (predvsem izolati iz mesa) kot med humanimi izolati.

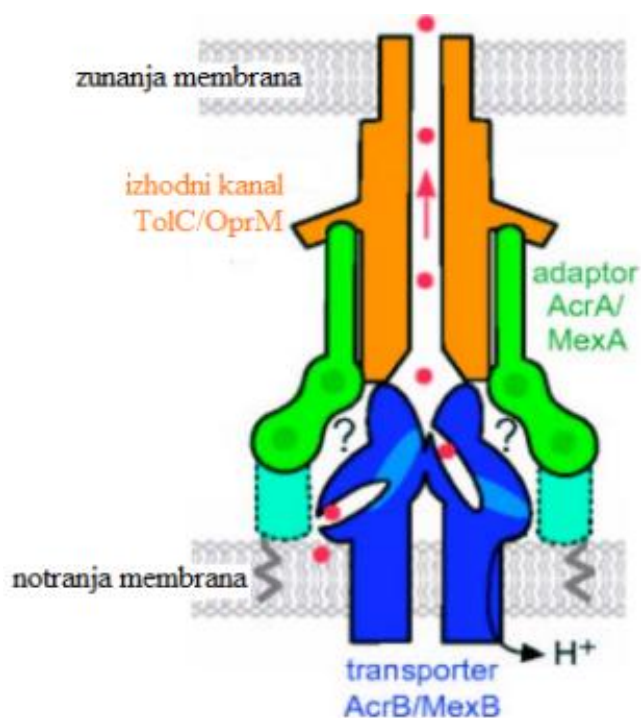
○ Mutacija v genu *cmeB*

Na povečano odpornost kampilobaktrov na eritromicin vpliva mutacija na genu, ki kodira rRNK. Pri visoko odpornih sevih (HLR) so ugotovili mutacijo na mestu 2075 gena 23S rRNK. Gre za spremembo v položaju dušikovih baz na A2075G in A2075T. Te spremembe na genu niso našli pri občutljivih sevih, kar nakazuje na vpliv mutacij tarčnih genov pri povišanju odpornosti kampilobaktrov (Payot in sod., 2006).

Lin in sodelavci (2002) so identificirali in molekularno opredelili gen *cmeB*, ki kodira izlivno črpalko CmeB. Odsotnost tega gena v mutantu *C. jejuni* NCTC 11168 *cmeB* (v nadaljevanju *cmeB*) je od dva- do štirikrat povišala občutljivost na eritromicin, ciprofloksacin, etidijev bromid, kloramfenikol, ampicilin, tetraciklin in SDS. S tem so potrdili vpletenost te membranske izlivne črpalke na odpornost na nesorodne protimikrobne snovi.

○ Membranske izlivne črpalke

Membranska izlivna črpalka CmeABC ima glavno vlogo pri pridobitvi odpornosti sevov *C. coli* in *C. jejuni* (Lin in sod., 2002; Mavri in Smole Možina, 2012), njena vloga je bila potrjena tudi pri *C. fetus*, *C. lari* in *C. upsaliensis* (Lin in sod., 2010). Znano je, da črpalka CmeABC pripomore k povišani odpornosti na ciprofloksacin in eritromicin v sevu *C. jejuni* (Zhang in Jeon, 2009; Smole Možina in sod., 2011). CmeABC je sestavljena iz treh delov: fuzijskega periplazemskega proteina CmeA (modra barva), notranjega membranskega transportnega proteina CmeB (zelena barva) in zunanega membranskega kanalnega proteina CmeC (oranžna barva) (Pagès in Amaral., 2009) (slika 7). Vsi trije proteini so zapisani na enem operonu (*cmeABC*), sestavljenem iz treh genov: *cmeA*, *cmeB* in *cmeC*.



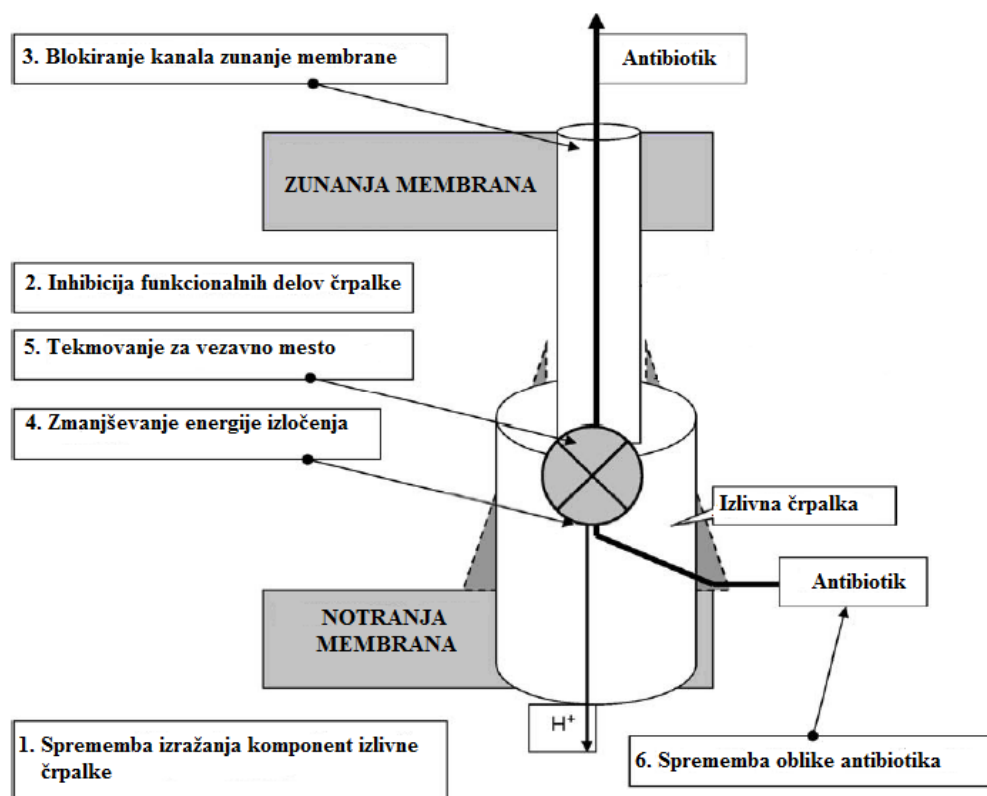
Slika 7: Model tridelne membranske izlivne črpalke po Gramu negativnih bakterij (Pagès, 2010).

○ Inhibitorji membranskih izlivnih črpalk.

Inhibitorji zmanjšajo aktivnost membranskih izlivnih črpalk na več načinov:

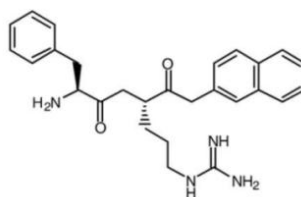
1. s spremembo regulatornih mehanizmov,
2. z inhibicijo funkcionalnih sestavnih delov izlivnih črpalk,
3. z blokiranjem zunanjega membranskega kanala s čepi,
4. z zmanjševanjem energije izločanja,
5. s tekmovanjem za vezavna mesta,
6. s spremembo kemijske sestave antibiotika, kar povzroči zmanjšanje afinitete izlivne črpalke in vezavnega mesta ali zaustavitev izlivnega transporta (Pagès in sod., 2010) (slika 8).

Mahmoud in sodelavci (2007) so razdelili uporabne inhibitorje v tri skupine: derivate fluorokinolonov, peptidomimetike (na primer PA β N) in arilpiperazine (na primer NMP). Analogi fluorokinolonov so nova, še ne povsem raziskana skupina inhibitorjev. Specifična inhibitorja, ki vplivata na glavno membransko izlivno črpalko kampilobaktra CmeABC, sta PA β N in NMP (Pidock in sod., 2010).



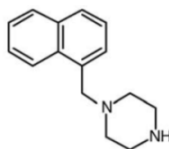
Slika 8: Možni načini delovanja inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (Pagès in sod., 2010).

PAβN (slika 9) učinkovito ovira delovanje izlivnih mehanizmov tako, da z antibiotikom tekmuje za vezavno mesto na črpalki. Končni učinek je zmanjšanje odpornosti bakterije na antibiotik (Pagès in sod., 2010). Inhibitor bolje učinkuje na seve *C. coli* kot pa na *C. jejuni*.



Slika 9: Kemijska strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN (Piddock in sod., 2010).

Inhibitor NMP (slika 10) s svojim delovanjem povzroči povišanje znotrajcelične koncentracije različnih substratov, kar je še dodaten mehanizem v korist zmanjšanja bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi (Mahmoud in sod., 2007; Pages in sod., 2009). Sodi v skupino inhibitorjev arilpiperazinov, ki imajo tekmovalen odnos do serotonina in velja za toksično snov s prepovedano uporabo za humano ter veterinarsko medicino. V tem desetletju je bilo veliko snovi prepoznanih kot zaviralci delovanja membranskih izlivnih črpalk (Pagès in Amaral., 2009). Iskanje inhibitorjev izlivnih črpalk se je preneslo na raziskovanje novih, naravnih virov. Inhibitorji naravnega izvora so lahko tudi produkti sekundarnega metabolizma rastlin.

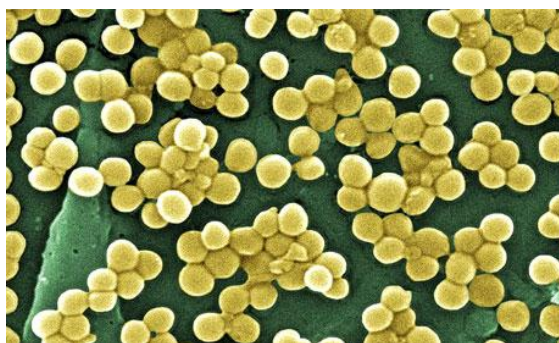


Slika 10: Kemijska strukturna formula NMP (Piddock in sod., 2010).

2.4 ROD *Staphylococcus*

2.4.1 Značilnosti bakterij *Staphylococcus aureus*

Po Gramu pozitivne bakterije rodu *Staphylococcus* (slika 11) sodijo med pomembnejše patogene mikroorganizme, ki se prenašajo s hrano in povzročajo gastrointestinalne bolezni (FDA, 2012). So fakultativno anaerobne bakterije, kar pomeni, da lahko rastejo z aerobno respiracijo ali s fermentacijo, katere stranski produkt je mlečna kislina. Okrogli, zlatorumeni koki so lahko samostojni ali pa se oblikujejo v pare oziroma v grozdasto strukturo. Iz zunanje podobe izhaja tudi ime; grško pomeni staphylo – grozd, kokus – jagoda in aureus – zlat. So negibljivi, v premeru merijo 1 μm in ne sporulirajo (Todar, 2008; FDA, 2012).



Slika 11: Fotografija celic *S. aureus* (Bigongiari, 2011).

S. aureus je pogost povzročitelj zastrupitev s hrano zaradi toplotno stabilnega enterotoksina (FDA, 2012). *S. aureus* spada med koagulaza pozitivne stafilokoke ter raste pri temperaturi od 15 do 45 °C in pri 15 % koncentraciji soli.

2.4.2 Epidemiologija in patogeneza stafilokoknih zastrupitev s hrano

Stafilokoki so ubikvitarni mikroorganizmi. Nepatogeni sevi rodu *Staphylococcus* so redno prisotni na koži, lasih, nosni votlini in sluznici ljudi ter živali. Stafilokokne okužbe se pojavljajo posamično ali epidemično in se prenašajo neposredno (z dotikom okužene osebe) ali posredno (preko kontaminiranih predmetov, hrane). Problem so predvsem bolnišnične okužbe, ki naraščajo po vsem svetu (Kapun-Dolinar, 2001). V veliki meri je za okužbe kriva navzkrižna kontaminacija preko zdravstvenega osebja, predvsem zdravih klicenoscev.

Bakterije vrste *S. aureus* sodijo med najpogostejše povzročitelje zastrupitev s hrano (FDA, 2012). Stafilokoki lahko kontaminirajo skoraj vsa živila, najbolj kritična pa so kremna živila (solate, kremne rezine, sladoledi, namazi). Veliko je okužb z navzkrižno kontaminacijo gotovih jedi (perutninsko meso, kuhano meso, pogrete jedi), ki niso bila shranjena pri dovolj nizki (pod 10 °C) ali dovolj visoki temperaturi (nad 60 °C) (Kapun-Dolinar, 2001; FDA, 2012). Okužbo je težko zaslediti, saj se samo živilo senzorično ne spremeni.

Za stafilokoknim gastroenteritisom lahko zbolimo tudi z zaužitjem okužene hrane, ki vsebuje enega ali več enterotoksinov. Za tvorbo toksina je dovolj dve urna izpostavitve na sobni temperaturi. Infekcijska doza je 10^6 celic v 1 g živila, saj pride pri tej koncentraciji celic do zadostne količine izločenih enterotoksinov. Znaki zastrupitve se pokažejo v času od ene do šestih ur po zaužitju okužene hrane. Simptomi se kažejo v obliki diareje, slabosti, utrujenosti, bruhanja, trebušnih bolečin, glavobola in povišanja telesne temperature (Kapun-Dolinar, 2001).

2.4.3 Odpornost stafilokokov proti protimikrobnim snovem

Vse bolj pogosti povzročitelji nalezljivih bolezni so večkratno odporni sevi bakterij na najbolj pogosto uporabljene antibiotike, kar povzroča zaskrbljenost strokovne javnosti. Mednje uvrščamo tudi *S. aureus*, ki je odporen na meticilin ali MRSA (ang. methicilin resistant *S. aureus*). Zato so vse večja prizadevanja po iskanju novih snovi s protimikrobnim delovanjem in inhibitorjev na razvoj odpornostnih mehanizmov v bakteriji.

2.4.3.1 Odpornost proti rastlinskim fenolnim izvlečkom

Za vrsto *S. aureus* so potrdili protimikrobno delovanje klorogenske kisline, izvlečkov mete (Sartoratto in sod., 2004), origana, žajblja, korenja, melise, ingverja, mandljevca in številnih drugih rastlinskih učinkovin (Hammer, 2001; Tajkarimi in sod., 2010). Izvlečki timijana so se izkazali kot učinkoviti proti zaviranju rasti seva MRSA (Horiuchu in sod., 2007). Med flavon-3-ole sodijo tudi katehini, ki zavirajo rast stafilokokov. Klančnik in sodelavci (2010a) so med drugim potrdili protimikrobno aktivnost izvlečkov zelenega čaja, žajblja in listov oljk na bakterije *S. aureus*.

2.4.3.2 Odpornost proti antibiotikom

Meticilin so leta 1959 pričeli uporabljati za zdravljenje infekcij, povzročenih z bakterijo *S. aureus*. Že leta 1961 so v Veliki Britaniji objavili novico o izolatu seva *S. aureus* s pridobljeno odpornostjo na meticilin ali t. i. MRSA (Gibbons, 2008). Za ta sev velja, da je odporen na penicilin zaradi encima β -laktamaze (ali penicilinaze), ki razgrajuje ta antibiotik. MRSA je odporna na vse t. i. beta-laktamske antibiotike, kamor poleg meticilina in penicilina sodi tudi amoksisilin (Hemaiswarya in sod., 2008). Zaradi svoje odpornosti je bakterija dobila celo naziv »superbug«.

Sevi MRSA so mnogokratno odporni izolati, občutljivi na delovanje le še nekaterih glikopeptidnih antibiotikov. Od leta 2002 so potrdili zmanjšanje občutljivosti določenih sevov MRSA tudi na antibiotik vankomicin, glikopeptidni antibiotik. Na tržišču je od leta 2010 antibiotik targocil, ki uspešno zaustavlja tako občutljive kot tudi odporne seve *Staphylococcus* (Campbell in sod., 2010).

2.5 DOLOČANJE PROTIMIKROBNEGA IN MODULATORNEGA DELOVANJA

2.5.1 Metode določanja protimikrobnega delovanja rastlinskih fenolnih izvlečkov

Izbira metode določanja protimikrobne aktivnosti je odvisna od občutljivosti, namena preiskave, fleksibilnosti, enostavnosti in možne avtomatizacije (Klančnik in sod., 2009b). Za ugotavljanje minimalnega protimikrobnega učinka v *in vitro* pogojih Burt (2004) priporoča metodi razredčevanja v tekočem in/ali trdnem gojišču. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču se najpogosteje uporablja metoda na mikrotitrski ploščici. Za vrednotenje protimikrobnega delovanja lahko določimo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), minimalno bakteriocidno koncentracijo (MBK), bakteriostatično koncentracijo in bakteriocidno koncentracijo.

Tako kot metoda za določanje protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov ni standardizirana, so tudi definicije protimikrobnih učinkov različne, kar lahko predstavlja problem pri primerjavi podatkov v literaturi. Protimikrobno aktivnost rastlinskih fenolnih izvlečkov najpogosteje izražamo z vrednostjo MIK ali MBK (Klančnik in sod., 2009b). V diplomski nalogi smo upoštevali vrednost MIK. To je najnižja koncentracija testirane protimikrobne snovi, pri kateri je inhibirana rast testnega mikroorganizma (Jeršek, 2009). Pri izvedbi mikrodilucijske metode v tekočem gojišču je potrebno dokazovanje bakterijske rasti v tekočem gojišču. Pri kolorimetričnih metodah uporabimo različne indikatorske snovi. Za aerofilne mikroorganizme so primerne tetrazolijeve soli, ki se preko respiracijskih procesov bakterij pretvorijo v obarvane derivate formazana, na primer 2,3,4-trifeniltetrazolijev klorid (TTC), *p*-jodonitrotetrazolijev klorid (INT) ali 3-(1-((fenil-amino)-karbonil)-3,4-tetrazolium)-bis(4-metoksi-6-nitro) benzensulfonska kislina hidrat (XTT). Rast mikrobnih celic pa lahko zaznamo tudi preko merjenja optične gostote, zaznavanja fluorescence ali bioluminiscence (Klančnik in sod, 2010).

2.5.2 Metode določanja modulatorne aktivnosti

Širjenje antibiotske odpornosti bakterij vodi v iskanje alternativnih virov protimikrobnih snovi, ki bi omejile razvoj mehanizmov za odpornost (Hemaiswarya in sod., 2008). Rastlinski izvlečki dokazujejo, da lahko z naravnimi snovmi zvišujemo občutljivost sevov. Zato so vse bolj v ospredju raziskovanja o dokazovanju sinergističnega oziroma modulatornega delovanja med naravnimi spojinami in antibiotiki. Do sedaj so že poznani učinki delovanja diterpenov iz izvlečka rožmarina (na primer karnozol) ter katehinov kot modulatorjev (Gibbons 2008). Odpornost kampilobaktrov na ciprofloksacin so zmanjšali z dodatkom eteričnega olja origana (Tajkarimi in sod., 2010).

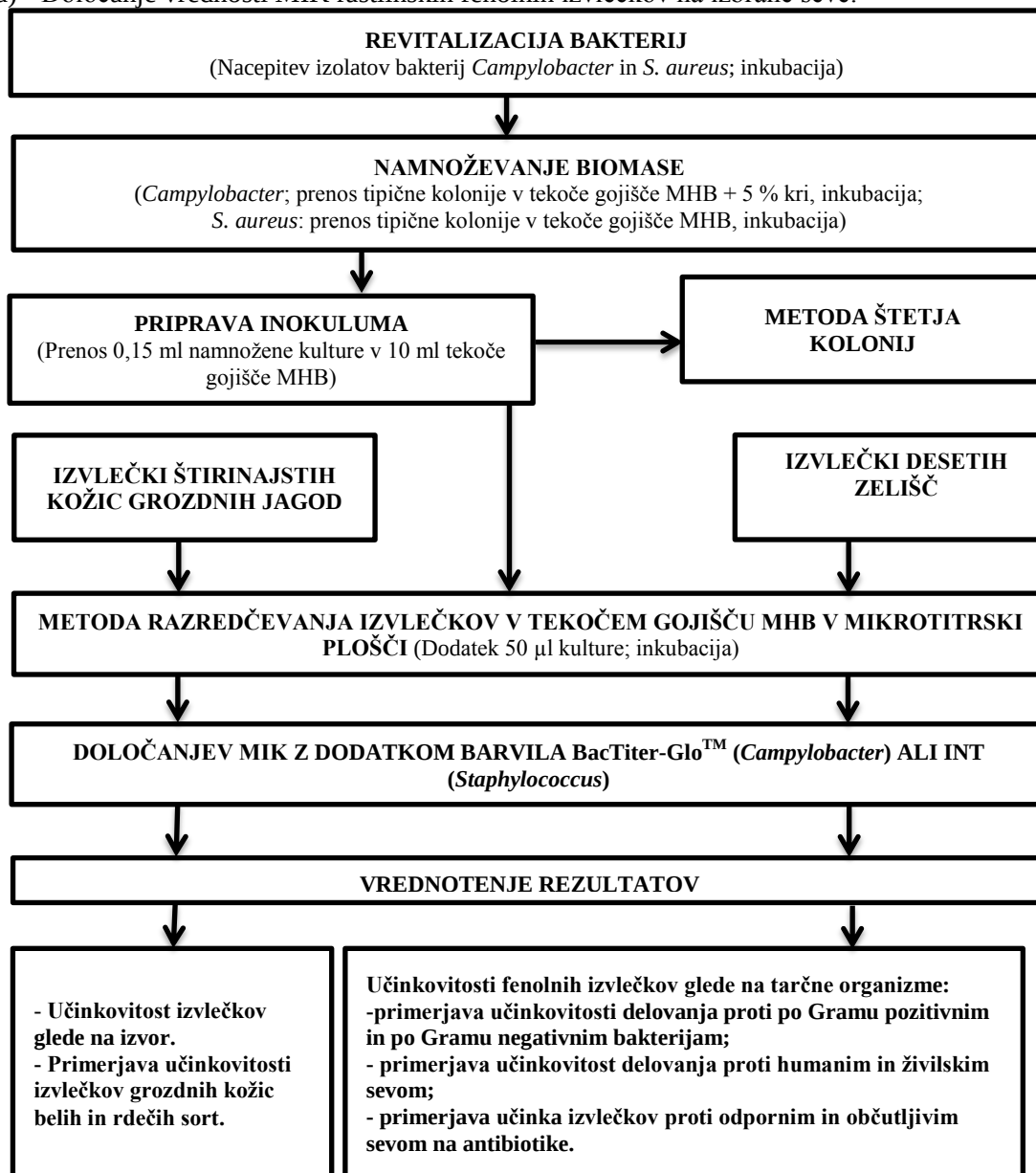
Za odkrivanje potencialnih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk se priporoča test privzema berberina (ang. berberine uptake test), test inhibicije efluksa etidijevega bromida (ang. ethidium bromide efflux inhibition assay), t. i. »akumulacijski testi« (ang. accumulation assays) ter modulacijski testi (Stavri in sod., 2007). Zadnja metoda je hitra ter enostavna, saj uporabimo metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski ploščici (Stavri in sod., 2007). Dodatek subinhibitorih koncentracij čistih snovi (PAβN, NMP) ali potencialnih (ILVT, V40) inhibitorjev lahko dokaže modulatorno aktivnost.

3 MATERIALI IN METODE

Namen diplomskega dela je določiti protimikrobno delovanje štirinajstih izvlečkov kožic grozdnih jagod in desetih zelišč na izbrane seve bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*. Za ovrednotenje mehanizmov odpornosti kampilobaktrov smo testirali dva znana kemijska in dva potencialna inhibitorja membranskih izlivnih črpalk ter sev z mutacijo v genu *cmeB*. Uporabljali smo mikrodilucijsko metodo v tekočem gojišču na mikrotitrski ploščici.

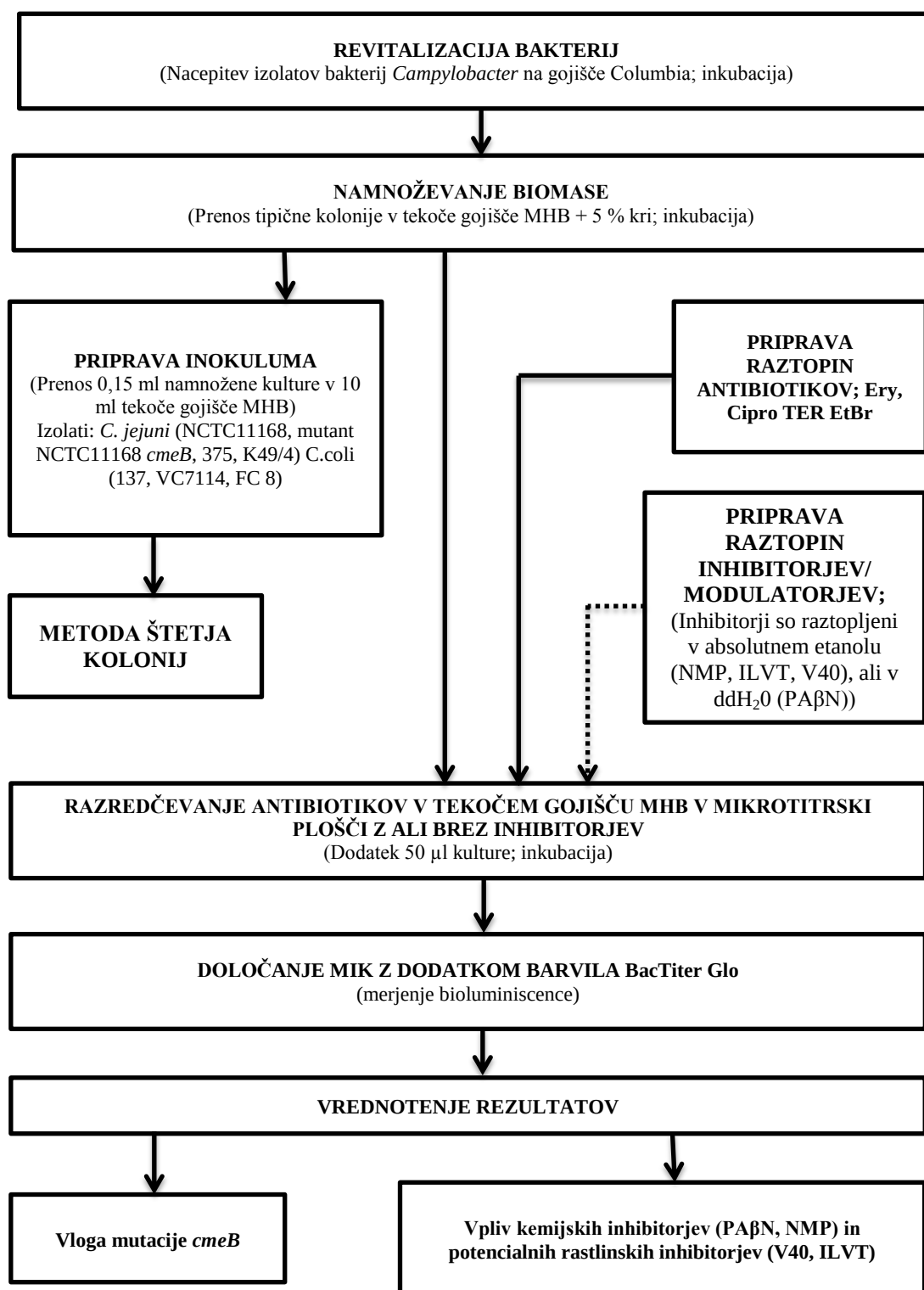
POTEK DELA

a) Določanje vrednosti MIK rastlinskih fenolnih izvlečkov na izbrane seve:



Slika 12: Shematski potek določanja MIK fenolnih rastlinskih izvlečkov za izbrane seve bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*.

- b) Ovrednotenje mehanizma odpornosti kampilobaktrov z uporabo kemijskih in potencialnih rastlinskih inhibitorjev (EPI) ter seva z mutacijo:



Slika 13: Shematski prikaz določitve vpliva inhibitorjev ter mutacije *cmeB* na povišano odpornost kampilobaktrov.

3.1 MATERIALI

V nadaljevanju poglavja so opisani vsi uporabljeni materiali (rastlinski fenolni izvlečki, delovni mikroorganizmi, priprave raztopin antibiotikov in inhibitorjev, reagenti, mikrobiološka gojišča, kemikalije, laboratorijski pribor in oprema), ki smo jih uporabili za izvedbo eksperimenta.

3.1.1 Rastlinski izvlečki

Pri določevanju protimikrobnega delovanja rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije smo uporabili izvlečke grozdnih kožic vinske trte (*Vitis vinifera* L.) ter izvlečkov zelišč. V nadaljevanju so opisani izbrani vzorci ter postopki priprave.

3.1.1.1 Izvlečki grozdnih kožic vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Izvlečki kožic izbranih sort grozdja, ki so bili uporabljeni v eksperimentalnem delu diplomske naloge, so bili pripravljeni na Fakulteti za kemijsko tehnologijo Univerze v Splitu (Katalinić in sod., 2011). Vse sorte izhajajo iz območja Dalmacije. Izvlečke so pridobili z uporabo ekstrakcije (tekoče-tekoče) z 80 % alkoholom (etanolom). Z metodo po Folic-Ciocalteu so v tako pripravljenih izvlečkih določili koncentracijo fenolov, izraženo v mg galne kisline na 1ml izvlečka (Katalinić in sod., 2011) (preglednica 2).

Preglednica 2: Seznam uporabljenih izvlečkov kožic grozdnih jagod v eksperimentalnem delu naloge.

IZVLEČKI	SKUPNE FENOLNE SPOJINE (mgGAE/ml)
Bele sorte	
Debit	2,01
Kuč	1,50
Kujundžuša	2,55
Maraština	1,21
Medna	1,18
Rkaciteli	1,17
Zlatarica	3,36
Rdeče sorte	
Babič	3,34
Lasin	1,34
Merlot	3,49
Plavina	2,33
Rudenžuša	6,66
Trnjak	6,98
Vranac	5,24

Priprava ustreznih koncentracij izvlečkov:

Pripravili smo 32 % raztopino vsakega izvlečka in ga razredčili s tekočim gojiščem MHB v enakem volumskem razmerju ter tako pridobili 16 % raztopino ekstrakta kot založno koncentracijo vzorca. Končne koncentracije (8 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %) smo dobili z dvakratnim razredčevanjem z bakterijsko kulturo.

3.1.1.2 Zelišča

Izvlečki zelišč so bili v tekoči (črnika, smilj) in v liofilizirani obliki (meta, origano, melisa, timijan, zeleni čaj, gornik, žajbelj). Protimikrobni učinek na izbrane seve bakterij smo testirali za izvlečke desetih zelišč z znano koncentracijo skupnih fenolnih spojin (preglednica 3).

Preglednica 3: Seznam uporabljenih zeliščnih izvlečkov pri eksperimentalnem delu naloge.

ZELIŠČA	SKUPNI FENOLNE SPOJINE (mg/ml oz. mg/g)
Črnika	39,05
Gornik	12,47
Melisa	4,85
Meta	34,89
Origano	271,36
Smilj	40,18
Sončnica	8,99
Timijan	179,94
Zeleni čaj	11,07
Žajbelj	5,40

Priprava testnih koncentracij tekočih izvlečkov

Pripravili smo 8 % raztopino vsakega izvlečka, raztopljenega v 100 % etanolu. Vzorce smo nato razredčili s tekočim gojiščem MHB in dobili 4 % začetno raztopino izvlečka. Končne koncentracije (2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, 0,0625 %) smo dobili z dvakratnim redčenjem z bakterijsko kulturo.

Priprava liofiliziranih vzorcev

Stehtali smo 0,02 g liofiliziranega vzorca in ga raztopili v 0,5 ml 100 % etanolu ter dodali 1,5 ml tekočega gojišča MHB. Tako pripravljena raztopina ima koncentracijo 10 mg/ml, kar pomeni, da je bila prva delovna raztopina na mikrotitrski ploščici 5 mg/ml (oziroma 0,5 %).

3.1.2 Priprava raztopin antibiotikov

Raztopine antibiotikov smo uporabili za določevanje odpornosti sevov. V nadaljevanju je opis priprave raztopin posameznih antibiotikov.

3.1.2.1 Eritromicin (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija)

Stehtali smo 0,0256 g eritromicina in ga raztopili v 5 ml absolutnega etanola ter prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo nato dodali 1,6 ml tekočemu gojišču MHB. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture je koncentracija antibiotika znašala 512 µg/ml.

3.1.2.2 Ciprofloksacin (Biochemika, Kitajska)

Stehtali smo 0,0256 g ciprofloksacina in ga raztopili v 4,5 ml absolutnega etanola in 0,5 ml NaOH (c=1M). Raztopino smo po mešanju na vrtničnem mešalniku prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo dodali 1,6 ml tekočemu gojišču MHB. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture je koncentracija antibiotika znašala 512 µg/ml.

3.1.2.3 Etidijev bromid (Avantor, Nizozemska)

Stehtali smo 0,0256 g etidijevega bromida, ga raztopili v 5 ml absolutnega etanola ter prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo nato dodali 1,6 ml tekočemu gojišču MHB. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture je končna koncentracija antibiotika tako znašala 512 µg/ml.

Etidijev bromid se veže na molekulo DNK in okvari njeno pravilno delovanje – deluje karcinogeno. Zato rokovanje s to raztopino zahteva še dodatno pazljivost pri delu, zaščitne rokavice morajo biti odpornejše, delo v digestoriju prepreči vdihavanje aerosola (Avantor, 2011). Odpadni material, ki nastane med delom, ločimo od ostalih odpadkov.

3.1.3 Priprava raztopin inhibitorjev

Z uporabo inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk smo potrjevali aktivno vlogo izlivnih črpalk pri kampilobaktrih. V nadaljevanju sledi opis priprave izhodnih raztopin.

3.1.3.1 Inhibitor PAβN (Sigma Aldrich, Združene države Amerike)

Stehtali smo 0,020 g PAβN ter ga raztopili v 1 ml ddH₂O. Dobljeno raztopino smo premešali v vrtničnem mešalniku in prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. Koncentracija izhodne raztopine je znašala 20 mg/ml. 15,73 µl te izhodne raztopine smo zmešali s 140 µl MHB, da smo dobili delovno raztopino 2,02 mg/ml, katero smo prenesli na mikrotitrsko ploščo po 1 µl. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture je končna koncentracija inhibitorja tako znašala 20 µg/ml.

3.1.3.2 Inhibitor NMP (Chess, Nemčija)

Stehtali smo 0,020 g NMP in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola. Dobljeno raztopino smo premešali v vrtničnem mešalniku in prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. Koncentracija izhodne raztopine je znašala 20 mg/ml. 102,73 µl te izhodne raztopine smo zmešali s 100 µl MHB, da smo dobili delovno raztopino 10,1 mg/ml, katero smo prenesli na mikrotitrsko ploščo po 1 µl. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture je končna koncentracija inhibitorja tako znašala 100 µg/ml.

3.1.3.3 V40

Stehtali smo 0,010 g V40 in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola. Dobljeno raztopino smo premešali v vrtničnem mešalniku in prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. Koncentracija izhodne raztopine je znašala 10 mg/ml.

Iz izhodne koncentracije (10 mg/ml) smo pripravili delovno raztopino s koncentracijo 0,5 MIK (0,49 mg/ml) in 0,25 MIK (0,25 mg/ml):

- V40, 0,5 MIK: 26,03 µl te izhodne raztopine smo razredčili v 500 µl MHB in dobili delovno raztopino 0,49 ml/ml. V mikrotitrsko ploščo smo v vsako vdolbinico prenesli po 1 µl inhibitorja, da je končna koncentracija znašala 4,9 mg/ml;
- V40, 0,25 MIK: 12,95 µl izhodne raztopine smo razredčili v 500 µl MHB in dobili delovno raztopino 0,252 ml/ml. V mikrotitrsko ploščo smo v vsako vdolbinico prenesli po 1 µl inhibitorja, da je končna koncentracija inhibitorja znašala 2,5 mg/ml.

3.1.3.4 ILVT

Izvleček ILVT je bil pripravljen iz listov vinske trte, nabranih v mesecu maju v okviru študije Katalinić in sod. (2011). Založna raztopina predstavlja 100 % raztopino izvlečka ILVT.

Iz izhodne raztopine smo pripravili subinhibitorni delovni koncentraciji 0,5 MIK in 0,25 MIK:

- ILVT 0,5 MIK: 51,01 µl izhodne raztopine (100 %) smo razredčili v 50 µl MHB in dobili delovno raztopino 50,5 %. V mikrotitrsko ploščo smo v vsako vdolbinico prenesli po 1 µl inhibitorja, da je končna koncentracija znašala 0,5 %;
- ILVT 0,25 MIK: 16,9 µl izhodne raztopine (100 %) smo razredčili v 50 µl MHB in dobili delovno raztopino 25,25 %. V mikrotitrsko ploščo smo v vsako vdolbinico prenesli po 1 µl inhibitorja, da je končna koncentracija inhibitorja znašala 0,25 %.

3.1.4 Delovni mikroorganizmi

Pri eksperimentu smo uporabili seve bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus* iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo.

3.1.4.1 *Campylobacter*

Za preučevanje bakterijske odpornosti smo uporabili enajst sevov bakterij rodu *Campylobacter* (preglednica 4). Uporabili smo tri referenčne seve (*C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* NCTC 11168), dva piščančja izolata (*C. jejuni* K49/4, *C. coli* 137), izolat iz perutnine (*C. coli* FC8) in svinjine (*C. coli* VC7114), med analiziranimi pa so bili uporabljeni tudi humani (klinični) sevi (*C. jejuni* 3552, *C. coli* 2235, *C. coli*

6553, *C. jejuni* 375). Poleg humanih sevov ter sevov, izoliranih iz živil, smo v nalogi uporabili tudi sev *cmeB*. Mutant *cmeB* ima v gen *cmeB* vstavljen transpozon EZ::TN<KAN-2> (Lin in sod., 2002).

Preglednica 4: Bakterijski sevi rodu *Campylobacter*, uporabljeni pri eksperimentu.

SEV	IZVOR	ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	referenčni (živalski iztrebki)	občutljiv
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	referenčni (humani)	občutljiv
<i>cmeB</i>	mutant	občutljiv
<i>C. jejuni</i> K49/4	piščanec	občutljiv
<i>C. jejuni</i> 375-06	humani	večkratno odporen
<i>C. jejuni</i> 3552	humani	občutljiv
<i>C. coli</i> ATCC 33559	referenčni (živalski iztrebki)	občutljiv
<i>C. coli</i> 137	piščanec	večkratno odporen
<i>C. coli</i> 2235	humani	večkratno odporen
<i>C. coli</i> 6553	humani	večkratno odporen
<i>C. coli</i> FC8	perutnina	srednje odporen
<i>C. coli</i> VC7114	svinjina	večkratno odporen

Legenda: ATCC: oznaka sevov iz zbirke American Type Culture Collection; NCTC: oznaka sevov iz zbirke National Collection of Type Cultures.

3.1.4.2 *S. aureus*

Pri izvedbi poizkusa smo uporabili tri različne seve *Staphylococcus*; *S. aureus* 72, *S. aureus* 345 in *S. aureus* MRSA 346 iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo (preglednica 5).

Preglednica 5: Bakterijski sevi rodu *S. aureus*, uporabljeni pri eksperimentu.

SEV	IZVOR SEVA
<i>S. aureus</i> ŽMJ 72	Živilo
<i>S. aureus</i> ŽMJ 345	Živilo
<i>S. aureus</i> ŽMJ 346	Humani, MRSA

Legenda: ŽMJ: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete.

3.1.5 Mikrobiološka gojišča

Preglednica 6: Seznam uporabljenih gojišč, uporabljenih za kultivacijo sevov .

SESTAVINE			PRIPRAVA GOJIŠČ
Količina	Sestavina	Proizvajalec	
Agar TSA (Tryptone Soya Agar)			
20 g	Osnovni medij: Trypton soya agar	Oxoid, CM0131	Sestavino smo natehtali v 1 L steklenico in raztopili v dH ₂ O. Sterilizirali smo v avtoklavu (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Tako pripravljeno gojišče smo aseptično razlili v sterilne petrijeve plošče. Plošče smo hranili do uporabe pri 4 °C.
1,25 g	Dikalijev hidrogenfosfat K ₂ HPO ₄		
1,25 g	D-(+)-glukoza	Kemika, 0705007	
3,0 g	Kvasni ekstrakt	Biolife, 412220	
500 ml	dH ₂ O		
Trdno gojišče Mueller Hinton (MHA)			
19 g	Osnovni medij: Mueller Hinton	Oxoid, CM337	19 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH ₂ O in avtoklavirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Aseptično smo gojišče razlili v sterilne petrijeve plošče in jih hranili pri 4 °C.
500 ml	dH ₂ O		
Tekoče gojišče MHB (Muller Hinton Bujon)			
10,5 g	Osnovni medij: Mueller Hinton bujon	Oxoid, CM0405	10,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH ₂ O in avtoklavirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Hranili smo pri 4 °C.
500 ml	dH ₂ O		
Tekoče gojišče BHI (Brain Heart Infusion)			
39 g	Osnovni medij: Brain Heart Infusion	Oxoid, CM225	39 g osnovnega medija smo raztopili v 1 L dH ₂ O. Razdelili smo ga v epruvete (po 4 ml) in avtoklavirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Hranili smo pri 4 °C.
1000 ml	dH ₂ O		
Trdno gojišče Columbia			
19,5 g	Osnovni medij: Columbia Agar Base	Oxoid, CM0331	Osnovni medij smo raztopili v 500 ml dH ₂ O in avtoklavirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Ko se je ohladil na 45 °C, smo mu dodali sterilno kri, raztopino za rast in za selektivnost. Vsebinsko smo dobro premešali in vlili v sterilne petrijeve plošče. Plošče smo hranili do uporabe pri 4 °C.
500 ml	dH ₂ O		
25 ml	Sterilna defibrilirana konjska kri	Oxoid, SR048C	
1 steklenička	Dodatek za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement	Oxoid, SR232E	
1 steklenička	Dodatek za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement	Oxoid, SR069	
Trdno modificirano gojišče AHB (Abeyta-Hunt-Bark agar)			
20 g	Osnovni medij: Bacto TM Heart Infusion Agar	Oxoid, CM 375	20 g osnovnega medija in 1 g kvasnega ekstrakta smo raztopili v 500 ml dH ₂ O ter avtoklavirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar). Medij smo ohladili na 45 °C, mu aseptično dodali raztopino za rast in 5 ml 1 % raztopine TTC. Gojišče smo vlili v petrijeve plošče in ga v temi hranili pri 4 °C.
1 g	Kvasni ekstrakt /Yeast Extract)	Oxoid, CM 19	
500 ml	dH ₂ O		
1	Dodatek za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement	Oxoid, SR232E	
1 %	Pripravljena raztopina TTC	Sigma-Aldrich T8877	

3.1.6 Mikrobiološka gojišča Reagenti

Preglednica 7: Seznam uporabljenih reagentov.

SESTAVINE			PRIPRAVA REAGENTOV
Količina	Sestavina	Proizvajalec	
Fiziološka raztopina s fosfatnim pufrom (Phosphate buffered saline – PBS)			
10 tablet	Fosfatni pufer PBS	Oxoid, BR0014	Osnovna raztopina je v obliki tablet. V 1 L ddH2O smo raztopili 10 tablet in avtoklavirali (115 °C, 10 min, 1,1 bar). Po ohladitvi smo hranili raztopino v hladilniku pri 4 °C.
500 ml	dH2O		

3.1.7 Druge kemikalije in dodatki

- Bakterijski rastni indikator: p-idol-nitro-tetrazolium violet = INT (Sigma, Švica),
- BacTiter-Glo[®] (Promega, Združene države Amerike),
- Absolutni etanol (Merck, Nemčija),
- Destilirana voda (dH₂O).

3.1.8 Laboratorijski pribor in oprema

Laboratorijski pribor za izvedbo eksperimentalnega dela:

- anaerobni lonci (AnaeroJar 2,5l, Ago 25A, Oxoid),
- avtomatske pipete in nastavki za avtomatske pipete: 10 µL, 100 µL, 1000 µL (Gilson, Eppendorf),
- cepilne zanke (Labortechnika Golias),
- epice 1 ml (Eppendorf),
- filtrni papir (Millipore, Isopore membrane filters 0,2 µm, GTBP),
- injekcijske brizgalke: 1 ml, 2 ml, 10 ml (PB Plastik),
- krioepuvertke (Heto),
- laboratorijske steklenice: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran),
- merilni valji: 100 ml, 500 ml, 1000 ml (Plastibrand),
- mikrotitrne plošče (črne) z ravnim dnem (Nunc),
- mikrotitrne plošče (bele) z ravnim dnem (Nunc),
- petrijeve plošče (Labortechnika, Golias),
- plinska bomba z mešanico plina: 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂ (Istragas),
- plinski gorilnik,
- steklovina (Brand).

Laboratorijska oprema za izvedbo eksperimentalnega dela:

- digestorij (TIP 382, Med-lab Rauh),
- hladilnik (Gorenje),
- inkubator (SP190, Kambič),
- mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo),

- programska oprema: Microsoft Office, programski paket Magellan,
- spektrofotometrični čitalec mikrotiterskih plošč (Safine 2, Tecan),
- sterilizator-avtoklav, V= 40 dm³ (tip 250, Sutjeska),
- tehtnici (Sartorius Analytic in Mettler Toledo),
- vrtnično mešalo (Yellowline, IKA),
- zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra),
- zaščitna mikrobiološka komora (SMBC 122AV, Iskra PIO),
- zmrzovalna omara -80°C (Heto Ultra Freeze),
- zmrzovalnik -20°C (LTH).

3.2 METODE DELA

3.2.1 Revitalizacija bakterij

3.2.1.1 Revitalizacija bakterij *Campylobacter*

Posamezni izolati bakterij rodu *Campylobacter* so trajno shranjeni pri -80 °C v krioepurvetkah (kultura je resuspendirana v 0,2 ml glicerola, 0,6 ml BHI in 0,2 ml krvi). Kulturo smo pri sterilnih pogojih s cepilno zanko prenesli na trdno selektivno gojišče Columbia. Petrijeve plošče smo inkubirali v mikroaerofilnih pogojih od 24 ur pri 42 °C oziroma do pojava tipičnih kolonij.



Slika 14: Razmaz do posamezne kolonije bakterij *Campylobacter* na gojišču Columbia.

3.2.1.2 Revitalizacija bakterij *S. aureus*

Bakterije rodu *Staphylococcus* so shranjene pri -20 °C v krioepurvetkah v tekočem gojišču BHI (0,86 ml) z dodatkom glicerola (0,15 ml). Iz krioepurvet smo enkrat tedensko s pomočjo sterilne cepilne zanke nacepili kulturo na gojišče MHA in inkubirali za 24 urah pri temperaturi 37 °C v aerobnih pogojih. Iz inkubiranih plošč smo po 24 urah preverili rast in prisotnost značilnih kolonij (slika 17).



Slika 15: Razmaz do posamezne kolonije bakterij rodu *S. aureus* na gojišču MHA.

3.2.2 Namnoževanje biomase in priprava inokuluma

3.2.2.1 Namnoževanje biomase in priprava inokuluma bakterij *Campylobacter*

Posamezne kolonije iz trdnega gojišča Columbia smo resuspendirali v 4 ml tekočega gojišča MHB z dodatkom 5 % sterilizirane konjske krvi in inkubirali v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C. Po 24 urah smo vsebino epruvete dobro premešali in s pipeto prenesli 0,15 ml namnožene kulture v 10 ml MH bujona, da smo dobili končno koncentracijo celic v gojišču 6–7 log CFU/ml.

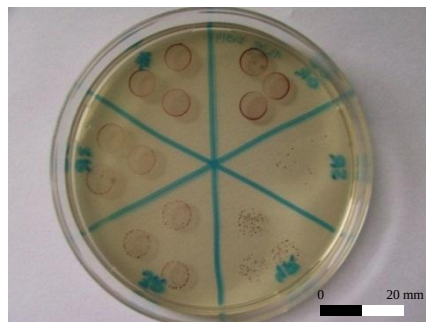
3.2.2.2 Metoda štetja kolonij

Za določitev točne koncentracije celic smo iz epruvete, v kateri je kultura resuspendirana v 10 ml tekočem gojišču MHB, odpipetirali 100 µl in prenesli v mikrocentrifugirko z 900 µl fiziološke raztopine s fosfatnim pufrom. Vsebino smo premešali in razredčevali po Kochu. Iz zadnjih šestih razredčitev (od -2 do -8) smo po trikrat prenesli 10 µl na selektivno gojišče AHB. Ploščo smo predhodno z ravnilom razdelili na 8 delov in označili razredčitve. Po inkubaciji (24 urah, 42 °C, mikroaerofilno) v zatemnjenem prostoru (zaradi dodatka TTC) smo plošče pregledali in prešteli zrasle kolonije ter izračunali koncentracijo bakterij (N) pri posamezni razredčitvi. Upoštevali smo razredčitve, pri kateri je bilo prisotnih od 1 do 25 kolonij ter računali po enačbi št.1 (ISO 4833, 1991).

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2)} \times R \left(\frac{CFU}{mL} \right) \quad \dots(1)$$

Legenda: N: povprečna koncentracija celic (CFU/ml); C: vsota kolonij na vseh ploščah; n₁:število plošč prve razredčitve; n₂: število plošč druge razredčitve; R: razredčitveni faktor prve razredčitve

Kolonije kampilobaktrov se zaradi dodatka 1 % raztopine TTC na gojišču obarvajo rdeče (slika 16).



Slika 16: Nacepitev sevov *Campylobacter* na gojišče AHB (za določitev koncentracije celic v tekočem gojišču MHB).

3.2.2.3 Namnoževanje biomase in priprava inokuluma bakterij *S. aureus*

V sterilno epruveto smo aseptično prenesli 4 ml tekočega gojišča MHB. Iz trdnega gojišča MHA smo prenesli s sterilno cepilno zanko tipično kulturo *Staphylococcus*, preostalo ploščo smo pustili v hladilniku na 4 °C do nadaljnje uporabe. Tekoče gojišče MHB s čisto kulturo smo dobro premešali na vrtničnem mešalu in aerobno inkubirali 24 ur pri 37 °C na stresalniku (100 obr./min). Predvidevali smo, da se je kultura namnožila do koncentracije 10^8 CFU/ml, zato smo za pripravo inokuluma odpipetirali 0,15 ml kulture v 10 ml MHB, da smo dobili delovno koncentracijo celic, ki znaša 10^6 CFU/ml.

Za določitev točne koncentracije bakterij rodu *S. aureus* smo uporabili isto metodo štetja kolonij kot za bakterije rodu *Campylobacter* (enačba 1), pri tem pa smo posamezne razredčitve prenesli na trdno gojišče MHA in inkubirali 24 ur, aerobno na 37 °C.

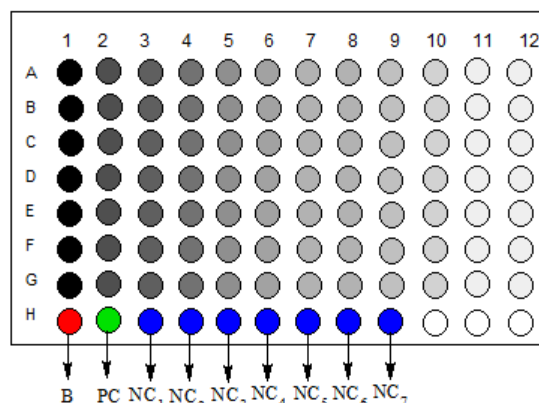
3.2.3 Metode razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči

S to metodo smo ugotavljali, kako različne koncentracije vzorca vplivajo na preiskovano kulturo. V mikrotitrsko ploščo smo dali z avtomatsko pipeto v vse, razen v prvo vrstico, po 50 µl steriliziranega tekočega gojišča MHB. V prvo pa smo odpipetirali 100 µl pripravljenega izvlečka in ga serijsko redčili; iz prve luknjice s pipeto vsebino dobro premešali, vzeli 50 µl premešanega ekstrakta in ga prenesli v naslednjo luknjico v vrstici ali stolpcu (slika 17). Tako smo redčili do zadnje vrstice, iz katere smo prav tako vzeli 50 µl razredčenega ekstrakta in ga zavrgli. Na ta način smo pripravili dvakratne razredčitve rastlinskih izvlečkov.

V vse vdolbinice mikrotitrške plošče s pripravljenimi dvakratnimi razredčitvami smo dodali po 50 µl pripravljenega inokuluma. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s pokrovom in inkubirali 24 ur.

Za pravilno ovrednotenje smo na isti mikrotitrski plošči pripravili tudi kontrole:

- negativna kontrola (B); 100 µl MBH,
- pozitivna kontrola (PC); 50 µl MBH + 50 µl 24-urna kultura,
- negativna kontrola (NC); 50 µl MBH + 50 µl izvlečka.



Slika 17: Shematični prikaz razporeditve vzorcev na mikrotitrski plošči; koncentracija rastlinskih izvlečkov pada od leve proti desni; število NC je odvisno od števila vseh uporabljenih vzorcev na mikrotitrski plošči.

3.2.3.1 Določanje MIK fenolnih izvlečkov pri bakterijah rodu *Campylobacter* z reagentom BacTiter-GloTM

Glede na indikator živosti bakterijskih celic smo preiskusili dve metodi. Testirali smo indikatorja BacTiter-GloTM (merjenje bioluminiscence) in CellTiter-BlueTM (merjenje fluorescence). Naključno smo izbrali pet vzorcev kožic grozdnih jagod in opravili razredčevanje v mikrotitrski plošči v dveh paralelnih poskusih. Obe metodi sta dali enake vrednosti MIK (prilogi A1 in A2), a moramo upoštevati, da lahko pride do napačnih podatkov zaradi avtofluorescence, redukcije soli ter antioksidativne aktivnosti rastlinskih izvlečkov (Klančnik in sod., 2010). Zato smo se odločili, da bomo za podajanje vrednosti MIK naravnih izvlečkov uporabljali metodo z merjenjem bioluminiscence.

Adenozin trifosfat (ATP) je nosilec energije vseh živih celic. Princip hitre in občutljive metode za določanje koncentracije živih celic v gojišču temelji na korelaciji med količino ATP in številom mikroorganizmov v gojišču (Jeršek, 2009). Pri encimski reakciji se luciferin pretvori v oksiluciferin, pri tem pa se kot stranski produkt reakcije sprosti svetloba, katere intenzivnost merimo preko merjenja bioluminiscence (562 nm). Po 24 urni mikroaerofilni inkubaciji smo v vsako testno luknjico dodali 100 µl reagenta BacTiter-GloTM. Nastala luminiscenca je proporcionalna količini ATP, ta pa je proporcionalna številu metabolno aktivnih celic. Ploščico smo pokrili s pokrovom, premešali na stresalniku in inkubirali 5 minut ter izmerili bioluminiscenco s čitalcem mikrotitrskih plošč (splošni integracijski čas 1000 ms) (Tecan). MIK smo določili iz odvisnosti relativne luminiscenčne enote (RLU) od koncentracije rastlinskega izvlečka.

3.2.3.2 Vrednotenje modulatorne vloge izvlečkov

Delovne raztopine modulatorjev smo pripravili glede na predhodno določeno vrednost MIK izvlečkov V40 in ILVT na bakterije rodu *Campylobacter*. Ugotavljali smo modulatorni učinek koncentracij, ki so bile, glede na inhibitorno vrednost MIK, polovične (0,5 MIK) ali četrtinske (0,25 MIK). Uporabili smo metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču MHB. Kot rastni indikator smo uporabili barvilo CellTiter-Glo.

3.2.3.3 Določanje vpliva mutacij *cmeB*

Da bi določili vpliv mutacije *cmeB*, smo primerjali vrednosti MIK referenčnega seva (*C. jejuni* NCTC 11168) z mutantom (*cmeB*), upoštevali smo enačbo št. 2. Uporabili smo metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču MHB. Kot rastni indikator smo uporabili barvilo CellTiter-Glo.

$$U = \frac{MIK_{ref}}{MIK_{mut}} \quad \dots(2)$$

Legenda: U=relativna vrednost; MIK_{ref} =vrednost MIK referenčnega seva; MIK_{mut} =vrednost MIK mutant.

3.2.3.4 Določanje vpliva inhibitorjev

Učinkovitost testiranega inhibitorja smo dokazali s primerjavo MIK z in brez dodatkov inhibitorjev z enačbo št. 3. Uporabili smo metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici v tekočem gojišču MHB. Kot rastni indikator smo uporabili barvilo CellTiter-Glo.

$$U = \frac{MIK_1}{MIK_2} \quad \dots(3)$$

Legenda: U=relativna učinkovitost inhibitorja; MIK_1 =MIK testiranega izolata; MIK_2 =vrednost MIK ob dodatku inhibitorja.

3.2.3.5 Določanje MIK fenolnih za stafilokoke z barvilom INT

Po razredčevanju izvlečkov v mikrotitrski plošči smo kot preiskovano kulturo uporabili bakterije *Staphylococcus* in inkubirali aerobno pri 37 °C. Po 24-urni inkubaciji smo v vse vdolbinice (tudi v vse kontrole) odpipetirali 10 µl bakterijskega rastnega indikatorja INT (s koncentracijo 2 mg/ml), ki sprejema elektrone iz encima dehidroksigenaze in jih reducira v rdeče obarvan formazan INFT. Inkubirali smo še 30 minut v temnem pri 37 °C. Rezultate smo po inkubaciji vizualno odčitali glede na spremembe barve. Prehod v neobarvano luknjico tako pomeni vrednost MIK, minimalno inhibitorno koncentracijo testnega vzorca na testirani sev (Klančnik in sod., 2010). Test je primeren za aerobne bakterije (Klančnik in sod., 2010).

3.2.3.6 Statistična oddelava podatkov

Eksperimentalni del smo ponovili v dveh poskusih. Vse pridobljene rezultate smo uredili v računalniškem programu Microsoft Office Excel 2007 in jim izračunali povprečne vrednosti (Košmelj, 2007). V preglednicah z rezultati so upoštevane izračunane povprečne vrednosti (enačba 4):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots(4)$$

Legenda: $\bar{x}$ =povprečana vrednost; x_i =posamezna meritev; n=število meritev.

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo želeli podati oceno o inhibitorni učinkovitosti pripravljenih rastlinskih fenolnih izvlečkov na antibiotsko odporne in občutljive seve bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*. Ugotavljali smo tudi vpliv membranske izlivne črpalke, ki pripomore k večji odpornosti kampilobaktrov.

Pri ugotavljanju protimikrobnega vpliva izvlečkov smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu (MHB), pri kateri smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo določenega izvlečka – MIK. Vrednost MIK je definirana kot najnižja koncentracija protimikrobne snovi, ki inhibira rast testnega mikroorganizma (Klančnik in sod., 2010). Vsebnost skupnih fenolnih snovi vzorcev je preračunana na galno kislino. Rezultati MIK so izraženi v ekvivalentih galne kisline v mg/ml gojišča.

Podani so rezultati, pridobljeni na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete v Ljubljani, v času od 1. februarja do 1. avgusta 2009.

4.1 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST FENOLNIH IZVLEČKOV, IZRAŽENA KOT MIK

4.1.1 Vpliv izvora in vsebnosti fenolnih snovi

4.1.1.1 Učinkovitost izvlečkov kožic grozdnih jagod pri kampilobakterih

Za določanje protimikrobnega delovanja naravnih fenolnih izvlečkov na kampilobakte smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu (MHB). Kot rastni indikator smo uporabili barvilo BacTiter-GloTM.

Vključili smo štirinajst izvlečkov, sedmih belih in sedmih rdečih sort grozdja, ki smo jih testirali v koncentracijskem območju od 32 do 0,125 %. Protimikrobno delovanje izvlečkov smo testirali na sedmih sevih rodu *Campylobacter*: *C. jejuni* (K49/4, 375-06, 3553), *C. coli* (137, ATCC 33559, 2235, 6553). V preglednici 8 so podane vrednosti MIK glede na MIK (%), v prilogi B pa so preračunane vrednosti MIK na mgGAE/ml.

Izvečki belih kožic so bili protimikrobno učinkovitejši. Povprečna vrednost MIK izvlečkov belih sort znaša 3,1 % oziroma 0,05 mgGAE/ml, vrednost MIK izvlečkov rdečih sort kožic grozdnih jagod pa 5,3 % oziroma 0,21 mgGAE/ml. Najnižjo povprečno vrednosti MIK smo dobili pri izvlečku kožic bele sorte debit (1,8 % oziroma 0,04 mgGAE/ml), najvišjo pa pri rdeči sorti rudežuša (9,4 % oziroma 0,62 mgGEA/ml) (preglednica 8).

Preglednica 8: Vrednosti MIK (%) izvlečkov kožic grozdnih jagod za kampilobakte.

	<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>C. coli</i> 137	<i>C. coli</i> ATCC 33559	<i>C. jejuni</i> 375-06	<i>C. jejuni</i> 3552	<i>C. coli</i> 2235	<i>C. coli</i> 6553-05
Bele sorte							
Kujundžuša	/	3	2	2	4	2	4
Rkaciteli	4	2	2	/	8	8	4
Zlatarica	/	2	3	2	2	2	1
Medan	/	2	4	1	4	4	4
Kuč	/	2	2	2	4	4	2
Maraština	4	3	2	/	8	8	4
Debit	/	3	2	1	1	2	2
Rdeče sorte							
Vranac	4	4	4	/	4	4	2
Trnjak	8	4	2	2	4	4	2
Rudežuša	8	4	4	2	16	16	16
Merlot	8	4	4	/	4	4	2
Babič	/	3	3	8	4	4	4
Lasin	8	2	1	/	4	4	2
Plavina	16	2	4	/	4	16	8

Legenda: /: ni podatkov

4.1.1.2 Učinkovitost izvlečkov zelišč pri kampilobaktrih

Za določanje MIK smo uporabili devet izvlečkov zelišč, ki so bili razredčeni v koncentracijskem območju od 4 do 0,01 %. V preglednici 9 so zbrani rezultati, izraženi v %, v prilogi C pa so podane vrednosti v mgGAE/ml. Povprečna vrednost MIK za kampilobakte je znašala 0,03 mgGAE/ml ali 0,33 %.

Preglednica 9: Vrednosti MIK (%) izvlečkov zelišč za kampilobakte.

	<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>C. coli</i> 137	<i>C. jejuni</i> 11168	<i>C. jejuni</i> 33560	<i>C. coli</i> 33559	<i>C. jejuni</i> 375-06
Črnika	1,00	1,00	0,50	manj kot 0,50	/	1,00
Smilj	0,50	0,50	1,00	manj kot 0,50	manj kot 0,50	1,00
Meta	0,20	0,20	0,06	0,25	/	0,03
Zeleni čaj	1,00	1,00	0,02	2,00	2,00	0,01
Origano	0,06	0,06	0,13	manj kot 0,05	0,13	0,02
Melisa	0,13	0,06	0,06	manj kot 0,05	0,13	0,02
Timijan	0,13	0,06	0,06	0,13	0,25	0,06
Žajbelj	0,06	0,06	0,03	/	0,25	0,06
Gornik	0,06	0,02	0,03	0,03	0,06	0,02

Legenda: /: ni podatkov

4.1.1.3 Učinkovitost izvlečkov kožic grozdnih jagod pri stafilokokih

Za določanje protimikrobnega delovanja naravnih fenolnih izvlečkov pri treh bakterijskih sevih rodu *Staphylococcus* smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu (MHB). Kot rastni indikator smo uporabili barvilo INT. Izvlečki kožic grozdnih jagod so bili razredčeni v koncentracijskem območju od 20 do 2,5 %.

V preglednici 10 so podani rezultati vrednosti MIK kožic grozdnih jagod za seve *S. aureus*, v prilogi D pa so preračunane vrednosti MIK na mgGAE/ml.

Preglednica 10: Vrednosti MIK (%) izvlečkov kožic grozdnih jagod za stafilokoke.

	<i>S. aureus</i> ŽMJ 72	<i>S. aureus</i> ŽMJ 345	<i>S. aureus</i> MRSA 346
Bele sorte			
Kujundžuša	3,13	5	5
Rkaciteli	20	> 20	> 20
Zlatica	7,5	5	5
Medan	20	> 20	> 20
Kuč	20	> 20	20
Maraština	15	> 20	20
Debit	15	10	10
Rdeče sorte			
Vranac	15	5	10
Trnjak	5	2,5	5
Rundenžuša	7,5	5	10
Merlot	10	5	10
Babič	10	5	10
Lasin	>20	>20	>20
Plavina	20	10	20

Najnižje MIK je imel izvleček sorte kujundžuša (4,3 % ali 0,11 mgGAE/ml), najvišjo vrednost pa izvleček sorte vranac (10 % oziroma 0,52 mgGAE/ml). Med testiranimi sevi stafilokokov je bil najbolj odporen sev *S. aureus* MRSA 346, sledil je sev *S. aureus* 72 kot najbolj občutljiv se je izkazal sev *S. aureus* 345. Bele kožice grozdnih jagod so delovale protimikrobno s povprečno vrednostjo MIK 14,3 % (0,22 mgGAE/ml), rdeče kožice pa z vrednostjo MIK 10,7 % (0,36 mgGAE/ml).

4.1.1.4 Učinkovitosti izvlečkov zelišč pri stafilokokih

Na stafilokokih smo testirali osem izvlečkov zelišč. Na izvlečke je bil odpornejši sev *S. aureus* ŽMJ 72 z vrednostjo MIK 4,3 % (0,21 mgGAE/ml). Sev *S. aureus* ŽMJ 345 ima povprečno vrednost MIK 3,7 % (0,14 mgGAE/ml) (preglednica 11, priloga E).

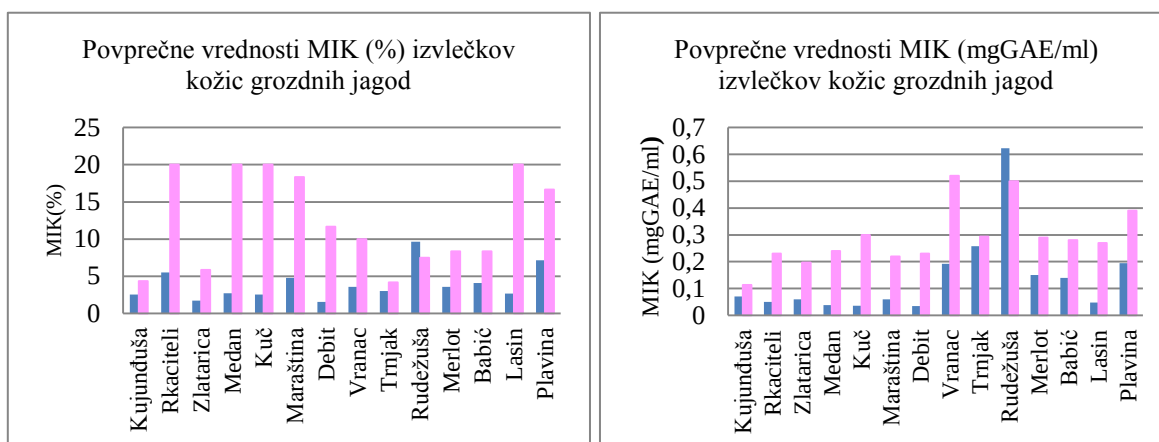
Preglednica 11: Vrednosti MIK (%) izvlečkov zelišč za stafilokoke.

	<i>S. aureus</i> ŽMJ 72	<i>S. aureus</i> ŽMJ 345
Zeleni čaj	2,5	2,5
Smilj	0,3	0,3
Sončnica	0,1	0,1
Žajbelj	1,3	0,3
Gornik	2,5	1,3
Žajbelj v.j.x	2,5	2,5
Žajbelj v.j.	5	2,5
Črnika	10	10

Legenda: v. j.: Vransko jezero (območje, s katerega so bili pobrani vzorci), x: listi žajblja, pobrani in pripravljeni za vzorec v mesecu oktober.

4.1.2 Primerjava učinkovitosti delovanja fenolnih izvlečkov proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam

Zaradi sestave celične stene bakterij veljajo po Gramu negativne bakterije (*Campylobacter*) za odpornejše v primerjavi s po Gramu pozitivnimi bakterijami (*S. aureus*). Povprečne vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod za kampilobakte in stafilokoke so prikazane na sliki 18. Povprečna MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod pri bakterijah rodu *Campylobacter* je znašala 4,2 % (0,15 mgGAE/ml), povprečna vrednost kožic jagod pri testiranih stafilokokih pa 12,2 % (0,34 mgGAE/ml).



Slika 18: Primerjava delovanja fenolnih izvlečkov na kampilobakte in stafilokoke (modra: kampilobaktri; roza: stafilokoki).

4.1.3 Učinkovitost delovanja proti humanim in živilskim sevom ter proti antibiotsko odpornim in občutljivim sevom

Izbrane izvlečke smo testirali na seve različnega izvora. Pri kampilobakterih smo uporabili štiri humane seve, en prašičji izolat, tri piščančje izolate, dva referenčna seva in en mutant (preglednica 4). Med njimi so se kot najbolj odporni izkazali humani sevi, ki so imeli povprečno MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod 3,05 %, sledili so piščančji izolati z 2,75 %, sledila sta referenčna seva. Pri stafilokokih sta imela živilska izolata povprečno MIK 11,8 %, humani sev MRSA pa 13,2 %.

Testirali smo različne seve, občutljive na antibiotike in večkratno odporne seve (preglednica 4). Za ti dve skupini smo izračunali povprečno MIK za testirane izvlečke. Povprečna vrednost MIK za občutljive seve je znašala 4,5 %, pri večkratno odpornih sevih pa 4,1 %. Torej so bili na antibiotike občutljivi in večkratno odporni sevi zelo podobno občutljivi na fenolne izvlečke oziroma so bili le-ti aktivni proti občutljivim in antibiotsko odpornim sevom. Pri stafilokokih je bil sev MRSA odpornejši v primerjavi s sevi, izoliranimi iz živil (preglednica 13).

Preglednica 12: Primerjava učinkovitosti izvlečkov na kampilobaktr različnega izvora.

Izvor bakterijskih sevov <i>Campylobacter</i>	Izvečki kožic grozdnih jagod		Izvečki zelišč	
	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)
piščančji izolati	4,55	0,32	0,12	0,14
humani izolati	4,60	0,23	0,17	0,15
humani izolati-referenčni	/	0,19	/	0,14
živalski iztrebki-referenčni	2,79	0,36	0,08	0,17

Preglednica 13: Primerjava učinkovitosti izvlečkov na stafilokoke različnega izvora.

Izvor bakterijskih sevov <i>S. aureus</i>	Izvečki kožic grozdnih jagod		Izvečki zelišč	
	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)
Živilska izolata	11,80	0,33	4,00	0,17
MRSA	13,20	0,37	/	/

Legenda: /: ni podatkov

4.2 VREDNOTENJE POTENCIALNE MODULATORNE VLOGE FENOLNIH IZVLEČKOV

Za ugotavljanje aktivnosti EPI pri bakterijah *C. jejuni* smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu z določanjem vrednosti MIK na osnovi merjenja bioluminescence (indikator živosti je BacTiter-Glo™).

Z uporabo EPI lahko posredno pokažemo vlogo, ki jo opravljajo membranske izlivne črpalke pri odpornosti bakterijskih sevov. Zato smo najprej raziskali bakterijsko odpornost na antibiotika eritromicin in ciprofloksacin ter na etidijev bromid. Njihove vrednosti MIK so podane v preglednici 14. Bakterijski izolati so bili izbrani kot občutljivi ali odporni na antibiotik eritromicin. Uporabili smo pet sevov in mutanta *cmeB*, ker smo poskušali pojasniti tudi mehanizem odpornosti proti antibiotikom in fenolnim izvlečkom preko primerjave spremembe občutljivosti referenčnega seva in mutanta. Vsem izolatam smo v nadaljevanju izračunali tudi relativno učinkovitost kemijskih in potencialnih rastlinskih inhibitorjev (U) na zmanjšanje odpornosti proti antibiotikoma eritromicinu in ciprofloksacinu ter proti etidijevemu bromidu.

Preglednica 14: Vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) za eritromicin, ciprofloksacin in etidijev bromid za kampilobakte.

Bakterijski sevi			MIK
Sev	Izvor	Občutljivost na eritromicin	Eritromicin
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Divji tip	Občutljiv	0,5
<i>cmeB</i>	Mutant	Občutljiv	0,063
<i>C. jejuni</i> 375-06	Humani	Visoko odporen	256
<i>C. jejuni</i> K49/4	Piščanec	Občutljiv	0,5
<i>C. coli</i> FC 8	Perutnina	Srednje odporen	64
<i>C. coli</i> VC 7114	Svinjina	Srednje odporen	64
			Ciprofloksacin
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Divji tip	Občutljiv	0,25
<i>cmeB</i>	Mutant	Občutljiv	0,25
<i>C. jejuni</i> 375-06	Humani	Visoko odporen	128
<i>C. jejuni</i> K49/4	Piščanec	Občutljiv	0,5
<i>C. coli</i> FC 8	Perutnina	Srednje odporen	16
<i>C. coli</i> VC 7114	Svinjina	Srednje odporen	16
			Etidijev bromid
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Divji tip	Občutljiv	2
<i>cmeB</i>	Mutant	Občutljiv	0,25
<i>C. jejuni</i> 375-06	Humani	Visoko odporen	256
<i>C. jejuni</i> K49/4	Piščanec	Občutljiv	4
<i>C. coli</i> FC 8	Perutnina	Srednje odporen	4
<i>C. coli</i> VC 7114	Svinjina	Srednje odporen	4

4.2.1 Testiranje seva z mutacijo *cmeB*

Pojasniti smo želeli mehanizem odpornosti proti antibiotikom in fenolnim snovem rastlinskih izvlečkov s primerjavo referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (divji tip) ter mutanta *cmeB*. Mutacije vodijo v razvoj sevov z novimi lastnostmi. Izlivna črpalka CmeABC igra pomembno vlogo pri povečanju odpornosti seva, saj s svojim aktivnim delovanjem pomaga pri izčrpavanju nezaželenih in za bakterijo škodljivih snovi. Okvare na genskem materialu, na katerem je zapis za pravilno delovanje črpalke, lahko resno ogrozijo bakterijo s povečanjem občutljivosti na zanjo škodljive snovi. Primer tovrstne mutacije je tudi sev *cmeB*.

4.2.1.1 Testiranje seva z izvlečki kožic grozdnih jagod

V preglednici 15 so podane vrednosti MIK izvlečkov za sev *C. jejuni* NCTC 11168 in *cmeB*. Testirali smo razliko v odpornosti na desetih različnih izvlečkih kožic grozdnih jagod. Izvlečki so bili razredčeni v koncentracijskem območju od 16 do 0,0078 %.

Preglednica 15: Vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod za seve *C. jejuni* NCTC 11168 in *cmeB*.

	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168		<i>cmeB</i>		U
	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)	MIK (%)	MIK (mgGAE/ml)	
Kujundežuša	4	0,102	0,063	0,002	64
Rkaciteli	4	0,047	0,063	0,000	64
Medna	0,5	0,006	0,063	0,000	8
Debit	0,5	0,010	0,063	0,000	8
Vranac	0,5	0,026	0,063	0,000	8
Trnjak	2	0,140	2	0,140	1
Rundenžuša	2	0,133	0,063	0,002	32
Merlot	2	0,070	0,063	0,001	32
Babič	8	0,267	4	0,133	2
Lasin	2	0,027	0,063	0,000	32

Legenda: U: relativni učinek mutacije.

Vrednosti MIK so bile pri mutantu *cmeB* do 64-krat nižje kot pri sevu brez mutacije (v povprečju za 25-krat). Izjemi sta izvlečka kožic grozdnih jagod trnjak in babič, pri katerih ni opazne bistveno večje občutljivosti seva z mutacijo.

4.2.1.2 Testiranje seva z izvlečki zelišč

V preglednici 16 so vrednosti MIK izvlečkov zelišč za seva *C. jejuni* NCTC 11168 in *cmeB*. Testirali smo njuno razliko v odpornosti na osmih različnih vzorcih zelišč. Izvlečki so bili razredčeni v koncentracijskem območju od 4 do 0,0039 %.

Preglednica 16: Vrednosti MIK izvlečkov zelišč za seve *C. jejuni* NCTC 11168 in *cmeB*.

	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168		<i>cmeB</i>		U
	MIK (%)	MIK (mgGAE/ ml)	MIK (%)	MIK (mgGAE/ ml)	
Črnika	0,50	0,195	0,062	0,024	8
Meta	0,06	0,022	0,001	0,003	64
Zeleni čaj	0,02	0,002	0,001	0,000	16
Origano	0,13	0,339	0,002	0,000	64
Melisa	0,06	0,184	0,001	0,000	64
Timijan	0,06	0,112	0,001	0,000	64
Žajbelj	0,03	0,039	0,001	0,000	32
Gornik	0,03	0,004	0,002	0,000	16

Legenda: U: relativna učinkovitost mutacije.

Vrednosti MIK zelišč so bile pri sevu *cmeB* od 8- do 64-krat nižje (v povprečju za 37-krat) kot pri sevu brez mutacije.

4.2.2 Učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk

4.2.2.1 Učinek kemijskih inhibitorjev PAβN in NMP

Ugotavljali smo aktivnost dveh kemijskih EPI, PAβN in NMP, na antibiotsko odpornost bakterij *C. jejuni*. Z dobljenimi rezultati smo primerjali vrednosti MIK eritromicina,

ciprofloksacina in etidijevega bromide z in brez dodatka PAβN (20μg/ml) ali NMP (100 μg/ml). Rezultati so podani v preglednici 17.

Inhibitorja PAβN in NMP sta bila najbolj učinkovita v smislu povečanja občutljivosti testiranih sevov proti eritromicinu, saj so bile vrednosti MIK ob dodatku PAβN in NMP zmanjšane za od 4- do 32-krat. PAβN in NMP sta bila manj učinkovita pri povečanju občutljivosti proti ciprofloksacinu in etidijevemu bromide, kjer so bile vrednosti MIK zmanjšane za več kot 4-krat večinoma le pri enem od petih testiranih sevov. Vpliv inhibitorjev je bil viden tudi pri spremembi odpornosti mutant *cmeB*, kateremu se je od dodatku PAβN in NMP povečala občutljivost na eritromicin in ciprofloksacin v območju od 4- do 16-krat.

Preglednica 17: Vrednosti MIK (μg/ml) antibiotikov v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN (20μg/ml) ali NMP (100 μg/ml).

Bakterijski sevi	MIK	Antibiotiki + inhibitorji			
		Eri + NMP		Eri + PAβN	
	Eritromicin	MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,50	0,03	16	0,03	16
<i>cmeB</i>	0,06	0,016	4	0,016	4
<i>C. jejuni</i> 375	256	32	8	16	16
<i>C. jejuni</i> K49/4	0,50	0,13	4	0,03	16
<i>C. coli</i> FC8	4	0,5	8	0,13	32
<i>C. coli</i> VC7114	1	0,03	32	0,06	16
	Ciprofloksacin	Cipro + NMP		Cipro + PAβN	
		MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,25	0,25	1	0,13	2
<i>cmeB</i>	0,25	0,02	16	0,02	16
<i>C. jejuni</i> 375	128	8	16	16	8
<i>C. jejuni</i> K49/4	0,50	0,50	1	0,50	1
<i>C. coli</i> FC8	16	8	2	8	2
<i>C. coli</i> VC7114	0,063	0,03	2	0,03	2
	Etidijev bromid	EtBr + NMP		EtBr + PAβN	
		MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	8	4	2	4	2
<i>cmeB</i>	0,25	0,13	2	/	/
<i>C. jejuni</i> 375	256	/	/	/	/
<i>C. jejuni</i> K49/4	4	8	0,5	8	0,5
<i>C. coli</i> FC8	4	1	4	2	2
<i>C. coli</i> VC7114	4	0,13	32	2	2

Legenda: /: ni podatkov; Eri: eritromicin; Cipro: ciprofloksacin; EtBr: etidijev bromid; NMP: 1-(1-naftilmetil)-piperazin; PAβN: fenilalanilarginin-β-naftilamida (PAβN); U: relativna učinkovitost inhibitorjev.

4.2.2.2 Učinek potencialnih naravnih inhibitorjev

Želeli smo preveriti tudi potencialni inhibitorni učinek fenolnih izvlečkov na izlivne črpalke. Vpliv potencialnih inhibitorjev izvlečkov ILVT (izvleček lista vinske trte) ter V40 (fenolni izvleček rožmarina) prikazuje preglednica 18. Potencialna inhibitorja smo dodali v subinhibitornih koncentracijah 0,5 ali 0,25 vrednosti MIK za vsak sev.

Preglednica 18: Vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) antibiotikov na izbrane seve z in brez dodatka izvlečkov ILVT in V40 kot inhibitorjev.

Bakterijski sevi	Antibiotik	Antibiotiki + izvleček							
		+ V40 (0,5 MIK)		+ V40 (0,25 MIK)		+ ILVT (0,5 MIK)		+ ILVT (0,25 MIK)	
	Eritromicin	MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,5	0,063	8	2	0,25	1	0,5	1	0,5
<i>C. jejuni</i> 375	256	64	4	128	2	128	2	128	2
<i>C. jejuni</i> K49/4	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	1
<i>C. coli</i> FC8	128	128	1	128	1	128	1	128	1
<i>C. coli</i> VC7114	64	32	2	32	2	64	1	64	1
	Ciprofloksacin	+ V40 (0,5 MIK)		+ V40 (0,25 MIK)		+ ILVT (0,5 MIK)		+ ILVT (0,25 MIK)	
		MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	2	0,5	4	0,5	4	0,25	4	0,25	4
<i>C. jejuni</i> 375	128	16	8	16	8	16	8	16	8
<i>C. jejuni</i> K49/4	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1	0,5
<i>C. coli</i> FC8	16	8	2	16	1	16	1	16	1
<i>C. coli</i> VC7114	16	16	1	16	1	16	1	16	1
	Etidijev bromid	+ V40 (0,5 MIK)		+ V40 (0,25 MIK)		+ ILVT (0,5 MIK)		+ ILVT (0,25 MIK)	
		MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	2	0,5	4	0,5	4	0,5	4	1	2
<i>C. jejuni</i> 375	256	512	0,5	512	0,5	256	1	256	1
<i>C. jejuni</i> K49/4	0,125	0,125	1	0,125	1	0,125	1	0,125	1
<i>C. coli</i> FC8	256	256	1	256	1	256	1	256	1
<i>C. coli</i> VC7114	256	256	1	256	1	256	1	256	1

Legenda: /: ni podatkov; Eri: eritromicin; Cipro: ciprofloksacin; EtBr: etidijev bromid; NMP: 1-(1-naftilmetil)-piperazin; PA β N: fenilalanilarginin- β -naftilamida (PA β N); U: relativna učinkovitost inhibitorjev.

Spremembe vrednosti MIK po dodatku potencialnih inhibitorjev V40 in ILVT niso bile izrazite in vidne pri vseh sevih. Potencialna inhibitorja sta bila učinkovita v smislu povečanja občutljivosti referenčnega seva *C. jejuni* ter izolata *C. jejuni* 375 proti eritromicinu in ciprofloksacinu za od 4- do 8-krat ter proti etidijevemu bromidu le pri referenčnem sevu za 4-krat.

Na protimikrobno delovanje eritromicina, ciprofloksacina in etidijevega bromida proti mutantu *cmeB* nismo zaznali modulatornega učinka potencialnih inhibitorjev V40 in ILVT,

saj se vrednosti MIK od dodatku V40 in ILVT niso spremenile. Bistvenih razlik v modulatornem učinku med obema subinhibitornima koncentracijama testiranih izvlečkov pri različnih sevih nismo opazili.

Napravili smo tudi test, s katerim smo želeli preveriti, ali imajo naravni izvlečki sinergistično inhibitorno delovanje na izbrane izolate. Uporabili smo izvlečka ILVT in V40 ter preverili njun vpliv na bakterije rodu *Campylobacter*. Rezultati so zbrani v preglednici 19.

Preglednica 19: Rezultati testiranja sinergističnega delovanja fenolnih izvlečkov.

Bakterijski sev	ILVT MIK (%)	ILVT + V40 (0,5 MIK)	
		MIK (%)	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	2	2	1
<i>C. coli</i> VC7114	1	/	/
<i>C. jejuni</i> 375	1	1	1
<i>C. coli</i> FC8	16	8	2
	V40 MIK (%)	V40 + ILVT (0,5 MIK)	
		MIK (%)	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	2	1	2
<i>C. coli</i> VC7114	3	3	1
<i>C. jejuni</i> 375	1	0,5	2
<i>C. coli</i> FC8	3	3	1

Legenda: /:ni podatkov; U: relativna učinkovitost inhibitorjev; V40: Vivox 40

4.2.3 Kombiniran vpliv mutacije v genu *cmeB* in inhibitorjev

4.2.3.1 Testiranje seva *cmeB* z antibiotiki z in brez inhibitorjev

V preglednici 20 so podani rezultati vrednosti MIK na antibiotike z in brez dodatka znanih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (PAβN, NMP). Opazili smo, da so se vse vrednosti pri sevu z mutacijo na genu *cmeB* vedno znižale. Dodatek znanih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk je prav tako vplival na občutljivost seva *C. jejuni* NCTC 11168, če smo uporabili antibiotik eritromicin ali ciprofloksacin, pri antibiotiku etidijev bromid pa so se vrednosti z uporabo inhibitorjev celo povišale.

Preglednica 20: Vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) antibiotikov in znanih inhibitorjev v primerjavi z *cmeB* in *C. jejuni* NCTC 11168.

Bakterijski sevi	Antibiotik	Antibiotiki + inhibitorji			
		+ NMP		+ PA β N	
		MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Eritromicin	0,03	16	0,03	16
<i>cmeB</i>	0,063	0,016	4	0,016	4
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Ciprofloksacin	+ NMP		+ PA β N	
		MIK	U	MIK	U
		0,25	1	0,125	2
<i>cmeB</i>	0,25	0,016	16	0,016	16
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Etidijev bromid	+ NMP		+ PA β N	
		MIK	U	MIK	U
		4	0,5	4	0,5
<i>cmeB</i>	0,25	0,125	2	/	/

Legenda: /: ni podatkov; Eri: eritromicin; Cipro: ciprofloksacin; EtBr: etidijev bromid; NMP: 1-(1-naftilmetil)-piperazin; PA β N: fenilalanilarginin- β -naftilamida (PA β N).

4.2.3.2 Testiranje seva z mutacijo *cmeB* z antibiotiki in izvlečki kot inhibitorji

Kot potencialni vir inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk smo uporabili dva izvlečka; V40 in ILVT. Oba smo pripravili v subinhibitornih koncentracijah; z 0,5MIK in 0,25 MIK. Rezultati so podani v preglednici 21.

Preglednica 21: Vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) antibiotikov in izvlečkov kot inhibitorji v primerjavi z *cmeB* in *C. jejuni* NCTC 11168.

Bakterijski sevi	Antibiotik	Antibiotiki + izvlečki							
		+ V40 (0,5MIK)		+ V40 (0,25MIK)		+ ILVT (0,5MIK)		+ ILVT (0,25MIK)	
		MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,5	1	0,5	2	0,25	1	0,5	1	0,5
<i>cmeB</i>	0,063	0,0313	2	0,0313	2	0,625	1	0,0625	1
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Ciprofloksacin	+ V40 (0,5MIK)		+ V40 (0,25MIK)		+ ILVT (0,5MIK)		+ ILVT (0,25MIK)	
		MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
		0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
<i>cmeB</i>	0,25	0,125	2	0,125	2	0,25	1	0,25	1
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Etidijev bromid	+ V40 (0,5MIK)		+ V40 (0,25MIK)		+ ILVT (0,5MIK)		+ ILVT (0,25MIK)	
		MIK	U	MIK	U	MIK	U	MIK	U
		2	4	0,5	4	0,5	4	1	2
<i>cmeB</i>	0,5	0,5	1	0,25	2	0,5	1	0,5	1

Legenda: Eri: eritromicin; Cipro: ciprofloksacin; EtBr: etidijev bromid; V40: Vivox 40

Z eksperimentom smo dokazali, da se sevu *cmeB* zmanjša vrednost MIK v kombinaciji antibiotika (eritromicin, ciprofloksacin) in naravnega izvlečka (V40, ILVT) kot sevu brez mutacije. Pri etidijevem bromidu je opazna večja vrednost relativne učinkovitosti inhibitorja (U) kot pri sevu brez mutacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Pred izvajanjem eksperimentalnega dela diplomske naloge smo si postavili delovne hipoteze, katere smo želeli potrditi s poizkusi. Preverjali smo protimikrobno delovanje izbranih rastlinskih fenolnih izvlečkov, z določanjem vrednosti MIK, za patogene bakterije rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*. Predpostavljali smo, da je protimikrobno delovanje izvlečkov odvisno od izvora in vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Rastlinski fenolni izvlečki naj bi imeli boljši protimikroben učinek na stafilokoke kot na kampilobakte, uspešno naj bi inhibirali tudi seve, večkratno odporne proti antibiotikom. V nadaljevanju smo poskušali ovrednotiti mehanizem odpornosti pri bakterijah *C. jejuni*. Z dodatom znanih in potencialnih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk ter z uporabo seva z mutacijo na genu *cmeB* smo želeli povišati občutljivost kampilobaktrov.

5.1 RAZPRAVA

Velika uporaba antibiotikov je prispevala k povišani odpornosti nekaterih bakterijskih sevov proti posameznim ali več vrstam antibiotikov. To je sprožilo vse večje zanimanje za iskanje protimikrobnih snovi rastlinskega izvora, saj imajo rastlinski fenolni izvlečki lahko protimikrobno aktivnost tudi na patogene bakterije. V diplomski nalogi smo zato skušali preveriti protimikrobno in modulatorno delovanje izbranih naravnih izvlečkov na po Gramu pozitivne in na po Gramu negativne bakterije. Bakterije so različno odporne na delovanje protimikrobnih snovi, zato smo vključili v testiranje humane in živalske seve ter večkratno odporne in občutljive seve proti antibiotikom.

K odpornosti bakterij *C. jejuni* proti različnim antibiotikom v znatni meri prispeva delovanje membranskih izlivnih črpalk (Zhang in Jeon, 2009). Kako velik pomen imajo membranske izlivne črpalke pri odpornosti proti naravnim rastlinskim izvlečkom, smo skušali prikazati preko dodatka dveh znanih in dveh potencialnih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk ter s primerjavo sevov z mutacijo v genu *cmeB*, ki je ključen za delovanje izlivne črpalke CmeABC.

5.1.1 Protimikrobno delovanje fenolnih izvlečkov kožic grozdnih jagod in izbranih zelišč

Veliko je raziskav o zdravih učinkih fenolnih komponent iz grozdja in vin, predvsem rdečih sort (Vrhovšek, 2001; Gaňan in sod., 2008) ter semen in listov vinske trte (Katalinić in sod., 2011). Tudi številna zelišča imajo potrjeno protibakterijsko delovanje (Burt, 2004; Gibbons in sod., 2008). Veliko komponent so že identificirali in okarakterizirali, še precej pa jih ostaja neraziskanih. Fenolne spojine so potencialno učinkovite tudi zaradi svojega hidrofobnega značaja, ki pripomore k večji interakciji z lipidi bakterijske celične membrane (Burt, 2004). V diplomski nalogi smo izvlečke, ekstrahirane iz štirinajstih belih in rdečih sort grozdja ter enajstih izbranih zelišč, testirali na po Gramu pozitivne bakterije *S. aureus* in na po Gramu negativne bakterije *C. jejuni* ter *C. coli*.

Izvlečki kožic in zelišč so pokazali protimikrobni vpliv na vse testirane patogene bakterije. Tako smo potrdili našo hipotezo, da so izvlečki naravni vir komponent s protimikrobnim delovanjem, ki jo omenjajo v številni literaturi (Burt, 2004; Gibbons, 2008; Piskernik in sod., 2011).

5.1.1.1 Učinkovitost glede na vsebnost fenolnih spojin in izvor izvlečkov

Glede na znano vsebnost skupnih fenolnih snovi kožic grozdnih jagod, smo izračunali povprečno vrednost sedmih rdečih sort, ki znaša 4,2 mgGAE/ml, in povprečje sedmih belih sort, ki znaša 1,9 mgGAE/ml. Znano je, da imajo rdeče sorte grozdja višjo vsebnost fenolnih komponent kot bele sorte (Vrhovšek, 2001; Gaňan in sod., 2008). Na podlagi teh znanih študij smo pričakovali, da imajo izvlečki rdečih sort boljše protimikrobno delovanje. Rezultati, ki smo jih pridobili pri eksperimentalnem delu, sicer nakazujejo večjo protimikrobno učinkovitost izvlečkov belih sort. Povprečna vrednost MIK izvlečkov belih sort je znašala pri kampilobaktrih 3,1 % (0,05 mgGAE/ml), vrednost MIK izvlečkov rdečih sort kožic grozdnih jagod pa 5,3 % (0,21 mgGAE/ml). Primerljive rezultate smo dobili tudi pri stafilokokih, kjer je bila povprečna vrednost izvlečkov kožic belih sort MIK 14,3 % (0,22 mgGAE/ml), rdeče sorte kožic pa so delovale protimikrobno pri 10,7 % (0,36 mgGAE/ml). Ker na vsebnost fenolnih snovi vpliva več dejavnikov (sorte, geografsko poreklo, sezona žetve, izbira eksteakcijskih metod, itd.) (Cowan, 1999) lahko sklepamo, da so ti dejavniki ključni pri aktivnosti fenolnih komponent s protimikrobnim delovanjem.

Občutljivost bakterij na fenolne izvlečke je odvisna tudi od sestave fenolnih komponent v izvlečku (Klančnik in sod., 2009c). Opazimo, da vsebnost fenolnih spojin ni nujno odvisna od barve kožic grozdnih jagod temveč predvsem od sortnih razlik. V preglednici 2 je razvidno, da imajo posamezne bele sorte večjo količino skupnih fenolnih spojin, na primer zlatarica (3,36 mgGAE/ml), kot nekateri izvlečki rdečih sort, na primer lasin (1,34 mgGAE/ml). Razlike v vsebnosti fenolnih spojin so se pokazale tudi v MIK (%), saj so izvlečki zlatarice delovali na kampilobakte in stafilokoke z nižjo MIK kot na primer lasin.

Vsak dodatek živilu lahko vpliva na njegovo senzorično lastnost (okus, vonj, barva) (Burt, 2004). Z morebitno uporabo izvlečkov belih kožic grozdja se pojavi prednost v primerjavi z rdečimi kožicami tudi v manj intenzivnejši barvi, ki jo le-te imajo. Kožice belih sort grozdja so tudi cenovno ugodnejše od kožic rdečih grozdnih jagod, saj se slednje uporabljajo za maceracijo v pridelavi vina (Katalinić in sod., 2011). Tropine belih sort grozdja ohranjajo vsebujoče fenole po stiskanju, ker niso podvržene dolgotrajni maceraciji. Njihova dobra učinkovitost, ki jo izrazimo kot MIK (v mgGAE/ml), kaže, da izvlečki belih sort vsebujejo drugačne, protimikrobno bolj učinkovite fenole, predvsem iz skupine flavonolov (Trošt in sod., 2011).

Izvlečki zelišč imajo v primerjavi z izvlečki kožic grozdnih jagod večji razpon tako v vsebnosti skupnih fenolnih spojin kot tudi v vrednosti MIK. V povprečju smo pri izvlečkih zelišč dobili nižje vrednosti MIK kot pri izvlečkih kožic, kar nakazuje na njihovo učinkovitejšo inhibitorno delovanje. Povprečna vrednost MIK zelišč pri kampilobaktrih je znašala 0,33 % (0,04 mgGAE/ml), pri stafilokokih pa 3,97 % (0,17 mgGAE/ml).

5.1.1.2 Učinkovitost delovanja glede na rod bakterij

Bakterija je podvržena različnim dejavnikom okolja, ki lahko ogrozijo obstoj celice. Zgradba celice lahko znatno pripomore k povišanju odpornosti. Prav zaradi zgradbe celične stene so po Gramu negativne bakterije na kemijske strese bolj odporni mikroorganizmi v primerjavi s po Gramu pozitivnimi bakterijami. Te so znatno bolj dovzetne za prehajanje protimikrobnih snovi (Garénaux in sod., 2008; Dykes in sod., 2003). Vzrok za oteženo prehajanje protimikrobnih snovi v po Gramu negativno bakterijo je zunanja membrana, ki celici daje dodaten zaščitni sloj pri prehajanju spojin preko lipopolisaharidnega ovoja (Garénaux in sod., 2008).

V nasprotju z literaturo (Burt, 2004; Garénaux in sod., 2008 Klančnik in sod., 2009c) naši rezultati nakazujejo, da so po Gramu negativne bakterije (*Campylobacter*) manj odporne na rastlinske izvlečke v primerjavi s po Gramu pozitivnimi bakterijami (*Staphylococcus*). Vzrok je v značilnosti bakterij rodu *Campylobacter*, ki so netipični predstavnik po Gramu negativnih bakterij, saj so netipične v svojih ekoloških značilnostih in so občutljive na različne okoljske razmere. Njihova večja občutljivost je bila potrjena tudi proti naravnim protimikrobnim snovem, kot so izvlečki grozdnih pečk (Baydar in sod., 2003), izvlečki rožmarina (Klančnik in sod., 2010), žajblja (Krznar, 2010) ter propolisa (Mavri in sod., 2012).

5.1.1.3 Učinkovitost delovanja fenolnih izvlečkov glede na izvor bakterij ter občutljivost/večratno odpornost sevov proti antibiotikom

Skušali smo preveriti ali imajo fenolni izvlečki primerljivo inhibitorno delovanje na bakterijske seve različnega izvora. Pri kampilobaktirih smo pri testiranju uporabili dva seva izolirana iz piščančjega mesa, dva iz živalskih iztrebkov, tri humane izolate in referenčne tipske seve. Pri stafilokokih smo testirali seva izolirana iz živil ter human izolat. Fenolni izvlečki so imeli protimikroben učinek na vse testirane seve, ne glede na izvor bakterij.

V testiranje so bili vključeni trije sevi vrste *C. jejuni* in štirje sevi vrste *C. coli*. Glede na literaturo veljajo bakterije vrste *C. coli* za odpornejše proti antibiotikom (Tambur in sod., 2010). Z našimi rezultati tega nismo potrdili, kar lahko pripišemo majhnemu številu testiranih sevov.

Testirane seve kampilobaktrov smo razdelili na občutljive, srednje odporne in večkratno odporne izolate glede na objavljene podatke o odpornosti proti antibiotiku eritromicin (preglednica 4). Na podlagi teh podatkov smo postavili hipotezo, da bodo visoko odporni sevi pokazali tudi večjo odpornost na testirane fenolne izvlečke, vendar tega naši rezultati niso dokazali. Torej ne moremo trditi, da bi bili sevi, odporni na eritromicin, enako odporni na vse protimikrobne snovi, vendar je glede na majhno število testiranih sevov težko postaviti jasne zaključke. V splošnem velja, da fenolne spojine lahko pripomorejo k večji občutljivosti bakterijskih sevov proti različnim antibiotikom (Palanippa in Holley, 2010), tudi proti večkratno odpornim proti antibiotikom.

5.1.2 Mehanizmi odpornosti bakterij rodu *Campylobacter*

Poleg vse pogostejše kontaminacije živil in vode predstavlja velik problem tudi razširjenost odpornosti po Gramu negativnih bakterij na različne protimikrobne snovi. Za pojav odpornosti so odgovorne mutacije v tarčnih genih in aktivnost izlivnih črpalk. Glavni mehanizem bakterijske odpornosti je delovanje izlivnih membranskih črpalk (Pages in sod., 2010; Lin in sod., 2010; Mavri in Smole Možina, 2012). Z uporabo inhibitorja PAβN so potrdili vpliv izlivne črpalke CmeABC v naravni in pridobljeni odpornosti kampilobaktrov na antibiotik eritromicin (Kurinčič in sod., 2009).

5.1.2.1 Uporaba seva z mutacijo *cmeB*

Eden od mehanizmov odpornosti kampilobaktrov na antibiotike so tarčne modifikacije (Jeon in sod., 2011). Vpliv mutacije smo dokazovali s primerjavo referenčnega seva NCTC 11168 in njegovega mutanta *C. jejuni* NCTC 11168 *cmeB*. Mutacija na genu, ki nosi zapis za delovanje membranske izlivne črpalke, povzroči njeno nepravilno delovanje. S tem se poviša občutljivost seva, saj izlivna črpalka ne prispeva k izčrpavanju za celico nevarnih snovi iz celice. Sodelovanje membranske črpalke pri povišanju odpornosti seva so potrdili s številnimi študijami (Lin in sod., 2002; Gibbons in sod., 2008).

Vrednosti MIK pri uporabi desetih izvlečkov kožic grozdnih jagod vinske trte in devetih zelišč je bila za od 8-krat do 64-krat nižja pri mutantu kot pri referenčnem sevu NCTC 11168 (preglednici 15 in 16). Rezultati kažejo, da mutacija v genu *cmeB* znatno poviša občutljivost seva. S tem smo potrdili vpletenost izlivne črpalke CmeABC pri zagotavljanju odpornosti proti testiranim naravnim fenolnim spojinam.

5.1.2.2 Uporaba inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk

Pri kampilobaktrih sta bila opredeljena vsaj dva izlivna transporterja, CmeABC in CmeDEF, ki pripomoreta k povečani odpornosti (Jeon in sod., 2011). Pri sevu *C. jejuni* je najpomembnejša črpalka CmeABC, za katero je znano, da zagotavlja odpornost proti antibiotikom, biocidom in tudi fenolnim komponentam tako, da zmanjša njihovo znotrajcelično koncentracijo (Pages in sod., 2010; Mavri in Smole Možina, 2012). Študije izlivnih črpalk ter inhibicije njihovega delovanja z inhibitorji so v medicini zelo pomembne. Identificiranih je bilo že ogromno snovi, ki naj bi bile zmožne povrniti prvotno funkcijo antibiotikom (Piddock in sod., 2010; Jeon in sod., 2011). PAβN in NMP inhibirata delovanje izlivnih transporterjev iz družine RND, kamor spada tudi črpalka CmeABC.

Na podlagi teh dejstev smo predpostavili, da bosta inhibitorja NMP in PAβN zmanjšala delovanje izlivnih črpalk pri *C. jejuni* NCTC 11168 in tako povečala njegovo občutljivost proti antibiotikom in izbranim izvlečkom. Dodatek inhibitorjev je povzročil v povprečju povišano občutljivost na antibiotik eritromicin za 16-krat, na antibiotik ciprofloksacin za 5-krat in na etidijev bromid na 2-krat, s čimer smo dokazali vlogo efluksa pri odpornosti bakterij na testirane protimikrobne učinkovine. Pokazal se je manjši učinek inhibitorja PAβN na občutljivost za ciprofloksacin kot za eritromicin, kar poroča v svojih študijah tudi Kurinčič s sodelavci (2009). Inhibitorja sta uspešno inhibirala tudi delovanje obeh

dokazanih izlivnih sistemov pri *C. jejuni*, črpalk CmeABC in CmeDEF, saj sta povečala občutljivost mutiranega seva *cmeB* proti eritromicinu in ciprofloksacinu.

Če upoštevamo razdelitev sevov glede na občutljive in visoko odporne izolate proti antibiotikom (preglednica 4), opazimo, da je prisotnost inhibitorjev vplivala na povišanje občutljivosti vseh testiranih sevov.

Iskanje netoksičnih inhibitorjev izlivnih črpalk se je preneslo na iskanje novih, naravnih substratov, ki so lahko tudi produkt sekundarnega metabolizma rastlin (Pages in sod., 2009). Zato smo v diplomski nalogi testirali tudi modulatorno delovanje dveh potencialnih inhibitorjev naravnega izvora: izvleček vinske trte (ILVT) in rožmarina (V40). Ugotavljali smo, v kakšni meri dodatek subinhibitornih koncentracij izvlečkov ILVT in V40 kot modulatorjev protimikrobnega delovanja vpliva na zmanjšanje odpornosti testiranih sevov proti eritromicinu, ciprofloksacinu in etidijevem bromidu.

V primerjavi z inhibitorjema PAβN in NMP je bila učinkovitost V40 in ILVT večinoma manjša. Torej izvlečka V40 in ILVT v testiranih subinhibitornih koncentracijah nista uporabna kot modulatorja, ki bi znižala stopnjo odpornosti kampilobaktrov proti različnim protimikrobnim snovem, saj je bila učinkovitost prešibka.

Preizkusili smo tudi sinergistično delovanje izvlečkov V40 in ILVT na testirane izolate, vendar le v eni izbrani kombinaciji koncentracij (preglednica 19), pri kateri sinergističnega delovanja med testnimi izvlečki nismo potrdili.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov eksperimentalnega dela v okviru diplomske naloge lahko sklepamo naslednje:

- Izbrani fenolni izvlečki vsebujejo spojine s protimikrobnim delovanjem. Vsebnost fenolnih spojin v kožicah rdečih sort grozdja (*Vitis vinifera* L.) je bila v povprečju večja kot v kožicah belih sort. Izvlečki kožic belih sort pa so pokazali učinkovitejše protimikrobno delovanje, iz česar sklepamo na velik pomen sestave fenolnega izvlečka za njegovo protimikrobno aktivnost;
- v nasprotju s predpostavljeno hipotezo so imeli fenolni izvlečki učinkovitejše protimikrobno delovanje na po Gramu negativne kampilobakte kot na po Gramu pozitivne stafilokoke. Velja, da so bakterije rodu *Campylobacter* netipični predstavnik po Gramu negativnih bakterij in so bolj občutljive na protimikrobne snovi;
- rastlinski fenolni izvlečki so uspešno inhibirali rast bakterijskih sevov različnega izvora. Visoko odporni sevi proti antibiotikom se niso izkazali za odpornejše, saj so izvlečki delovali primerljivo tako na občutljive kot na večkratno odporne seve proti antibiotikom;
- dodatek kemijskih inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (PAβN in NMP) so vplivali na povišano občutljivost kampilobaktrov. Potencialnim inhibitorjem naravnega izvora ILVT in V40 nismo dokazali modulatornega delovanja pri odpornosti proti antibiotikoma, etidijevem bromidu ali naravnim izvlečkom. Sev z mutacijo na genu izlivne črpalke CmeABC, *cmeB*, izkazuje povišano občutljivost.

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus* sodijo med patogene mikroorganizme. Lahko povzročajo črevesne okužbe, prenosljive s hrano ali pa v živilih tvorijo toksine, ki po zaužitju povzročajo zastrupitve gostitelja. Dodatno zaskrbljenost povzroča dejstvo, da so tako kampilobaktri kot stafilokoki zaradi izpostavljanja različnim protimikrobnim snovem postajajo vse bolj odporni proti posameznim snovem ali več vrstam protimikrobnih snovi hkrati. Med njimi je najbolj znana naraščajoča odpornost proti protimikrobnim zdravilom oz. antibiotikom.

V okviru diplomske naloge smo določili protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na antibiotsko odporne in občutljive kampilobaktre in stafilokoke. Izbrali smo izvlečke kožic grozdnih jagod in zelišč. Protimikrobno delovanje smo ovrednotili z vrednostjo MIK (minimalno inhibitorno koncentracijo v ekvivalentih galne kisline v mg/ml gojišča), ki je v mikrodilucijskem testu zavrla rast testnega organizma. Izvlečki so pokazali inhibitorno delovanje za vse testirane seve. Večji protimikrobni učinek so imeli izvlečki na po Gramu negativne bakterije (*Campylobacter*) kot na po Gramu pozitivne (*S. aureus*). Izvlečki zelišč so bili učinkoviti že pri zelo nizkih vrednostih MIK (npr. žajbelj med 0,002 in 0,014 mgGAE/ml). Med izvlečki kožic grozdnih jagod so bili učinkovitejši izvlečki belih sort (npr. medan med 0,01-0,05 mgGAE/ml), slabše so se izkazali izvlečki rdečih sort. To nakazuje, da je sestava fenolnih spojin in s tem protimikrobna učinkovitost zelo odvisna od sortnih razlik. Sevi so različno odporni na antibiotike, na podlagi česar jih uvrščamo na občutljive, odporne in večkratno odporne seve proti različnim protimikrobnim snovem. Rezultati naših eksperimentov ne nakazujejo, da bi bili večkratno odporni sevi na različne antibiotike tudi bolj odporni na protimikrobno delovanje naravnih izvlečkov v primerjavi z občutljivimi sevi. Ker je bilo v testiranje vključeno zelo majhno število sevov, bi morali rezultate potrditi z večjim številom večkratno odpornih sevov.

Na odpornost bakterij vplivajo membranske izlivne črpalke, katere s svojim delovanjem pospešijo izločanje toksične snovi iz celice. Pri *C. jejuni* je najpomembnejša izlivna črpalka CmeABC. Njeno aktivno vlogo smo dokazali na dva načina. Najprej smo primerjali referenčni sev in mutant, ki ima okvarjen gen *cmeB*. Mutacija na genu, ki nosi zapis za protein membranske izlivne črpalke, je pripomogla k večji občutljivosti seva v primerjavi s sevom brez mutacije. Drugi način za dokaz aktivne vloge črpalk je bil uporaba inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk (EPIs). Uporaba znanih kemijskih inhibitorjev (NMP in PAβN) je povečala občutljivost vseh testiranih izolatov proti antibiotikoma eritromicinu in ciprofloksacinu ter etidijevemu bromidu, s čimer smo potrdili vpletenost efluksa v mehanizem odpornosti. Potencialna naravna inhibitorja, izvleček listov vinske trte in rožmarina, nista pokazala modulatornega delovanja. Bodoče raziskave bodo usmerjene v iskanje novih virov naravnih snovi z učinkom na membranske izlivne črpalke. Take snovi bi lahko izboljšale učinkovitost različnih protimikrobnih snovi, ki jih bakterije z izlivnimi črpalkami izločajo iz celice in tako povečajo svojo odpornost.

7 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573–589
- Avantor. 2011. Safety data sheet. Corporate Parkway, Center Valley, Avantor Performance Materials: 3–3
http://avantormaterials.tw/documents/MSDS/Dev/GB/MSDS_4007_GB.pdf (14. 12. 2011)
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plant and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191–203
- Bartolome B., Gómez-Cordovés C., Monagas M., Hernández-Ledesma B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2: 319–327
- Baydar N. G., Özkan G., Sagdiç O. 2003. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15, 5: 335–339
- Bibek R., Arun B. 2008. *Fundamental food microbiology*. 4th ed. Boca Raton, CRC Press: 301–303
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253
- Cadenas E., Packer L. 2002. *Handbook of antioxidants*. 2nd ed. New York, Marcel Dekker: 21–36
- Campbell J., Lee K., Meredith T., Swoboda J., Walker Kahne S. 2010. Targocil: novel antibiotics against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Cambridge, Harvard University Office of Technology Development: 2 str.
<http://www.techtransfer.harvard.edu/technologies/tech.php?case=3242> (5. 2. 2012)
- Cody A. J., Colles F. M., Sheppard S. K., Maudden M. C. J. 2010. Where does *Campylobacter* come from? A molecular odyssey. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 659: 47–56
- Collado L., Figueras M. J. 2011. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 1: 174–192
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564–582
- Dykes G. A., Amarowicz R., Pegg R. 2003. Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiology*, 2, 20: 211–216
- FDA. 2012. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook *Staphylococcus aureus*. Silver Spring, U. S. Food and Drug Administration: 86–90
<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf> (2. 4. 2012)
- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acid against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria*

- monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 66, 10: 1811–1821
- Garénaux A., Barloy-Hubler F., De Jonge R., Ermel G., Federighi M., Guillou S., Luchetti-Miganeh C., Newell D., Payot S., Tresse O., Ritz M. 2008. Better understanding of the *Campylobacter* conundrum. New York, Nova Science Publishers, Inc: 3–46
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. Planta Medica, 74: 594–602
- Greiner K., Weber A. 2007. Zelišča od A do Ž: najboljše rastline za vaš vrtni raj: mnogostranske ideje za oblikovanje gredic in lončkov. Kranj, Narava: 142–173
- Gulluce M., Adiguzel A., Ogutcu H., Sengul M., Karaman I., Sahin F. 2004. Antimicrobial effect of *Quercus ilex* L. extract. Phytotherapy Research, 18: 208–211
- Gousia P., Economou V., Leveidiotou S., Papadopoulou C., Sakkas H. 2011. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. Foodborne Pathogens and Disease, 8, 1: 27–38
- Hamilton-Miller J. M. T. 1995. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 11: 2375–2377
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 2001. Antimicrobial activity of essential oils and other extracts. Journal of Applied Microbiology, 86, 6: 985–990
- Hemaiswarya S., Doble M., Kumar Kruthiventi A. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine, 15: 639–652
- Horiuchi K., Shiota S., Hatanko T., Yoshida T., Kuroda T., Tsuchiya T. 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds an vancomycin-resistance enterococci (VRE). Biological/Pharmaceutical Bulletin, 30, 6: 1147–1149
- ISO 4833. Microbiology-General guidance for the enumeration of micro-organisms-Colony count technique at 30°C. 1991: 5 str.
- IVZ. 2011. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji, 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47–49
- Jeon B., Barton Y. W., Wang Y., Hao H., Zhang Q. 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66: 79–85
- Jeršek B. 2009. Higiena živil, laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. 2. dopolnjena izdaja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 52–52
- Kapun-Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 104–198
- Katalinić V., Smole Možina S., Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Klančnik A. 2011. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts of six *Vitis vinifera* L. varieties. International Journal of Food Properties. doi: 101080/10942912.2010.526274: 10 str. [v tisku]

- Klančnik A., Guzej B., Jamnik P., Vučkovič D., Abram M., Smole Možina S. 2009a. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Research in Microbiology*, 160: 345–352
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009b. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 146–156
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010a. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121–126
- Klančnik A., Piskernik S., Lipoglavšek L., Smole Možina S. 2010b. Anti-*Campylobacter* effect of alternative antimicrobial compounds. V: 5th Central European Congress on Food. Bratislava, 19th-22nd may 2010. Book of abstracts and full papers. Bratislava, Food Research Institute (FRI): 6–6
- Klančnik A., Smole Možina S., Abramovič H., Guzej B., Hadolin Kolar M. 2009c. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1744–1752
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 str.
- Kurinčič M., Lušicky M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina S. 2009. Epidemiologija in antibiotična odpornost bakterij *Campylobacter* iz vzorcev vod in piščančjega mesa. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor p., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 206–211
- Lin J., Overbye Michel L., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 7: 2124–2131
- Lin J., Guo B., Reynolds D. L., Zhang Q. 2010. Contribution of the Multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1: 77–83
- Lindsay J. A., Holden M. T. G. 2007. The *Staphylococci*: a postgenomic view. V: Bacterial pathogenomics. Nelson K. E., Pellen, M. J., Preston G. M. (eds.). Washington, ASM Press: 120–140.
- Macheix J. J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press: 392 str.
- Mavri A., Smole Možina S. 2012. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistant of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology*, doi: 10.1099/jmm.0.041467-0: 5.str. [v tisku]
- Mimica-Dukić N., Božin B., Soković M., Simin N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 9: 2485–2489
- Monagas M., Hernandez-Ledesma B., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 319–327

- Nostro A., Germanò M. P., Marino D. A., Cannatelli M. A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medical plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 5: 179–381
- Pagès J. M., Amaral L. 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1794: 826–833
- Pagès J. M., Bolla J. M., Davin-Regli A., Chevalier J., Garnotel E., Alibert-Franco S., Mahamoud A. 2010. Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10: 1848–1857
- Palanippa K., Holley R. A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 2–3: 164–168
- Payot S., Bolla J. M., Corcoran D., Fanning S., Mégraud F., Zhang Q. 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8: 1967–1971
- Piddock L. J. V., Garvey M. I., Rahman M. M., Gibbons S. 2010. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 6: 1215–1223
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 579–590
- Piskernik S., Klančnik A., Riedel C. T., Brøndsted L., Smole Možina S. 2011. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, 22, 8: 718–724
- Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira M., Duarte M. C. T., Rehder V. L. G. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plant used in Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 4: 275–280
- Sefton A. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistant and their clinical relevance in the new millenium. *Drugs*, 62, 4: 557–566
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 2/3: 91–98
- Spigno G., Dermiki M., Pastori C., Casanova F., Jauregi P. 2010. Recovery of gallic acid with colloidal gas aphrons generated from a cationic surfactant. *Separation and Purification Technology*, 71, 1: 56–62
- Stavri M., Piddock L. J. V., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1247–1260
- Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herbs and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199–1218
- Tambur Z., Doder R., Kulisic Z., Miljkovic-Selimovic B. 2010. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from animals and humans to tetracycline. *African Journal of Microbiology*, 4, 12: 1246–1250

- Todar K. 2008. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* disease. V: Todar's online textbook of bacteriology. Madison, University of Wisconsin: 6 str.
<http://textbookofbacteriology.net/staph.html> (9. 12. 2012)
- Trošt K., Mozetič Vodopivec B., Sternad Lemut M., Jug K., Raspor P., Smole Možina S. 2011. Antioksidativna in antimikrobna aktivnost fenolnih izvlečkov grozdnih tropin. V: Slovenski kemijski dnevi 2011. Zbornik povzetkov referatov s predavanja. Portorož, 14.-16. september 2011. Kravanja Z., Brodnjak-Vončina D., Bogataj M (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru: 203–203
- Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., De Ley J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: emendation of generic description and proposal of *Arcobacter* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 41, 1: 88–103
- Vrhovšek U. 2001. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. Slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož, 4.–6. decembra 2001. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124–134
- Yim G. 2007. Attack of the superbugs: Antibiotic resistance. The Science Creative Quarterly, 3: 1 str.
<http://www.scq.ubc.ca/attack-of-the-superbugs-antibiotic-resistance/> (23. 4. 2011)
- Zhang Q., Jeon B. 2009. Sensitization of *Campylobacter jejuni* to fluoroquinolone and macrolide antibiotics by antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux transporter. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 63: 946–948
- Zgang Q., Jeon B., Wayne T. M. 2010. Advances in *Campylobacter* biology and implications for biotechnological applications. Microbial Biotechnology, 3, 3: 242–258

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in somentorici dr. Anji Klančnik za strokovno pomoč in vso potrpežljivost, ki sta mi jo nudili v času izdelave diplomske naloge. Recenzentu prof. dr. Petru Rasporju se zahvaljujem za koristne nasvete pri pregledu diplomske naloge.

V obdobju ekperimentalnega dela sta mi v laboratoriju vedno priskočili na pomoč Saša Piskernik in Ana Mavri.

Hvala Lini Burkan za pomoč in svetovanje pri zbiranju in urejanju literature ter za hiter pregled diplomske naloge.

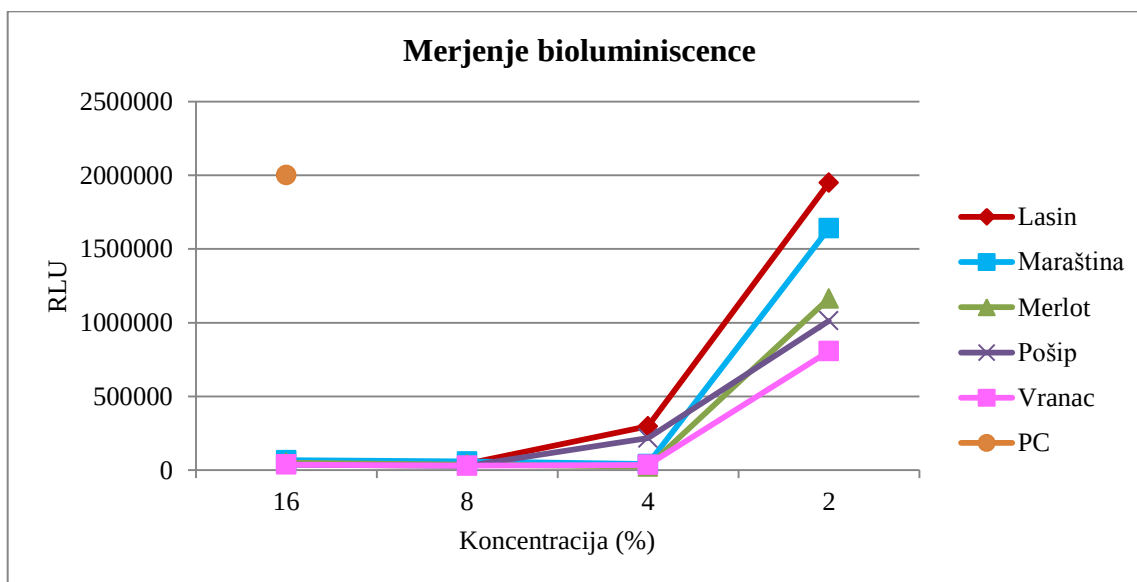
Hvala sošolcem, prijateljem in družini, ki so me spodbujali in stali ob strani tako v času študija kot pri pisanju diplome. Hvala Nataši za vso podporo in nasvete!

Posebna zahvala fantu Juretu za zaupanje vame, razumevanje in vsakodnevne spodbube.

PRILOGE

Priloga A1: Prikaz odčitanih rezultatov merjenja in grafični prikaz določitve vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod na testiran sev *C. jejuni* K49/4 z merjenjem bioluminiscence

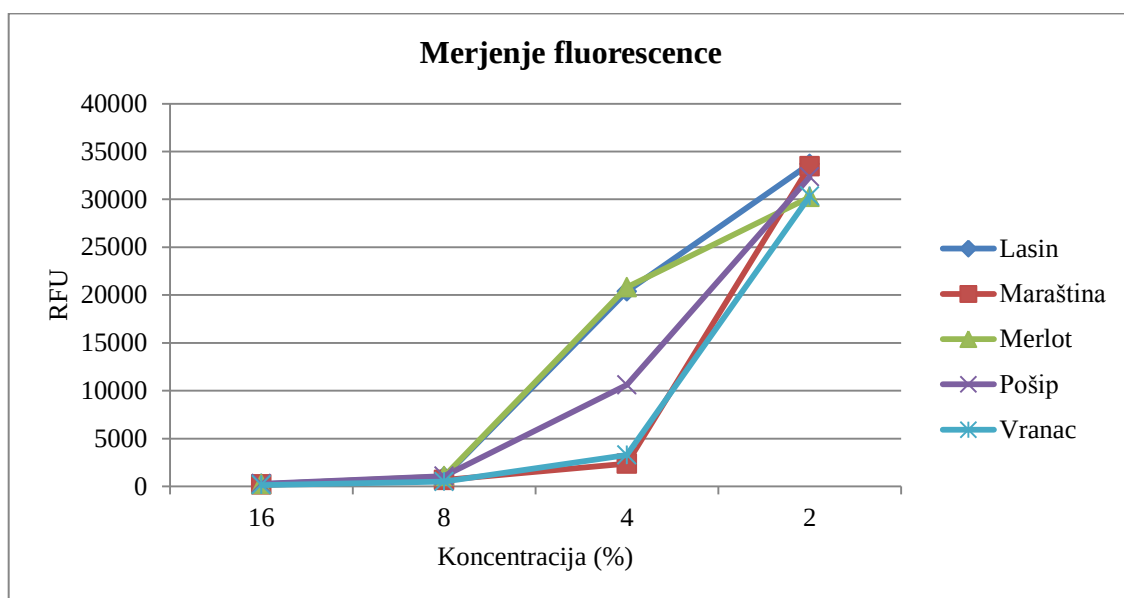
Testirani sev:	<i>C. jejuni</i> K49/4									
Metoda:	Merjenje bioluminiscence (dodatek indikatorja BacTiter-Glo)									
Izvečki:	Fenolni izvlečki grozdnih kožic									
Konc. (%)	Lasin		Maraština		Merlot		Pošip		Vranac	
16	55055	53879	65933	67352	50222	49534	37880	38364	37952	35071
8	42826	43989	53822	58374	38717	37462	27594	29753	30764	29260
4	282580	297494	41431	40638	216220	23852	216840	253853	35787	34474
2	1836000	1948028	1549400	1639832	1046000	1163564	1012400	996328	806365	753030
MIK (%)	8		4		8		8		4	



Legenda: RLU: relativne enote luminescence

Priloga A2: Prikaz odčitanih rezultatov merjenja in grafični prikaz določitve vrednosti MIK izvlečkov kožic grozdnih jagod na testiran sev *C. jejuni* K49/4 z merjenjem fluorescence

Testirani sev:	<i>C. jejuni</i> K49/4									
Metoda:	Merjenje fluorescence (dodatek indikatorja CellTiter-Blue)									
Izvečki:	Fenolni izvlečki grozdnih kožic									
Konc. (%)	Lasin		Maraština		Merlot		Pošip		Vranac	
16	221	235	175	170	219	204	295	280	141	149
8	958	980	601	657	1088	1048	1032	1057	540	500
4	21749	20362	2465	2362	19722	20804	19115	10595	2840	3271
2	32787	33683	33723	33457	30030	30230	32150	32335	30056	30328
MIK (%)	8		4		8		8		4	



Priloga B: Vrednosti MIK (mgGAE/ml) izvlečkov kožic za kampilobaktre

	<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>C. coli</i> 137	<i>C. coli</i> ATCC 33559	<i>C. jejuni</i> 375-06	<i>C. jejuni</i> 3552	<i>C. coli</i> 2235	<i>C. coli</i> 6553-05
Bele sorte kožic grozdnih jagod							
Kujundžuša	/	0,08	0,04	0,05	0,10	0,07	0,10
Rkaciteli	0,05	0,02	0,02	/	0,09	0,09	0,05
Zlatica	/	0,05	0,09	0,07	0,07	0,07	0,03
Medan	/	0,02	0,05	0,01	0,05	0,05	0,05
Kuč	/	0,02	0,02	0,03	0,06	0,06	0,03
Maraština	0,05	0,04	0,02	/	0,10	0,10	0,05
Debit	/	0,06	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04
Rdeče sorte kožic grozdnih jagod							
Vranac	0,21	0,21	0,20	/	0,21	0,21	0,11
Trnjak	0,56	0,28	0,13	0,14	0,28	0,28	0,14
Rudežuša	0,53	0,27	0,25	0,13	1,06	1,06	1,06
Merlot	0,28	0,14	0,13	/	0,14	0,14	0,07
Babić	/	0,10	0,10	0,27	0,13	0,13	0,13
Lasin	0,11	0,03	0,02	/	0,05	0,05	0,03
Plavina	0,37	0,06	0,09	/	0,09	0,37	0,19

Priloga C: Vrednost MIK (mgGAE/ml) izvlečkov zelišč za kampilobaktre

	<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>C. coli</i> 137	<i>C. j.</i> NCTC 11168	<i>C. j.</i> ATCC 33560	<i>C. c.</i> ATCC 33559	<i>C. jejuni</i> 375-06
Črnika	0,039	0,39	0,020	< 0,020	/	0,020
Smilj	0,020	0,020	0,040	< 0,020	< 0,020	0,040
Meta	0,069	0,069	0,022	0,087	/	0,011
Zeleni čaj	0,111	0,111	0,221	0,221	0,221	0,221
Origano	0,012	0,012	0,039	0,085	0,039	0,042
Melisa	0,006	0,003	0,003	<0,00	0,006	0,000
Timijan	0,023	0,011	0,011	0,02	0,04	0,011
Žajbelj	0,003	0,003	0,002	/	0,014	0,003
Gornik	0,008	0,003	0,004	0,004	0,008	0,003

Legenda: /: ni podatkov

Priloga D: Vrednosti MIK (mgGAE/ml) izvlečkov kožic za stafilokoke

	<i>S. aureus</i> 72	<i>S. aureus</i> 345	<i>S. aureus</i> MRSA 346
Bele sorte			
Kujundežuša	0,08	0,13	0,13
Rkaciteli	0,23	> 0,23	> 0,23
Zlatarica	0,25	0,17	0,17
Medan	0,24	> 0,24	> 0,24
Kuč	0,30	> 0,30	0,30
Maraština	0,18	> 0,24	0,24
Debit	0,30	0,20	0,20
Rdeče sorte			
Vranac	0,78	0,26	0,52
Trnjak	0,35	0,18	0,35
Rundenžuša	0,50	0,33	0,67
Merlot	0,35	0,18	0,35
Babič	0,34	0,17	0,34
Lasin	> 0,27	0,27	0,27
Plavina	0,47	0,23	0,47

Priloga E: Vrednost MIK (mgGAE/ml) izvlečkov zelišč za stafilokoke

	<i>S. aureus</i> ŽMJ 72	<i>S. aureus</i> ŽMJ 345
Zeleni čaj	0,28	0,28
Smilj	0,03	0,03
Sončnica	0,12	0,12
Kadulja list	0,11	0,03
Gornik	0,51	0,25
Kadulja v.j.x	0,14	0,14
Kadulja v.j.	0,35	0,17
Črničevje	0,61	0,61