

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Tina CVETKOVIĆ

**MODULATORJI ODPORNOSTI BAKTERIJ *Campylobacter* IN  
*Staphylococcus* V SEMENIH RASTLINE *Alpinia katsumadai***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**RESISTANCE-MODULATORY ACTIVITY OF *Alpinia katsumadai*  
SEED EXTRACTS AGAINST *Campylobacter* AND *Staphylococcus***

M. SC. THESIS

Master Study Programme: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Del je bil opravljen tudi na Oddelku za farmakognozijo Inštituta za farmacevtske znanosti na Univerzi v Gradcu (Avstrija).

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Recenzentka: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana, se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tina Cvetković

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 579.24+579.26:547.9(043)=163.6  
KG protimikrobne snovi/odpornost bakterij/modulatorna učinkovitost/minimalna inhibitorna koncentracija/izlivne črpalke/zaviralci izlivnih črpalk/CmeABC/CmeDEF/*Campylobacter*/*Staphylococcus*/mutante/*Alpinia katsumadai*/eterično olje/etanolni izvleček/izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji/fenolne spojine/diarilheptanoidi/terpeni/terpenoidi  
AV CVETKOVIĆ, Tina, dipl. mikrobiol. (UN)  
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije  
LI 2014  
IN MODULATORJI ODPORNOSTI BAKTERIJ *Campylobacter* IN *Staphylococcus* V SEMENIH RASTLINE *Alpinia katsumadai*  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)  
OP X, 70 str., 19 pregl., 7 sl., 6 pril., 106 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Problem naraščajoče bakterijske odpornosti je spodbudil iskanje novih načinov zmanjševanja odpornosti in povrnitve delovanja neučinkovitih protimikrobnih snovi. Namen dela je bil določiti modulatorno učinkovitost dveh izvlečkov in eteričnega olja semen rastline *Alpinia katsumadai* na občutljivih in odpornih bakterijskih sevih rodov *Campylobacter* in *Staphylococcus* ter primerjati njihovo učinkovitost glede na kemijsko sestavo. Z metodo mikrodilucije v bujonu smo ugotavljali ali posamezni izvlečki v subinhibitorni koncentraciji (0,25 in 0,5 minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)) skupaj z izbranimi protimikrobnimi snovmi (ciprofloksacin, eritromicin, triklosan, žolčne soli in etidijev bromid) znižajo MIK teh snovi oz. povečajo njihovo protimikrobno delovanje. Rezultati so pokazali, da etanolni izvleček, eterično olje in odpadni material po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka izkazujejo sevno-specifično in od koncentracije priprava odvisno modulatorno učinkovitost. Izvlečki so zlasti v višji koncentraciji odpornim in občutljivim bakterijskim sevom povečali občutljivost na vsaj eno ali na vse protimikrobne snovi. Z mutantami *cmeB*, *cmeF* in *cmeR* seva *C. jejuni* 11168 smo priprave preverili kot potencialne zaviralce izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF. Izkazalo se je, da sta etanolni izvleček in izvleček odpadnega materiala najverjetneje substrata izlivne črpalke CmeDEF ali drugih izlivnih sistemov, eterično olje pa je potencialni zaviralec izlivne črpalke CmeABC. Kemijska analiza izvlečka odpadnega materiala s HPLC in LC/MS je pokazala prisotnost diarilheptanoidov in flavonoidov, ki so bili že predhodno določeni v etanolnem izvlečku. Analiza eteričnega olja z GC/MS je potrdila prisotnost terpenov in terpenoidov. Tako fenolne spojine iz etanolnega izvlečka in izvlečka odpadnega materiala, kot tudi terpeni iz eteričnega olja učinkovito vplivajo na modulatorno delovanje testiranih pripravkov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 579.24+579.26:547.9(043)=163.6  
CX antimicrobials/bacterial resistance/modulatory activity/minimal inhibitory concentration/efflux pumps/efflux pump inhibitors/CmeABC/CmeDEF/*Campylobacter/Staphylococcus*/mutants/*Alpinia katsumadai*/essential oils/ethanolic extracts/extract of post-distillation waste material/phenolic compounds/diarylheptanoids/ terpenes/terpenoids  
AU CVETKOVIĆ, Tina  
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/SEPČIĆ, Kristina (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2014  
TI RESISTANCE-MODULATORY ACTIVITY OF *Alpinia katsumadai* SEED EXTRACTS AGAINST *Campylobacter* AND *Staphylococcus*  
DT M. SC. THESIS (Master Study Programme: Field Microbiology)  
NO X, 70 p., 19 tab., 7 fig., 6 ann., 106 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB An increasing emergence of antimicrobial resistance has induced investigation of new strategies to recover the activity of currently inactive antimicrobials. The aim of this work was to assess resistance-modulatory activity of three different extracts prepared from *A. katsumadai* seeds, against sensitive and resistant strains of *Campylobacter* and *Staphylococcus*. The potential modulators were tested at the sub-inhibitory concentrations of 0,25 and 0,5 minimal inhibitory concentration (MIC), in combination with antibiotics ciprofloxacin and erythromycin, disinfectant triclosan, bile salts and ethidium bromide. Using broth microdilution method we determined possible enhanced antimicrobial activity of the tested substances by reduction of their MICs. Our results show that the resistance-modifying effect of ethanolic extract, essential oil and the extract of post-distillation material is strain-specific and concentration dependent. All three formulations were mostly effective in higher sub-inhibitory concentration and they increased susceptibility of both resistant and sensitive strains to at least one or to all tested antimicrobial substances. Furthermore, we determined the role of seed extracts as efflux pump inhibitors, using *cmeB*, *cmeF* and *cmeR* mutant strains of *C. jejuni* 11168. Results show that ethanolic extract and the extract of post-distillation material are probably involved in inhibition of efflux pumps other than CmeABC, while essential oil is potential inhibitor of the efflux pump CmeABC. Chemical composition of the extract of post-distillation material using HPLC and LC/MS analysis determined the presence of diarylheptanoids and flavonoids identical to those previously identified in ethanolic extract. GC/MS analysis of essential oil determined the presence of terpenes and terpenoids. All identified compounds are involved in effective resistance-modifying activity of the tested materials.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                               | str.      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....                                                                     | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION .....                                                                                 | IV        |
| KAZALO VSEBINE .....                                                                                          | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC .....                                                                                       | VII       |
| KAZALO SLIK .....                                                                                             | VIII      |
| KAZALO PRILOG .....                                                                                           | IX        |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....                                                                                     | X         |
| <b>1 UVOD</b>                                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE                                                                                   | 2         |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE                                                                                          | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                                                        | <b>3</b>  |
| 2.1 UPORABA PROTIMIKROBNIH SNOVI IN RAZVOJ ODPORNOSTI PRI BAKTERIJAH                                          | 3         |
| 2.2 MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJ                                                                             | 4         |
| 2.2.1 <b>Membranske izlivne črpalke (efluks)</b>                                                              | <b>4</b>  |
| 2.3 BAKTERIJSKI ROD <i>Campylobacter</i>                                                                      | 6         |
| 2.3.1 <b>Vrste <i>Campylobacter</i> kot povzročitelji okužb s hrano</b>                                       | <b>6</b>  |
| 2.3.2 <b>Odpornost proti antibiotikom in drugim protimikrobnim snovem pri bakterijah <i>Campylobacter</i></b> | <b>7</b>  |
| 2.3.2.1 Mehanizmi odpornosti proti fluorokinolonom                                                            | 8         |
| 2.3.2.2 Mehanizmi odpornosti proti makrolidom                                                                 | 8         |
| 2.3.3 <b>Pomen membranskih izlivnih črpalk</b>                                                                | <b>8</b>  |
| 2.3.3.1 CmeABC                                                                                                | 9         |
| 2.3.3.2 CmeDEF                                                                                                | 10        |
| 2.4 BAKTERIJSKI ROD <i>Staphylococcus</i>                                                                     | 10        |
| 2.4.1 <b><i>Staphylococcus aureus</i> kot povzročitelj okužb</b>                                              | <b>11</b> |
| 2.4.2 <b>Odpornost proti antibiotikom pri <i>S. aureus</i></b>                                                | <b>12</b> |
| 2.4.3 <b>Pomen izlivnih črpalk pri odpornosti</b>                                                             | <b>12</b> |
| 2.5 MODULATORJI ODPORNOSTI BAKTERIJ                                                                           | 12        |
| 2.5.1 <b>Zaviralci izlivnih črpalk</b>                                                                        | <b>13</b> |
| 2.6 RASTLINSKI IZVLEČKI KOT VIR PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN                                                      | 15        |
| 2.6.1 <b>Pomen medicinskih rastlin</b>                                                                        | <b>16</b> |
| 2.6.1.1 <i>Alpinia katsumadai</i>                                                                             | 16        |
| 2.7 METODE ZA PRIPRAVO RASTLINSKIH IZVLEČKOV                                                                  | 18        |
| 2.7.1 <b>Ekstrakcija v topilu</b>                                                                             | <b>19</b> |
| 2.7.2 <b>Hidrodestilacija eteričnega olja</b>                                                                 | <b>19</b> |
| 2.8 KEMIJSKA ANALIZA SPOJIN S KROMATOGRAFSKIMI TEHNIKAMI                                                      | 19        |
| 2.8.1 <b>Plinska kromatografija (GC)</b>                                                                      | <b>20</b> |
| 2.8.2 <b>Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)</b>                                              | <b>20</b> |
| 2.9 METODE DOLOČANJA MODULATORNE UČINKOVITOSTI                                                                | 20        |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>                                                                                   | <b>22</b> |
| 3.1 SHEMA POTEKA DELA                                                                                         | 22        |
| 3.2 MATERIAL                                                                                                  | 24        |
| 3.2.1 <b>Bakterijski sevi</b>                                                                                 | <b>24</b> |
| 3.2.2 <b>Bakterijska gojišča</b>                                                                              | <b>25</b> |
| 3.2.3 <b>Laboratorijski material in aparature</b>                                                             | <b>26</b> |
| 3.2.4 <b>Delovne raztopine, topila in reagenti</b>                                                            | <b>27</b> |
| 3.2.5 <b>Testne protimikrobne snovi</b>                                                                       | <b>28</b> |
| 3.2.5.1 Ciprofloksacin                                                                                        | 28        |
| 3.2.5.2 Eritromicin                                                                                           | 28        |

|              |                                                                                                                                                                   |           |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5.3      | Razkužilo triklosan                                                                                                                                               | 29        |
| 3.2.5.4      | Žolčne soli                                                                                                                                                       | 29        |
| 3.2.5.5      | Etidijev bromid                                                                                                                                                   | 29        |
| <b>3.2.6</b> | <b>Izvlečki semen <i>A. katsumadai</i> (modulatorji)</b>                                                                                                          | <b>29</b> |
| 3.2.6.1      | Priprava izvlečkov                                                                                                                                                | 29        |
| 3.2.6.2      | Kemijska analiza izvlečkov                                                                                                                                        | 29        |
| 3.2.6.3      | Priprava raztopin izvlečkov za mikrodilucijsko metodo                                                                                                             | 30        |
| 3.3          | METODE                                                                                                                                                            | 30        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Priprava izvlečkov iz semen <i>A. katsumadai</i></b>                                                                                                           | <b>30</b> |
| 3.3.1.1      | Etanolna ekstrakcija semen <i>A. katsumadai</i>                                                                                                                   | 30        |
| 3.3.1.2      | Hidrodestilacija eteričnega olja                                                                                                                                  | 31        |
| 3.3.1.3      | Izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka                                                                                              | 31        |
| <b>3.3.2</b> | <b>Kemijska analiza izvlečkov semen <i>A. katsumadai</i></b>                                                                                                      | <b>31</b> |
| 3.3.2.1      | Analiza kemijske sestave eteričnega olja z metodo GC/MS                                                                                                           | 31        |
| 3.3.2.2      | Analiza kemijske sestave izvlečka odpadnega materiala z metodo HPLC                                                                                               | 32        |
| 3.3.2.3      | Analiza kemijske sestave izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS                                                                                                 | 32        |
| <b>3.3.3</b> | <b>Priprava bakterijske kulture</b>                                                                                                                               | <b>33</b> |
| 3.3.3.1      | Revitalizacija bakterij                                                                                                                                           | 33        |
| 3.3.3.2      | Priprava tekoče kulture in inokuluma                                                                                                                              | 33        |
| 3.3.3.3      | Metoda nakapljalne plošče                                                                                                                                         | 34        |
| <b>3.3.4</b> | <b>Metoda mikrodilucije v bujonu</b>                                                                                                                              | <b>34</b> |
| <b>3.3.5</b> | <b>Določanje živosti bakterij</b>                                                                                                                                 | <b>35</b> |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI</b>                                                                                                                                                  | <b>36</b> |
| 4.1          | PRIPRAVA IZVLEČKOV IZ SEMEN <i>A. katsumadai</i>                                                                                                                  | 36        |
| 4.2          | MODULATORNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV SEMEN <i>A. katsumadai</i>                                                                                                     | 37        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Modulatorni učinek izvlečkov semen <i>A. katsumadai</i> na seve bakterij <i>Campylobacter</i></b>                                                              | <b>38</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Modulatorni učinek izvlečkov na seve bakterij <i>Staphylococcus</i></b>                                                                                        | <b>41</b> |
| 4.3          | ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE ETERIČNEGA OLJA IZ SEMEN                                                                                                                 | 44        |
| 4.4          | ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE IZVLEČKA ODPADNEGA MATERIALA S HPLC-PDA                                                                                                  | 46        |
| 4.5          | ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE IZVLEČKA ODPADNEGA MATERIALA Z LC-PDA-MS                                                                                                 | 47        |
| <b>4.5.1</b> | <b>Spojine v ostanku izvlečka odpadnega materiala</b>                                                                                                             | <b>48</b> |
| <b>4.5.2</b> | <b>Spojine v filtratu izvlečka odpadnega materiala (vodna faza)</b>                                                                                               | <b>49</b> |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                                                                                         | <b>52</b> |
| 5.1          | PROTIMIKROBNO DELOVANJE CIPROFLOKSACINA, ERITROMICINA, TRIKLOSANA, ŽOLČNIH SOLI IN ETIDIJEVEGA BROMIDA NA BAKTERIJE <i>Campylobacter</i> IN <i>Staphylococcus</i> | 52        |
| 5.2          | MODULATORNI UČINEK IZVLEČKOV SEMEN <i>A. katsumadai</i> NA ODPORNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> IN <i>Staphylococcus</i>                                       | 54        |
| <b>5.2.1</b> | <b>Učinkovitost delovanja modulatorjev na občutljivih in odpornih sevih</b>                                                                                       | <b>56</b> |
| <b>5.2.2</b> | <b>Učinkovitost delovanja modulatorjev na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije</b>                                                                  | <b>56</b> |
| <b>5.2.3</b> | <b>Delovanje potencialnih modulatorjev iz semen <i>A. katsumadai</i> na seve z okvarjenimi izlivnimi črpalkami CmeABC in CmeDEF</b>                               | <b>57</b> |
| 5.3          | MODULATORNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV SEMEN <i>A. katsumadai</i> GLEDE NA KEMIJSKO SESTAVO                                                                           | 58        |
| 5.4          | SKLEPI                                                                                                                                                            | 61        |
| <b>6</b>     | <b>VIRI</b>                                                                                                                                                       | <b>62</b> |

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | str. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Preglednica 1:</b> Bakterijski sevi in njihova odpornost proti ciprofloksacinu, eritromicinu in meticilinu.                                                                                                                                                                                                                                                                        | 24   |
| <b>Preglednica 2:</b> Krvni agar Columbia. Sestavine gojišča in postopek priprave.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 25   |
| <b>Preglednica 3:</b> Mueller Hinton bujon. Sestavine gojišča in postopek priprave.                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 25   |
| <b>Preglednica 4:</b> Mueller Hinton agar. Sestavine gojišča in postopek priprave.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 25   |
| <b>Preglednica 5:</b> Abeyta-Hunt-Bark agar. Sestavine gojišča in postopek priprave.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26   |
| <b>Preglednica 6:</b> Laboratorijski material in njihov proizvajalec.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 26   |
| <b>Preglednica 7:</b> Aparature in njihov proizvajalec.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 27   |
| <b>Preglednica 8:</b> Pripravljene koncentracije in injiciran volumen vzorcev odpadnega materiala za HPLC.                                                                                                                                                                                                                                                                            | 32   |
| <b>Preglednica 9:</b> MIK protimikrobnih sredstev samih in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki v subinhibitorni koncentraciji 0,25 MIK, pri bakterijah rodu <i>Campylobacter</i> .                                                                                                                                                                                                 | 38   |
| <b>Preglednica 10:</b> MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki v subinhibitorni koncentraciji 0,5 MIK, pri bakterijah rodu <i>Campylobacter</i> .                                                                                                                                                                                            | 40   |
| <b>Preglednica 11:</b> MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki pri bakterijah rodu <i>Staphylococcus</i> . Koncentracija pripravkov je znašala 0,25 MIK.                                                                                                                                                                                     | 41   |
| <b>Preglednica 12:</b> MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki pri bakterijah rodu <i>Staphylococcus</i> . Koncentracija pripravkov je znašala 0,5 MIK.                                                                                                                                                                                      | 42   |
| <b>Preglednica 13:</b> Retencijski čas (Rt), retencijski indeks (Ri), referenčni Ri in deleži identificiranih spojin v eteričnem olju. Spojine brez podatka o deležu so bile prisotne v prenizki koncentraciji za detekcijo.                                                                                                                                                          | 44   |
| <b>Preglednica 14:</b> Deleži posameznih spojin v vzorcih odpadnega materiala.                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 46   |
| <b>Preglednica 15:</b> Delež identificiranih spojin in ostalih neidentificiranih spojin v vzorcih odpadnega materiala.                                                                                                                                                                                                                                                                | 46   |
| <b>Preglednica 16:</b> Predhodno že identificirane spojine in njihova molekulska masa.                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 48   |
| <b>Preglednica 17:</b> Identificirana spojina, retencijski čas (Rt), molekulska masa (Mw), UV max, razmerje $m/z$ (negativni ali pozitivni ionski način) in mase fragmentiranih ionov dobljeni pri LC/MS analizi ostanka odpadnega materiala. V odebeljenem tisku so spojine, ki smo jih že potrdili s HPLC. Ostale spojine se po molekulski masi ujemajo s spojinami iz literature.  | 48   |
| <b>Preglednica 18:</b> Identificirana spojina, retencijski čas (Rt), molekulska masa (Mw), UV max, razmerje $m/z$ (negativni ali pozitivni ionski način) in mase fragmentiranih ionov dobljeni pri LC/MS analizi filtrata odpadnega materiala. V odebeljenem tisku so spojine, ki smo jih že potrdili s HPLC. Ostale spojine se po molekulski masi ujemajo s spojinami iz literature. | 49   |
| <b>Preglednica 19:</b> Spojine najdene v literaturi in njihove molekulske mase ter nekateri UV absorpcijski maksimumi. Vse spojine navedene v preglednici so bile najdene v semenih <i>A.katsumadai</i> .                                                                                                                                                                             | 51   |

## KAZALO SLIK

str.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Model črpalke RND pri po Gramu negativnih bakterijah, ki iznaša antibiotik iz citoplazme ali periplazme. 1 – transporter na notranji membrani, 2 – periplazemski povezovalni protein, 3 – proteinski kanalček na zunanji membrani (Poole, 2008). ....                                                                                                                        | 9  |
| <b>Slika 2:</b> Načini delovanja modulatorjev bakterijske odpornosti. ○ - antibiotik, ☪ - receptor, ▼ - spremenjena tarča, ☐ - izlivna črpalka, ✦ - encim, ☼ - razgrajen antibiotik. A* - spojina, ki inhibira spremenjeno tarčo (npr. inhibicija PBP2a); B* - inhibitor β-laktamaze; C* - spojina, ki poveča prepustnost membrane; D* - inhibitor efluksa (Hemaiswarya in sod., 2008). .... | 13 |
| <b>Slika 3:</b> Diagram poteka priprave in kemijske analize etanolnega izvlečka, eteričnega olja in izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka <i>A. katsumadai</i> . ....                                                                                                                                                                                         | 22 |
| <b>Slika 4:</b> Diagram poteka priprave bakterijske kulture, koncentracij modulatorjev in protimikrobnih snovi, ter izvedbe mikrodilucijske metode. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 23 |
| <b>Slika 5:</b> Deleži spojin v eteričnem olju iz semen <i>A. katsumadai</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 45 |
| <b>Slika 6:</b> Delež identificiranih spojin v gostem ostanku izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji semen. ....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 47 |
| <b>Slika 7:</b> Delež identificiranih spojin v vodni fazi filtrata izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji semen. ....                                                                                                                                                                                                                                                              | 47 |



## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Prikaz rezultatov kemijske analize izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS, s pozitivnim ionskim načinom. Zgoraj levo-kromatogram masnih pikov (base peak); spodaj levo-PDA kromatogram. Desno-masni spektri in UV spekter za primer alpinetina (RT 12,78).

**Priloga B:** Prikaz rezultatov kemijske analize izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS, z negativnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.

**Priloga C:** Prikaz rezultatov kemijske analize filtrata izvlečka odpadnega materiala (vodna faza) z LC-PDA-MS, s pozitivnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.

**Priloga D:** Prikaz rezultatov kemijske analize filtrata izvlečka odpadnega materiala (vodna faza) z LC-PDA-MS, z negativnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.

**Priloga E:** Prikaz določanja MIK žolčnih soli samih in v kombinaciji z izvlečki v subinhibitorni koncentraciji 0,25 MIK na primeru mutante *cmeB* seva *C. jejuni* 11168. Oznaka ŽS pomeni žolčne soli. Rfu pomeni relativne fluorescenčne enote.

**Priloga F:** Strukturne formule nekaterih spojin izoliranih iz semen *A. katsumadai* (Xiao in sod., 2011; Gröblacher in sod., 2012).

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                     |                                                                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABC                 | angl. ATP binding cassette (ATP-vezavna kaseta)                                                       |
| ACN                 | acetonitril                                                                                           |
| AHB                 | gojišče Abeyta-Hunt Bark                                                                              |
| <i>A.katsumadai</i> | <i>Alpinia katsumadai</i>                                                                             |
| ATP                 | adenozin trifosfat                                                                                    |
| CA-MRSA             | angl. community-associated MRSA (okužbe z MRSA pridobljene v domačem okolju)                          |
| <i>C. jejuni</i>    | <i>Campylobacter jejuni</i>                                                                           |
| CDT                 | citoletalni toksin (angl. cytolethal distending toxin)                                                |
| dH <sub>2</sub> O   | destilirana voda                                                                                      |
| DMSO                | dimetilsulfoksid                                                                                      |
| EI                  | etanolni izvleček                                                                                     |
| EO                  | eterično olje iz semen                                                                                |
| EOI                 | eterično olje iz etanolnega izvlečka                                                                  |
| FK                  | fluorokinoloni                                                                                        |
| GC/MS               | plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo                                              |
| HA-MRSA             | angl. healthcare-acquired MRSA (okužbe z MRSA iz bolnišničnega okolja)                                |
| HPLC                | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti                                                          |
| LA-MRSA             | angl. livestock-associated MRSA (MRSA, ki se pojavlja pri živalih namenjenih za prehrano)             |
| LC/MS               | tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo                                           |
| MATE                | angl. multidrug and toxic compound extrusion                                                          |
| MF                  | modulatorni faktor                                                                                    |
| MFS                 | angl. major facilitator superfamily                                                                   |
| MHA                 | gojišče Mueller Hinton agar                                                                           |
| MHB                 | gojišče Mueller Hinton bujon                                                                          |
| MIK                 | minimalna inhibitorna koncentracija                                                                   |
| MRSA                | <i>Staphylococcus aureus</i> odporen proti meticilinu (angl. methicillin resistant <i>S. aureus</i> ) |
| MSSA                | <i>Staphylococcus aureus</i> občutljiv na meticilin (angl. methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> ) |
| MTT                 | metil tiazolil tetrazolijeva sol                                                                      |
| NaCl                | natrijev klorid                                                                                       |
| NaOH                | natrijev hidroksid                                                                                    |
| OM                  | odpadni material                                                                                      |
| PAβN                | fenilalanin-arginin β-naftilamid                                                                      |
| PDA                 | fotodiodni detektor (angl. photodiode array detector)                                                 |
| QAC                 | kvarterne amonijeve spojine (angl. quaternary ammonium compounds)                                     |
| Ri                  | retencijski indeks                                                                                    |
| RND                 | angl. resistance nodulation division                                                                  |
| Rt                  | retencijski čas                                                                                       |
| <i>S. aureus</i>    | <i>Staphylococcus aureus</i>                                                                          |
| SMR                 | angl. small multidrug resistance                                                                      |
| TTC                 | 2, 3, 5-trifenil-tetrazolijev klorid                                                                  |
| ZIČ                 | zaviralci izlivnih črpalk                                                                             |
| ŽS                  | žolčne soli                                                                                           |

## 1 UVOD

V zadnjih desetletjih je fenomen bakterijske odpornosti deležen precejšnjega zanimanja. Zaradi številnih mehanizmov odpornosti, ki so jih razvile patogene bakterije, je delovanje različnih protimikrobnih snovi postalo neučinkovito. Poleg sposobnosti prilagoditve na nekatera biocidna sredstva in druge spojine (Russell, 2004) je danes najbolj zaskrbljujoča odpornost proti antibiotikom. Njihova prekomerna in pogostokrat neustrezna uporaba je vzrok za vse večji pojav in širjenje odpornih bakterijskih sevov, kar vodi v neuspešno zdravljenje bakterijskih okužb. Med tovrstne povzročitelje spadajo tudi bakterije rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*.

Vrste rodu *Campylobacter* so po Gramu negativne bakterije, od katerih je *Campylobacter jejuni* znan kot glavni povzročitelj bakterijskih gastroenteritisov pri človeku. Do okužbe pride preko kontaminirane hrane in vode, najpogosteje zaradi neposrednega zaužitja ali kontakta živil s toplotno neustrezno obdelano perutnino. Za zdravljenje hujših oblik okužb se uporablja makrolidne antibiotike (eritromicin) ali fluorokinolone (ciprofloksacin), vendar naraščajoča incidenca sevov odpornih proti tovrstnim antibiotikom predstavlja velik problem (Luangtongkum in sod., 2009).

Stafilokoki so po Gramu pozitivne bakterije, med katerimi je *Staphylococcus aureus* glavni povzročitelj bolnišničnih okužb. Povzroča tudi okužbe v zaprtih skupnostih ljudi in okužbe, ki se prenašajo s hrano. Posledice so različne, od blagih do resnejših oblik bolezni, ki se lahko končajo tudi s smrtjo. Danes vzbujajo skrb predvsem proti meticilinu odporni *S. aureus* (MRSA) in hkrati nenehen pojav novih odpornih izolatov, sposobnih hitrega razvoja odpornosti tudi proti novjšim antibiotikom na tržišču (Lowy, 2003).

Eden od mehanizmov odpornosti, tako pri kampilobaktrijah kot tudi stafilokokih, so membranske izlivne črpalke. Te so sposobne iz bakterijske celice izločati kemično in strukturno nesorodne spojine, med katere sodijo različni antibiotiki (Gröblacher in sod., 2012), ter prav tako nekatera dezinfekcijska sredstva, barvila in žolčne soli. Zato so raziskave usmerjene v iskanje zaviralcev izlivnih črpalk (ZIČ), ki zavrejo ali celo preprečijo izločanje in tako povečajo koncentracijo protimikrobne snovi v bakterijski celici. Nekatere rastline so pomemben naravni vir tovrstnih spojin (Stavri in sod., 2007), ki lahko delujejo kot modulatorji bakterijske odpornosti in povzročijo znižanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) protimikrobnega sredstva (Gröblacher in sod., 2012). Ker razvoj novih protimikrobnih snovi, predvsem antibiotikov, težko dohiteva naraščanje števila odpornih bakterijskih sevov, se zadnja leta išče in preučuje ZIČ, ki bi tako omogočili ponovno delovanje nekoč učinkovitih antibiotikov. Predmet zanimanja pri odkrivanju naravnih ZIČ so predvsem izvlečki medicinsko pomembnih rastlin (Garvey in sod., 2010). Mednje spada tudi *Alpinia katsumadai*, katero uporabljajo v kitajski tradicionalni medicini za zdravljenje želodčnih težav in bruhanja (Lee in sod., 2003).

Vsebuje številne spojine s protimikrobno, antioksidativno, protivnetno in protivirusno aktivnostjo. Spojine iz izvlečkov semen *A. katsumadai* so se že izkazale kot potencialni ZIČ pri bakterijah *Mycobacterium smegmatis* (Gröblacher in sod., 2012) in *Campylobacter jejuni* (Klančnik in sod., 2012a).

## 1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE

- Priprava etanolnega izvlečka, eteričnega olja in izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji olja iz etanolnega izvlečka semen rastline *A. katsumadai*.
- Določiti modulatorno delovanje rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*. Določiti in primerjati MIK izbranih protimikrobnih snovi (antibiotikov – ciprofloksacina, eritromicina; razkužila triklosana; žolčnih soli; etidijevega bromida) z MIK teh protimikrobnih snovi v kombinaciji s pripravki iz semen *A. katsumadai*.
- Primerjati učinkovitost delovanja modulatorjev proti po Gramu pozitivnim (*Staphylococcus*) in po Gramu negativnim bakterijam (*Campylobacter*).
- Primerjati učinkovitost delovanja modulatorjev glede na vsebnost fenolnih spojin.
- Primerjati učinkovitost delovanja modulatorjev proti izbranim večkratno odpornim sevom in občutljivim sevom.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Rastlinski pripravki iz semen *A. katsumadai* so bogati s fenolnimi in terpenoidnimi spojinami ter delujejo kot modulatorji odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* in *Staphylococcus*;
- Omenjeni pripravki so potencialni zaviralci izlivnih črpalk. Pričakujemo, da bodo povečali protimikrobno učinkovitost tistih antibiotikov in razkužil, pri katerih so izlivni membranski proteini vpleteni v razvoj bakterijske odpornosti proti tem snovem;
- Modulatorno delovanje je odvisno od vsebnosti in sestave fenolnih spojin v preiskovanem etanolnem izvlečku, eteričnem olju ali izvlečku odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka iz semen *A. katsumadai*;
- Pričakujemo, da je modulatorni učinek pripravkov pogojen z vrsto tarčnega mikroorganizma, ne pa z njegovo odpornostjo proti drugim protimikrobnim snovem.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 UPORABA PROTIMIKROBNIH SNOVI IN RAZVOJ ODPORNOSTI PRI BAKTERIJAH

Ljudje so že stoletja in celo tisočletja uporabljali različne snovi s protimikrobnim delovanjem, čeprav se še niso zavedali prisotnosti mikroorganizmov. Danes je na razpolago precejšen nabor naravnih in sintetičnih protimikrobnih snovi, katerih namen je uničenje ali zaviranje rasti mikroorganizmov. Poleg antibiotikov, ki se jih uporablja v medicini in veterini, se biocide kot dezinfekcijska sredstva, antiseptike in konzervanse uporablja v različne namene. Raziskave so usmerjene tudi v iskanje naravnih protimikrobnih učinkovin iz rastlinskih izvlečkov, ki bi nadomestile sintetične.

Po začetku uporabe antibiotika penicilina l. 1946 se je začelo revolucionarno obdobje zdravljenja bakterijskih okužb in razvoja novih antibiotikov. Sprva je sicer kazalo, da je bitka proti patogenim bakterijam dobljena, vendar so se že takoj po uvedbi penicilina pojavili prvi odporni sevi stafilokokov. Po vsakem začetku uporabe drugih novejših antibiotikov so zabeležili prisotnost odpornih bakterijskih sevov še pri ostalih bakterijskih vrstah. Razširjena uporaba antibiotikov je povzročila pojav odpornih patogenih bakterij, ki se danes hitro širijo predvsem v zdravstvenih ustanovah (Kumar in Schweizer, 2005), najdemo pa jih tudi v domačem okolju, v vodi, na živilih in v okolju, kjer se obdeluje ali predeluje živila (Smole Možina in sod., 2011; Ortega Morente in sod., 2013). Poleg široke uporabe antibiotikov, ne le v medicini, je vzrok za širjenje odpornosti tudi splošna globalizacija, porast regionalnih in mednarodnih potovanj ljudi, svetovna trgovina s hrano in surovinami, kar omogoča lažji prenos odpornih sevov na druga geografska območja. V začetku 21. stoletja so pri nekaterih izolatih zabeležili odpornost proti že vsem razredom antibiotikov (Harbarth in Samore, 2005).

Čeprav je trenutno najbolj zaskrbljujoča odpornost proti antibiotikom, je aktualen tudi pojav bakterijske tolerance na biocide. Splošna in včasih tudi neustrezna uporaba številnih antiseptikov, dezinfekcijskih sredstev in konzervansov predstavlja zaskrbljujoč dejavnik za selekcijo odpornih bakterijskih sevov in širjenje odpornosti (Ortega Morente in sod., 2013). Patogeni mikroorganizmi so lahko pogosto izpostavljeni sub-inhibitornim koncentracijam biocidov, kar vodi v razvoj zmanjšane občutljivosti (Huet in sod., 2008). Odpornost proti triklosanu je trenutno najbolj preučen primer mehanizma odpornosti pri biocidih (Chapman, 2003). Skrb vzbujajoča je možna povezava med toleranco na biocide in odpornostjo proti antibiotikom. Bakterijske izolate s toleranco na določena dezinfekcijska sredstva in hkrati z zmanjšano občutljivostjo za nekatere antibiotike so našli tudi v prehranski verigi (Ortega Morente in sod., 2013; Mavri in sod., 2014). Podobno se je izkazalo po izpostavitvi bakterijskih sevov naraščajoči koncentraciji izbranih razkužil (Mavri in Smole Možina, 2013).

## 2.2 MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJ

Bakterije so razvile številne mehanizme odpornosti, ki so z naraščanjem uporabe antibiotikov postajali vedno bolj zapleteni (Tenover, 2006). Kljub velikemu napredku v razumevanju molekularnega delovanja mehanizmov odpornosti, bakterije postajajo še naprej vse bolj odporne (Lowy, 2003). Njihova odpornost je lahko intrinzična ali pridobljena. V prvem primeru imajo nekatere vrste bakterij že po naravi sposobnost, da se izognejo delovanju protimikrobnih snovi. Tako so npr. po Gramu negativne bakterije zaradi svoje zunanje membrane, ki omejuje prehod protimikrobnih snovi v celico, odpornejše od po Gramu pozitivnih bakterij. Pri pridobljeni odpornosti predhodno občutljive bakterije postanejo odporne, zaradi novonastalih mutacij ali pridobitve genov za odpornost. Genetski zapisi za odpornost se nahajajo na kromosomu ali na plazmidih (R plazmidi) in se iz odpornih sevov na občutljive prenašajo s konjugacijo, transformacijo ali transdukcijo. Posledično pride do razvoja naslednjih mehanizmov odpornosti (Madigan in Martinko, 2006):

- sprememba ali izguba tarčnega mesta,
- sinteza encimov za razgradnjo ali inaktivacijo protimikrobnih snovi,
- zmanjšana prepustnost za protimikrobno snov v celico oz. onemogočen dostop protimikrobnega sredstva do tarče,
- sinteza črpalk za izločanje protimikrobne snovi iz celice,
- razvoj biokemijske poti za odpornost.

Za večino mehanizmov odpornosti je značilno, da so specifični za posamezen antibiotik ali razred antibiotikov. Številni sistemi izlivnih črpalk pa so za razliko od drugih mehanizmov nespecifični, saj preprečujejo delovanje različnih vrst protimikrobnih snovi na bakterijsko celico. Razumevanje mehanizmov odpornosti je bistvenega pomena za načrtovanje novih strategij preprečevanja odpornosti.

### 2.2.1 Membranske izlivne črpalke (efluks)

Sistem izlivnih črpalk je bil kot eden od mehanizmov odpornosti prvič opisan v poznih 70. letih 20. stoletja, na primeru efluksa tetraciklina pri bakteriji *Escherichia coli*. Od takrat dalje so pri številnih bakterijah poročali o vpletenosti črpalk v razvoj odpornosti proti mnogim protimikrobnim snovem, vključno z antibiotiki, biocidi in drugimi spojinami (Kumar in Schweizer, 2005; Poole, 2007). Danes so sistemi efluksa pomembna determinanta odpornosti pri bakterijskih patogenih, katerim omogočajo preživetje v okolju s prisotnimi škodljivimi snovmi. Lahko so specifični za določen antibiotik ali razred antibiotikov, medtem ko jih je veliko sposobnih izločati širok nabor kemijsko in strukturno nesorodnih protimikrobnih snovi, kar prispeva k intrinzični ali pridobljeni obliki večkratne odpornosti (Kumar in Schweizer, 2005). S tem je onemogočeno kopičenje protimikrobnih

snovi v celici, ki posledično ne morejo dostopati do tarče. V primerjavi s substratno specifičnimi črpalkami, katerih zapisi se prenašajo na mobilnih genetskih elementih, so izlivne črpalke za iznos raznolikih spojin, običajno kodirane na kromosomu. Ti kromosomski geni se lahko konstitutivno izražajo, lahko je njihovo izražanje posledica nastale mutacije, izražajo se tudi v določenem stanju rasti (npr. biofilm) ali kot odziv na prisotnost določenih substratov ter specifičnih rastnih pogojev (npr. prisotnost žolčnih soli) (Poole, 2005; 2012). Sistemi, specifični za efluks antibiotikov, morebiti izhajajo iz znanih proizvajalcev antibiotikov, *Streptomyces* spp., ki tovrstni mehanizem izkoriščajo za obrambo pred lastnimi antibiotiki. Nasprotno pa nespecifične črpalke prvotno najverjetneje niso bile namenjene izločanju antibiotikov, ampak so sodelovale pri drugih vlogah iznašanja iz bakterijskih celic (Poole, 2005; 2008). Izlivne črpalke delimo v pet glavnih družin:

1. superdružina MF (angl. major facilitator superfamily MFS),
2. družina adenzin trifosfat (ATP)-vezavnih kaset (družina ABC),
3. družina RND (angl. resistance-nodulation-division),
4. družina SMR (angl. small multidrug resistance),
5. družina MATE (angl. multidrug and toxic compound extrusion).

Črpalke so lahko sestavljene iz enega samega proteina ali pa jih sestavlja več komponent. Nahajajo se na citoplazemski membrani po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij. Pri slednjih obstajajo tudi kompleksnejše oblike črpalk iz družine RND, ki segajo skozi celoten ovoj bakterije (od citoplazemske membrane do zunanje membrane). Tovrstna oblika transporta je energetsko odvisna, pri čemer gre za antiport protimikrobne snovi in iona ( $H^+$  ali  $Na^+$ ), razen v primeru družine ABC, kjer pri transportu sodeluje ATP (Poole, 2012).

Večina izlivnih črpalk pri po Gramu pozitivnih bakterijah izhaja iz družine MF, nekaj pa je tudi predstavnikov družin ABC, SRF in MATE. Pri po Gramu negativnih bakterijah najdemo predstavnike vseh petih družin črpalk, od katerih so najpomembnejše in najbolj razširjene črpalke iz družine RND. Slednje so sposobne izločanja širokega nabora protimikrobnih snovi iz celic, zaradi česar so vzrok za večkratno odpornost pri klinično pomembnih izolatih po Gramu negativnih bakterij (Poole, 2012). Danes je vpletenost izlivnih črpalk eden od glavnih razlogov za neučinkovito delovanje mnogih antibiotikov ali skupin antibiotikov. Prav tako tovrstni mehanizem prispeva k odpornosti proti biocidom (QAC, klorheksidin, triklosan) ter izloča tudi druga barvila, detergente in organska topila (Kumar in Schweizer, 2005). Z intenzivnim preučevanjem strukture in funkcije bakterijskih efluksnih sistemov se odpirajo možnosti za razvoj novih zdravil, ki bi se izognile efluksu ali bi z zaviralci izlivnih črpalk preprečili izločanje protimikrobnih sredstev ter s tem uspeli uničiti odporne patogene bakterije.

## 2.3 BAKTERIJSKI ROD *Campylobacter*

Preden je bil leta 1963 predlagan rod *Campylobacter*, ki se je bolj uveljavil šele po obširnejši taksonomski študiji l. 1973, so predstavnike tega rodu uvrščali med *Vibrio* spp. Kasneje so na podlagi naprednejših metod razvrščanja še natančneje prerazporedili vrste v rodove, rod *Campylobacter* pa so umestili v razred  $\epsilon$ -proteobakterij ter v družino *Campylobacteriaceae* (On, 2001). Danes je v omenjeni rod uvrščenih 24 vrst bakterij (On, 2013), od katerih sta vrsti *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* odgovorni za največ primerov (več kot 90 %) kampilobakterioz pri človeku (Dasti in sod., 2010).

Kampilobaktri so po Gramu negativni, ukrivljeni do spiralno zaviti bacili, ki se gibljejo s pomočjo enega ali dveh polarnih bičkov. V primerjavi z drugimi bakterijami, ki povzročajo okužbe s hrano, so dokaj občutljivi na okoljske stresne dejavnike in zahtevajo določene rastne pogoje. Med obdelavo in shranjevanjem živil se posledično ne razmnožujejo. Ker gre za mikroaerofilne in termofilne mikroorganizme, za optimalno rast potrebujejo atmosfero s 5 % kisika, 85 % dušika in 10 % ogljikovega dioksida ter temperaturo med 37 °C in 42 °C. Pri višjih temperaturah, ki jih dosežemo med pripravo hrane ali pasterizacijo, kampilobaktri ne preživijo. Prav tako ne preživijo pri koncentraciji NaCl, višji od 2 %. Občutljivi so tudi na izsušitev, osmotski stres in prezračevanje (Ganan in sod., 2012).

### 2.3.1 Vrste *Campylobacter* kot povzročitelji okužb s hrano

Kampilobaktri veljajo v industrializiranih državah za glavne povzročitelje bakterijskih okužb, ki se prenašajo s hrano. Med njimi je *C. jejuni* najpogostejši vzrok bakterijskih gastroenteritisov pri človeku, od ostalih vrst pa mu sledi *C. coli* (Dasti in sod., 2010). V Evropski Uniji so kampilobakterioze z več kot 220.000 primeri na leto na prvem mestu okužb s hrano, čeprav naj bi dejansko število primerov znašalo okoli devet milijonov (EFSA, 2013a; 2013b).

Naravni rezervoarji teh zoonotskih mikroorganizmov so domače in divje živali, predvsem perutnina ter druge divje ptice, pri katerih se kampilobaktri kot komenzali nahajajo v njihovem črevesju. Prevalenca kampilobaktrov v živalih, namenjenih za hrano ljudi, bi naj presegala 80 % (Horrocks in sod., 2009). *C. jejuni* najpogosteje kolonizira slepo in debelo črevo piščancev, redkeje še črevo puranov in rac. Črevesje piščancev zaradi mikroaerofilnih pogojev in temperature okoli 41 °C predstavlja ugodno okolje za preživetje in razmnoževanje kampilobaktrov (Dasti in sod., 2010), od koder se bakterije med zakolom prenesejo na meso in kožo. Človek se okuži z zaužitjem kontaminiranega piščančjega mesa, ki ni bilo dovolj termično obdelano ali z morebitno navzkrižno kontaminacijo drugih živil, ki so bila v kontaktu s tako perutnino. Prav tako lahko pride do okužbe preko kontakta z živino in zaužitja kontaminirane govedine ter mleka. Drugi manj verjetni viri okužbe so ovce, divje ptice, kontaminirana voda ali hišni ljubljenci (Dasti in



sod., 2010; Wilson in sod., 2008). Okužijo se lahko pripadniki vseh starostnih skupin, pogostejše otroci ter mlajši odrasli. Infektivna doza je nizka in znaša od 500 do 800 bakterijskih celic (Black in sod., 1988, cit. po Ligowska, 2011). Po zaužitju in vstopu v prebavni trakt človeka *Campylobacter* kolonizira tanko črevo ter debelo črevo, kjer se po prodoru skozi sluz veže na epiteljske celice ter vanje tudi vstopa. Bakterije se na epiteljske celice vežejo z adhezijskimi faktorji, nekatere pa nato prodrejo še v samo celico. Pomemben virulenčni dejavnik pri številnih vrstah kampilobaktrov je citoletalni toksin CDT (ang. cytolethal distending toxin), ki povzroči zaustavitev celičnega cikla, kar vodi v napihovanje in apoptozo gostiteljevih celic. Toksin vpliva tudi na gostiteljev imunski odgovor, saj izzove vnetje črevesnih celic (Dasti in sod., 2010).

V številnih primerih poteka okužba brez bolezenskih znakov, medtem ko se pri simptomatskih primerih bolezni kaže s povišano telesno temperaturo, slabostjo, bruhanjem, glavobolom in značilno vodeno ali krvavo diarejo z bolečinami v trebuhu, ki traja tri do sedem dni. Kampilobakterioza je običajno blaga in mine sama od sebe, zato pogosto ni diagnosticirana. Resnejši primeri so redki, kjer lahko pride do dehidracije, za kar je potrebno bolnišnično zdravljenje. Pri imunsko oslabeledih bolnikih lahko bakterije vstopijo v krvni obtok in povzročijo sepsa. Tovrstne hujše primere se zdravi z antibiotiki, od katerih se najpogosteje uporabljata eritromicin iz skupine makrolidov ali ciprofloksacin iz skupine fluorokinolonov (FK). Kot alternativno izbiro se pri sistemskih okužbah uporabljata še tetraciklin in gentamicin (Luangtongkum in sod., 2009). Kampilobakterioza predstavlja tudi tveganje za kasnejši pojav vnetne črevesne bolezni, reaktivnega artritisa ali sindroma Guillain-Barré (Dasti in sod., 2010).

### **2.3.2 Odpornost proti antibiotikom in drugim protimikrobnim snovem pri bakterijah rodu *Campylobacter***

Med sevi kampilobaktrov v zadnjih 20 letih vse bolj narašča odpornost proti klinično pomembnim antibiotikom, kar predstavlja grožnjo učinkovitemu zdravljenju resnejših okužb. Dejstvo, da so kampilobaktri izpostavljeni antibiotikom tako v živinoreji, kot tudi med zdravljenjem ljudi, predstavlja večjo možnost za razvoj in prenos odpornih bakterijskih sevov (Luangtongkum in sod., 2009). Poleg tega je zaskrbljujoč porast večkratno odpornih sevov v prehranski verigi, ki so odporni proti dvema ali več različnim antibiotikom in tudi drugim protimikrobnim snovem, npr. žolčnim solem in biocidom (Smole Možina in sod., 2011). Danes med sevi kampilobaktrov prevladuje odpornost proti FK. Odstotek sevov odpornih proti makrolidom je nižji, vendar opazno višji pri vrstah *C. coli*, kot pa pri *C. jejuni*. Po podatkih iz leta 2010 je v članicah EU največji delež izolatov odpornih proti ciprofloksacinu, medtem ko je odpornost proti eritromicinu nizka (od 1,7-2 % pri *C. jejuni* ter od 11-25 % pri *C. coli*). Visok delež odpornosti je opazen tudi proti nalidiksični kislini, tetraciklinu in ampicilinu (EFSA/ECDC, 2012). Odpornost proti antibiotikom je v veliki meri posledica mutacij v specifičnih genih in delovanja izlivnih

črpalk. Slednje so predvsem pri večkratno odpornih bakterijah vpletene pri iznosu tudi drugih, za celico toksičnih snovi. Nedavno so pri kampilobaktrih opisali tudi zmanjšano občutljivost na biocide, ki je kljub kompleksni sestavi razkužil, posledica sprememb v prepustnosti membrane in aktivnega efluksa. Oba mehanizma sta poleg tolerance na biocide vpletena tudi pri pojavu zmanjšane občutljivosti na antibiotike, po postopni izpostavitvi sub-inhibitornim koncentracijam biocidov (Mavri in Smole Možina, 2013; Mavri in sod., 2014).

#### 2.3.2.1 Mehanizmi odpornosti proti fluorokinolonom

Eden od vzrokov za odpornost proti FK so spontane točkovne mutacije v genu za DNK girazo A (*gyrA*), natančneje, v regiji za kinolonsko odpornost. Pri kampilobaktrih že ena sama mutacija zadostuje za pojav zmanjšane občutljivosti na FK. Mehanizem, ki prav tako prispeva k odpornosti proti FK, so izlivne črpalke (CmeABC), sposobne izločanja različnih protimikrobnih snovi iz celice. Mutacije v *gyrA* in izlivne črpalke lahko delujejo sinergistično, kar poveča pojav odpornih sevov. Odporne mutante se v večji populaciji bakterij ( $>10^6$ ) pojavijo ob izpostavitvi FK antibiotikom. Pri piščancih, okuženih z občutljivimi sevi *C. jejuni*, so se kmalu po začetku zdravljenja s FK pojavile odporne mutante. Zdravljenje s FK namreč omogoči selekcijo spontano nastalih odpornih mutant. FDA je zato l. 2005 v ZDA prepovedala uporabo FK pri piščancih (Luangtongkum in sod., 2009).

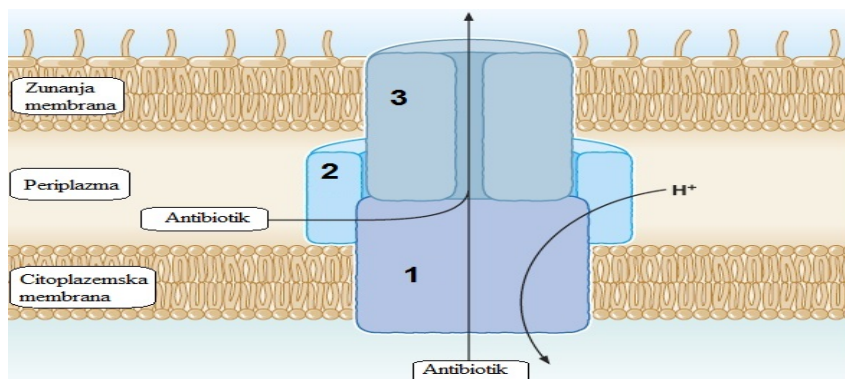
#### 2.3.2.2 Mehanizmi odpornosti proti makrolidom

Pri kampilobaktrih je odpornosti proti makrolidom posledica sprememb v ribosomskih tarčah in delovanja izlivnih črpalk. Ribosomske tarče (podenota 23S rRNA in ribosomska proteina L4 ter L22) se spremenijo zaradi spontano nastalih točkovnih mutacij. Med zdravljenjem s tovrstnimi antibiotiki se odporne mutante ne pojavijo tako hitro kot pri FK, ampak je zato potrebna neprestana, dlje časa trajajoča izpostavitvev. Frekvenca mutacij za odpornost proti makrolidom je v primerjavi s FK nižja. Aktivno izločanje makrolidov s pomočjo izlivnih črpalk je prav tako izrednega pomena pri odpornih izolatih, ki lahko deluje sinergistično z mutacijami v tarčah (Luangtongkum in sod., 2009).

### 2.3.3 Pomen membranskih izlivnih črpalk

O vpletenosti efluksa pri *C. jejuni* so leta 1995 prvič poročali Charvalos in sodelavci. Sekvenca genoma *C. jejuni* 11168 je leta 2000 tudi razkrila prisotnost genov, ki so homologni genom za izlivne črpalke iz drugih bakterij. Tako naj bi *C. jejuni* domnevno vseboval 14 izlivnih črpalk iz različnih družin (Zhang in Plummer, 2008). Do sedaj sta bili kot poglavitni izlivni črpalke odkriti in natančneje raziskani CmeABC ter CmeDEF. Obe spadata v družino RND črpalk, ki so najpomembnejši sistemi za efluks pri po Gramu

negativnih bakterijah. Gre za kompleksne tridelne sisteme, sestavljene iz proteina na citoplazemski membrani, ki zagotavlja energijo za transport, proteinskega kanalčka na zunanji membrani, ki iznaša snovi iz celice in vmesnega periplazemskega povezovalnega proteina, ki stabilizira črpalko (slika 1) (Misra in Bavro, 2009). Njihov genetski zapis se običajno nahaja na kromosomu, kot operon iz treh genov, katerega izražanje kontrolirajo regulatorni proteini. Mutacije v tovrstnih genih vodijo v prekomerno izražanje izlivnih črpalk in s tem pojav odpornosti. Te večproteinske črpalke iznašajo iz bakterijskih celic najrazličnejše substrate, kot so antibiotiki, barvila, detergenti, gostiteljeve molekule (žolčne soli) in težke kovine (Blair in Piddock, 2009). Znano je, da so poleg omenjenih dveh črpalk pri bakterijah *Campylobacter* prisotne tudi številne druge domnevne črpalke, katerih delovanje je v večini še nepojasnjeno (Akiba in sod., 2006). Po ugotovitvah Akiba in sod. (2006) obstajajo med obema znanima črpalkama ter med preostalimi še neraziskanimi efluksnimi sistemi kompleksne medsebojne povezave, ki sodelujejo pri nastanku odpornosti.



**Slika 1:** Model črpalke RND pri po Gramu negativnih bakterijah, ki iznaša antibiotik iz citoplazme ali periplazme. 1 – transporter na notranji membrani, 2 – periplazemski povezovalni protein, 3 – proteinski kanalček na zunanji membrani (Poole, 2008).

#### 2.3.3.1 Izlivna črpalka CmeABC

Lin in sod. so leta 2002 pri *C. jejuni* prvič okarakterizirali izlivno črpalko CmeABC, ki sodeluje pri večkratni odpornosti. Črpalko sestavljajo trije deli, in sicer periplazemski povezovalni protein CmeA, transporter na notranji membrani CmeB in proteinski kanalček na zunanji membrani CmeC. Hkrati so z insercijsko mutagenozo v genu *cmeB* in z inhibicijo črpalke onemogočili njeno normalno delovanje, kar je povzročilo povečano občutljivost *C. jejuni* na različne vrste antibiotikov ter tudi povečano akumulacijo protimikrobnih snovi v celici. Črpalka CmeABC je razširjena med različnimi sevi bakterij *Campylobacter*, kjer se izraža konstitutivno. Tako igra pomembno vlogo pri odpornosti kampilobaktrov proti fluorokinolonom, makrolidom, žolčnim solem in drugim protimikrobnim snovem. Odpornost proti žolčnim solem je pri bakterijah ključnega pomena, da preživijo v črevesnem okolju. Žolčne soli, ki se nahajajo v črevesju živali in ljudi, so podobne detergentom. Delujejo baktericidno na bakterijske celice tako, da uničijo

njihov membranski lipidni dvosloj. Izločanje žolčnih soli iz celice s pomočjo CmeABC pripomore k uspešni kolonizaciji kampilobaktrov v črevesju, saj mutante v genu *cmeB* niso sposobne preživeti v črevesju piščancev (Lin in sod., 2002, 2005a). Izražanje črpalke je regulirano s transkripcijskim represorjem CmeR, ki spada v družino TetR transkripcijskih regulatorjev. Njegov zapis (*cmeR*) se nahaja navzgor od *cmeABC*, med njima pa je promotor za *cmeABC*. CmeR z vezavo na promotor prepreči transkripcijo genov za črpalko (Lin in sod., 2005b). Inaktivacija *cmeR* tako vodi v povečano izražanje *cmeABC* in razvoj odpornosti. N-terminalna domena regulatorja vsebuje motiv za vezavo na DNK, medtem ko C-terminalna domena vsebuje edinstvene sekvence in se najverjetneje veže na ligande za indukcijo. Primer takih ligandov so žolčne soli, ki preprečijo vezavo CmeR na promotor in omogočijo izražanje *cmeABC* (Su in sod., 2007).

#### 2.3.3.2 Izlivna črpalka CmeDEF

Izlivno črpalko CmeDEF sestavljajo proteini CmeD, CmeE in CmeF, ki so tako kot proteini črpalke CmeABC nameščeni na obeh membranah in v periplazmi. Čeprav tudi CmeDEF prispeva k intrinzični odpornosti pri *C. jejuni*, je v primerjavi s CmeABC njen nivo izražanja nizek, kar je razlog za zmerno vlogo te črpalke pri odpornosti proti različnim protimikrobnim in toksičnim snovem. Njeno delovanje naj bi zakrivala aktivnost prevladujoče črpalke CmeABC, zato CmeDEF najverjetneje deluje kot sekundarni mehanizem za efluks, ki se morebiti odziva predvsem ob določenih pogojih. Do sedaj še ni bil odkrit regulator, ki uravnava izražanje črpalke CmeDEF. Zanimiva je ugotovitev, da se pri nekaterih sevih ob inaktivaciji gena *cmeF* odpornost proti številnim testiranim substancam poveča. Slednje nakazuje na povečano delovanje drugih efluksnih sistemov v primeru nedelovanja CmeDEF, med drugim se v manjši meri poveča tudi izražanje *cmeABC*. Delovanje črpalke CmeDEF je najverjetneje povezano s preostalimi efluksnimi sistemi, vključno s črpalko CmeABC. Skupaj z omenjeno črpalko omogoča CmeDEF tudi prilagoditev kampilobaktrov na prisotnost žolčnih soli in drugih detergentov v njihovem naravnem okolju. Obenem je aktivnost vsaj ene od obeh znanih črpalk nujna za vzdrževanje optimalne celične viabilnosti pri *C. jejuni* (Akiba in sod., 2006).

## 2.4 BAKTERIJSKI ROD *Staphylococcus*

Rod uvrščamo v družino *Staphylococcaceae*, ki sodi med firmikute oz. po Gramu pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo gvanina in citozina. Do sedaj je v rod uvrščenih 49 vrst bakterij z nekaj podvrstami (DSMZ, 2014). Vrste so ločene v skupini koagulaza-negativnih in koagulaza-pozitivnih stafilokokov, na podlagi vsebnosti encima koagulaze, ki zlepi krvno plazmo. Najpomembnejši povzročitelj različnih oblik okužb pri človeku je *Staphylococcus aureus* iz skupine koagulaza pozitivnih stafilokokov. Predstavniki tega rodu so negibljivi in ne tvorijo spor, njihove okrogle celice se lahko pojavljajo kot

posamezne celice, v parih, tetradah, nepravilnih grozdastih skupkih in občasno v kratkih verigah (Götz in sod., 2006). Gre za katalaza pozitivne, fakultativno anaerobne bakterije, katerih rast je razen nekaterih izjem najugodnejša v aerobnih razmerah. Rastejo lahko pri koncentraciji NaCl do 15 %, temperaturno območje rasti pa sega od 15 °C do 45 °C (Turnidge in sod., 2008).

#### **2.4.1 *Staphylococcus aureus* kot povzročitelj okužb**

*S. aureus* se kot komenzal nahaja na koži ali v nosni votlini zdravih ljudi, katere obravnavamo kot perzistentne ali občasne nosilce teh bakterij. Okoli 20 % ljudi je dolgotrajno ali celo doživljenjsko koloniziranih na predelu nosne votline, katere sprednji del je značilen primarni habitat *S. aureus* (Weidenmaier in sod., 2012; Zeconni in Scali, 2013). *S. aureus* lahko kot komenzal ne povzroča zdravstvenih težav pri nosilcih, vendar vseeno predstavlja tveganje za razvoj različnih oblik blagih ali resnih okužb, zato je iz tega vidika pomemben patogen pri ljudeh in živalih. Med nabor okužb, ki jih povzroča, sodijo okužbe kože in mehkih tkiv, pljučnica, endokarditis, osteomielitis, mastitis, flebitis, okužbe krvnega obtoka, sindrom toksičnega šoka in okužbe s hrano zaradi enterotoksinov. Potek in izid tovrstnih okužb je različen, kar je posledica kombinacije številnih virulenčnih faktorjev bakterije, mesta okužbe in gostiteljevega imunskega odziva (Zeconni in Scali, 2013). Ker gre za bakterijo, ki se je sposobna prilagoditi na različna okolja in okoljske spremembe, se lahko izogiba gostiteljevemu imunskemu odzivu in je razvila odpornost proti številnim antibiotikom, predstavlja velik problem v humani in veterinarski medicini. Veliko grožnjo predstavljajo zlasti proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* (MRSA), ki so danes odporni proti večini antibiotikov in so odgovorni za hujše primere okužb z zapleti, slabšo prognozo in višjo smrtnostjo. Okužbe z MRSA so najpogostejše v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah (HA-MRSA). Ocenjujejo, da je MRSA vzrok za 171.200 primerov bolnišničnih okužb letno v Evropi, kar znaša 44 % vseh bolnišničnih okužb (Gould in sod., 2012). Poleg tega povzroča MRSA okužbe tudi izven bolnišničnega okolja v skupnostih (CA-MRSA) ali preko stika z živalmi (krave, prašiči), ki so rezervoar za okužbo (LA-MRSA) (Zeconni in Scali, 2013).

Ustrezna antibiotična terapija mora biti skrbno izbrana na podlagi lokalne prevalence in odpornosti MRSA, dejavnikov tveganja in lastnosti posameznega pacienta. Zaradi visoke stopnje odpornosti proti meticilinu med bakterijami *S. aureus* se za začetno terapijo resnejših okužb izbere antibiotike, ki ne sodijo med  $\beta$ -laktame. Običajno je to vankomicin, vendar se glede na MIK antibiotika, obliko okužbe in morebitno predhodno izpostavljenost tej skupini antibiotikov uporablja tudi druge, kot so daptomicin, linezolid, klindamicin, trimetoprim/sulfametoksazol, rifampin, tetracikline, fluorokinolone, makrolide in aminoglikozide. V primeru izolatov, občutljivih na meticilin, so učinkoviti penicilini (Gould in sod., 2012; Winston in Chambers, 2009).

#### **2.4.2 Odpornost proti antibiotikom pri bakteriji *S. aureus***

Odpornost proti številnim antibiotikom pri bakterijah *S. aureus* predstavlja pomembno in skrb vzbujajoče orožje poleg mnogih virulenčnih dejavnikov, s katerimi ogrožajo zdravje ljudi. Število odpornih sevov narašča, problematična pa je njihova izjemna prilagodljivost na antibiotike, ki traja že skozi celotno dobo razvoja antibiotikov. *S. aureus* ima sposobnost hitrega razvoja odpornosti proti vsakemu na novo vpeljanemu antibiotiku pri čemer uporablja različne mehanizme odpornosti. Odpornost je posledica prevzema genov za odpornost ali spontanij mutacij (Pantosti in sod., 2007). Večina bolnišničnih izolatov je odpornih proti penicilinom (MRSA), ki so nekoč bili še učinkoviti. Danes za izolate MRSA velja, da so odporni proti vsem  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Tudi proti vankomicinu, ki je trenutno pogosto prva izbira za zdravljenje, se je razvila odpornost, ki se nevarno širi (VISA, VRSA). Danes je za *S. aureus* značilna odpornost proti skoraj vsem razredom antibiotikov, kar pomeni da kmalu morda ne bo več na voljo učinkovitega antibiotika, saj so nekateri izolati odporni tudi proti več različnim antibiotikom (Lowy, 2003). Večkratna odpornost je pogosta pri sevih MRSA, so pa tudi sevi MSSA odporni proti različnim razredom antibiotikov.

#### **2.4.3 Pomen izlivnih črpalk pri odpornosti bakterije *S. aureus***

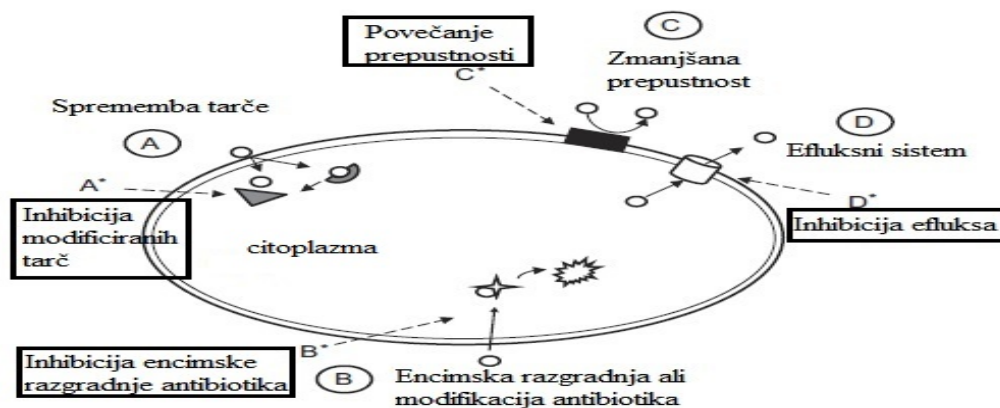
Sekvenca genoma *S. aureus* je razkrila prisotnost vsaj 30 genov za potencialne izlivne črpalke, ki so odgovorne za pojav večkratne odpornosti proti antibiotikom in zmanjšanje občutljivosti na biocide (Kosmidis in sod., 2012). NorA je ena izmed glavnih črpalk pri *S. aureus*, ki je odgovorna za drastično zmanjšanje občutljivosti na fluorokinolone in sodeluje pri večkratni odpornosti. Sodi v družino črpalk MFS, njen genetski zapis pa se nahaja na kromosomu. Od predstavnikov te družine najdemo na kromosomu *S. aureus* tudi črpalko MdeA in nedavno opisane NorB, NorC ter SdrM (Huet in sod., 2008). Na plazmidih sta kodirani še znani črpalke QacA in QacB ter nekatere redke črpalke QacG, QacJ, QacH (Costa in sod., 2010). Iz družine MATE je prisotna črpalka MepA, iz družine SMR pa črpalka Smr. Najdemo tudi gen za strukturno posebno črpalko SepA (Huet in sod., 2008) in za črpalko Tet38. Naštete črpalke izkazujejo različno substratno specifičnost. NorA, NorB in NorC sodelujejo pri odpornosti proti fluorokinolonom in drugim antibiotikom, medtem ko je Tet38 specifična za odpornost proti tetraciklinu (Ding in sod., 2008). Glavni substrat Qac A/B so kvarterne amonijeve spojine, vendar ta črpalka izloča tudi širok spekter drugih spojin, zlasti antiseptikov (Costa in sod., 2010).

### **2.5 MODULATORJI ODPORNOSTI BAKTERIJ**

Že od odkritja antibiotikov dalje se spopadamo s problemom pojava odpornosti pri bakterijah, kar je spodbujalo k iskanju venomer novih učinkovitih protimikrobnih spojin. Čeprav se danes boj z odpornimi patogenimi mikroorganizmi še kar nadaljuje, je v

zadnjem desetletju prišlo v farmacevtskih podjetjih do dramatičnega upada v razvoju novih antibiotikov. S tem se je zanimanje preusmerilo na iskanje spojin z drugačnimi načini delovanja, ki bi povrnilo aktivnost trenutno neučinkovitim antibiotikom in ponovno omogočile njihovo uporabo v terapiji (Garvey in sod., 2011). Take spojine izkazujejo modulatorno aktivnost in lahko na različne načine vplivajo na odpornost bakterij tako, da povečajo aktivnost specifičnih antibiotikov (Gibbons, 2004), spodbujajo odstranitev plazmidov, zavirajo transport preko plazemske membrane in pri tem inhibirajo membranske izlivne črpalke (slika 2) (Coutinho in sod., 2009). Zmanjšanje odpornosti s tovrstnimi snovmi je morda tudi posledica nekaterih strukturnih sprememb v odpornih bakterijah, kar olajša prepustnost antibiotika skozi zunanje plasti celične stene v celico (Hemaiswarya in sod., 2008).

Modulatorji odpornosti so v naravi prisotni kot produkti mnogih rastlin, katerih izvlečke se v zadnjih letih intenzivno preučuje. Poleg protimikrobne učinkovitosti so pri številnih izvlečkih ali njihovih spojinah določili tudi modulatorno delovanje. Spojine z modulatornim delovanjem lahko v kombinaciji z določenim antibiotikom povečajo občutljivost bakterij na ta antibiotik, saj zmanjšajo učinek mehanizmov odpornosti. Posledica tega je znižanje MIK protimikrobnega sredstva, ki tako učinkoviteje zavira ali preprečuje rast bakterij. Ko je učinek kombinacije dveh spojin večji od vsote posameznih učinkov obeh spojin, govorimo o sinergizmu (Palaniappan in Holley, 2010).



**Slika 2:** Načini delovanja modulatorjev bakterijske odpornosti. ○ - antibiotik, ☪ - receptor, ▼ - spremenjena tarča, ☐ - izlivna črpalka, ✨ - encim, ☼ - razgrajen antibiotik. A\* - spojina, ki inhibira spremenjeno tarčo (npr. inhibicija PBP2a); B\* - inhibitor  $\beta$ -laktamaze; C\* - spojina, ki poveča prepustnost membrane; D\* - inhibitor efluksa (Hemaiswarya in sod., 2008).

### 2.5.1 Zaviralci izlivnih črpalk

Membranske izlivne črpalke so zaradi svoje vpletenosti pri izločanju raznolikih spojin pomembna tarča za razvoj ali iskanje novih terapevtskih učinkovin, ki bi preprečevale delovanje teh mehanizmov večkratne odpornosti. Inaktivacija efluksa je možna na različnih nivojih (Pages in Amaral, 2009):

- sprememba v regulaciji izražanja izlivne črpalke (represija izražanja genov),
- onemogočeno sestavljanje komponent v funkcionalno črpalko,
- blokiranje kanalčka na zunanji membrani,
- porušenje energije potrebne za efluks,
- kompetitivna ali ne-kompetitivna inhibicija z molekulo, ki se veže na afinitetna vezavna mesta črpalke namesto protimikrobne snovi,
- kemijska sprememba oblike protimikrobne molekule, ki zmanjša njeno afiniteto za vezavo na prepoznavna mesta črpalke ali blokira efluksni transport.

Modulatorji odpornosti, ki delujejo kot zaviralci efluksnih črpalk, so deležni precejšnje pozornosti. Ob uporabi take pomožne spojine v kombinaciji s protimikrobnim sredstvom, ki je substrat za to črpalko, ZIČ omogoči ponovno kopičenje protimikrobnega sredstva v bakterijski celici in povrne njegovo učinkovitost (Gibbons, 2004). Povišana koncentracija protimikrobne snovi v celici je namreč potrebna za uspešno vezavo na tarčne molekule in s tem baktericidno ali bakteriostatično aktivnost. Okarakteriziranih je bilo že nekaj sintetičnih molekul s funkcijo ZIČ, vendar se jih zaradi toksičnosti in slabe biološke stabilnosti uporablja zgolj v namene raziskav in razvoja njihovih derivatov. Med njimi je pomemben in dobro preučen fenilalanin-arginin- $\beta$ -naftilamin (PA $\beta$ N), ki se ga zaradi njegove učinkovitosti uporablja v mnogih študijah efluksa. Čeprav mehanizem delovanja mnogih ZIČ še ni natančno definiran, za določene molekule velja, da preprečijo efluks protimikrobne snovi tako, da tekmujejo za vezavna mesta na črpalkah in se s tem izločijo namesto protimikrobne molekule (npr. PA $\beta$ N). Črpalka prepozna ZIČ kot svoj substrat in ga aktivno izloča iz celice, medtem ko antibiotik ostane v celici. Pri tem se ZIČ uporabljajo v taki koncentraciji, pri kateri sami ne izkazujejo protimikrobne aktivnosti. Omenjena strategija je deležna posebnega zanimanja za razvoj in identifikacijo novih molekul s tovrstnim načinom delovanja (Pages in Amaral, 2009).

Pri ugotavljanju tarč delovanja ZIČ se je potrebno zavedati, da posamezne bakterije vsebujejo več različnih izlivnih črpalk in da je celoten efluks posledica delovanja več aktivnih transporterjev (Stavri in sod., 2007). Inaktivacija ali izbris poglavitne izlivne črpalke lahko vpliva na izražanje preostalih prisotnih črpalk, ki prevzamejo funkcijo izločanja. Ob dodatku ZIČ, ki specifično zavre glavno črpalko, tako ni nujno, da bo prišlo do uspešnega zavrtja efluksa (Pages in Amaral, 2009). Zato je potreben natančen vpogled v interakcije in regulacijo efluksnih sistemov.

Rastline so pomembne proizvajalke številnih spojin s protimikrobno aktivnostjo, zato je trenutno veliko študij usmerjenih v iskanje naravnih ZIČ. Tegos in sod. (2002) so prišli do ugotovitve, da se prvotno šibka aktivnost rastlinskih protimikrobnih spojin izrazito poveča ob prisotnosti zaviralca izlivnih črpalk. Iz tega sledi, da so naravni produkti substrati izlivnih črpalk bakterij. Domnevali so, da je kombinacija teh spojin pomembna strategija, ki služi rastlinam za obrambo pred patogenimi mikroorganizmi, saj so rastlinske



protimikrobne snovi ob dodatku ZIČ enako učinkovite kot konvencionalni antibiotiki. Garvey in sod. (2011) so se pri preučevanju ZIČ osredotočili na izvlečke iz medicinsko pomembnih rastlin. Mnoge izmed njih se namreč tradicionalno uporablja za zdravljenje bakterijskih okužb na različnih predelih sveta, kar napeljuje na morebitno navzočnost ZIČ v teh izvlečkih. Večina dobljenih rezultatov trenutno temelji na modulatornih testih za ugotavljanje povečane aktivnosti protimikrobnega sredstva, katerim sledijo testi akumulacije in efluksa. Za nadaljnje raziskave so potrebne še biokemijske študije za potrditev interakcije med ZIČ in črpalko, testi toksičnosti ter *in vivo* študije (Stavri in sod., 2007).

## 2.6 RASTLINSKI IZVLEČKI KOT VIR PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Rastline so bogat vir biološko aktivnih spojin, ki zaradi kemijske in strukturne raznolikosti posedujejo številne lastnosti. Širok spekter naravnih spojin dela rastline izjemno privlačne pri iskanju »čudežnih« molekul z boljšo učinkovitostjo in brez negativnih stranskih učinkov na zdravje, tako da bi na različnih področjih lahko nadomestile sintetične spojine (Ghosh in Rangan, 2012). Med naravnimi spojinami se nahaja tudi precejšen nabor molekul s protimikrobno aktivnostjo, katere služijo rastlinam za obrambo pred škodljivimi mikroorganizmi. Rastlinski produkti zato nudijo obetavne možnosti za uporabo pri obvladovanju patogenih mikroorganizmov in kvarljivcev živil v prehranski industriji, kot tudi v terapevtske namene na medicinskem področju (Negi, 2012). Naraščajoč problem odpornosti pri bakterijah spodbuja iskanje novih terapevtskih učinkovin, katerih vir so rastlinski izvlečki. Ena od prednosti je trenutno še dokaj redek razvoj odpornosti proti naravnim rastlinskim produktom (Radulović in sod., 2013). Glede na to, da se odporni bakterijski sevi prenašajo na človeka tudi s prehransko verigo, je nov pristop uporabe naravnih protimikrobnih snovi pomemben za kontrolo teh problematičnih mikroorganizmov. Tudi zaradi nagibanja potrošnikov k bolj zdravim in naravnim prehranskim proizvodom, industrija stremi k nadomestitvi umetnih konzervansov z naravnimi (Serra in sod., 2008). Posledica tega so številne študije, v katerih je bilo v zadnjih letih preučenih veliko število rastlinskih produktov, iz katerih so izolirali ogromno spojin s protimikrobno aktivnostjo.

Sekundarne metabolite iz rastlin uvrščamo med polifenole, flavonoide, tanine, alkaloidne, terpenoide, izotiocianate, lektine, polipeptide in njihove derivate (Negi, 2012). Glavne skupine predstavljajo terpenoidi, alkaloidi in fenolne spojine. Zaradi kompleksnih struktur je sinteza tovrstnih spojin zahtevna, zato jih najenostavneje izoliramo iz rastlin. Nadalje jih lahko preučujemo kot čiste spojine ali kot mešanico spojin v obliki izvlečkov. Preučevanje mešanic je pomembno zaradi morebitnih interakcij med spojinami, saj so nekatere lahko aktivne v kombinaciji z drugimi spojinami. Hkrati je težko določiti mehanizme delovanja posameznih bioaktivnih spojin v mešanici in s tem razložiti splošni mehanizem delovanja

izvlečkov (Radulović in sod., 2013). Protimikrobna aktivnost izvlečka je posledica njihove različne kemijske sestave in kombinacije učinkov delovanja določenih spojin.

## 2.6.1 Pomen medicinskih rastlin

Predmet zanimanja številnih raziskav so rastline, ki se že od nekdaj uporabljajo v tradicionalni medicini za zdravljenje različnih oblik okužb. Danes se približno 10-30 % višjih rastlin izkorišča v terapevtske namene in jih označujemo kot medicinsko pomembne rastline (Radulović in sod., 2013). Azijski kontinent nudi pestro izbiro aromatičnih in medicinsko pomembnih rastlin z ustaljeno prakso v tradicionalni medicini. Nekatere azijske države so privlačni botanični vrtovi z bogato rastlinsko biodiverzitetjo, ki spodbuja preučevanje teh dragocenih virov bioloških učinkovin. Samo Kitajska ponuja nabor kar 30.000 vrst višjih rastlin (Handa, 2008).

### 2.6.1.1 *Alpinia katsumadai*

Predstavniki rodu *Alpinia* iz družine Zingiberaceae so znani po vsebnosti pestre palete bioaktivnih učinkovin in jih intenzivno preučujejo za morebitno uporabo v biomedicinske namene. Rod vključuje 230-250 vrst, ki se razprostirajo preko tropskega in subtropskega predela Azije. Privlačni in aromatični cvetovi, ter nadzemni in podzemni deli večine predstavnikov tega rodu se uporabljajo za priprave raznovrstnih izvlečkov, eteričnih olj in pridobivanje bioaktivnih sestavin. Različni deli rastlin nudijo zalogo spojin, med katerimi določene izkazujejo aktivnost za nadaljnji razvoj potencialnih novih terapevtikov (Ghosh in Rangan, 2012). *Alpinia katsumadai* je pritegnila zanimanje zaradi razširjene uporabe v kitajski tradicionalni medicini, kjer se jo uporablja za zdravljenje različnih želodčnih težav, bruhanja in za povečanje apetita (Lee in sod., 2003). Uporablja se jo tudi kot dodatek v krmi za pospešitev rasti domačih živali (Kovač in sod., 2014). Množica spojin, ki so jih izolirali iz te rastline, je odgovorna za protimikrobno, antioksidativno, protivnetno in protitumorsko aktivnost. Pri preučevanju antioksidativnih lastnosti se je izkazalo, da preprečujejo oksidativne poškodbe celic in povečajo celično proliferacijo. Nedavno so dokazali protivirusno aktivnost proti rotavirusu in virusu influence ter učinek nevrološke zaščite po ishēmiji (Lee in Kim, 2011). Na mišjih modelih se je pokazal tudi učinek delovanja proti astmi in zaščita pred sepso (Lee in sod., 2010).

Kompleksen kemijski profil *A. katsumadai* sestavljajo spojine, ki jih uvrščamo med flavonoide, kalkone, diarilheptanoide, monoterpene, seskviterpene, stilbene in labdane (Kuroyanagi in sod., 1983; Ngo in Brown, 1998). Poglavitne aktivne spojine v etanolnem izvlečku semen rastline so alpinetin, kardamomin in pinocembrin iz skupine flavonoidov ter diarilheptanoida 1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on in (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on (Klančnik in sod., 2012a). Omenjene spojine poleg protimikrobnih, protivnetnih in antioksidativnih lastnosti delujejo še protitumorsko, antimutageno, kot

vazorelaksanti, ter protivirusno (Xiao in sod., 2011). Izvlečki inhibirajo tudi adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v modelih črevesnih celic (Šikić Pogačar in sod., 2014). Aciklični triterpenoid, izoliran iz semen, se je izkazal kot inhibitor encima, odgovornega za nastanek holesterola, in je tako potencialno zdravilo za zdravljenje hiperlipidemije in ateroskleroze (Choi in sod., 2012). V novejših študijah so v semenih identificirali še nekaj novih spojin, med njimi kavalaktone (Li in sod., 2010), edinstvene konjugate monoterpena/seskviterpena in kalkona (Hua in sod., 2008, 2009), adukt kalkona in diarilheptanoida (Yang in sod., 2011) ter bifenilpropanoid katsumadin (Huang in sod., 2007). V eteričnih oljih *A. katsumadai* so v prevladujočem deležu prisotni terpeni in terpenoidi (Šikić Pogačar in sod., 2014).

Tako kot pri nekaterih predstavnikih drugih vrst rodu *Alpinia* (npr. *A. galanga*) (Ghosh in Rangan, 2012), so tudi izvlečki *A. katsumadai* v nedavnih študijah izkazali zmerno do izrazito protimikrobno aktivnost proti nekaterim vrstam po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Klančnik in sod., 2012a). Izvlečki semen in nekatere izolirane spojine delujejo tudi modulatorno, saj zmanjšajo MIK določenih antibiotikov in so posledično potencialni ZIČ pri bakterijah *Mycobacterium smegmatis* (Gröblacher in sod., 2012) in *Campylobacter* spp. (Klančnik in sod., 2012a).

**Fenolne spojine:** so med najbolj razširjenimi sekundarnimi metaboliti rastlin, kjer igrajo pomembno vlogo pri obrambi pred patogenimi mikroorganizmi in predatorji, pri rasti in razmnoževanju rastlin, dajejo pa jim tudi značilno barvo in okus (Balasundram in sod., 2006). Predvsem zaradi svojih antioksidativnih lastnosti, kot lovilci prostih radikalov in kelatorji kovinskih kationov, delujejo blagodejno na zdravje ljudi (Randhir in sod., 2004). Poleg tega delujejo tudi protimikrobno, protivnetno, protiglivno, protivirusno, antitumorigeno, protivirusno, antialergeno, protiarterogeno in protitrombotično (Balasundram in sod., 2006; Jayaraman in sod., 2010). Fenoli iz rastlinskih izvlečkov imajo pomembno vlogo pri preprečevanju oksidacije lipidov v živilih in mikrobne kvarjenja živil. Vsebnost fenolov v rastlinah niha zaradi njihove kompleksnosti, procesov ekstrakcije, vrste rastline, pridelave, okolja in pogojev rasti, obiranja ter shranjevanja pridelka. Znano je tudi, da se izvlečki s podobno vsebnostjo fenolov med seboj razlikujejo po protimikrobni in antioksidativni učinkovitosti (Klančnik in sod., 2009). Sadje, zelenjava in nekatere pijače naravnega izvora so pomemben vir fenolnih spojin v prehrani. Poleg tega jih je veliko prisotnih tudi v stranskih in odpadnih produktih iz kmetijske in prehranske industrije (olupki, lupine, semena, kože, listi, odpadne vode iz oljarn), kjer se je izkazalo, da je količina fenolov celo višja kot v olupljenih oz. oluščenih plodovih (Balasundram in sod., 2006).

Značilnost fenolnih spojin je aromatski obroč z enim ali več hidroksilnimi skupinami. V naravi so fenoli pogosto vezani z mono ali polisaharidi, prisotni pa so lahko tudi kot estri ali metilni estri. Najdemo v obliki od enostavnih molekul do kompleksnejših

polimeriziranih spojin. Zaradi strukturnih razlik jih delimo v več razredov: flavonoidi, hidroksibenzojske kisline, fenilpropanoidi, stilbeni, benzokinoni, lignini, lignani, biflavonoidi, ksantoni, naftokinoni in acetofenoni. Glavne skupine fenolnih spojin so fenolne kisline, flavonoidi in tanini (Balasundram in sod., 2006).

**Terpenoidi:** so obsežna skupina spojin, ki jo sestavlja več kot 40.000 strukturno različnih molekul. Prisotni so predvsem v eteričnih oljih, voskih in smolah rastlin. Kot kompleksni rastlinski produkti igrajo pomembno vlogo v kitajski in indijski tradicionalni medicini. Posamezni terpenoidi izkazujejo številne biološke učinke, med njimi anti-kancerogene, protitumorske učinke, učinkovito delujejo proti kardiovaskularnim boleznim, zaščitijo celice pred poškodbami, delujejo antioksidativno in sodelujejo v mnogih metabolnih poteh. Na podlagi števila osnovnih izoprenskih enot ločimo hemiterpenoide, monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpene, sesterterpenoide, triterpenoide, tetraterpenoide in politerpenoide. Večina terpenoidov je večcikličnih struktur, ki se razlikujejo po funkcionalnih skupinah in po osnovnem ogrodju iz ogljikovih atomov (Putignani in sod., 2013).

**Diarilheptanoidi:** Med diarilheptanoide uvrščamo spojine z značilnim ogrodjem 1,7-difenilheptana. Zaradi svojih bioloških aktivnosti se jih v zadnjih desetletjih z zanimanjem preučuje kot potencialne terapije, saj delujejo protimikrobno, protivnetno, antioksidativno, protitumorsko, lišmanicidno, zavirajo melanogenezo, izkazujejo funkcijo zaščite jeter in živčevja ter estrogeno aktivnost. Iz naravnih produktov so jih izolirali okoli 400, pretežno iz rastlinskih rodov *Zingiber*, *Curcuma*, *Alpinia*, *Alnus* in *Myrica*. Po strukturi ločimo linearne in ciklične diarilheptanoide (Lv in She, 2012).

## 2.7 METODE ZA PRIPRAVO RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Za ekstrakcijo aktivnih učinkovin iz rastlin je na voljo veliko različnih postopkov, od katerih je odvisno, katere spojine se izločijo. Ustrezen del rastline, namenjen za ekstrakcijo, najprej posušimo in zmeljemo do enakomernih delcev. Glede na polarnost aktivnih učinkovin izberemo vrsto topila, v katerem se izločijo želene učinkovine. Pri tem moramo paziti, da se v izbranem topilu sestavine ne razgradijo. Izbira postopka ekstrakcije je odvisna tudi od temperaturne občutljivosti sestavin. Čas trajanja ekstrakcije igra pomembno vlogo, saj se v prekratnem času izvajanja ekstrakcije ne uspejo izločiti vse sestavine, medtem ko se ob predolgi ekstrakciji lahko izločijo tudi neželene spojine. Pri postopku koncentriranja in sušenja izvlečkov morajo učinkovine ostati stabilne in obstojne (Handa, 2008). V splošnem poteka priprava izvlečkov v več zaporednih korakih:

1. **Zmanjšanje velikosti delcev** rastlinskega materiala z drobljenjem ali mletjem. S tem se spojine iz tkiv in celic izpostavijo ekstrakcijskemu topilu, hkrati pa se s povečanjem površine izboljša masni prenos učinkovin v topilo.

## **2. Ekstrakcija**

**3. Filtracija:** pridobljeni ekstrakt ločimo od trdnih delcev rastlinskega materiala.

**4. Koncentriranje:** iz ekstrakta z vakuumom odstranimo topilo.

**5. Sušenje ekstrakta** (Handa, 2008)

### **2.7.1 Ekstrakcija v topilu**

Pri tovrstni ekstrakciji pride do kontakta med trdnim rastlinskim materialom in izbranim topilom. Sledi masni prenos topnih rastlinskih komponent v topilo. Z naraščajočo koncentracijo učinkovin v topilu se hkrati zmanjšuje masni prenos, dokler se ne vzpostavi ravnovesje, ko je koncentracija učinkovin v topilu in trdnem rastlinskem materialu enaka. Z mešanjem ekstrakcijske raztopine ali s segrevanjem topila se masni prenos bistveno izboljša (Handa, 2008).

### **2.7.2 Hidrodestilacija eteričnega olja**

Pri tem procesu rastlinski material postavimo v aparat za destilacijo, ga namočimo v ustrezni količini vode ter celotno vsebino zavremo. Ob vrenju vode se hlapno eterično olje sprosti iz oljnih žlez rastlinskega tkiva in se raztopi v vodi. Raztopina olja in vode se z difuzijo prenese na zunanjo stran rastlinskih membran, kjer se olje upari. Z ohlajanjem na kondenzorju se nato para z oljem in vodo kondenzira, nakar tekočina steče v separator, kjer se olje loči od vode. Eterično olje je hlapna in aromatična oljnata tekočina, ki jo sestavljajo ogljikovi hidrati, estri, terpeni, fenoli, aldehidi, kisline, laktoni, alkoholi in ketoni, od katerih dajejo nekatere olju značilen vonj (Handa, 2008).

## **2.8 KEMIJSKA ANALIZA SPOJIN S KROMATOGRAFSKIMI TEHNIKAMI SKLOPLJENIMI Z MASNO SPEKTROMETRIJO**

Kromatografske tehnike omogočajo ločevanje sestavin vzorca in njihovo identifikacijo ter kvantifikacijo. Ločevanje sestavin temelji na njihovi porazdelitvi med mobilno in stacionarno fazo, kar je odvisno od razlik v interakciji posameznih spojin s stacionarno fazo. Mobilna faza, ki je v tekočem ali plinskem stanju, enakomerno prenaša mešanico spojin iz vzorca in potuje skozi stacionarno fazo. Slednja je lahko v trdni, tekoči ali želatinasti obliki in je v nasprotju z mobilno fazo imobilizirana. Na njej se posamezne spojine med pretokom mobilne faze zadržujejo različno dolgo, kar je vzrok za različen čas potovanja molekul skozi ločevalno kolono (retencijski čas). Do ločevanja pride ob neprestanem prehajanju molekul iz ene faze v drugo, dokler se z mobilno fazo ne izločijo na koncu kolone (Wilson in Walker, 2007).

Masna spektrometrija je vse bolj popularna analitska metoda, s pomočjo katere identificiramo spojine v vzorcu na podlagi masnih spektrov posameznih spojin. Velikokrat se jo uporablja v sklopu z drugimi kromatografskimi tehnikami, pri čemer se molekule iz vzorca po ločevanju na kromatografski koloni prenesejo na masni spektrometer. Masni spektrometer vsako molekulo v vzorcu ionizira in loči nastalo mešanico ioniziranih fragmentov na podlagi razmerja med maso in nabojem ( $m/z$ : mass-to-charge). Iz tega pridobimo podatke o molekularni masi spojine in v določenih primerih tudi informacije o njeni strukturi (Kazakevich in Lobrutto, 2007).

### **2.8.1 Plinska kromatografija (GC)**

S pomočjo plinske kromatografije ločujemo spojine hlapnih vzorcev, katere skozi kapilarno kolono s konstantnim pretokom prenaša mobilna faza v plinskem stanju. Slednjo sestavlja inertni plin (dušik, helij ali argon), ki gre pred vstopom na kolono skozi postopek prečiščevanja. Tekoča ali voskasta stacionarna faza se nahaja na notranji steni kolone ali na trdnem nosilcu znotraj kolone. Temperatura na koloni se giblje med 50-300 °C, z namenom doseganja čim boljše hlapljivosti vzorca, ki mora biti hkrati tudi temperaturno obstojen. Kolona je nameščena v pečici z možnostjo reguliranja temperature, ki lahko med celotnim procesom postopoma narašča ali pa je konstantna (Wilson in Walker, 2007).

### **2.8.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

HPLC sodi med najpomembnejše analitske metode. Ker se med procesom vzpostavi visok tlak (več kot 50 bar), stacionarno fazo sestavljajo trdni delci z zelo majhno velikostjo (3-10 µm v premeru), ki vzdržijo tlak na koloni (Wilson in Walker, 2007). Sistem črpalk ima ključno vlogo pri prenosu tekoče mobilne faze in vzorca, saj se z visokim tlakom ustvarja konstanten pretok tekočine. Če se sestava mobilne faze med ločevanjem na koloni ne spreminja, imenujemo ta postopek izokratsko izpiranje. Nasprotno se pri gradientnem izpiranju sestava mobilne faze postopoma spreminja in s tem tudi njena polarnost, pH ali koncentracija soli. Vzorci, namenjeni za analizo s HPLC, so običajno pripravljene v topilu in morajo biti obvezno prečiščeni, saj lahko sledovi nečistoč vplivajo na kolono in detektor.

## **2.9 METODE DOLOČANJA MODULATORNE UČINKOVITOSTI**

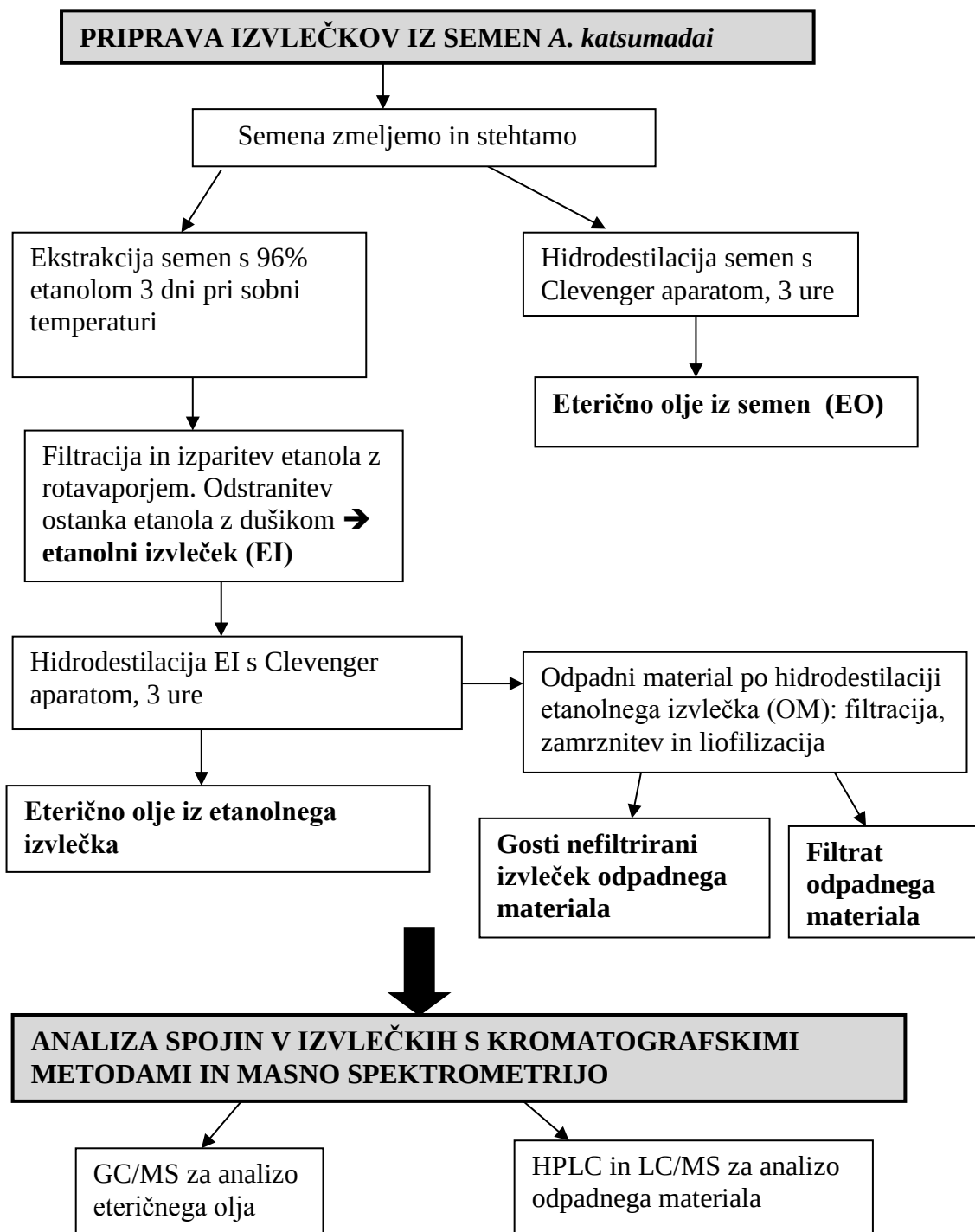
Za določanje protimikrobne učinkovitosti so na voljo različne difuzijske in dilucijske metode, vendar za ugotavljanje MIK naravnih učinkovin še ni določene standardne metode. Ker je iskanje rastlinskih protimikrobnih snovi trenutno v polnem razcvetu, želimo da bi bili rezultati številnih študij med seboj primerljivi. Zato so Klančnik in sod. (2010) z ovrednotenjem različnih metod predlagali metodo mikrodilucije v bujonu, kot najprimernejšo in hitro metodo določanja protimikrobne učinkovitosti rastlinskih izvlečkov

in njihovih učinkovin. Pri tem se uporablja sterilne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicam, na katere nanese protimikrobne snovi, s serijskim dvakratnim redčenjem v rastnem gojišču. Sledi nanos bakterijske kulture, inkubacija in odčitavanje MIK (Klančnik in sod., 2010). Protimikrobni testi naj bi bili enostavni, hitri, učinkoviti, zanesljivi, občutljivi, poceni in varni (Sarker in sod., 2007).

Za testiranje kombinacije protimikrobnih snovi se najpogosteje uporablja metodo šahovnice, s katero ugotavljamo morebiten sinergistični učinek obeh testiranih snovi. Ime metode se nanaša na vzorec vdolbinic mikrotitrne plošče, kjer zaradi serijskih dvakratnih redčitev vsako območje vsebuje edinstveno kombinacijo obeh protimikrobnih snovi (Pillai in sod., 2005). Določanje modulatornega učinka potencialnih ZIČ temelji na različicah omenjene metode. Najprej je potrebno določiti protimikrobno aktivnost rastlinskega izvlečka ali čiste spojine, katere se nadalje z modulatornim testom testira v subinhibitorni koncentraciji. Potencialnemu modulatorju nato v serijskih dvakratnih redčitvah dodamo izbrano protimikrobno snov, ki je substrat izlivne črpalke (Stavri in sod., 2007). Na koncu odčitamo MIK protimikrobnega sredstva v kombinaciji z modulatorjem. MIK je najnižja koncentracija, pri kateri ni opazne bakterijske rasti.

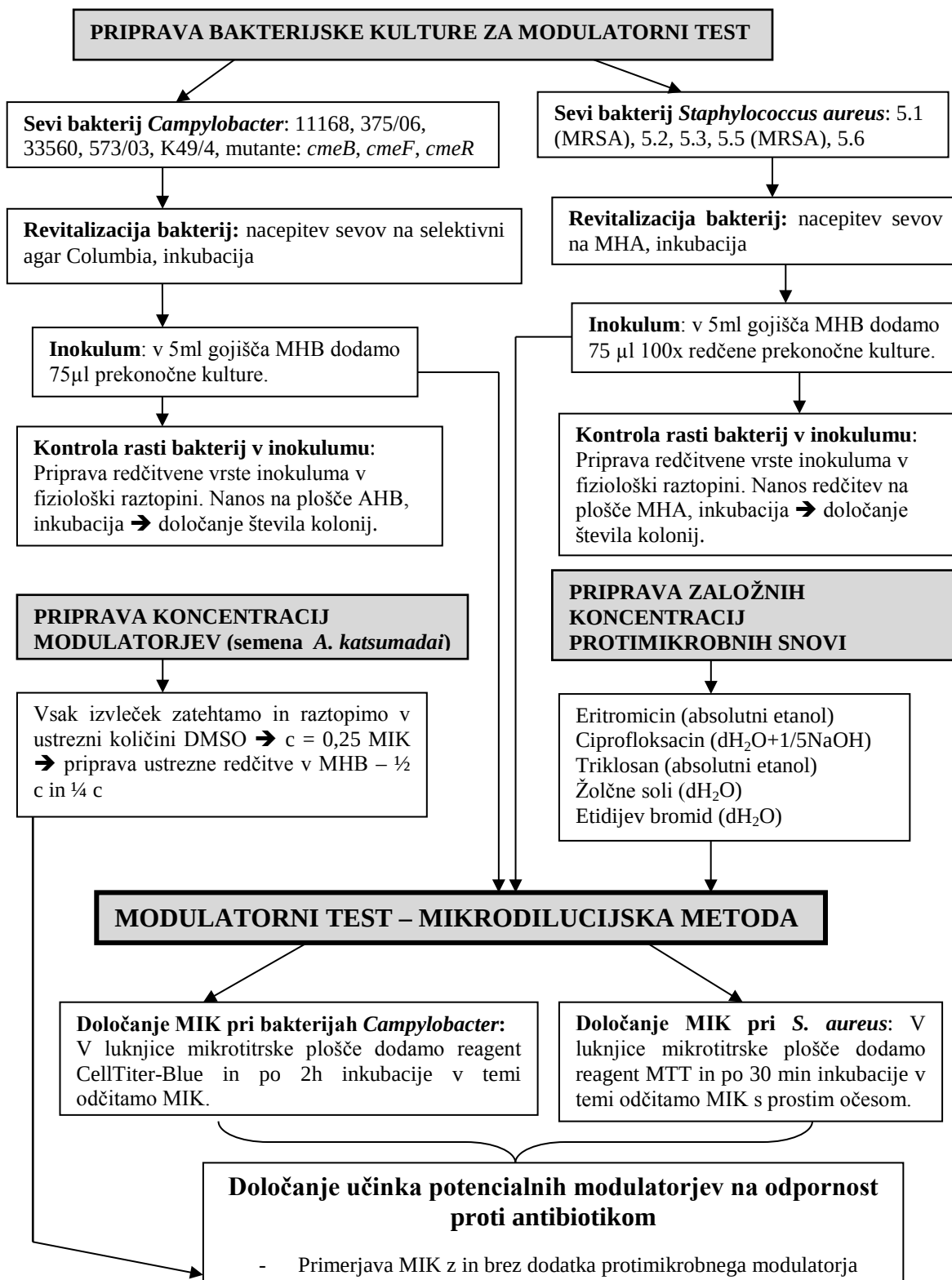
### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 SHEMA POTEKA DELA



**Slika 3:** Diagram poteka priprave in kemijske analize etanolnega izvlečka, eteričnega olja in izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka *A. katsumadai*.





**Slika 4:** Diagram poteka priprave bakterijske kulture, koncentracij modulatorjev in protimikrobnih snovi, ter izvedbe mikrodilucijske metode.

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterijski sevi

Pri eksperimentalnem delu določanja modulatorne učinkovitosti smo uporabili osem sevov bakterij *Campylobacter jejuni* in pet sevov bakterij *Staphylococcus aureus* iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Sevi obeh bakterijskih rodov so izkazovali različen profil odpornosti proti antibiotikom, kar prikazuje preglednica 1.

Sevi *C. jejuni*: referenčni sev humanega izvora *C. jejuni* NCTC 11168, referenčni sev živalskega izvora *C. jejuni* ATCC 33560, izoliran iz govedine, sev *C. jejuni* 375/06, humanega izvora, sev *C. jejuni* 573/03, živalskega izvora (meso), sev *C. jejuni* K49/4, živalskega izvora (perutnina), tri mutante seva *C. jejuni* NCTC 11168: sev z mutacijo v genu *cmeB* izlivne črpalke CmeABC, sev z mutacijo v genu *cmeF* izlivne črpalke CmeDEF in sev z mutacijo v genu *cmeR* za represor izlivne črpalke CmeABC.

Sevi *S. aureus*: *S. aureus* 5.1 (MRSA), *S. aureus* 5.2, *S. aureus* 5.3, *S. aureus* 5.5 (MRSA), *S. aureus* 5.6.

Preglednica 1: Bakterijski sevi in njihova odpornost proti ciprofloksacinu, eritromicinu in meticilinu.

| Sevi kampilobaktrov                     | Odpornost proti antibiotikom |                |                |
|-----------------------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
|                                         | Ciprofloksacin               | Eritromicin    | Meticilin      |
| <i>C. jejuni</i> NCTC 11168             | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 <i>CmeB</i> | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 <i>CmeF</i> | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 <i>CmeR</i> | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> ATCC 33560             | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> 375/06                 | <b>Odporen</b>               | <b>Odporen</b> | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> K49/4                  | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>C. jejuni</i> 573/03                 | <b>Odporen</b>               | Občutljiv      | Občutljiv      |
| Sevi stafilokokov                       |                              |                |                |
| <i>S. aureus</i> 5.1                    | <b>Odporen</b>               | Občutljiv      | <b>Odporen</b> |
| <i>S. aureus</i> 5.2                    | Občutljiv                    | <b>Odporen</b> | Občutljiv      |
| <i>S. aureus</i> 5.3                    | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |
| <i>S. aureus</i> 5.5                    | <b>Odporen</b>               | Občutljiv      | <b>Odporen</b> |
| <i>S. aureus</i> 5.6                    | Občutljiv                    | Občutljiv      | Občutljiv      |

Opombe: Odporni sevi *C. jejuni* – MIK ciprofloksacina  $\geq 4$  mg/L, MIK eritromicina  $\geq 32$  mg/L (Kurinčič in sod., 2012). Odporni sevi *S. aureus* – MIK ciprofloksacina  $>1$  mg/L, MIK eritromicina  $>2$  mg/L (EUCAST, 2014).

### 3.2.2 Bakterijska gojišča

Za gojenje sevov *C. jejuni* smo uporabili selektivni krvni agar Columbia z dodatki za rast in selektivnost, ter tekoče gojišče Mueller Hinton (MHB) z dodatkom defibrilirane konjske krvi. Za štetje kolonij smo uporabili trdno modificirano gojišče Abeyta-Hunt-Bark (AHB) agar. Za kultivacijo sevov *S. aureus* smo uporabili trdno gojišče Mueller Hinton agar (MHA) in tekoče gojišče MHB. Za štetje kolonij smo uporabili MHA.

Preglednica 2: Krvni agar Columbia. Sestavine gojišča in postopek priprave.

| <b>Krvni agar Columbia, 500 ml</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sestavine</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Proizvajalec, referenčna št.</b> |
| 19,5 g osnovnega gojišča Columbia blood Agar Base                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Oxoid, CM0331                       |
| 500 ml destilirane vode                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                     |
| 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Oxoid, SR048C                       |
| 1 viala dodatka za rast - <i>Campylobacter</i> Growth Supplement                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Oxoid, SR232E                       |
| 1 viala dodatka za selektivnost – <i>Campylobacter</i> Selective Supplement                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Oxoid, SR069E                       |
| <b>Priprava</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                     |
| V steklenici smo zatehtali osnovno gojišče, dolili dH <sub>2</sub> O in segreli v mikrovalovni pečici da se je vsebina raztopila. Avtoklavirali smo 15 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Gojišče smo nato ohladili na 45 °C, mu dodali defibrilirano konjsko kri, dodatek za rast in dodatek za selektivnost ter ga premešali. Razlili smo ga v petrijeve plošče, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. |                                     |

Preglednica 3: Mueller Hinton bujon. Sestavine gojišča in postopek priprave.

| <b>Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon (MHB), 500 ml</b>                                                                                                                                                      |                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sestavine</b>                                                                                                                                                                                              | <b>Proizvajalec, referenčna št.</b> |
| 10,5 g osnovnega gojišča Mueller Hinton bujon                                                                                                                                                                 | Merck, 1.10293.0500                 |
| 500 ml destilirane vode                                                                                                                                                                                       |                                     |
| <b>Priprava</b>                                                                                                                                                                                               |                                     |
| V steklenici smo zatehtali osnovni medij in dolili dH <sub>2</sub> O do 500 ml. Vsebino smo premešali in avtoklavirali 20 min pri 121 °C in 1,1 bar. Ohlajenega smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. |                                     |

Preglednica 4: Mueller Hinton agar. Sestavine gojišča in postopek priprave.

| <b>Trdno gojišče Mueller Hinton agar (MHA), 500 ml</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sestavine</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>Proizvajalec, referenčna št.</b> |
| 19 g osnovnega gojišča Mueller Hinton Agar                                                                                                                                                                                                                                                                        | Oxoid, CM337                        |
| 500 ml destilirane vode                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                     |
| <b>Priprava</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                     |
| V steklenici smo zatehtali osnovno gojišče in dolili destilirano vodo. Vsebino smo premešali in segreli v mikrovalovni pečici, da je zavrela. Po avtoklaviranju (20 min, 121 °C, 1,1 bar) smo gojišče ohladili v inkubatorju na 42 °C in ga razlili v petrijeve plošče, ki smo jih hranili v hladilniku pri 4 °C. |                                     |

Preglednica 5: Abeyta-Hunt-Bark agar. Sestavine gojišča in postopek priprave.

| <b>Trdno modificirano gojišče Abeyta-Hunt-Bark (AHB) agar, 500 ml</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sestavine</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>Proizvajalec, referenčna št.</b> |
| 20 g osnovnega gojišča Bacto TM Heart Infusion Agar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Oxoid, CM375                        |
| 1 g kvasnega ekstrakta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Oxoid, CM19                         |
| 1 steklenička dodatka za rast - <i>Campylobacter</i> Growth Supplement                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Oxoid, SR232E                       |
| 500 ml destilirane vode                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                     |
| 5 ml 1 % raztopine TTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Sigma-Aldrich T8877                 |
| <b>Priprava</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                     |
| Zatehtali smo gojišče Bacto TM Heart Infusion agar in kvasni ekstrakt, nakar smo dodali dH <sub>2</sub> O. Mešanico smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je vsebina raztopila. Po 15 minutnem avtoklaviranju pri 121 °C in tlaku 1,1 bar, smo ohlajenemu gojišču dodali stekleničko dodatka za rast ter 1 % TTC. Gojišče smo dobro premešali in razlili v petrijeve plošče, katere smo zaradi občutljivosti TTC ovili v aluminijevo folijo ter shranili v hladilniku pri 4 °C. |                                     |

1 % raztopino TTC (2,3,5 – trifenil tetrazolijev klorid) smo pripravili tako, da smo 0,1g TTC raztopili v 100 ml sterilne ddH<sub>2</sub>O. Stekleničko smo, zavito v aluminijevo folijo, do uporabe hranili v hladilniku.

### 3.2.3 Laboratorijski material in aparature

Za kultivacijo bakterij, izvedbo mikrodilucijske metode v bujonu in pripravo ter analizo rastlinskega materiala smo uporabili naslednji laboratorijski material in aparature.

Preglednica 6: Laboratorijski material in njihov proizvajalec.

| <b>Laboratorijski material</b>             | <b>Proizvajalec</b>                                         |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Anaerobni lonci, posode                    | Oxoid Ago 25A, Anglija                                      |
| Cepilne zanke (plastične)                  | Labortechnika Golias, Slovenija                             |
| Filtri (velikost por 0,2 µm)               | Sartorius, Nemčija                                          |
| Filtrirni papir                            | Whatman (GE Healthcare), Anglija                            |
| Injekcijske brizge                         | BD Plastipak, Združene države Amerike                       |
| Litrške steklenice                         | Duran, Nemčija                                              |
| Kolona za HPLC (Zorbax SB-C18, 2.1x150 nm) | Agilent, Združene države Amerike                            |
| Merilni valji                              | Plastibrand, Nemčija                                        |
| Mikrocentrifugirke                         | Eppendorf, Nemčija                                          |
| Mikrotitrne plošče                         | Nunc, Danska                                                |
| Parafilm                                   | Pechiney Plastic Packaging Company, Združene države Amerike |
| Petrijeve plošče                           | Labortechnika Golias, Slovenija                             |
| Pipete, nastavki za pipete (tipsi)         | Eppendorf (Nemčija), Gilson (Združene države Amerike)       |
| Viale                                      | Waters, Združene države Amerike                             |
| Steklene čaše, epruvete                    | Brand, Nemčija                                              |

Preglednica 7: Aparature in njihov proizvajalec.

| Aparature                                                                                    | Proizvajalec                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Inkubator (tip SP 190)                                                                       | Kambič, Slovenija                         |
| Digestorij                                                                                   | Med-lab Rauh, Slovenija                   |
| Avtoklav, tip 500x700 in tip 1-61-137                                                        | Sutjeska, Srbija                          |
| Hladilnik                                                                                    | Zanussi, Japonska                         |
| Zamrzovalnik -18 °C, Zamrzovalna omara -80 °C                                                | LTH, Slovenija; Heto Ultra Freeze, Kanada |
| Stresalnik mikrotitrskih plošč (Thermomixer comfort)                                         | Eppendorf, Nemčija                        |
| Čitalec mikrotitrskih plošč (Tecan Safire 2)                                                 | Tecan Trading, AG Švica                   |
| Plinski gorilnik                                                                             |                                           |
| Mikrovalovna pečica                                                                          | Sanyo, Japonska                           |
| Plinska jeklenka z mešanico 85 % N <sub>2</sub> , 10 % CO <sub>2</sub> in 5 % O <sub>2</sub> | Istragas, Slovenija                       |
| Tehnika (PB1502-S)                                                                           | Mettler toledo, Švica                     |
| Analitska tehnika                                                                            | Sartorius analytic, GMBH, Nemčija         |
| Vrtinčno mešalo (Yellowline)                                                                 | IKA, Belgija                              |
| Sušilnik steklovine (SO-250)                                                                 | Elektromedicina, Slovenija                |
| rotavapor                                                                                    | Buchi, Švica                              |
| clevenger aparat                                                                             |                                           |
| lioofilizator                                                                                |                                           |
| HPLC-PDA                                                                                     | Merck Hitachi LaChrom                     |
| LC-PDA-MS (Thermo Surveyor LC system, Thermo Finnigan LCQ DECA XP)                           | Thermo Finnigan, Združene države Amerike  |
| GC/MS (Agilent 7890A GC, Agilent 5975C MSD)                                                  | Agilent, Združene države Amerike          |

### 3.2.4 Delovne raztopine, topila in reagenti

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabili naslednje spojine:

- absolutni etanol in 96 % etanol (Merck),
- sterilno fiziološko raztopino, ki smo jo pripravili iz KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika) in dH<sub>2</sub>O. Natehtali smo 3,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ga raztopili v 100 ml dH<sub>2</sub>O in uravnali pH raztopine na 7,20. Nato smo 1,25 ml pripravljene raztopine prenesli v 1000 ml dH<sub>2</sub>O in premešali. Fiziološko raztopino smo avtoklavirali 15 min (121 °C, 1,1 bar),
- reagent za določanje živosti bakterij (Cell Titer-Blue) (Promega, ZDA),
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, 1.0295.1000),
- raztopino MTT (metil tiazolil tertazolijevo sol), ki smo jo pripravili iz 50 mg MTT in 10 ml metanola. V falkonki smo natehtali 50 mg MTT in dodali 10 ml metanola. Raztopino smo premešali in ovili v aluminijevo folijo, saj je reagent občutljiv na svetlobo. Hranili smo ga v hladilniku,
- metanol za HPLC (Merck), acetonitril za HPLC (Merck),
- 0,1 % trifluoroacetat (Sigma-Aldrich Co.),
- protimikrobne snovi: ciprofloksacin (Fluka Biochemika), eritromicin (Sigma-Aldrich Co.), triklosan (Merck), žolčne soli (Sigma-Aldrich Co.), etidijev bromid (Sigma, E751).

### 3.2.5 Testne protimikrobne snovi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili pet različnih protimikrobnih snovi: dva antibiotika (ciprofloksacin iz skupine fluorokinolonov in eritromicin iz skupine makrolidov), dezinfekcijsko sredstvo triklosan, žolčne soli in barvilo etidijev bromid, ki se uporablja kot splošni substrat izlivnih črpalk (Gröblacher in sod., 2012). Za našete snovi smo najprej pripravili njihove založne koncentracije, iz katerih smo si pred vsako nadaljnjo izvedbo testa mikrodilucije v bujonu pripravili ustrezne delovne koncentracije snovi. Želeli smo, da končna koncentracija v prvi vdolbinici mikrotirske plošče znaša 2 do 4-krat več od že predhodno določenih MIK izbranih protimikrobnih snovi za posamezen bakterijski sev. Ker se je ob dodatku ostalih testnih učinkovin in bakterijske kulture koncentracija protimikrobnega sredstva naknadno znižala za 4-krat, smo delovne raztopine pripravili v koncentraciji, ki je bila 8 do 16-krat višja od MIK. Po spodnji enačbi smo izračunali potreben volumen založne raztopine protimikrobne snovi ( $v_1$ ), ki smo ga prenesli v predhodno pripravljeno ustrezno količino gojišča MHB, tako da je končni volumen znašal 1 ml ( $v_2$ ), koncentracija pa 16-krat več od MIK ( $c_2$ ).

$$c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2 \rightarrow v_1 = (c_2 \times v_2) / c_1 \quad \dots(1)$$

$c_1$  označuje založno koncentracijo,  $c_2$  delovno koncentracijo,  $V_1$  volumen založne raztopine, ki smo ga prenesli v MHB,  $V_2$  pa končni volumen delovne raztopine.

#### 3.2.5.1 Ciprofloksacin

Pripravili smo dve založni koncentraciji ciprofloksacina (Fluka Biochemika), in sicer 1 mg/ml in 10 mg/ml. Natehtano ustrezno količino ciprofloksacina (1 mg in 10 mg) smo raztopili v 1 ml raztopine sterilne destilirane vode in ene petine 1M NaOH ter premešali na vrtinčnem mešalu. Dobljeni založni raztopini ciprofloksacina smo na koncu filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,2  $\mu$ m. Mikrocentrifugirki z obema koncentracijama smo prekrili s parafilmom in do uporabe hranili v hladilniku.

#### 3.2.5.2 Eritromicin

Založno koncentracijo eritromicina (Sigma-Aldrich Co.) smo pripravili v absolutnem etanolu. 1 mg in 10 mg natehtanega antibiotika smo raztopili v 1 ml absolutnega etanola in premešali na vrtinčnem mešalu, da smo dobili založni koncentraciji 1 mg/ml in 10 mg/ml. Raztopini smo filtrirali skozi filter z 0,2  $\mu$ m porami, mikrocentrifugirki smo prekrili še s parafilmom in shranili v hladilniku. Pri pripravi delovne raztopine smo morali paziti, da po prenosu izračunanega volumna založne raztopine v gojišče MHB, koncentracija etanola v delovni raztopini ni bila višja od 10 % oz. na mikrotitrski plošči 2,5 %.

### 3.2.5.3 Razkužilo triklosan

Triklosan (Merck) smo prav tako pripravili v dveh založnih koncentracijah (1 mg/ml in 10 mg/ml), tako da smo natehtano količino raztopili v absolutnem etanolu in premešali na vrtničnem mešalu. Raztopini smo filtrirali skozi filter z 0,2 µm porami, mikrocentrifugirki prekrili s parafilmom in shranili v hladilniku. Tudi v tem primeru smo morali zaradi vsebnosti etanola paziti, da v delovni raztopini njegova koncentracija ni presegala 10 % oz. na mikrotitrski plošči 2,5 %.

### 3.2.5.4 Žolčne soli

Zaradi višjih vrednosti MIK žolčnih soli (Sigma-Aldrich Co.), smo pripravili založni koncentraciji 20 mg/ml in 30 mg/ml. Natehtano količino žolčnih soli (20 mg in 30 mg) smo raztopili v 1 ml sterilne destilirane vode in premešali na vrtničnem mešalu. Po filtraciji raztopine skozi 0,2 µm filter, smo mikrocentrifugirko z založno koncentracijo obdali še s parafilmom in jo shranili v hladilniku.

### 3.2.5.5 Etidijev bromid

Založno koncentracijo etidijevega bromida (Sigma, E8751) smo imeli že pripravljeno in sicer je ta znašala 5120 µg/ml. Po izračunu in prenosu potrebnega volumna založne raztopine v MHB, smo delovno raztopino premešali na vrtničnem mešalu. Pri delu smo zaradi varnosti uporabljali nitrilne rokavice, odvečno raztopino etidijevega bromida pa smo zavrgli v za to namenjeno plastično posodico.

## 3.2.6 Izvlečki semen *A. katsumadai* (modulatorji)

### 3.2.6.1 Priprava izvlečkov

Iz 471,5 g semen *A. katsumadai* (ShiZhen-Chinese Herbs, CAO DOU KOU) smo pripravili naslednje izvlečke: etanolni izvleček (EI), eterično olje iz semen (EO), eterično olje iz etanolnega izvlečka (EIO) in izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka (OM). Za pripravo EO smo natehtali in uporabili 201,8 g semen, za EI in kasneje še EIO pa 269,7 g semen.

### 3.2.6.2 Kemijska analiza izvlečkov

Za analizo eteričnega olja s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo smo vzorce pripravili v heksanu, v razmerju 1/60. Tako smo 20 µl eteričnega olja raztopili v 1200 µl heksana.

Izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji EI smo za natančnejšo analizo spojin s HPLC-PDA in LC-PDA-MS, ločili, ter analizirali gosti nefiltrirani del (ostanek OM) in vodno fazo ostanka (filtrat OM). Ostanek OM smo pripravili v čistem metanolu, vodno fazo ostanka pa v 50 % metanolu (50 % metanol + 50 % ddH<sub>2</sub>O). Slednjega smo pred prenosom v vialo tudi centrifugirali, da smo odstranili odvečne plavajoče delce.

### 3.2.6.3 Priprava raztopin izvlečkov za mikrodilucijsko metodo

Pri ugotavljanju modulatorne učinkovitosti smo etanolni izvleček, izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji EI in eterično olje iz semen raztopili v DMSO. Potencialne modulatorje smo testirali v subinhibitornih koncentracijah rastlinskih pripravkov. Glede na predhodno določene MIK pripravkov, smo za izvedbo modulatornega testa izbrali četrtno oz. polovico vrednosti MIK določenega rastlinskega pripravka (0,25 MIK, 0,5 MIK) za posamezen bakterijski sev. Koncentracija DMSO je na mikrotitrski plošči lahko znašala največ 2,5 %.

Priprava delovne koncentracije potencialnih modulatorjev: Najprej smo izračunali četrtno oz. polovico vrednosti MIK za vsak rastlinski pripravek. Nato smo pripravili 40x višjo koncentracijo posameznih izvlečkov od zelene začetne koncentracije na mikrotitrski plošči ( $c_{40}$ ) [mg/ml]. Po spodnji enačbi smo izračunali maso izvlečka, ki smo ga zatehtali in pripravili v določenem volumni DMSO. Raztopino smo pred nanosom na ploščo še razredčili v MHB, da smo v nadaljevanju dobili subinhibitorno koncentracijo modulatorjev v gojišču.

$$m \text{ (mg)} = c_{40} \times v_{\text{DMSO}} \quad \dots(2)$$

$m$  = masa izvlečka,  $c_{40}$  = 40x višja koncentracija izvlečka od zelene,  $v_{\text{DMSO}}$  = volumen DMSO (ml) v katerem raztopimo zatehtan izvleček.

## 3.3 METODE

### 3.3.1 Priprava izvlečkov iz semen *A. katsumadai*

Semena *A. katsumadai* smo zmleli in stehtali. Za pripravo eteričnega olja iz semen (EO) smo uporabili 201,8 g semen, za etanolni izvleček (EI) in kasneje še eterično olje iz EI (EOI) pa 269,7 g semen.

#### 3.3.1.1 Etanolna ekstrakcija semen *A. katsumadai*

Natehtano količino semen smo prenesli v veliko stekleno čašo, dodali smo 1 L 96 % etanola in pustili mešati z mešalom 3 dni na sobni temperaturi. Čašo smo prekrili z aluminijasto folijo. Po treh dneh mešanja semen v etanolu, smo ekstrakcijsko mešanico



filtrirali. Filtrat smo prelili v bučko in z rotavaporjem pri 40 °C izparili etanol. Preostanek etanola smo odstranili z dušikom.

### 3.3.1.2 Hidrodestilacija eteričnega olja

Hidrodestilacijo semen smo izvedli z uporabo Clevenger aparata. Za pridobitev eteričnega olja smo uporabili 201,8 g zmletih semen *A. katsumadai*. Postopek smo izvedli dvakrat, tako da smo vsakič destilirali polovico mase semen ( $m_1=100,3$  g ;  $m_2=101,5$  g).

Bučko smo postavili v grelnik, vanjo smo prenesli semena, dodali nekaj vrelnih kamenčkov in dolili destilirano vodo do polovice. Na bučko smo nadeli steklen Clevenger aparat ter v lij na sredini aparata dolili destilirano vodo do ustreznega nivoja. Pri tem smo pazili, da niso nastali zračni mehurčki. Aparat smo preko cevke povezali s pipo, da je voda pritekla v kondenzor. Manjšo odprtino pri strani smo zaprli z aluminijasto folijo. Nato smo prižgali grelnik v katerem je bila položena bučka, da je voda s semeni zavrela. Najprej smo nastavili na najvišjo temperaturo, ko je vsebina zavrela pa smo temperaturo znižali in jo vmes uravnavali. Destilacija je trajala 3 ure. Para je iz bučke po cevki navzgor potovala do kondenzorja. Bledo rumeno eterično olje iz semen se je nabiralo v cevki pod kondenzorjem. Po 3 urah smo aparat ugasnili in počakali približno 20 minut, da je voda prenehala vreti in se je olje poglelo na mestu. S tristranskim ventilom smo nato počasi odstranili vodo pod eteričnim oljem, odmerili volumen olja v merilni cevki in ga zbrali v vialo. Po pripravi EI je po enakem postopku kot za EO sledila hidrodestilacija EI za pridobitev EOI, katerega v nadaljevanju sicer nismo uporabili pri poskusih.

### 3.3.1.3 Izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka

Po hidrodestilaciji olja iz EI je v bučki ostal odpadni material, katerega smo filtrirali in filtrat zamrznili. Prav tako smo zamrznili gosti nefiltrirani ostanek OM. Na koncu smo oboje liofilizirali.

## 3.3.2 Kemijska analiza izvlečkov semen *A. katsumadai*

### 3.3.2.1 Analiza kemijske sestave eteričnega olja z metodo GC/MS

Vzorci EO za GC/MS smo pripravili v heksanu v razmerju 1/60, torej 20 µl eteričnega olja v 1200 µl heksana. Analizo smo izvedli z napravo Agilent 7890A GC, sklopljeno z Agilent 5975C MSD. Program je bil sledeč: 2 min na 45 °C, nato dvig temperature za 4 °C/min do 250 °C in na koncu 2 min na 250 °C. Nosilni plin je bil helij 5.6 s pretokom 0,9 ml/min. Injiciran volumen vzorca je znašal 1 µl (split ratio 50:1). Temperatura injektorja je znašala 240 °C, temperatura ionskega vira 230 °C in temperature interfaze 280 °C. Za vsako zaznano spojino v eteričnem olju smo dobili njen delež v olju in retencijski čas (Rt), tako da smo spojino identificirali na podlagi izračunanega retencijskega indeksa (Ri) (enačba 4)

in primerjave masnega spektra v zbirki podatkov (Adams, 2007). Za standard smo uporabili alkane od C9 do C24.

$$R_i X = 100 * ((R_t X - R_{t n0}) / (R_{t n1} - R_{t n0}) + C_{n0}) \quad \dots(4)$$

X = spojina; n0 = alkan, ki se izloči pred X; n1 = alkan, ki se izloči po X

### 3.3.2.2 Analiza kemijske sestave izvlečka odpadnega materiala z metodo HPLC

S HPLC/PDA smo določali kemijsko sestavo vzorcev odpadnega materiala po hidrodestilaciji EI. Za umeritveno krivuljo in s tem kvantifikacijo spojin smo kot standard uporabili čisti spojini diarilheptanoid-1 (DAH-1) in pinocembrin. Analiza je stekla na HPLC-PDA (Merck Hitachi LaChrom) s kolono Zorbax SB-C18, 2.1x150 nm, 3.5 micron (Agilent). Ločevanje je potekalo z gradientom v mobilnih fazah A: 0,1 % trifluoroacetat (TFA) v acetonitrilu (ACN) in B: 0,1 % trifluoroacetat v vodi (ddH<sub>2</sub>O). Hitrost pretoka je znašala 0,250 ml/min, temperatura kolone pa 30 °C. Za vsak vzorec je analiza stekla dvakrat. Metodo smo povzeli po predhodno analizi, ki so jo opravili Klančnik in sod. (2012a).

Preglednica 8: Pripravljene koncentracije in injiciran volumen vzorcev odpadnega materiala za HPLC.

| Vzorec                         | Konc. (mg/ml) | Injiciran V (μl) |
|--------------------------------|---------------|------------------|
| DAH-1                          | 0,1           | 5                |
|                                |               | 10               |
|                                | 0,025 (1/4)   | 2                |
|                                |               | 6                |
| <b>Gosti ostanek OM</b>        | 1,66          | 5                |
|                                | 0,84 (1/2)    | 3                |
| <b>Filtrat OM (vodna faza)</b> | 10            | 5                |
| Pinocembrin                    | 0,5           | 5                |
|                                |               | 2                |
|                                | 0,05 (1/10)   | 2                |
|                                |               | 10               |

### 3.3.2.3 Analiza kemijske sestave izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS

Za LC/MS analizo smo uporabili že pripravljene vzorce iz analize s HPLC. Uporabili smo naslednje koncentracije in injicirane volumne:

- Pinocembrin: 0,05 mg/ml (10 μl)
- DAH-1: 0,1 mg/ml (5 μl)
- Ostanek OM: 1,66 mg/ml (5 μl) in 0,84 mg/ml (3 μl)
- Filtrat OM: 10 mg/ml (5 μl)

Temperatura, hitrost pretoka, gradient in kolona so bili isti kot pri HPLC analizi. Razlika je bila v mobilnih fazah: A: 0,1 % HCOOH v ACN in B: 0,1 % HCOOH v ddH<sub>2</sub>O. Uporabili smo masni spekter z ionskim lovilec (ang. ion trap) in z ionizacijo z razprševanjem v

električnem polju (ESI). Rang iskanih mas je pokrival razmerja  $m/z$  od 50 do 2000. Podatke so pridobili na podlagi tako negativnega, kot tudi pozitivnega ionskega načina.

### 3.3.3 Priprava bakterijske kulture

Pred izvedbo mikrodilucijske metode smo pripravili ustrezno koncentracijo bakterijskih celic v inokulumu za nanos na mikrotitrne plošče. Da ne bi prišlo do kontaminacije, smo delali aseptično ob plinskem gorilniku ali v laminariju.

#### 3.3.3.1 Revitalizacija bakterij

Na plošče s krvnim agarjem Columbia smo s cepilno zanko nacepili zamrznjene seve bakterij *Campylobacter*, ki so bili shranjeni v krioepurvetkah pri temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plošče smo 24 ur inkubirali v posodah z mikroaerofilno atmosfero pri temperaturi  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po tem času smo značilne zrasle kolonije precepili na sveže plošče Columbia, ki smo jih ponovno inkubirali 24 ur pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v mikroaerofilnih pogojih in nadalje uporabili v eksperimentih.

Zamrznjene seve *S. aureus*, shranjene v krioepurvetkah pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo s cepilno zanko nacepili na plošče MHA. Plošče smo nato inkubirali 24 h v aerobnih pogojih in pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po tem času smo značilne zrasle kolonije precepili na sveže gojišče MHA, ponovno inkubirali 24 ur pri istih pogojih in nato uporabili v eksperimentih.

#### 3.3.3.2 Priprava tekoče kulture in inokuluma

Po inkubaciji smo majhne in prosojne kolonije kampilobaktrov s cepilno zanko prenesli v epruveto s 4 ml sterilnega tekočega gojišča MHB, kateremu smo predhodno dodali še 0,2 ml sterilne defibrilirane konjske krvi. Kulturo smo premešali na vrtničnem mešalu in inkubirali 24 ur pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v posodah z mikroaerofilno atmosfero. Naslednji dan smo 75  $\mu\text{l}$  kulture prenesli v 5 ml svežega sterilnega gojišča MHB in premešali na vrtničnem mešalu. S tem smo si pripravili ustrezno koncentracijo inokuluma kulture, ki smo jo v nadaljevanju ob izvedbi mikrodilucijske metode prenesli na mikrotitrne plošče.

Majhne bele kolonije stafilokokov smo iz plošče MHA prenesli v 4 ml sterilnega tekočega gojišča MHB. Kulturo smo premešali na vrtničnem mešalu in po 24 urni inkubaciji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pripravili inokulum. Med inkubacijo je bila kultura na stresalniku s 100 obrati/min. Zaradi dobre rasti stafilokokov smo naslednji dan pripravili 100-kratno redčitev kulture, tako da smo v 990  $\mu\text{l}$  fiziološke raztopine dodali 10  $\mu\text{l}$  prekonočne kulture. Od tako pripravljene redčitve ( $10^{-2}$ ) smo odvzeli 75  $\mu\text{l}$  in prenesli v 5 ml sterilnega MHB. Kulturo smo premešali na vrtničnem mešalu in jo uporabili pri izvedbi mikrodilucijske metode.

### 3.3.3.3 Metoda nakapljalne plošče

Ker smo pri mikrodilucijski metodi potrebovali kulturo z ustrezno koncentracijo bakterijskih celic, smo po pripravi inokuluma to koncentracijo določili z metodo nakapljalne plošče. Pred prenosom na mikrotitrsko ploščo smo iz epruvete s 5 ml kulture odvzeli 100  $\mu$ l inokuluma za pripravo ustreznih redčitev. Odvzeti inokulum smo prenesli v mikrocentrifugirko z 900  $\mu$ l fiziološke raztopine in pripravili redčitveno vrsto do  $10^{-4}$ . Nato smo po 10  $\mu$ l zadnjih dveh redčitev prenesli na ustrezne plošče z gojišči. V primeru kampilobaktrov smo uporabili plošče z AHB, v primeru stafilokokov pa plošče z MHA. Plošče s selektivnim gojiščem AHB smo inkubirali 48 ur pri 42 °C in v mikroaerofilni atmosferi, plošče MHA s stafilokoki pa 24 ur pri 37°C in v aerobnih pogojih. Po inkubaciji smo prešteli kolonije in po spodnji enačbi (enačba 5) izračunali koncentracijo bakterijskih celic v posameznem inokulumu. Kampilobaktri so na ploščah AHB tvorili rdeče kolonije zaradi redukcije TTC, ki je v gojišču brezbarven, do formazana, ki je rdeče barve.

**Modulatorni test:** Modulatorni učinek izvlečkov smo prav tako določili po zgoraj opisanem principu metode mikrodilucije v bujonu s tem, da smo imeli v gojišču MHB dodano subinhibitorno koncentracijo modulatorja. Tako smo na mikrotitrski plošči pripravili dvakratne redčitve protimikrobnih snovi v kombinaciji s posameznim modulatorjem iz semen. Po inkubaciji smo odčitali MIK protimikrobne snovi z dodanim modulatorjem.

Modulatorno vlogo izvlečkov smo določili glede na razliko v MIK izbranih protimikrobnih sredstev samih in skupaj s potencialnim modulatorjem. Rezultat smo izrazili z modulatornim faktorjem (MF), ki predstavlja razmerje med MIK samega protimikrobnega sredstva in MIK protimikrobnega sredstva z modulatorjem (enačba 6). Kot modulatorje odpornosti smo označili izvlečke z MF 4 ali več.

## 4 REZULTATI

V magistrskem delu smo ugotavljali modulatorni učinek semen rastline *A. katsumadai* na odpornost izbranih sevov bakterij *Campylobacter* in *Staphylococcus*. V ta namen smo imeli pripravljene tri različne pripravke iz semen in sicer, etanolni izvleček, eterično olje iz semen in izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji olja iz etanolnega izvlečka. Njihovo modulatorno vlogo smo preverjali v kombinaciji z različnimi protimikrobnimi snovmi in določali morebitno spremembo v protimikrobnem delovanju izbranih snovi. Za izvedbo modulatornega testa smo uporabili metodo mikrodilucije v bujonu. Pri delu smo uporabili proti antibiotikom odporne in občutljive bakterijske seve po Gramu negativnih ter po Gramu pozitivnih bakterij. Hkrati nas je zanimal vpliv modulatorjev na delovanje izlivnih črpalk, kar smo preverjali na mutantah *C. jejuni* NCTC 11168 z okvarjenimi geni za delovanje izlivnih črpalk. Opisani del magistrske naloge je bil opravljen v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, v obdobju od sredine aprila do sredine avgusta leta 2012.

Modulatorno delovanje pripravkov iz semen smo med seboj primerjali tudi glede na vsebnosti biološko aktivnih spojin v posameznem pripravku. Na oddelku za farkamognozijo Inštituta za farmacevtske znanosti na Univerzi v Gradcu smo z etanolno ekstrakcijo in hidrodestilacijo semen pripravili posamezne izvlečke ter analizirali kemijsko sestavo eteričnega olja in odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka. Z metodo GC/MS smo določili vsebnost spojin v eteričnem olju, medtem ko smo spojine v izvlečku odpadnega materiala določili z metodo HPLC in nadalje še z LC/MS. Ta del magistrske naloge je bil opravljen v obdobju od 15. oktobra 2012 do 7. decembra 2012.

### 4.1 PRIPRAVA IZVLEČKOV IZ SEMEN *A. katsumadai*

S postopkom etanolne ekstrakcije 269,7 g semen *A. katsumadai* smo pridobili 19,8 g posušenega etanolnega izvlečka (EI), kar znaša 7 % mase semen.

Po prvi izvedbi hidrodestilacije smo iz 100,3 g semen dobili 0,85 ml eteričnega olja (EO), kar znaša 0,85 % semen. Pri drugi hidrodestilaciji smo iz 101,5 g semen dobili 0,75 ml EO, kar znaša 0,74 % semen. Skupaj smo iz 201,8 g semen pridobili 1,6 ml EO, kar predstavlja 0,79 % semen.

Po hidrodestilaciji 18 g etanolnega izvlečka smo pridobili 0,67 ml eteričnega olja (EOI), katerega nismo uporabili v eksperimentih. Preostali odpadni material po hidrodestilaciji (OM), ki smo ga uporabili pri modulatornih testih, smo za kemijsko analizo ločili na dva dela. Tako smo po filtraciji in liofilizaciji dobili 11g gostega ostanka OM in 3,6 g filtrata OM (vodna faza).

#### 4.2 MODULATORNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV SEMEN *A. katsumadai*

Modulatorno učinkovitost EI, OM in EO smo določili glede na razliko v minimalnih inhibitornih koncentracijah izbranih protimikrobnih sredstev samih in skupaj s potencialnim modulatorjem. MIK so bile določene z metodo mikrodilucije v bujonu na standardnih mikrotitrskih ploščah (Klančnik in sod., 2010). Učinkovitost modulatorjev smo določali skupaj z antibiotikoma ciprofloksacinom iz skupine fluorokinolonov in eritromicinom iz skupine makrolidov, razkužilom triklosanom, žolčnimi solmi in etidijevim bromidom, ki se uporablja kot splošni substrat izlivnih črpalk (Gröblacher in sod., 2012). Potencialne modulatorje smo testirali v subinhibitornih koncentracijah rastlinskih pripravkov, ki so znašale četrtno in polovico vrednosti MIK določenega rastlinskega pripravka (0,25 MIK in 0,5 MIK) za posamezen sev. Modulatorni učinek smo izrazili z modulatornim faktorjem (MF), ki predstavlja količnik MIK-a samega protimikrobnega sredstva in MIK-a protimikrobnega sredstva z modulatorjem. Kot modulatorje odpornosti smo označili materiale z MF 4 ali več.

#### 4.2.1 Modulatorni učinek izvlečkov semen *A. katsumadai* na seve bakterij *Campylobacter*

Preglednica 9: MIK protimikrobnih sredstev samih in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki v subinhibitorni koncentraciji 0,25 MIK, pri bakterijah rodu *Campylobacter*.

| Sev                            | PROTIMIKROBNO SREDSTVO |               |             |               |             |                |             |                |                 |               |
|--------------------------------|------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-----------------|---------------|
|                                | Ciprofloksacin         |               | Eritromicin |               | Triklosan   |                | Žolčne soli |                | Etidijev bromid |               |
|                                | MIK (µg/ml)            | MF            | MIK (µg/ml) | MF            | MIK (µg/ml) | MF             | MIK (mg/ml) | MF             | MIK (µg/ml)     | MF            |
| <b><i>C. jejuni</i> 11168</b>  | 0,125                  |               | 0,25        |               | 32          |                | >2          |                | 1               |               |
| +EI                            | 0,063                  | 2             | 0,25        | 1             | 4           | <b>8</b>       | >2          | ND             | 2               | 0,5           |
| +OM                            | 0,063                  | 2             | 0,25        | 1             | 2           | <b>16</b>      | >2          | ND             | 2               | 0,5           |
| +EO                            | <0,008                 | <b>&gt;16</b> | 0,125       | 2             | <0,125      | <b>&gt;256</b> | 1           | >2             | 0,5             | 2             |
| <b><i>cmeB</i></b>             | 0,031                  |               | 0,031       |               | 2           |                | 0,064       |                | 0,063           |               |
| +EI                            | <0,001                 | <b>&gt;32</b> | <0,0005     | <b>&gt;64</b> | <0,25       | <b>&gt;8</b>   | <0,002      | <b>&gt;32</b>  | <0,002          | <b>&gt;32</b> |
| +OM                            | <0,001                 | <b>&gt;32</b> | <0,0005     | <b>&gt;64</b> | <0,25       | <b>&gt;8</b>   | <0,002      | <b>&gt;32</b>  | <0,002          | <b>&gt;32</b> |
| +EO                            | 0,0156                 | 2             | 0,0313      | 1             | 2           | 1              | 0,064       | 1              | 0,063           | 1             |
| <b><i>cmeF</i></b>             | 0,125                  |               | 0,5         |               | 8           |                | >4          |                | 1               |               |
| +EI                            | 0,125                  | 1             | 0,5         | 1             | >8          | <1             | >4          | ND             | 2               | 0,5           |
| +OM                            | 0,125                  | 1             | 0,5         | 1             | 8           | 1              | >4          | ND             | 2               | 0,5           |
| +EO                            | 0,125                  | 1             | 0,25        | 2             | >8          | <1             | >4          | ND             | 1               | 1             |
| <b><i>cmeR</i></b>             | 0,25                   |               | 2           |               | 16          |                | >4          |                | 2               |               |
| +EI                            | 0,125                  | 2             | 1           | 2             | 32          | 0,5            | >4          | ND             | 2               | 1             |
| +OM                            | 0,25                   | 1             | 1           | 2             | 16          | 1              | >4          | ND             | 2               | 1             |
| +EO                            | 0,125                  | 2             | 1           | 2             | >16         | <1             | >4          | ND             | 2               | 1             |
| <b><i>C. jejuni</i> 375/06</b> | 32                     |               | 128         |               | 8           |                | >2          |                | 1               |               |
| +EI                            | 32                     | 1             | 64          | 2             | <0,25       | <b>&gt;32</b>  | 0,512       | <b>&gt;4</b>   | 1               | 1             |
| +OM                            | 32                     | 1             | 64          | 2             | 0,5         | <b>16</b>      | >2          | ND             | 1               | 1             |
| +EO                            | 32                     | 1             | 32          | <b>4</b>      | <0,25       | <b>&gt;32</b>  | <0,032      | <b>&gt;128</b> | 1               | 1             |
| <b><i>C. jejuni</i> K49/4</b>  | 1                      |               | 0,5         |               | 32          |                | >4          |                | 1               |               |
| +EI                            | 1                      | 1             | 0,5         | 1             | 32          | 1              | >4          | ND             | 2               | 0,5           |
| +OM                            | 1                      | 1             | 0,5         | 1             | 32          | 1              | 2           | <b>&gt;2</b>   | 2               | 0,5           |
| +EO                            | 0,5                    | 2             | 0,25        | 2             | 64          | 0,5            | >4          | ND             | 1               | 1             |
| <b><i>C. jejuni</i> 573/03</b> | 32                     |               | 1           |               | 16          |                | >4          |                | 0,5             |               |
| +EI                            | 32                     | 1             | 1           | 1             | 8           | 2              | 4           | >1             | 1               | 0,5           |
| +OM                            | 32                     | 1             | 1           | 1             | 8           | 2              | 4           | >1             | 0,5             | 1             |
| +EO                            | 16                     | 2             | 1           | 1             | 16          | 1              | 1           | <b>&gt;4</b>   | 0,25            | 2             |
| <b><i>C. jejuni</i> 33560</b>  | 0,125                  |               | 2           |               | 16          |                | >4          |                | 2               |               |
| +EI                            | 0,125                  | 1             | 1           | 2             | 16          | 1              | >4          | ND             | 4               | 0,5           |
| +OM                            | 0,125                  | 1             | 0,5         | <b>4</b>      | 16          | 1              | >4          | ND             | 4               | 0,5           |
| +EO                            | 0,063                  | 2             | 0,5         | <b>4</b>      | 32          | 0,5            | >4          | ND             | 2               | 1             |

Opombe: Krepko označeni modulatorni faktorji (MF) pomenijo signifikantno modulatorno učinkovitost (MF>2). Oznaka EI predstavlja etanolni izvleček, oznaka OM odpadni material, oznaka EO pa eterično olje iz semen *A. katsumadai*. ND pomeni, da vrednosti nismo mogli določiti.



Iz rezultatov v preglednici 9 je razvidno, da je modulatorna učinkovitost pripravkov iz semen *A. katsumadai* skupaj s testiranimi protimikrobnimi sredstvi v primeru kampilobaktrov sevno specifična. Vsi trije pripravki so učinkoviti modulatorji odpornosti v kombinaciji s triklosanom na sevih NCTC 11168 in *C. jejuni* 375/06. Pri slednjem izkazuje EO šibkejšo modulatorno učinkovitost tudi v kombinaciji z eritromicinom in izrazito dobro učinkovitost skupaj z žolčnimi solmi. Modulatorni učinek EO je bil dokazan tudi v kombinaciji s ciprofloksacinom in žolčnimi solmi na sevu *C. jejuni* NCTC 11168. Pri ostalih sevih se razen nekaj primerov šibke modulatorne učinkovitosti (MF=4) vrednosti MIK v večini niso spremenile za več kot faktor 2, torej v teh primerih izvlečki niso izkazovali modulatorne učinkovitosti. Izmed testiranih protimikrobnih sredstev izstopata triklosan in etidijev bromid, pri katerih se je MIK v kombinaciji z rastlinskimi pripravki v nekaterih primerih povišal.

Od mutant seva *C. jejuni* NCTC 11168, najbolj izstopa sev z mutacijo v genu *cmeB* za notranji membranski prenašalec izlivne črpalke CmeABC, pri katerem opazimo izrazito znižanje vrednosti MIK protimikrobnih snovi, v primerjavi z divjim tipom. Tukaj sta se kot učinkovita modulatorja izkazala pripravki EI in OM, medtem ko EO ni bistveno znižalo vrednosti MIK protimikrobnim snovem. Pri ostalih dveh mutantah izvlečki niso izkazovali modulatornega učinka.

Vsi sevi izkazujejo nizko odpornost proti triklosanu in visoko odpornost proti žolčnim solem. Potrdili smo tudi odpornost seva *C. jejuni* 375/06 proti ciprofloksacinu in eritromicinu, ter odpornost seva *C. jejuni* 573/03 proti ciprofloksacinu. Modulatorni učinek posameznih izvlečkov je opazen na odpornih sevih, zlasti v primeru triklosana in žolčnih soli, kot tudi na občutljivih sevih, kjer so v posameznih primerih povišali občutljivost na antibiotika ciprofloksacin ali eritromicin.

Preglednica 10: MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki v subinhibitorni koncentraciji 0,5 MIK, pri bakterijah rodu *Campylobacter*.

| Sev                                | PROTIMIKROBNO SREDSTVO |     |             |     |             |     |             |      |                 |      |
|------------------------------------|------------------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|------|-----------------|------|
|                                    | Ciprofloksacin         |     | Eritromicin |     | Triklosan   |     | Žolčne soli |      | Etidijev bromid |      |
|                                    | MIK (µg/ml)            | MF  | MIK (µg/ml) | MF  | MIK (µg/ml) | MF  | MIK (mg/ml) | MF   | MIK (µg/ml)     | MF   |
| <b><i>C. jejuni</i> NCTC 11168</b> | 0,125                  |     | 0,25        |     | 32          |     | >2          |      | 1               |      |
| +OM                                | 0,125                  | 1   | 0,063       | 4   | 8           | 4   | 0,256       | >8   | 1               | 1    |
| +EO                                | <0,063                 | >2  | 0,004       | >64 | <0,5        | >64 | <0,125      | >32  | <0,008          | >128 |
| <b><i>C. jejuni</i> 375/06</b>     | 32                     |     | 128         |     | 8           |     | >2          |      | 1               |      |
| +OM                                | 16                     | 2   | ND          | ND  | 4           | 2   | 0,512       | >4   | 0,5             | 2    |
| +EO                                | <0,5                   | >64 | ND          | ND  | <0,25       | >32 | <0,016      | >256 | <0,031          | >32  |
| <b><i>C. jejuni</i> K49/4</b>      | 1                      |     | 0,5         |     | 32          |     | >4          |      | 1               |      |
| +OM                                | <0,0156                | >64 | <0,125      | >4  | <0,5        | >64 | <0,5        | >16  | <0,016          | >64  |
| +EO                                | <0,0156                | >64 | <0,125      | >4  | <0,5        | >64 | <0,5        | >16  | <0,016          | >64  |
| <b><i>C. jejuni</i> 573/03</b>     | 32                     |     | 1           |     | 16          |     | >4          |      | 0,5             |      |
| +OM                                | <2                     | >16 | <0,5        | >2  | <0,25       | >64 | <0,25       | >32  | 0,5             | 1    |
| +EO                                | <2                     | >16 | <0,5        | >2  | <0,25       | >64 | <0,25       | >32  | <0,016          | >32  |

Opombe: Krepko označeni modulatorni faktorji (MF) pomenijo signifikantno modulatorno učinkovitost (MF>2). Oznaka OM predstavlja odpadni material, oznaka EO pa eterično olje iz semen *A. katsumadai*. ND pomeni, da vrednosti nismo mogli določiti.

Modulatorni testi z višjo subinhibitorno koncentracijo (0,5 MIK) pripravkov OM in EO (preglednica 10) so pokazali, da sta oba v večini učinkoviteje znižala MIK testiranim protimikrobnim snovem, kot pa v nižji koncentraciji. Najbolje se je izkazalo EO, ki je pri vseh sevih *C. jejuni* delovalo modulatorno v kombinaciji z vsemi protimikrobnimi snovmi. Enako učinkovito je deloval tudi izvleček OM, vendar le pri sevih *C. jejuni* K49/4 in 573/03. Pri ostalih dveh sevih je bil učinek OM nekoliko slabši.

Oba izvlečka izkazujeta modulatorni učinek na odpornih in občutljivih bakterijskih sevih. Pri vseh sevih opazimo učinkovito znižanje odpornosti proti triklosanu in žolčnim solem. Pri odpornih sevih *C. jejuni* 375/06 in 573/03 opazimo uspešno znižanje MIK ciprofloksacina. Prav tako se je znižala MIK obeh antibiotikov in etidijevega bromida pri občutljivih sevih kampilobaktrov.

#### 4.2.2 Modulatorni učinek izvlečkov na seve bakterij rodu *Staphylococcus*

Preglednica 11: MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki pri bakterijah rodu *Staphylococcus*. Koncentracija pripravkov je znašala 0,25 MIK.

| Sev                                | PROTIMIKROBNO SREDSTVO |    |             |      |             |       |             |     |                 |      |
|------------------------------------|------------------------|----|-------------|------|-------------|-------|-------------|-----|-----------------|------|
|                                    | Ciprofloksacin         |    | Eritromicin |      | Triklosan   |       | Žolčne soli |     | Etidijev bromid |      |
|                                    | MIK (µg/ml)            | MF | MIK (µg/ml) | MF   | MIK (µg/ml) | MF    | MIK (mg/ml) | MF  | MIK (µg/ml)     | MF   |
| <b><i>S. aureus</i> 5.1 (MRSA)</b> | 2                      |    | 0,25        |      | 0,125       |       | 4           |     | 64              |      |
| +EI                                | 1                      | 2  | 0,25        | 1    | 0,5         | 0,25  | 1           | 4   | 16              | 4    |
| +OM                                | 1                      | 2  | 0,125       | 2    | 0,25        | 0,5   | 2           | 2   | 16              | 4    |
| +EO                                | 0,5                    | 4  | 0,063       | 4    | 0,25        | 0,5   | 0,512       | 8   | 16              | 4    |
| <b><i>S. aureus</i> 5.2</b>        | 0,25                   |    | >1024       |      | 0,031       |       | 4           |     | 8               |      |
| +EI                                | 0,125                  | 2  | >1024       | ND   | 0,125       | 0,25  | 2           | 2   | 4               | 2    |
| +OM                                | 0,25                   | 1  | >1024       | ND   | 0,125       | 0,25  | 4           | 1   | 4               | 2    |
| +EO                                | <0,031                 | >8 | 8           | >128 | <0,002      | >16   | <0,063      | >64 | <0,063          | >128 |
| <b><i>S. aureus</i> 5.3</b>        | 0,5                    |    | 0,5         |      | 0,002       |       | 4           |     | 2               |      |
| +EI                                | 0,125                  | 4  | 0,5         | 1    | 0,125       | 0,016 | 4           | 1   | 4               | 0,5  |
| +OM                                | 0,25                   | 2  | 0,5         | 1    | 0,125       | 0,016 | 4           | 1   | 4               | 0,5  |
| +EO                                | 0,125                  | 4  | 0,25        | 2    | 0,016       | 0,125 | 2           | 2   | 0,5             | 4    |
| <b><i>S. aureus</i> 5.5 (MRSA)</b> | 64                     |    | 0,5         |      | 0,063       |       | 4           |     | 4               |      |
| +EI                                | 32                     | 2  | 0,5         | 1    | 0,25        | 0,25  | 2           | 2   | 1               | 4    |
| +OM                                | 32                     | 2  | 0,5         | 1    | 0,25        | 0,25  | 4           | 1   | 2               | 2    |
| +EO                                | 8                      | 8  | <0,031      | >16  | <0,004      | >16   | 0,256       | 16  | <0,031          | >128 |
| <b><i>S. aureus</i> 5.6</b>        | 0,5                    |    | 0,25        |      | 1           |       | 4           |     | 8               |      |
| +EI                                | 0,25                   | 2  | 0,25        | 1    | 2           | 0,5   | 2           | 2   | 4               | 2    |
| +OM                                | 0,25                   | 2  | 0,25        | 1    | 4           | 0,25  | 2           | 2   | 4               | 2    |
| +EO                                | 0,25                   | 2  | 0,125       | 2    | 2           | 0,5   | 2           | 2   | 2               | 4    |

Opombe: Krepro označeni modulatorni faktorji (MF) pomenijo signifikantno modulatorno učinkovitost (MF>2). Oznaka EI predstavlja etanolni izvleček, oznaka OM odpadni material, oznaka EO pa eterično olje iz semen *A. katsumadai*. ND pomeni, da vrednosti nismo mogli določiti.

Iz rezultatov je razvidno, da se pri vseh sevih kaže določena modulatorna učinkovitost vsaj enega izmed testiranih rastlinskih pripravkov v kombinaciji z določenimi protimikrobnimi snovmi. Pri *S. aureus* 5.1 je EO iz semen znižalo MIK skoraj vseh protimikrobnih snovi. Tudi EI in OM sta pri omenjenem sevu delovala modulatorno skupaj z etidijevim bromidom, EI pa tudi skupaj z žolčnimi solmi. Prav tako se je EO kot učinkovit modulator izkazalo pri sevih *S. aureus* 5.2 in 5.5, kjer je znižalo MIK vsem protimikrobnim snovem od 8-krat do več kot 128-krat. Slabše je kot modulator deloval EI, ki je znižal MIK za največ 4-krat. Najslabše se je izkazal OM, ki v kombinaciji s protimikrobnimi sredstvi skoraj nikjer ni znižal MIK, razen v enem primeru skupaj z etidijevim bromidom. Pri sevih *S. aureus* 5.3 in 5.6 so bili modulatorji manj učinkoviti, saj večinoma niso znižali MIK protimikrobnih snovi, v nekaj primerih pa največ 4-krat. Zanimivo je, da se je v kombinaciji z izvlečki, MIK triklosana v večini primerov zvišala.

Opazno je, da modulatorji učinkujejo na obeh sevih MRSA, kjer izstopa zlasti EO. EO je pri sevih, odpornih proti ciprofloksacinu oz. eritromicinu, znižalo odpornost proti obema antibiotikoma. Prav tako se je v kombinaciji z EO pri določenih sevih učinkovito znižala njihova visoka odpornost proti žolčnim solem. Vsi izvlečki so znižali MIK etidijevega bromida pri odpornem sevu *S. aureus* 5.1. Poleg učinka na odporne seve je EO v določenih primerih delovalo modulatorno tudi na občutljivih sevih.

Preglednica 12: MIK posameznih protimikrobnih sredstev in v kombinaciji z rastlinskimi pripravki pri bakterijah rodu *Staphylococcus*. Koncentracija pripravkov je znašala 0,5 MIK.

| PROTIMIKROBNO SREDSTVO      |                                  |      |                               |     |                             |      |                               |      |                                   |      |
|-----------------------------|----------------------------------|------|-------------------------------|-----|-----------------------------|------|-------------------------------|------|-----------------------------------|------|
| SEV                         | Ciprofloksacin<br>MIK<br>(µg/ml) |      | Eritromicin<br>MIK<br>(µg/ml) |     | Triklosan<br>MIK<br>(µg/ml) |      | Žolčne soli<br>MIK<br>(mg/ml) |      | Etidijev bromid<br>MIK<br>(µg/ml) |      |
|                             |                                  | MF   |                               | MF  |                             | MF   |                               | MF   |                                   | MF   |
| <b>S. aureus 5.1 (MRSA)</b> | 2                                |      | 0,25                          |     | 0,125                       |      | 4                             |      | 64                                |      |
| +EI                         | <0,031                           | >64  | <0,031                        | >8  | <0,001                      | >128 | <0,064                        | >64  | 16                                | 4    |
| +OM                         | 2                                | 1    | 0,125                         | 2   | 0,125                       | 1    | 0,256                         | 16   | 32                                | 2    |
| +EO                         | 1                                | 2    | 0,125                         | 2   | >0,125                      | <1   | 1                             | 4    | 8                                 | 8    |
| <b>S. aureus 5.2</b>        | 0,25                             |      | >1024                         |     | 0,031                       |      | 4                             |      | 8                                 |      |
| +EI                         | 0,25                             | 1    | >1024                         | ND  | 0,12                        | 0,25 | <0,031                        | >128 | 8                                 | 1    |
| +OM                         | 0,063                            | 4    | >1024                         | ND  | <0,0009                     | >32  | 0,512                         | 8    | 4                                 | 2    |
| +EO                         | 1                                | 0,25 | 1024                          | >1  | <0,0009                     | >32  | 0,256                         | 16   | 8                                 | 1    |
| <b>S. aureus 5.3</b>        | 0,5                              |      | 0,5                           |     | 0,002                       |      | 4                             |      | 2                                 |      |
| +EI                         | 0,25                             | 2    | 0,06                          | 8   | <0,00006                    | >32  | <0,016                        | >256 | <0,03                             | >64  |
| +OM                         | 0,25                             | 2    | <0,008                        | >64 | 0,0001                      | 16   | <0,016                        | >256 | <0,03                             | >64  |
| +EO                         | 0,25                             | 2    | 0,125                         | 4   | 0,0001                      | 16   | <0,016                        | >256 | <0,03                             | >64  |
| <b>S. aureus 5.5 (MRSA)</b> | 64                               |      | 0,5                           |     | 0,06                        |      | 4                             |      | 4                                 |      |
| +EI                         | 32                               | 2    | 0,25                          | 2   | 0,06                        | 1    | 2                             | 2    | 2                                 | 2    |
| +OM                         | 32                               | 2    | 1                             | 0,5 | >0,06                       | <1   | 0,512                         | 8    | 2                                 | 2    |
| +EO                         | 128                              | 0,5  | 1                             | 0,5 | >0,06                       | <1   | 1                             | 4    | 4                                 | 1    |
| <b>S. aureus 5.6</b>        | 0,5                              |      | 0,25                          |     | 1                           |      | 4                             |      | 8                                 |      |
| +EI                         | 0,125                            | 4    | 0,125                         | 2   | <0,008                      | >128 | <0,032                        | >128 | 2                                 | 4    |
| +OM                         | 0,25                             | 2    | 0,125                         | 2   | 1                           | 1    | 0,5                           | >8   | 4                                 | 2    |
| +EO                         | 0,008                            | 64   | <0,004                        | >64 | <0,008                      | >128 | 0,5                           | >8   | <0,06                             | >128 |

Opombe: Krepko označeni modulatorni faktorji (MF) pomenijo signifikantno modulatorno učinkovitost (MF>2). Oznaka EI predstavlja etanolni izvleček, oznaka OM odpadni material, oznaka EO pa eterično olje iz semen *A. katsumadai*. ND pomeni, da vrednosti nismo mogli določiti.

V primerjavi s koncentracijo 0,25 MIK pripravkov iz semen opazimo, da so ti pri višji subinhibitorni koncentraciji, v več primerih znižali MIK protimikrobnih snovi. Najučinkoviteje so znižali odpornost sevu *S. aureus* 5.3, kjer so vsi trije pripravki delovali modulatorno v kombinaciji skoraj z vsemi protimikrobnimi snovmi, razen v primeru ciprofloksacina. Najslabše so pripravki učinkovali v primeru seva MRSA 5.5, kjer sta

samo OM in EO znižala MIK žolčnih soli za faktor 4 in 8. V splošnem je bila modulatorna vloga posameznega pripravka odvisna od seva in same protimikrobne snovi.

Zanimivo je, da EO ni bil tako uspešen modulator odpornosti sevov *S. aureus* 5.1, 5.2 in 5.5, kot v nižji subinhibitorni koncentraciji. Učinkovito je vsem snovem znižal MIK le pri sevu *S. aureus* 5.6. Prav tako je tudi EI znižal MIK vseh protimikrobnih snovi pri sevu MRSA 5.1. Izvlečka EI in OM sta se v višji subinhibitorni koncentraciji bolje odrezala pri znižanju MIK.

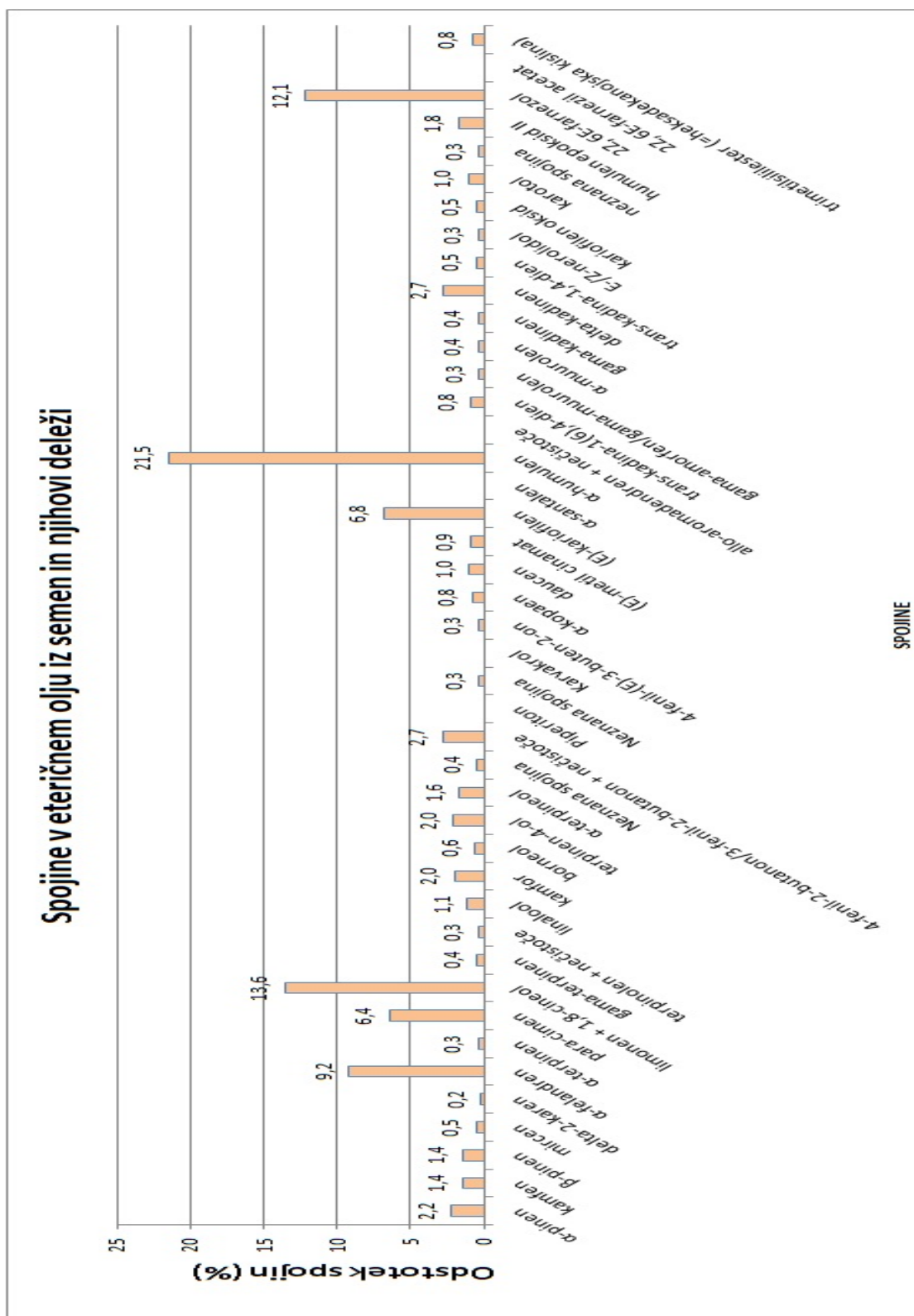
Vsi trije izvlečki so vsem sevom uspešno znižali njihovo visoko odpornost proti žolčnim solem in sicer od 4-krat do >256-krat. Sledilo je znižanje MIK za triklosan, na katerega so sevi stafilokokov visoko občutljivi. Nekoliko slabše so pripravki delovali modulatorno v kombinaciji z obema antibiotikoma. Pri sevih, odpornih proti ciprofloksacinu ali eritromicinu, je samo pripravek EI znižal odpornost proti ciprofloksacinu na sevu MRSA 5.1. Vsi trije pripravki so znižali MIK eritromicina pri sicer občutljivem sevu *S. aureus* 5.3.

#### 4.3 ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE ETERIČNEGA OLJA IZ SEMEN

Spojine v EO smo določili s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Spojine smo identificirali na podlagi izračunanega retencijskega indeksa in masnega spektra. Podan je tudi odstotek vsebnosti posamezne spojine v EO (Preglednica 13).

Preglednica 13: Retencijski čas (Rt), retencijski indeks (Ri), referenčni Ri in deleži identificiranih spojin v eteričnem olju. Spojine brez podatka o deležu so bile prisotne v prenizki koncentraciji za detekcijo.

| Št. spojine | Rt     | Ri      | Ref. Ri    | Delež (%) | Identificirana spojina                          |
|-------------|--------|---------|------------|-----------|-------------------------------------------------|
| 1           | 6,308  | 970,16  | 932        | 2,18      | $\alpha$ -pinen                                 |
| 2           | 6,781  | 975,70  | 946        | 1,425     | Kamfen                                          |
| 3           | 7,79   | 987,50  | 974        | 1,405     | $\beta$ -pinen                                  |
| 4           | 8,508  | 995,90  | 988        | 0,514     | Mircen                                          |
| 5           | 8,761  | 998,87  | 1001       | 0,158     | Delta-2-karen                                   |
| 6           | 8,903  | 998,99  | 1002       | 9,163     | $\alpha$ -felandren                             |
| 7           | 9,411  | 1012,98 | 1014       | 0,349     | $\alpha$ -terpinen                              |
| 8           | 9,738  | 1020,65 | 1020       | 6,433     | Para-cimen                                      |
| 9           | 9,953  | 1025,69 | 1024, 1026 | 13,556    | Limonen + 1,8-cineol                            |
| 10          | 11,2   | 1054,95 | 1054       | 0,429     | Gama-terpinen                                   |
| 11          | 12,451 | 1084,30 | 1086       | 0,345     | Terpinolen + nečistoče                          |
| 12          | 13,094 | 1099,42 | 1095       | 1,116     | Linalool                                        |
| 13          | 14,788 | 1137,27 | 1141       | 1,968     | Kamfor                                          |
| 14          | 15,805 | 1159,99 | 1165       | 0,56      | Borneol                                         |
| 15          | 16,348 | 1171,71 | 1174       | 2,043     | Terpinen-4-ol                                   |
| 16          | 16,989 | 1186,24 | 1186       | 1,643     | $\alpha$ -terpineol                             |
| 17          | 17,468 | 1197,10 |            | 0,435     | Neznana spojina                                 |
| 18          | 19,369 | 1240,19 | 1242       | 2,746     | 4-fenil-2-butanon/3-fenil-2-butanon + nečistoče |
| 19          | 19,765 | 1249,17 | 1249       |           | Piperiton                                       |
| 20          | 20,047 | 1255,57 |            | 0,29      | Neznana spojina                                 |
| 21          | 22,129 | 1302,87 | 1298       |           | Karvakrol                                       |
| 22          | 24,253 | 1352,86 |            | 0,337     | 4-fenil-(E)-3-buten-2-on                        |
| 23          | 24,939 | 1369,00 | 1374       | 0,765     | $\alpha$ -kopaen                                |
| 24          | 25,134 | 1373,59 | 1380       | 0,953     | Daucen                                          |
| 25          | 25,352 | 1378,72 | 1376       | 0,924     | (E)-metil cinamat                               |
| 26          | 26,679 | 1410,47 | 1417       | 6,843     | (E)-kariofilen                                  |
| 27          | 26,832 | 1414,26 | 1416       |           | $\alpha$ -santalen                              |
| 28          | 28,07  | 1444,91 | 1455       | 21,504    | $\alpha$ -humulen                               |
| 29          | 28,335 | 1451,47 | 1458       |           | Allo-aromadendren + nečistoče                   |
| 30          | 28,967 | 1467,12 | 1475       | 0,822     | <i>trans</i> -kadina-1(6),4-dien                |
| 31          | 29,1   | 1470,41 | 1477       | 0,303     | Gama-amorfen/gama-muurolen                      |
| 32          | 30,068 | 1505,91 | 1500       | 0,359     | $\alpha$ -muurolen                              |
| 33          | 30,555 | 1506,77 | 1507       | 0,396     | $\gamma$ -kadinen                               |
| 34          | 30,988 | 1518,05 | 1520       | 2,724     | $\delta$ -kadinen                               |
| 35          | 31,274 | 1525,50 | 1533       | 0,451     | <i>trans</i> -kadina-1,4-dien                   |
| 36          | 32,685 | 1562,26 | 1561       | 0,348     | E-/Z-nerolidol                                  |
| 37          | 33,089 | 1572,78 | 1582       | 0,529     | Kariofilen oksid                                |
| 38          | 33,618 | 1586,56 | 1594       | 1,016     | Karotol                                         |
| 39          | 33,853 | 1592,68 |            | 0,285     | Neznana spojina                                 |
| 40          | 34,087 | 1598,78 | 1608       | 1,751     | Humulen epoksid II                              |
| 41          | 38,492 | 1720,33 | 1722       | 12,132    | 2Z, 6E-Farnezol                                 |
| 42          | 42,632 | 1839,36 | 1845       |           | 2Z, 6E-Farnezil acetat                          |
| 43          | 49,326 | 2031,83 |            | 0,801     | Trimetilsililester (= heksadekanojska kislina)  |

Slika 5: Deleži spojin v eteričnem olju iz semen *A. katsumadai*.

V eteričnem olju iz semen je bilo zaznanih 43 spojin, od katerih smo jih identificirali 40. Opazimo da so v eteričnem olju prisotni predvsem terpeni in terpenoidi. V 2 % ali več, so prisotne naslednje spojine:  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -felandren, 1,8-cineol skupaj z limonenom, kamfor, terpinen-4-ol, 4-fenil-2-butanon, para-cimen, *trans*-kariofilen,  $\alpha$ -humulen,  $\delta$ -kadinen in 2-*cis*,6-*trans*-farnezol. Med njimi zavzema  $\alpha$ -humulen največji delež, sledijo mu 1,8-cineol z limonenom, farnezol in  $\alpha$ -felandren.

#### 4.4 ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE IZVLEČKA ODPADNEGA MATERIALA S HPLC-PDA

Na podlagi retencijskih časov in ujemajočih se UV spektrov (Klančnik 2012a), smo določili naslednje spojine:

- Alpinetin (1),
- Pinocembrin (2),
- Kardamomin (3),
- (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on (4),
- *trans*, *trans*-1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on (DAH-1) (5).

Glede na absorpcijski maksimum smo površino kromatografskih vrhov za spojine 1, 2 in 4 odčitali pri 260 nm, za 3 in 5 pa pri 320 nm. Na podlagi površin vrhov smo preračunali še dodatne koncentracije vzorcev in standardov, ki smo jih potrebovali za umeritveno krivuljo (preglednica 8).

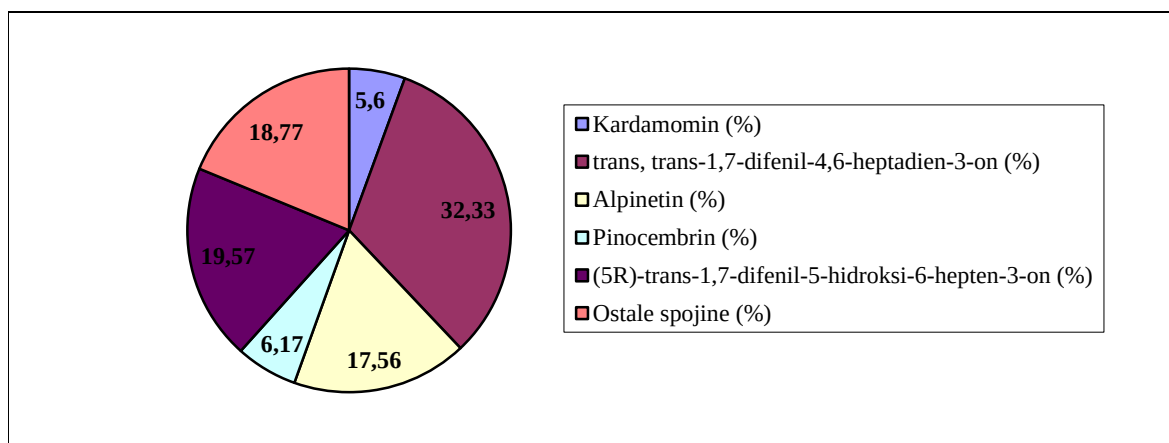
Preglednica 14: Deleži posameznih spojin v vzorcih odpadnega materiala.

|            | Kardamomin (%) | DAH-1 (%) | Alpinetin (%) | Pinocembrin (%) | (5R)- <i>trans</i> -1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on (%) |
|------------|----------------|-----------|---------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| Ostanek OM | 5,6            | 32,33     | 17,56         | 6,17            | 19,57                                                        |
| Filtrat OM | 0,22           | 0,6       | 0,56          | 0,5             | 0,86                                                         |

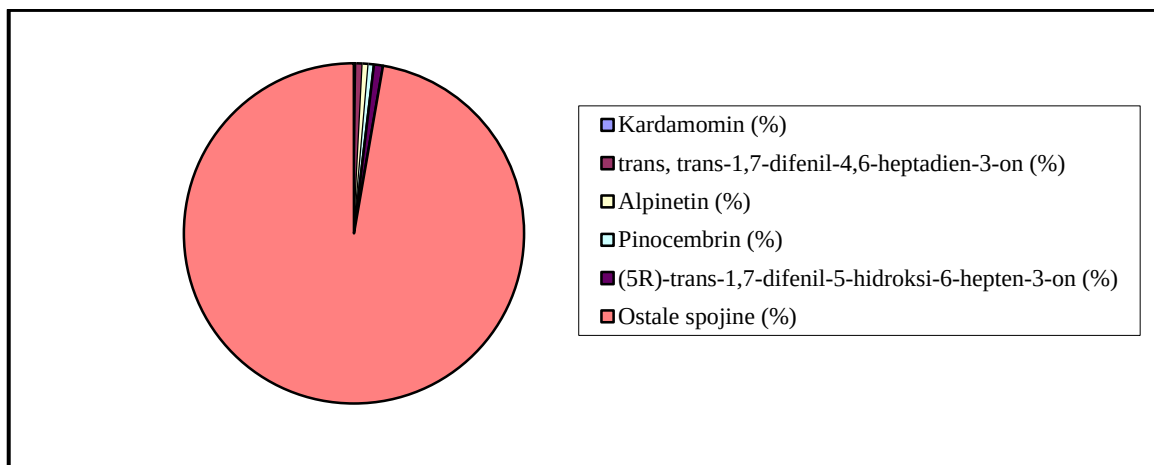
Preglednica 15: Delež identificiranih spojin in ostalih neidentificiranih spojin v vzorcih odpadnega materiala.

| Vzorec     | Identificirane spojine (%) (skupaj) | Ostale spojine (%) |
|------------|-------------------------------------|--------------------|
| Ostanek OM | 81,23                               | 18,77              |
| Filtrat OM | 2,74                                | 97,26              |





**Slika 6:** Delež identificiranih spojin v gostem ostanku izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji semen.



**Slika 7:** Delež identificiranih spojin v vodni fazi filtrata izvlečka odpadnega materiala po hidrodestilaciji semen.

V gostem ostanku OM zavzemajo identificirane spojine kar 81 % celotnega deleža OM etanolnega izvlečka. Neznanih spojin je le 18,7 %. Vseh pet spojin je prisotnih v izrazito večjih količinah v primerjavi z vzorcem iz filtrirane vodne faze ostanka po hidrodestilaciji. Z 32 % prevladuje DAH-1, sledi (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on v 19,6 %, alpinetin v 17,6 %, pinocembrin v 6,2 % in kardamomin v 5,6 %. Nasprotno je v filtriranem vzorcu OM delež identificiranih spojin izrazito nizek in sicer je za vsako od spojin manjši od 1 %.

#### 4.5 ANALIZA KEMIJSKE SESTAVE IZVLEČKA ODPADNEGA MATERIALA Z LC-PDA-MS

Spojine v vzorcih smo identificirali na podlagi retencijskega časa, molekulske mase in UV spektra v primerjavi z literaturo. V vseh vzorcih so bile pričakovano prisotne že predhodno s HPLC identificirane spojine (preglednica 16). Za ostale neznane spojine smo pridobili njihove molekulske mase in mase fragmentiranih ionov ter UV spektre. Rezultate smo

primerjali s spojinami iz literature, ki so bile najdene v semenih *A. katsumadai* (preglednica 19). Za večino spojin smo v literaturi našli samo osnovne molekulske mase, ne pa tudi UV spektrov, zato lahko samo domnevamo, da gre za te spojine. Za potrditev bi se moral ujemati vsaj še UV spekter spojin. Te bi nato izolirali in izvedli LC/MS analizo z ustreznim standardom ter v nadaljevanju še NMR spektroskopijo.

Preglednica 16: Predhodno že identificirane spojine in njihova molekulska masa.

| SPOJINE                                                    | M (g/mol) |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| Alpinetin                                                  | 270,29    |
| Pinocembrin                                                | 256,25    |
| Kardamomin                                                 | 270,29    |
| 5R- <i>trans</i> -1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on     | 280       |
| <i>trans,trans</i> -1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on (DAH-1) | 262,35    |

#### 4.5.1 Spojine v ostanku izvlečka odpadnega materiala

Preglednica 17: Identificirana spojina, retencijski čas (Rt), molekulska masa (Mw), UV max, razmerje *m/z* (negativni ali pozitivni ionski način) in mase fragmentiranih ionov dobljeni pri LC/MS analizi ostanka odpadnega materiala. V odebeljenem tisku so spojine, ki smo jih že potrdili s HPLC. Ostale spojine se po molekulski masi ujemajo s spojinami iz literature.

| Identificirana/domnevna spojina                                                          | Rt           | Mw     | UV max        | [M-H] (+/-) | Fragmentacijski vzorec ionov                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------|---------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (3S,5R)-3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan                                                 | 9,25         | 285    | 194, 223, 286 | 285 (-)     | MS <sup>2</sup> : 165<br>MS <sup>3</sup> (165): 121, 150, 97                                    |
| <b>Alpinetin</b>                                                                         | 12,83        | 270,29 | 210, 287      | 269 (-)     | MS <sup>2</sup> : 254, 227, 226, 212, 201, 165<br>MS <sup>3</sup> (227):212, 184                |
| <b>Pinocembrin</b>                                                                       | 16,14        | 256,25 | 220, 291      | 255 (-)     | MS <sup>2</sup> : 213, 227, 211, 187, 169, 151, 145<br>MS <sup>3</sup> (213):185, 169, 145, 141 |
| <b>Kardamomin</b>                                                                        | 18,20        | 270,29 | 212, 344      | 269 (-)     | MS <sup>2</sup> : 254, 253, 227, 226, 165<br>MS <sup>3</sup> (227): 212, 184                    |
| <b>5R-<i>trans</i>-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on</b> (280 - H <sub>2</sub> O=262) | 18,72        | 280    | 206, 253      | 263 (+)     | MS <sup>2</sup> : 105, 133<br>MS <sup>3</sup> (105): 105                                        |
| Katsumain A/B                                                                            | 19,96-20,42  | 535    | /             | 535 (+)     |                                                                                                 |
| 2,3,22,23-Tetrahidroksil-2,6,10,15,19,23-heksametil-6,10,14,18-tetracosatetraen          | 20,85-21,02  | 479    | /             | 479 (+)     |                                                                                                 |
| <b><i>trans,trans</i>-1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on (DAH-1)</b>                         | 22,66        | 262,35 | 192, 230, 324 | 263 (+)     | MS <sup>2</sup> : 105, 133<br>MS <sup>3</sup> : 105                                             |
| Neznana spojina                                                                          | 22, 79-22,99 |        | 225           | 351         |                                                                                                 |
| <i>trans,trans</i> -1,7-difenil-5-hidroksi-4,6-heptadien-3-on                            | 24,31-24,52  | 279    | 226, 342      | 279 (+)     | MS <sup>2</sup> : 131<br>MS <sup>3</sup> : 103                                                  |

V vzorcu ostanka OM je poleg večinskega deleža spojin iz preglednice 16 prisotnih tudi nekaj drugih spojin najdenih v literaturi (preglednica 19), katerih delež je sicer nižji. Za nekatere spojine smo dobili samo njihove masne spektre, ne pa tudi UV spektrov.

#### 4.5.2 Spojine v filtratu izvlečka odpadnega materiala (vodna faza)

Preglednica 18: Identificirana spojina, retencijski čas (Rt), molekulska masa (Mw), UV max, razmerje  $m/z$  (negativni ali pozitivni ionski način) in mase fragmentiranih ionov dobljeni pri LC/MS analizi filtrata odpadnega materiala. V odebeljenem tisku so spojine, ki smo jih že potrdili s HPLC. Ostale spojine se po molekulski masi ujemajo s spojinami iz literature.

| Identificirana/domnevena spojina                                                  | Rt    | Mw      | UV max        | [M-H] (+/-) | Fragmentacijski vzorec ionov                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|---------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Neznana spojina                                                                   | 4,09  |         | 202, 281      | 577 (-)     | MS <sup>2</sup> : 425, 401, 451<br>MS <sup>3</sup> (425): 407                                    |
| Katsumadin/Katehin                                                                | 4,86  | 289     | 209, 281      | 289 (-)     | MS <sup>2</sup> : 245, 205, 179<br>MS <sup>3</sup> (245): 203, 217, 227, 161, 187                |
| Katsumadin/Katehin                                                                | 5,74  | 289     | 203, 281      | 289 (-)     | MS <sup>2</sup> : 245, 205, 179<br>MS <sup>3</sup> (245): 203, 217, 227, 161, 187                |
| Neznana spojina                                                                   | 8,77  |         | 241, 286      | 559 (+)     | MS <sup>2</sup> : 541, 407, 313<br>MS <sup>3</sup> (541): 419, 437                               |
| (3S,5R)-3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan                                          | 9,27  | 287     | 210, 285      | 285 (-)     | MS <sup>2</sup> : 165, 179<br>MS <sup>3</sup> (165): 121, 150, 97, 65                            |
| Kaliksins Y                                                                       | 11,35 |         | 205           | 543 (-)     | MS <sup>2</sup> : 417, 499, 391, 287, 255<br>MS <sup>3</sup> (417): 255                          |
| Neznana spojina                                                                   | 11,53 |         | 206, 359      | 501 (-)     | MS <sup>2</sup> : 349, 375, 329, 287, 457, 483<br>MS <sup>3</sup> (349): 177                     |
| Neznana spojina                                                                   | 11,62 |         | 207, 216, 279 | 501 (-)     | MS <sup>2</sup> : 349, 457, 375, 329, 287<br>MS <sup>3</sup> (349): 177                          |
| <b>Alpinetin</b>                                                                  | 12,78 | 271     | 225, 288      | 269 (-)     | MS <sup>2</sup> : 254, 227, 226, 165<br>MS <sup>3</sup> (227): 212, 184                          |
| Neznana spojina                                                                   | 13,38 |         | 220, 351      | 213 (-)     | MS <sup>2</sup> : 169<br>MS <sup>3</sup> (169): 141                                              |
| <b>Pinocembrin</b>                                                                | 16,10 | 257     | 220, 291      | 255 (-)     | MS <sup>2</sup> : 213, 227, 211, 187, 169, 151, 145<br>MS <sup>3</sup> (213): 185, 169, 145, 141 |
| <b>Kardamomin</b>                                                                 | 18,16 | 270, 29 | 212, 344      | 269 (-)     | MS <sup>2</sup> : 254, 253, 227, 226, 165<br>MS <sup>3</sup> (227): 212, 184                     |
| <b>5R-trans-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on</b> (280 - H <sub>2</sub> O=262) | 18,71 | 280     | 209, 250      | 263 (+)     | MS <sup>2</sup> : 105, 133<br>MS <sup>3</sup> (105): 105                                         |
| <b>trans,trans-1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on (DAH-1)</b>                         | 22,66 | 263     | 192, 226, 324 | 263 (+)     | MS <sup>2</sup> : 105, 133<br>MS <sup>3</sup> (105): 105                                         |
| Katsumadain                                                                       | 22,97 | /       | 225           | 349 (-)     |                                                                                                  |
| trans,trans-1,7-difenil-5-hidroksi-4,6-heptadien-3-on                             | 24,41 | 278     | 226, 347      | 279 (+)     | MS <sup>2</sup> : 131<br>MS <sup>3</sup> (131): 103                                              |
| Neznana spojina                                                                   | 24,97 |         | 226           | 501 (+)     | MS <sup>2</sup> : 483, 485, 492<br>MS <sup>3</sup> (483): 466, 351, 261                          |

Pri tem vzorcu je poleg že potrjenih spojin prisotnih tudi veliko še neznanih spojin. Nekaj smo jih določili glede na molekulske mase iz literature. Mase ostalih neznanih spojin se ne ujemajo z masami spojin, najdenih v literaturi (preglednica 19).

Poleg alpinetina, pinocembrina, kardamomina, (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-ona in DAH-1, ki so po rezultatih HPLC prisotni v največjem deležu v vzorcu ostanka OM, smo z LC/MS dobili še podatke o drugih prisotnih spojinah. Nekatere molekulske mase se ujemajo z masami spojin, ki so bile najdene v semenih *A. katsumadai* v drugih študijah (Preglednica 19). Pri spojini (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on se je v procesu hidrodestilacije odcepila molekula vode, zato je molekulska masa iz rezultatov nižja od prave.

Od domnevnih spojin, ki smo jih določili, najdemo v obeh vzorcih diarilheptanoid *trans,trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-4,6-heptadien-3-on. V ostanku OM se nahajajo še diarilheptanoid katsumain A ali B; aciklični triterpenoid 2,3,22,23-tetrahidroksil-2,6,10,15,19,23-heksametil-6,10,14,18-tetracosatetraen, ki sta bila izolirana v nedavnih študijah (Li, 2010; Choi 2012) ter že znani diarilheptanoid (3S,5R)-3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan. V vzorcu filtrata OM so domnevno prisotni še: bifenilpropanoid katsumadin (Huang in sod., 2007) ali morebiti katehin, nato nedavno izoliran edinstveni adukt kalkona in diarilheptanoida imenovan kaliksin Y (Yang in sod., 2011) ter kavalakton katsumadain (Li, 2010).

Preglednica 19: Spojine najdene v literaturi in njihove molekulske mase ter nekateri UV absorpcijski maksimumi. Vse spojine navedene v preglednici so bile najdene v semenih *A.katsumadai*.

| SPOJINE                                                                                                     | Mw         | UV max          | Vir                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|
| Sumadain A                                                                                                  | 459+; 457- | 348, 240 (CHCl) | Hua in sod., 2008        |
| Sumadain B                                                                                                  | 459+; 457- |                 | Hua in sod., 2008        |
| Katsumadain C                                                                                               | 699-       |                 | Yang in sod., 2011       |
| Kaliksin Y                                                                                                  | 547-       |                 | Yang in sod., 2011       |
| (3S,5R)-3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan                                                                    | 285+       |                 | Kuroyanagi in sod., 1983 |
| (5R)-trans-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on                                                             | 280+       |                 | Kuroyanagi in sod., 1983 |
| (3S,5S)-3,5-dihidroksi-1,7-difenilheptan                                                                    | 282+       |                 | Kuroyanagi in sod., 1983 |
| trans-1,7-difenil-5-hidroksi-1-hepten                                                                       | 226+       |                 | Kuroyanagi in sod., 1983 |
| trans,trans-1,7-difenil-5-hidroksi-4,6-heptadien-3-on oz. (4E,6E)-5-hidroksi-1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on | 278        |                 | Kuroyanagi in sod., 1983 |
| 2,3,22,23-tetrahidroksil-2,6,10,15,19,23-heksametil-6,10,14,18-tetracosatetraen                             | 501 (M+Na) |                 | Choi in sod., 2012       |
| ()-(R)-40"-hidroksiyashabushiketol                                                                          | 319 (M+Na) | 325, 233        | Nam in sod., 2011        |
| (3S,5S)-Alpinikatin                                                                                         | 321 (M+Na) | 252, 227        | Nam in sod., 2011        |
| Katsumain C                                                                                                 | 567 +      | 348, 288, 217   | Nam in sod., 2011        |
| 7-epi-Katsumain C                                                                                           | 567 +      | 347, 288, 216   | Nam in sod., 2011        |
| Ent-alpinnanin B                                                                                            | 551 +      | 350, 289, 217   | Nam in sod., 2011        |
| Ent-alpinnanin A                                                                                            | 551 +      | 351, 289, 217   | Nam in sod., 2011        |
| Alpinnanin B                                                                                                | 551 +      |                 | Nam in sod., 2011        |
| Ent-kaliksin H                                                                                              | 567+       | 371, 228        | Nam in sod., 2011        |
| Epikaliksin H                                                                                               | 567+       |                 | Nam in sod., 2011        |
| Kaliksin H                                                                                                  | 567+       |                 | Nam in sod., 2011        |
| Katsumain A                                                                                                 | 557 (M+Na) |                 | Li in sod., 2010         |
| Katsumain B                                                                                                 | 557 (M+Na) |                 | Li in sod., 2010         |
| Katsumadain                                                                                                 | 349-       |                 | Li in sod., 2010         |
| Katsumadin                                                                                                  | 290+       |                 | Huang in sod., 2007      |
| 2,3,5, 22,23-Pentahidroksi-2,6,10,15,19,23-heksametil-6,10,14,18-tetracosatetraen                           | 517 (M+Na) |                 | Rho in sod., 2008        |
| Izorubain                                                                                                   | 389- 391+  |                 | Hua in sod., 2009        |
| Sumadain C                                                                                                  | 389- 391+  |                 | Hua in sod., 2009        |
| Rubrain                                                                                                     | 390        |                 | Hua in sod., 2009        |
| Katsumadain A                                                                                               | 476        |                 | Yang in sod., 1999       |
| Katsumadain B                                                                                               | 476        |                 | Yang in sod., 1999       |
| Katsumain D-G                                                                                               | 567+       |                 | Nam in Seo, 2013         |
| 3-(acetiloksi)-alpinikatin                                                                                  | 341+       |                 | Nam in Seo, 2013         |
| 5-(acetiloksi) alpinikatin                                                                                  | 341+       |                 | Nam in Seo, 2013         |

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Vse pogostejši pojav bakterijskih sevov odpornih proti antibiotikom, vključno z večkratno odpornimi sevi, vodi v iskanje novih strategij bojevanja proti tovrstnim patogenim mikroorganizmom. Medtem ko v razvoju novih antibiotikov ni opaznega večjega napredka, je z namenom obvladovanja odpornih bakterij naraslo zanimanje za izkoriščanje naravnih protimikrobnih učinkovin pridobljenih iz rastlin oz. njihovih izvlečkov. Trenutno se v rastlinah intenzivno išče modulatorje odpornosti bakterij, zlasti zaviralce izlivnih črpalk, ki bi preprečili iznos protimikrobnih snovi iz celice in s tem povrnili delovanje neučinkovitim protimikrobnim snovem (Stavri in sod., 2007). Ideja o uporabi rastlinskih izvlečkov in njihovih spojin v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi tako nudi obetavne možnosti v zniževanju odpornosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem.

Odporni bakterijski sevi rodov *Campylobacter* in *Staphylococcus* v današnjem času predstavljajo tveganje za neučinkovito terapijo z antibiotiki. Pri obeh rodovih igrajo pomembno vlogo tudi membranske izlivne črpalke. V magistrski nalogi smo zato preverjali učinek izvlečkov iz semen rastline *A. katsumadai* na spremembo odpornosti omenjenih po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterij ter ugotavljali ali morebiti zavirajo delovanje izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF pri bakterijah *Campylobacter*. V kombinaciji z izvlečki smo poleg antibiotikov eritromicina in ciprofloksacina, testirali še triklosan, žolčne soli in etidijev bromid. Učinek smo ugotavljali tako na občutljivih, kot tudi na odpornih bakterijskih sevih.

Pomen rastlinskih izvlečkov se odraža v vsebnosti ključnih spojin z določeno aktivnostjo. Raznolikost v kemijski sestavi izvlečkov je vzrok za številne biološke aktivnosti, ki jih posedujejo in zaradi katerih se jih uporablja v številne namene, tako v prehrani kot v medicini (Negi, 2012). Zaradi vsebnosti številnih biološko aktivnih učinkovin in uporabe v tradicionalni kitajski medicini je *Alpinia katsumadai* deležna velikega zanimanja. V magistrski nalogi smo se usmerili v določanje modulatornega učinka treh različnih pripravkov iz semen rastline. To so etanolni izvleček (EI), eterično olje iz semen (EO) in izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji EI (OM). Prav tako smo njihovo učinkovitost primerjali glede na kemijsko sestavo posameznega izvlečka.

### 5.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE CIPROFLOKSACINA, ERITROMICINA, TRIKLOSANA, ŽOLČNIH SOLI IN ETIDIJEVEGA BROMIDA NA BAKTERIJE *Campylobacter* IN *Staphylococcus*

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo želeli ugotoviti ali pripravljene izvlečki iz semen rastline *A. katsumadai* v subinhibitornih koncentracijah delujejo kot modulatorji odpornosti in v kolikšni meri znižajo MIK protimikrobnih snovi pri testiranih bakterijskih sevih. Izbrana protimikrobna sredstva so se zaradi različnih mehanizmov odpornosti pri

bakterijah *Campylobacter* in *Staphylococcus* že predhodno izkazala kot neučinkovita. Odpornosti proti antibiotikoma ciprofloksacinu in eritromicinu, ki predstavljata prvo izbiro pri zdravljenju hujših oblik kampilobakterioz, z leti vse bolj naraščata. Prav tako je pri *S. aureus* zaskrbljujoča njihova sposobnost razvoja odpornosti proti velikemu številu antibiotikov, pri čemer so nekateri izolati že odporni proti vsem uporabnim antibiotikom (Gibbons, 2004).

Triklosan je široko uporaben biocid, ki se ga uporablja za preprečevanje kontaminacij v različnih higienskih produktih in drugih materialih, kot so kuhinjski pripomočki in igrače, ter v kliničnem okolju za kontrolo MRSA (Suller in Russel, 2000). Izpostavljenost triklosanu je vodila k pojavu izolatov z zmanjšano občutljivostjo ali odpornostjo proti tej spojini. Pomemben dejavnik pri pojavu tovrstnih sevov je nenehen stik bakterij z nizkimi koncentracijami dezinfekcijskih sredstev na določenih površinah, kar lahko vodi tudi v selekcijo sevov s povečano odpornostjo proti antibiotikom (Suller in Russel, 2000; Mavri in Smole Možina, 2013). V posameznih študijah so pri različnih bakterijskih vrstah že potrdili, da delovanje izlivnih črpalk, ponekod tudi vključno z drugimi mehanizmi odpornosti, prispeva k povišani odpornosti proti triklosanu in drugim biocidom (Hernandez in sod., 2011; McMurry in sod., 1998; Mavri in Smole Možina, 2013).

Naslednja testirana protimikrobna snov so žolčne soli, katerih ena izmed funkcij je tudi protimikrobno delovanje na patogene bakterije za preprečitev njihove kolonizacije v črevesju. Odpornost proti žolčnim solem nekaterih črevesnih patogenov se odraža pri njihovem uspešnem preživetju v črevesnem okolju. V primeru kampilobaktrov so pri odpornosti proti tem snovem dokazano vpletene izključno izlivne črpalke, ki se ob prisotnosti žolčnih soli celo aktivneje izražajo (Lin in sod., 2005a).

V številnih študijah je bilo dokazano, da sistemi izlivnih črpalk sodelujejo pri odpornosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem. Etidijev bromid je že znan in velikokrat uporaben substrat izlivnih črpalk, ki se ga uporablja v študijah izlivnih mehanizmov. Ker je bil pri protimikrobnih snoveh, ki smo jih uporabili pri eksperimentu, že predhodno opazen vpliv izlivnih črpalk pri razvoju odpornosti, gre najverjetneje za substrate izlivnih črpalk.

Rezultati iz preglednic 9-12 potrjujejo občutljivost oz. odpornost določenih bakterijskih sevov proti obema testiranima antibiotikoma, kot je navedeno tudi v preglednici 1. Seva *S. aureus*, odporna proti ciprofloksacinu, sta MRSA 5.1 in MRSA 5.5, z MIK 2 µg/ml in 64 µg/ml, medtem ko je proti eritromicinu odporen sev *S. aureus* 5.2 z MIK višjo od 1024 µg/ml. Podatke o odpornosti sevov smo pridobili s strani referenčnega laboratorija EU (EURL). Mejne vrednosti znašajo > 1 µg/ml za ciprofloksacin in > 2 µg/ml za eritromicin. Od sevov *C. jejuni* se je sev 375/06 izkazal kot odporen proti obema antibiotikoma, kar je v skladu z dejstvom, da gre za večkratno odporen sev. Proti ciprofloksacinu je bil pričakovano odporen tudi sev *C. jejuni* 573/03 z MIK 32 µg/ml.

Odpornost sevov *C. jejuni* smo potrdili na podlagi mejnih vrednosti MIK, ki znašajo  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  za ciprofloksacin in  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  za eritromicin (Kurinčič in sod., 2012). Od ostalih protimikrobnih snovi opazimo tako pri sevih *C. jejuni*, kot tudi pri sevih *S. aureus*, visoko odpornost proti žolčnim solem, kjer vrednosti MIK pri kampilobaktrih v večini presegajo 2 ali 4 mg/ml, pri stafilokokih pa znaša MIK 4 mg/ml. Ta ugotovitev nakazuje na zelo dobro prilagojenost testiranih bakterij na črevesno okolje, kar na podlagi že predhodnih objav velja za kampilobakte. Testirani sevi kampilobaktrov so se izkazali kot občutljivi na etidijev bromid, z MIK od 0,5 do 2  $\mu\text{g/ml}$ , medtem ko so sevi stafilokokov občutljivi do nizko odporni, z MIK 2 do 8  $\mu\text{g/ml}$ . Kot bolj odporen se je izkazal sev MRSA 5.1, kjer je MIK za etidijev bromid znašala 64  $\mu\text{g/ml}$ . Pri triklosanu opazimo nižjo stopnjo odpornosti samo pri sevih kampilobaktrov. Vsi sevi stafilokokov so občutljivi na omenjeno razkužilo, z nizkimi vrednostmi MIK.

## 5.2 MODULATORNI UČINEK IZVLEČKOV SEMEN *A. katsumadai* NA ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* IN *Staphylococcus*

Protimikrobna učinkovitost je ena od mnogih terapevtsko pomembnih lastnosti, ki jo izkazujejo izvlečki iz *A. katsumadai*. To je tudi lastnost mnogih do sedaj odkritih modulatorjev odpornosti oz. zaviralcev izlivnih črpalk (Stavri in sod., 2007). Nekatere prevladujoče spojine izolirane iz semen *A. katsumadai* so se že izkazale kot uspešne zaviralke izlivnih črpalk pri po Gramu pozitivni bakteriji *Mycobacterium smegmatis* (Gröblacher in sod., 2012). Na primeru bakterij *Campylobacter* so Klančnik in sod. (2012b) v študiji protimikrobne aktivnosti rastlinskih fenolnih spojin ugotovili, da izlivne črpalke opazno prispevajo k odpornosti proti tem protimikrobnim snovem, za katere se je izkazalo, da so substrati izlivnih črpalk. Fenolne spojine so tudi ene od glavnih sestavin izvlečkov *A. katsumadai*, zato predvidevamo, da so spojine v EI, OM in EO prav tako substrati bakterijskih izlivnih črpalk ter modulirajo odpornost bakterij.

Na podlagi predhodno pridobljenih rezultatov o protimikrobni učinkovitosti EI, OM in EO, smo za izvedbo modulatornih testov izbrali četrtno in polovico vrednosti MIK posameznih pripravkov. Potencialne modulatorje oz. zaviralce izlivnih črpalk se namreč testira v koncentraciji, pri kateri sami ne izkazujejo protimikrobne aktivnosti, saj bi sicer v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi tudi sami delovali inhibitorno, kar bi povzročilo lažno pozitivne rezultate (Stavri in sod., 2007). Pričakovali smo, da bo MIK protimikrobnega sredstva v kombinaciji z izvlečkom nižja od MIK samega protimikrobnega sredstva. Obstajajo tudi spojine, ki same sicer ne delujejo protimikrobno, vendar so odgovorne za povečano kopičenje druge protimikrobne snovi v bakterijski celici, pri čemer izničijo delovanje določenega mehanizma odpornosti. Tak primer je 5'-metoksihidnokarpin, ki ga rastline proizvajajo skupaj s protimikrobno delujočim berberinom (Pages in Amaral, 2009; Stermitz in sod., 2000).



Modulatorno vlogo pri odpornosti bakterij smo pripisali tistim izvlečkom, katerih subinhibitorna koncentracija je protimikrobnemu sredstvu znižala MIK za faktor 4 ali več. Rezultati modulatornih testov s pripravki semen *A. katsumadai* nakazujejo na modulatorno delovanje vsakega izmed posameznih pripravkov, pri čemer so prisotne določene razlike med bakterijskimi sevi in obema testiranima koncentracijama pripravkov v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi (preglednice 9-12). Iz rezultatov z 0,25 MIK izvlečkov je razvidno, da se pri vseh sevih *C. jejuni* in *S. aureus* kaže določena modulatorna učinkovitost vsaj enega izmed testiranih izvlečkov skupaj z določenim protimikrobnim sredstvom, vendar so izvlečki v manj primerih učinkovali modulatorno v primerjavi z višjo subinhibitorno koncentracijo. Pri kampilobaktirih so izvlečki v nižji koncentraciji izkazali izrazitejši modulatorni učinek pri sevih *C. jejuni* NCTC11168 in *C. jejuni* 375/06, zlasti skupaj s triklosanom, ter šibko modulatorno delovanje v nekaj posameznih primerih ostalih sevov. Pri stafilokokih smo opazili dober modulatorni učinek EO na sevih *S. aureus* 5.1, 5.2 in 5.5., ki je znižalo MIK skoraj vsem protimikrobnim snovem od 4 do >128-krat, medtem ko je bil učinek izvlečkov na ostalih sevih šibek ali ga sploh ni bilo.

V višji subinhibitorni koncentraciji (0,5 MIK) smo na sevih *C. jejuni* NCTC 11168, 375/06, K49/4 in 573/03 testirali samo izvlečka OM in EO. Oba sta v tej koncentraciji uspešno potencirala protimikrobno delovanje vseh protimikrobnih snovi, EO celo na vseh testiranih sevih kampilobaktrov. Tudi pri stafilokokih je višja koncentracija izvlečkov izkazala boljši modulatorni učinek, ki je bil opazen pri večini sevov, predvsem pa pri sevu *S. aureus* 5.3. Vsi trije izvlečki so v največji meri znižali MIK žolčnih soli pri vseh sevih. Sledilo je učinkovito znižanje MIK triklosana in nato etidijevega bromida. V splošnem so v višji subinhibitorni koncentraciji pripravki pogostejše in učinkoviteje znižali odpornost večine testiranih sevov obeh bakterijskih rodov, kjer so znižali MIK protimikrobnih snovi od 4-krat do več kot 256-krat. Izstopa le EO, ki je pri obeh sevih MRSA in sevu *S. aureus* 5.2, učinkovitejši modulator v koncentraciji 0,25 MIK. Opazimo torej, da je vsak izmed pripravkov znižal MIK vsem testiranim protimikrobnim snovem, vendar ne nujno pri vsakem posameznem sevu hkrati. Modulatorno delovanje izvlečkov je torej sevno specifično in odvisno od koncentracije. Glede na že dokazano vpletenost izlivnih črpalk pri iznosu žolčnih soli iz celic kampilobaktrov (Lin in sod., 2005a) in hkrati vlogo izlivnih sistemov pri iznosu antibiotikov in drugih protimikrobnih snovi iz celic obeh bakterijskih rodov, rezultati nakazujejo na morebitno zavrtje izlivnih črpalk s strani testiranih modulatorjev. To možnost bi morali nadalje potrditi še s testom akumulacije in efluksa etidijevega bromida, vključno z že znanimi zaviralci izlivnih črpalk (Gröblacher in sod., 2012; Kovač in sod., 2014). Vzrok za modulatorni učinek je lahko tudi povečana prepustnost protimikrobnih snovi skozi celično membrano.

Izmed testiranih protimikrobnih sredstev izstopajo rezultati za triklosan, pri katerem se je MIK v kombinaciji z 0,25 MIK modulatorjev v večini primerov povečal ( $MF < 1$ ), kar pomeni, da dodatek posameznih izvlečkov v tej koncentraciji okrepi odpornost proti

razkužilu (preglednica 9 in 11). Enako velja tudi za etidijev bromid, kjer zanimivo opazimo povišan MIK le pri dodanem EI in OM. Povečana odpornost nakazuje, da je ob prisotnosti rastlinskih pripravkov prišlo do učinkovitejšega izčrpavanja protimikrobne snovi iz celice ali do zmanjšane privzema v celico. Okrepljeno odpornost zaradi povečanega delovanja črpalk so potrdili tudi Akiba in sod. (2006) in sicer pri *C. jejuni* z mutacijjo v genu *cmeF*. Tako predvidevajo, da okvarjena črpalka CmeDEF povzroči povečano izražanje in aktivacijo drugih črpalk. Poleg tega mehanizmi delovanja triklosana niso še popolnoma jasni, saj ima več tarčnih mest delovanja. Tudi Mavri in sod. (2013) so v svoji študiji poročali o nepričakovanem učinku povečane MIK za triklosan ob dodatku nekaterih zaviralcev izlivnih črpalk, kar je morebiti posledica delovanja drugega izlivnega sistema, ki se aktivira ob zavrtju določene izlivne črpalke.

### **5.2.1 Učinkovitost delovanja modulatorjev na občutljivih in odpornih sevih**

Pripravki iz semen so učinkovito znižali vrednosti MIK protimikrobnih snovi tako pri občutljivih, kot tudi odpornih sevih *C. jejuni* in *S. aureus*. Pomembna vloga izvlečkov se kaže pri drastičnem znižanju visoke odpornosti proti žolčnim solem, ki jo izkazujejo vsi testirani sevi. Izvlečki so uspešno znižali MIK triklosana pri nizko odpornih sevih kampilobaktrov, kot tudi pri občutljivih sevih stafilokokov (preglednici 10 in 12). V primerih žolčnih soli in triklosana je bilo delovanje modulatorjev, razen nekaj izjem, najučinkovitejše v višji subinhibitorni koncentraciji. Prav tako se je v kombinaciji z izvlečki uspešno znižala odpornost proti ciprofloksacinu in eritromicinu pri odpornih in občutljivih sevih, z določenimi razlikami v učinkovitosti med obema subinhibitornima koncentracijama modulatorjev. Predhodno se je tudi že izkazalo, da izvlečki semen *A. katsumadai* delujejo protimikrobno proti občutljivim in odpornim bakterijskim sevom (Klančnik in sod., 2012a, Kovač in sod., 2014).

### **5.2.2 Učinkovitost delovanja modulatorjev na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije**

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko trdimo, da vsi trije pripravki iz semen delujejo kot modulatorji odpornosti, tako pri po Gramu pozitivnih, kot pri po Gramu negativnih bakterijah. Za stafilokoke sicer velja, da so kot po Gramu pozitivne bakterije občutljivejše od po Gramu negativnih bakterij, katere varuje zunanja membrana z lipopolisaharidnim slojem. Vendar so v predhodnih študijah ugotovili, da so kampilobaktiri v primerjavi z ostalimi po Gramu negativnimi bakterijami občutljivejši na delovanje različnih rastlinskih izvlečkov in fenolnih spojin, najverjetneje zaradi pomanjkanja prilagoditvenih odzivov na stres in drugih še neznanih mehanizmov (Klančnik in sod., 2010; Piskernik in sod., 2011). V tem pogledu so podobni po Gramu pozitivnim bakterijam, saj jih rastlinski izvlečki dokazano učinkovito inhibirajo.

### 5.2.3 Delovanje potencialnih modulatorjev iz semen *A. katsumadai* na seve z okvarjenimi izlivnimi črpalkami CmeABC in CmeDEF

Za ugotavljanje ali testirani modulatorji izkazujejo funkcijo zaviralcev izlivnih črpalk smo njihovo delovanje preverili še na treh mutantah seva *C. jejuni* NCTC 11168, in sicer v poglavitni izlivni črpalki CmeABC, v sekundarni črpalki CmeDEF in v represorju CmeR za poglavitno izlivno črpalko. Vpliv omenjenih črpalk na odpornost proti testiranim protimikrobnim snovem smo določili s primerjavo MIK protimikrobnih snovi pri referenčnemu sevu *C. jejuni* NCTC11168 in njegovih mutantah *cmeB*, *cmeF* in *cmeR*. Prav tako smo primerjali MIK protimikrobnih snovi samih in z dodanimi modulatorji iz semen.

Klančnik in sod. (2012a) so ugotovili, da so nekateri izvlečki *A. katsumadai*, med njimi tudi EI, substrati izlivne črpalke CmeABC, saj se je pri mutantu *cmeB* njihova MIK znatno znižala. V našem poskusu znižane vrednosti MIK vseh protimikrobnih snovi, ki jih opazimo pri mutantu *cmeB*, potrjujejo, da črpalka CmeABC sodeluje pri njihovem iznosu iz celice (preglednica 9). Ker omenjena mutanta nima delujoče črpalke CmeABC, ki bi iz celice iznašala dodane protimikrobne snovi, so torej znižane vrednosti MIK protimikrobnih snovi pričakovane. V največji meri se je znižala MIK žolčnih soli, kar potrjuje poglavitno vlogo črpalke pri iznosu teh snovi iz celice. Pri mutantu *cmeF* opazimo znižanje MIK samo v primeru triklosana, iz česar sklepamo, da je substrat črpalke CmeDEF. Nasprotno se je MIK eritromicina nekoliko povišala. Kot poročajo Akiba in sod. (2006) ima črpalka CmeDEF v primerjavi s črpalko CmeABC manjšo vlogo pri odpornosti. Slednja se kot dominantna črpalka konstitutivno izraža in naj bi zakrivala delovanje sekundarne črpalke CmeDEF. Dokazali so tudi, da obe črpalki delujeta v medsebojni interakciji in da mutacija v genu *cmeF* celo spodbudi izražanje črpalke CmeABC, kar posledično poviša MIK oz. odpornost proti določenim protimikrobnim snovem. Pri mutantu *cmeR* brez delujočega represorja za izlivno črpalko CmeABC smo pričakovali višjo stopnjo izražanja te črpalke. Rezultati to potrjujejo, saj so bile vrednosti MIK protimikrobnih snovi v primerjavi z divjim tipom v večini višje.

Ob dodatku potencialnih modulatorjev iz semen v subinhibitorni koncentraciji 0,25 MIK je izmed testiranih sevov najbolj izstopala mutanta *cmeB*. Tukaj sta se kot učinkovita modulatorja izkazala pripravek EI in OM (preglednica 9). MIK vseh testiranih protimikrobnih snovi se je v kombinaciji s posameznim od obeh pripravkov namreč znižal od več kot 8- do več kot 64-krat. Nasprotno pa EO pri mutantu *cmeB* ni izkazalo modulatornega učinka ampak so MIK protimikrobnih snovi v večini ostale nespremenjene. Ker pa je EO delovalo modulatorno v kombinaciji s ciprofloksacinom, triklosanom in žolčnimi solmi pri sevu divjega tipa, bi v teh primerih lahko bil potencialni zaviralec izlivne črpalke CmeABC, ki uspešno okrepi občutljivost seva na omenjena protimikrobna sredstva. Glede na to, da se je ob dodatku izvlečkov EI in OM, MIK protimikrobnih snovi pri mutantu *cmeB* še dodatno bistveno znižala, lahko sumimo na vpletenost še drugih

mehanizmov v spremembo odpornosti s temi materiali. Morebiti delujejo še na katere izmed drugih prisotnih izlivnih sistemov, ki so do neke mere prav tako odgovorni za iznos protimikrobnih snovi iz celice in se najverjetneje aktivirajo ob izključenem delovanju črpalke CmeABC. EI se je že izkazal kot dober modulator bakterijske odpornosti v kombinaciji z različnimi protimikrobnimi sredstvi (Klančnik in sod., 2012a). V tej študiji prav tako dokazujejo morebitno vlogo drugih izlivnih mehanizmov pri odpornosti kampilobaktrov proti EI. Po dodatku že znanih zaviralcev črpalk (PAβN, NMP in CCCP) k mutantam *cmeB*, *cmeF* in *cmeR* je namreč prišlo do povečane občutljivosti sevov na EI, kar nakazuje na aktivno delovanje enega od ostalih sistemov za izčrpavanje ali morebiti aktivacijo katerega od drugih mehanizmov odpornosti.

Na podlagi rezultatov pri mutanti *cmeF* in učinka EI ter OM pri mutanti *cmeB*, bi lahko sklepali, da sta izvlečka tudi potencialna zaviralca izlivne črpalke CmeDEF. To bi morali preveriti še s testom akumulacije etidijevega bromida. Pri mutantah *cmeF* in *cmeR* namreč nobeden od testiranih izvlečkov ni deloval modulatorno. V teh primerih se črpalka CmeABC izraža in aktivno izloča protimikrobne snovi iz celic. Še vedno so lahko modulatorji iz semen substrati tudi drugih prisotnih izlivnih sistemov, ki jih črpajo iz celice. Ob inaktivaciji poglavitnih izlivnih črpalk lahko namreč funkcijo izločanja prevzamejo tudi drugi izlivni sistemi (Pages in Amaral, 2009). Akiba in sod. (2006) prav tako poročajo o morebitni vpletenosti drugih še neznanih izlivnih sistemov, ki se domnevno aktivirajo v primeru okvarjene črpalke CmeDEF. Tako predvidevajo, da je črpalka CmeDEF povezana z drugimi izlivnimi sistemi, ki se izražajo z namenom nadomestitve okvarjene črpalke. Znano je, da so pri kampilobaktrih poleg izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF prisotne tudi številne druge, katerih delovanje je v večini še nepojasnjeno (Akiba in sod., 2006). Prekomerno izražanje, okvara ali delecija ene izmed izlivnih črpalk ima lahko pomemben vpliv na izražanje drugih izlivnih sistemov, zlasti v primeru večkratno odpornih bakterij. Zavedati se moramo, da rezultati modulatornih testov in testov efluksa izkazujejo skupni učinek vseh udeleženih izlivnih transporterjev (Stavri in sod., 2007), med katerimi so prisotne kompleksne interakcije. Stavri in sod. (2007) navajajo tudi primer spojin, izoliranih iz rastline *Dalea spinosa*, ki znižajo MIK šibke protimikrobne spojine berberina pri izogeni mutanti *norA* seva *S. aureus*, nasprotno pa ni bilo opaznega učinka pri mutanti s prekomerno izraženo črpalko NorA. Primer nakazuje na inhibicijo drugih izlivnih črpalk, kar smo opazili tudi pri naših rezultatih.

### 5.3 MODULATORNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV SEMEN *A. katsumadai* GLEDE NA KEMIJSKO SESTAVO

Zdravilne učinke rastline *A. katsumadai* pripisujejo številnim spojinam, ki so bile izolirane iz različnih delov rastline in različnih ekstraktijskih topil. V predhodnih študijah so iz semen izolirali številne fenolne spojine (flavonoide, kalkone), diarilheptanoide, monoterpene, seskviterpene in stilbene (Kurayanagi in sod., 1983; Brown in Rice-Evans

1998; Saiki in sod., 1978, cit. po Lee in sod., 2003). V nedavnih študijah so identificirali še nekaj novih diarilheptanoidov in nekaterih nenavadnih ter edinstvenih spojin, značilnih za semena *A. katsumadai*. V izvlečkih sicer prevladujejo fenolne spojine (flavanoni, kalkoni) in diarilheptanoidi, medtem ko so omenjene novejšje spojine prisotne v manjših količinah (Klančnik in sod., 2012a). V EO prevladujejo zlasti terpeni in terpenoidi (Šikić Pogačar in sod., 2014).

V magistrski nalogi smo izvedli kemijsko analizo pripravljenih izvlečkov EO in OM po hidrodestilaciji EI iz semen *A. katsumadai*. V EO, ki smo ga pridobili s hidrodestilacijo semen, in ga nato analizirali z GC/MS, smo identificirali 40 spojin. Rezultati kažejo na pričakovano prevladujočo prisotnost terpenov in terpenoidov iz skupin monoterpenov in seskviterpenov. Opazimo, da so se iz kolone najprej izločili monoterpeni, katerim so sledili še po strukturi večji seskviterpeni. Oboji so poznani kot ključne sestavine številnih eteričnih olj, ki izkazujejo tudi protimikrobno aktivnost (Silva de Almeida in sod., 2013; Shunying in sod., 2005). Glavne sestavine EO so  $\alpha$ -humulen z 21 % deležem, 1,8-cineol skupaj z limonenom v 13,6 % deležu in 2-*cis*, 6-*trans* farnezol z 12,1 % deležem (preglednica 13, slika 5).

Med spojinami, ki smo jih identificirali v gostem ostanku OM, sta v največjem deležu prisotna dva diarilheptanoida *trans*, *trans*-1,7-difenil-4,6-heptadien-3-on in (5R)-*trans*-1,7-difenil-5-hidroksi-6-hepten-3-on, katerima sledijo flavonoidi alpinetin, pinocembrin in kardamomin. Naštete spojine so tudi glavne sestavine EI, ki so jih identificirali Klančnik in sod. (2012a). Iz tega sklepamo, da OM kot odpadni produkt hidrodestilacije EI, izkazuje določene biološke učinke in bi se ga prav tako lahko izkoriščalo za nadaljnjo uporabo. Poleg tega smo pripravili še filtrat, kjer smo ločeno analizirali vodno fazo OM. V tej fazi so prevladujoče spojine iz gostega OM prisotne v manj kot 1 %. Z LC-PDA-MS smo pridobili še informacije o drugih molekulah, ki se poleg že identificiranih spojin nahajajo v OM. Ujemanje nekaterih molekulskih mas nakazuje na prisotnost spojin, ki se sicer značilno nahajajo v semenih *A. katsumadai* in so bile na novo izolirane v novejših študijah. To so najverjetneje katsumain A/B, katsumadin, kaliksin Y, katsumadain in nekateri novi diarilheptanoidi. Za natančnejšo identifikacijo tovrstnih spojin so potrebne nadaljnje analize z ustreznimi standardi ali NMR.

Različne vrste bakterij se med seboj ločijo po občutljivosti na polifenole, kar je odvisno tudi od same strukture teh protimikrobnih spojin (Klančnik in sod., 2012b). Razlike v učinkih testiranih modulatorjev nakazujejo na vpliv različnih spojin, ki so prisotne v posameznih pripravkih. Glede na kemijsko analizo in rezultate modulatornih testov lahko potrdimo, da so aktivne komponente v EI in OM predvsem diarilheptanoidi ter druge fenolne spojine, medtem ko so za učinkovitost EO odgovorni monoterpeni in seskviterpeni. Opazimo, da so nekateri pripravki pri posameznih sevih znižali MIK samo določenim protimikrobnim snovem, spet drugi pa vsem protimikrobnim snovem. Pri

kampilobaktrij se je v višji subinhibitorni koncentraciji najboljše izkazalo EO. Učinek izvlečka OM je bil pri nekaterih sevih primerljiv z EO, pri drugih pa slabši. V primeru stafilokokov je opaznih več razlik med samimi sevi, zlasti v višji subinhibitorni koncentraciji izvlečkov. Posledično iz pridobljenih rezultatov ne moremo določiti, kateri od pripravkov je najučinkovitejši modulator odpornosti. Pri nekaterih sevih imajo torej pomembnejšo vlogo pri zniževanju odpornosti sestavine EO, medtem ko je učinkovitost modulatorjev iz EI in OM ponekod primerljiva z EO in v posameznih primerih boljša od EO. Iz tega sklepamo, da so tako fenolne spojine in diarilheptanoidi iz EI in OM, kot tudi terpeni iz EO učinkoviti modulatorji odpornosti, katerih delovanje je odvisno od njihove koncentracije in testiranega seva. Če primerjamo učinek EI in OM opazimo, da sta pri določenih sevih oba delovala modulatorno v kombinaciji z istimi protimikrobnimi snovmi, ali pa sta nekaterim sevom posamično znižala odpornost proti določenim snovem. To potrjuje, da se kljub hidrodestilaciji eteričnega olja iz EI, v preostalem izvlečku OM ohranijo bioaktivne spojine, ki dajejo pripravku modulatorni učinek.

Kljub prevladujočemu deležu določenih spojin v posameznem izvlečku, modulatorne vloge ne moremo pripisati izključno tem spojinam. Omeniti je potrebno možnost, da je določena biološka aktivnost izvlečka lahko posledica interakcij med spojinami, prisotnimi v tem izvlečku, medtem ko posamezne spojine morebiti izkazujejo to aktivnost v manjši meri ali je sploh ne izkazujejo. To nakazuje na pomen kombinacije spojin pri zagotavljanju večjega biološkega učinka, zaradi možnega sinergizma med posameznimi sestavinami v izvlečkih (Radulović in sod., 2013). V nekaterih študijah opisujejo pomen kombinacije posameznih terpenov v izvlečkih, od katerih je odvisna njihova učinkovitost. Kljub temu obstajajo tudi posamezne učinkovine z visoko biološko aktivnostjo, katere so v naravnih pripravkih prisotne v nizkih količinah. Potrebno se je torej zavedati, da glavne komponente rastlinskih pripravkov niso nujno vedno same odgovorne za določeno učinkovitost celotnega pripravka, ampak lahko k temu botrujejo tudi druge molekule prisotne v nižjem deležu (Radulović in sod., 2013).  $\alpha$ -humulen so kot eno izmed glavnih sestavin zaznali tudi v nekaterih drugih eteričnih oljih. Izkazalo se je, da ima ta spojina učinkovito protivnetno funkcijo in bi jo lahko uporabljali za zdravljenje različnih vnetnih obolenj (Fernandes in sod., 2007). Za farnezol in 1,8-cineol velja, da delujeta protimikrobno na določene vrste bakterij. Nekaj študij poroča tudi o pomembni vlogi farnezola pri povečanju občutljivosti bakterij na nekatere antibiotike. Za farnezol in nekatere druge seskviterpenoide se je izkazalo, da se kot lipofilne molekule porazdelijo znotraj membran in s tem motijo njeno funkcijo selektivne prepustnosti. Posledično te snovi povečajo prepustnost protimikrobnim snovem v celico (Brehm-Stecher in Johnson, 2003). Tudi za glavne sestavine EI in OM se je že izkazalo, da delujejo protimikrobno. Med njimi so nekateri diarilheptanoidi in flavonoid pinocembrin potencialni modulatorji odpornosti pri *Mycobacterium smegmatis* (Groblacher in sod., 2012).

#### 5.4 SKLEPI

Iz rezultatov, pridobljenih pri eksperimentalnem delu magistrske naloge, lahko povzamemo sledeče sklepe:

- Etanolni izvleček, eterično olje in izvleček odpadnega materiala po hidrodestilaciji etanolnega izvlečka iz semen *A. katsumadai* so potencialni modulatorji odpornosti bakterij *Campylobacter* in *Staphylococcus*, saj so zlasti v višji subinhibitorni koncentraciji 0,5 MIK povečini učinkovito znižali MIK protimikrobnih snovi ciprofloksacina, eritromicina, triklosana, žolčnih soli in etidijevega bromida. V nekaterih primerih so pripravki povečali protimikrobno učinkovitost vsem testiranim protimikrobnim snovem, ponekod pa samo določenim snovem. Modulatorno delovanje posameznih izvlečkov je odvisno od bakterijskega seva, njihove subinhibitorne koncentracije in dodane protimikrobne snovi.
- Pripravki iz semen so potencialni zaviralci izlivnih črpalk, saj so znižali MIK protimikrobnim snovem, katerih odpornost je posledica delovanja teh izlivnih mehanizmov. Kot potencialni zaviralec izlivne črpalke CmeABC se je izkazalo eterično olje. Mutanta z okvarjeno črpalko CmeABC pa nakazuje, da bi lahko bila etanolni izvleček in izvleček odpadnega materiala substrata črpalke CmeDEF ali drugih izlivnih črpalk, ki so vpletene pri nastanku odpornosti.
- Vsi trije pripravki iz semen so povečali občutljivost, tako po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij na testirane protimikrobne snovi. Prav tako so znižali MIK protimikrobnih snovi pri občutljivih in odpornih bakterijskih sevih.
- Kemijska analiza je pokazala, da modulatorno aktivnost eteričnega olja pripisujemo terpenoidnim spojinam, medtem ko so za modulatorni učinek izvlečka odpadnega materiala odgovorni flavonoidi in diarilheptanoidi, ki so jih predhodno dokazali že v etanolnem izvlečku.

## 6 VIRI

- Adams R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream, Allured Publishing Corporation: 804 str.
- Akiba M., Lin J., Barton Y.W., Zhang Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57: 52–60.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191–203.
- Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. Journal of Infection Diseases, 157, 3: 472–479. Cit po: Ligowska M. 2011. Adaptation of *Campylobacter jejuni* to oxidative stress and poultry meat environment. Copenhagen, University of Copenhagen, Faculty of Life Sciences, Department of Veterinary Disease Biology: 139 str.
- Blair J.M.A., Piddock L.J.V. 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Current Opinion in Microbiology, 12: 512–519.
- Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apitone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 10: 3357–3360.
- Brown J.E., Rice-Evans C.A. 1998. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. Free Radical Research, 29: 247–255.
- Chapman J.S. 2003. Biocide resistance mechanisms. International Biodeterioration & Biodegradation, 51: 133 – 138.
- Charvalos E., Tselentis Y., Hamzehpour M.M., Köhler T., Pechere J.C. 1995. Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 9: 2019–2022.
- Choi S.Y., Lee M.H., Choi J.H., Kim Y.K. 2012. 2,3,22,23-Tetrahydroxyl-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18- tetracosatetraene, an acyclic triterpenoid isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*, inhibits acyl-CoA : cholesterol acyltransferase activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 35, 11: 2092–2096.
- Costa S.S., Ntokou E., Martins A., Viveiros M., Pournaras S., Couto I., Amaral L. 2010. Identification of the plasmid-encoded *qacA* efflux pump gene in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain HPV107, a representative of the MRSA Iberian clone. International Journal of Antimicrobial Agents, 36, 6: 557–561.



- Coutinho H.D.M., Costa J.G.M., Lima E.O., Falcão-Silva V., Siqueira J.P. 2009. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. BMC Complementary and Alternative Medicine, 9: 13, doi: 10.1186/1472-6882-9-13: 4 str.
- Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology, 300: 205–211.
- Ding Y., Onodera Y., Lee J.C., Hooper D.C. 2008. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. Journal of Bacteriology, 190, 21: 7123-7129.
- DSMZ. 2014. List of prokaryotic names validly published in Januar 2014. Braunschweig, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: 4 str. <http://www.dsmz.de/support/bacterial-nomenclature-up-to-date-downloads.html> (januar, 2014).
- EUCAST. 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. Växjö, EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 79 str. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (januar, 2014).
- EFSA. 2013a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA Journal, 11, 4: 3129, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3129: 250 str.
- EFSA. 2013b. Food-borne zoonotic diseases. *Campylobacter*. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 2 str. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/campylobacter.htm> (april, 2013).
- EFSA/ECDC. 2012. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal, 10, 3: 2598, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2598: 233 str.
- Fernandes E.S., Passos G.F., Medeiros R., da Cunha F.M., Ferreira J., Campos M.M., Pianowski L.F., Calixto J.B. 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. European Journal of Pharmacology, 569, 3: 228-236.
- Ganan M., Silván J.M., Carrascosa A.V., Martínez-Rodríguez A.J. 2012. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. Food Control, 24: 6-14.

- Garvey M.I., Rahmanb M.M., Gibbons S., Piddock L.J.V. 2011. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 145–151.
- Ghosh S., Rangan L. 2012. *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics. *3 Biotech*, 3, 3: doi: 10.1007/s13205-012-0089-x: 173-185.
- Gibbons S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21: 263-277.
- Götz F., Bannerman T., Schleifer K.H. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Macroccus*. *Prokaryotes*, 4: 5–75.
- Gould I.M., David M.Z., Esposito S., Garau J., Lina G., Mazzei T., Peters G. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 96– 104.
- Gröblacher B., Kunert O., Bucar F. 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20: 2701-2706.
- Handa S.S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. V: *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Handa S.S., Singh Khanuja S.P., Longo G., D.D. Rakesh (eds.). Trieste, International Centre for Science and High Technology: 21-54.
- Harbarth S., Samore M.H. 2005. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 6: 794-801.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K., Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639–652.
- Hernández A., Ruiz M.F., Romero A., Martínez J.L. 2011. The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS Pathogenes*, 7, 6: e1002103, doi: 10.1371/journal.ppat.1002103: 12 str.
- Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15: 18-25.
- Hua S.Z., Wang X.B., Luo J.G., Wang J.S., Kong L.Y. 2008. A pair of unique sesquiterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Tetrahedron Letters*, 49: 5658-5661.
- Hua S.Z., Luo J.G., Wang X.B., Wang J.S., Kong L.Y. 2009. Two novel monoterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 2728–2730.

- Huang W.Z., Zhang C.F., Zhang M., Wang Z.T. 2007. A new biphenylpropanoid from *Alpinia katsumadai*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54: 1553-1556.
- Huet A.A., Raygada J.L., Mandiratta K., Seo S.M., Kaatz G.W. 2008. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. *Microbiology*, 154: 3144–3153.
- Jayaraman P. , Sakharkar M.K., Lim C.S., Hock Tang T., Sakharkar K.R. 2010. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *International Journal of Biological Science*, 6, 6: 556-568.
- Kazakevich Y., Lobrutto R. 2007. HPLC for pharmaceutical scientists. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, John Wiley & Sons: 1140 str.
- Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1744–1752.
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole-Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 8: 121–126.
- Klančnik A., Gröblacher B., Kovač J., Bucar F., Smole Možina S. 2012a. Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 5: 1249-1262.
- Klančnik A., Smole-Možina S., Zhang Q. 2012b. Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*. *PLoS One*, 7, 12: e51800, doi: 10.1371/journal.pone.0051800: 10 str.
- Kosmidis C., Schindler B.D., Jacinto P.L., Patel D., Bains K., Seo S.M., Kaatz G.W. 2012. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40: 204– 209.
- Kovač J., Gavarić N., Bucar F., Smole Možina S. 2014. Antimicrobial and resistance-modulatory activity of *Alpinia katsumadai* seed extract, essential oil and post-distillation extract. *Food Technology and Biotechnology*, 52, 3 (v tisku).
- Kumar A., Schweizer H.P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 10: 1486–1513.
- Kurinčič M., Klančnik A., Smole Možina S. 2012. Effects of efflux pump inhibitors on erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline resistance in *Campylobacter* spp. isolates. *Microbial Drug Resistance*, 18: 492-501.

- Kuroyanagi M., Noro T., Fukushima S., Aiyama R., Ikuta A., Itokawa H., Morita M. 1983. Studies on the constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 31, 5: 1544-1550.
- Lee S.E., Shin H.T., Hwang H.J., Kim J.H. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. Phytotherapy Research, 17: 1041-1047.
- Lee M.Y., Lee N.H., Seo C.S., Lee J.A., Jung D., Kim J.H., Shin H.K. 2010. *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. Food and Chemical Toxicology 48: 1746-1752.
- Lee E.J., Kim J.H. 2011. Protective effects of *Alpinia katsumadai* extract against oxidative stress. International Journal of Oral Biology, 36, 3: 149-154.
- Ligowska M. 2011. Adaptation of *Campylobacter jejuni* to oxidative stress and poultry meat environment. Copenhagen, University of Copenhagen, Faculty of Life Sciences, Department of Veterinary Disease Biology: 139 str.
- Li Y.Y., Chou G.X., Wang Z.T. 2010. New diarylheptanoids and kavalactone from *Alpinia katsumadai* Hayata. Helvetica Chimica Acta, 93: 382-388.
- 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., Cagliero C., Guo B., Barton Y.W., Maurel M.C., Payot S., Zhang Q. 2005a. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 187, 21: 7417-7424.
- Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005b. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 3: 1067-1075.
- Lowy F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Investigation, 111: 1265-1273.
- Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C.M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiology, 4, 2: 189-200.
- Lv H., She G. 2012. Naturally occurring diarylheptanoids - A supplementary version. Records of Natural Products, 6, 4: 321-333.
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> ed. Glenview, Pearson Education: 992 str.

- Mavri A., Smole Možina S. 2013. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 160: 304–312.
- Mavri A., Ribič U., Smole-Možina S. 2014. The biocide and antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* V: Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food. Nedovic V., Raspor P., Tumbas V., Barbosa-Cánovas G. (eds.) New York, Springer (v tisku).
- McMurry L.M., Oethinger M., Levy S.B. 1998. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 166: 305–309.
- Misra R., Bavro V.N. 2009. Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794: 817–825.
- Nam J.W., Kang G.Y., Han A.R., Lee D., Lee Y.S., Seo E.K. 2011. Diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia katsumadai* as heat shock factor 1 inducers. *Journal of Natural Products*, 74, 10: 2109–2115.
- Nam J.W., Seo E.K. 2013. Identification of six new minor diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Helvetica Chimica Acta*, 96: 1670–1680.
- Negi P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 7–17.
- Ngo K.S., Brown G.D. 1998. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry*, 47, 6: 1117–1123.
- On S.L.W. 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 1–15.
- On S.L.W. 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *Journal of Microbiological Methods*, 15, 1: 3–7.
- Ortega Morente E., Fernández-Fuentes M.A., Grande Burgos M.J., Abriouel H., Pérez Pulido R., Gálvez A. 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162: 13–25.
- Pagès J.M., Amaral L. 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794: 826–833.

- Palaniappan K., Holley R.A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 164–168.
- Pantosti A., Sanchini A., Monaco M. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2, 3: 323–334.
- Pillai S. K., Moellering R. C., Eliopoulos G. M. 2005. Antimicrobial combinations. V: *Antibiotics in laboratory medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Lorian V. (ed.). Philadelphia, The Lippincott Williams & Wilkins Co.: 365–440.
- 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: 718–724.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20–51.
- Poole K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39:162–176.
- Poole K. 2012. Efflux-mediated antimicrobial resistance. V: *Antibiotic discovery and development*. Dougherty T.J., Pucci M.J. (eds.). New York, Springer: 349–395.
- Poole K. 2008. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe*, 3, 4: 179–185.
- Putignani L., Massa O., Alisi A. 2013. Engineered *Escherichia coli* as new source of flavonoids and terpenoids. *Food Research International*, 54,1: 1084–1095.
- Radulović N.S., Blagojević P.D., Stojanović-Radić Z.Z., Stojanović N.M. 2013. Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 932–952.
- Randhir R., Lin Y.T., Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 3: 295–307.
- Rho M.C., Kim Y.K., Lee H.S., Jun C.D., Kim K., Lee S.W., Choi J.H., Song G.Y. 2008. New acyclic triterpenoids compound, and pharmaceutical composition comprising *Alpinia katsumadai* extract or acyclic triterpenoids compounds isolated from the same. Patent Cooperation Treaty WO2008/133387 A1: 27 str.
- Russel A.D. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, 57: 97–104.

- Saiki Y., Ishikawa Y., Uchida M., Fukushima S. 1978. Essential oil from Chinese drug 'caodoukou', the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry*, 17, 4: 808-809. Cit po: Lee S.E., Shin H.T., Hwang H.J., Kim J.H. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, 17: 1041–1047.
- Sarker S.D., Nahar L., Kumarasamy Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-314.
- Serra A.T., Matias A.A., Nunes A.V.M., Leitão M.C., Brito D., Bronze R., Silva S., Pires A., Crespo M.T., San Romão M.V., Duarte C.M. 2008. *In vitro* evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 311–319.
- Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y., Guolin Z. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 : 151-158.
- Silva de Almeida T., Batista T. Rocha J., Rodrigues F.G., Campos R., Costa J.G.M. 2013. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44: 630–633.
- Stavri M., Piddock L.J.V., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1247–1260.
- 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: 91-98.
- Stermitz F.R., Lorenz P., Tawara J.N., Zenewicz L.A., Lewis K. 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 1433–1437.
- Su C.C., Shi F., Gu R., Li M., McDermott G., Yu E.W., Zhang Q. 2007. Preliminary structural studies of the transcriptional regulator CmeR from *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica*, 63: 34–36.
- Suller M.T., Russel A.D. 2000. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 1: 11-18.
- Šikić Pogačar M., Klančnik A., Kovač J., Bucar F., Langerholc T., Smole Možina S. 2014. *Alpinia katsumadai* extracts inhibit adhesion and invasion of *C. jejuni* in animal and human foetal small intestine cell lines. *Foodborne Pathogenes and Disease* (poslano v objavo).



- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Luis K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, 10: 3133- 3141.
- Tenover F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119: 3–10.
- Turnidge J., Rao N., Chang F.Y., Fowler V.G., Kellie S.M., Arnold S., Lee B.Y., Tristan A. 2008. *Staphylococcus aureus*. Pittsburgh, Antimicrobe.org: 101 str. [http://www.antimicrobe.org/sample\\_staphylococcus.asp](http://www.antimicrobe.org/sample_staphylococcus.asp) (april, 2013).
- Weidenmaier C., Goerke C., Wolz C. 2012. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends in Microbiology*, 20, 5: 243-250.
- Wilson D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.J.H., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C.A., Diggle P.J. 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genetics*, 4, 9: e1000203, doi: 10.1371/journal.pgen.1000203: 9 str.
- Winston L.G., Chambers H.F. 2009. Antimicrobial resistance in staphylococci: Mechanisms of resistance and clinical implications. V: Antimicrobial drug resistance. Mayers D.L. (ed.). New York, Humana Press: 735-748.
- Xiao X., Si X., Tong X., Li G. 2011. Preparation of flavonoids and diarylheptanoid from *Alpinia katsumadai* hayata by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 81: 265 – 269.
- Yang Y., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Tai T., Nunoura Y., Watanabe K. 1999. Two novel anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai*. *Journal of Natural Products*, 62: 1672-1674.
- Yang C.S., Wang X.B., Wang J.S., Luo J.G., Luo J., Kong L.Y. 2011. A [2+2] Cycloaddition dimer and a Diels-Alder adduct from *Alpinia katsumadai*. *Organic Letters*, 13, 13: 3380–3383.
- Zecconi A., Scali F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*, 150: 12– 22.
- Zhang Q., Plummer P.J. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. V: *Campylobacter*. Nachmakin I., Szymanski C.M., Blaser M.J. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Washington, ASM Press: 263-276.



## **ZAHVALA**

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovno vodenje, za vse nasvete, motivacijo in spodbudo v času opravljanja magistrske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za ponujeno priložnost sodelovanja z Inštitutom za farmacevtske znanosti na Univerzi v Gradcu. Prav tako bi se zahvalila prof. dr. Franzu Bucarju iz omenjenega inštituta, za vso strokovno pomoč pri pripravi in analizi rastlinskih izvlečkov.

Posebno se zahvaljujem Jasni Kovač za vso strokovno pomoč pri delu v laboratoriju, za vse koristne nasvete med delom, za dobro voljo, za ves trud in nenehno pripravljenost pomagati.

Velika hvala staršem za vso podporo v času študija in za ves trud, spodbudne besede, motivacijo ter pozitivne misli, ki so pripomogle k dokončanju magistrskega dela.

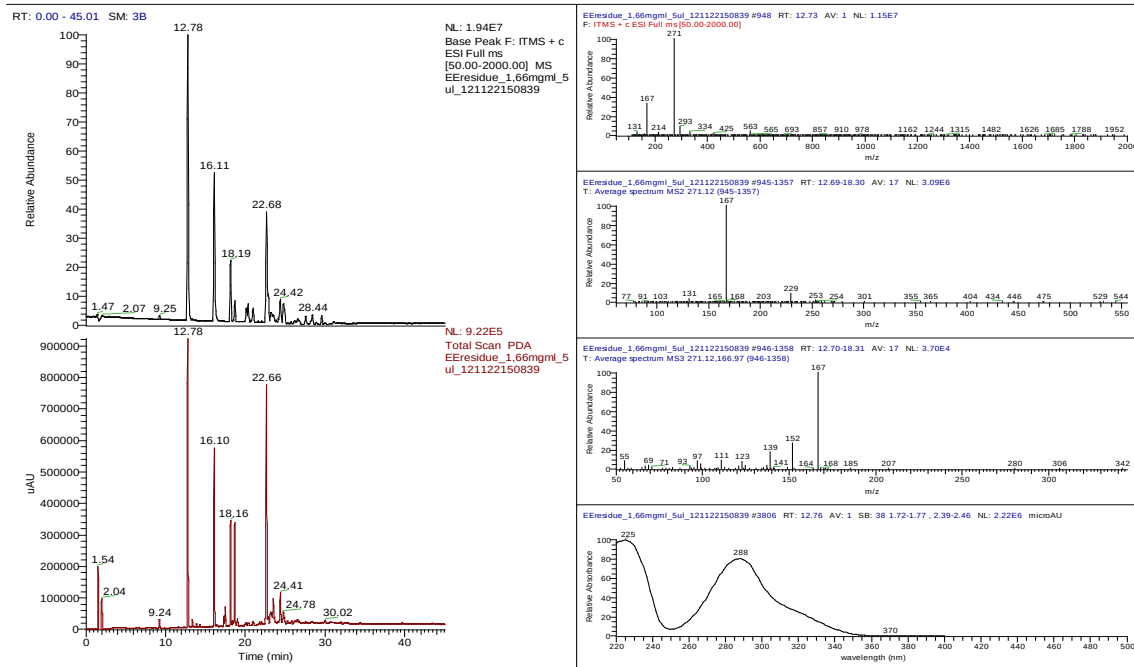
Hvala bratu za vsa možna računalniška popravila in odpravo različnih okvar, ki so se v času študija in med magistrsko nalogo zmeraj pojavile ob nepravem trenutku.

Zahvaljujem se tudi kolegici Sandri za vse nasvete, pomoč pri pomembnih odločitvah, vlivanju motivacije in skupnem premagovanju ovir tekom celotnega študija. Hvala tudi Niki in ostalim sošolcem (Ani, Gašperju, Maji, Urši) za vso podporo, dobro voljo, pozitivno energijo in zabavne dogodivščine, zaradi česar sem med študijem še toliko bolj uživala in veliko lažje prišla do zaključka magistrskega dela.

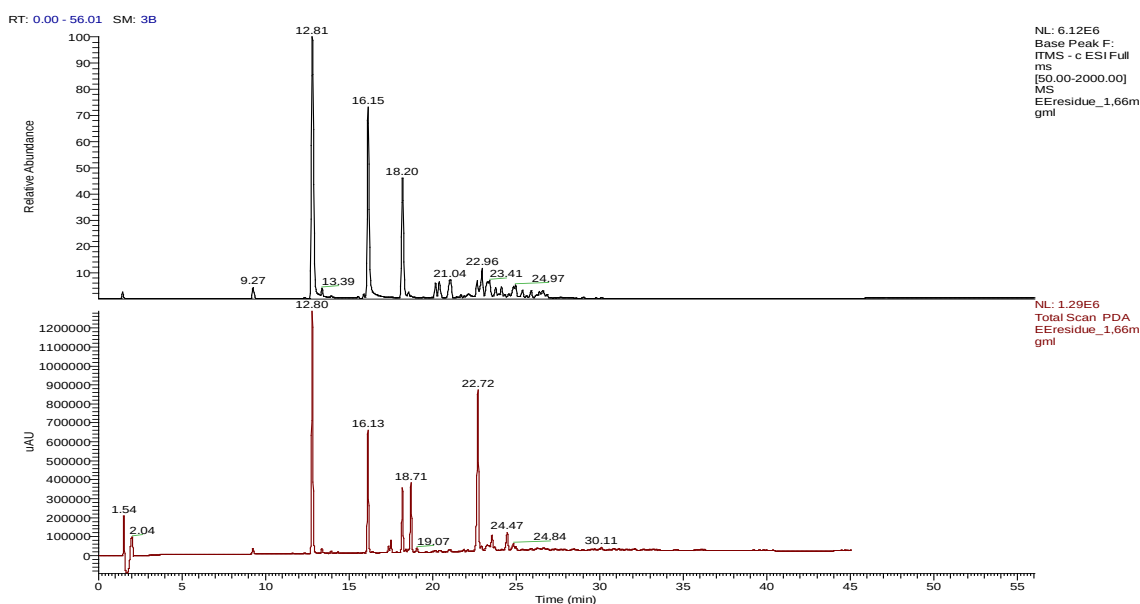
## PRILOGE

EEresidue\_1.66mgml\_5ul\_121122150839

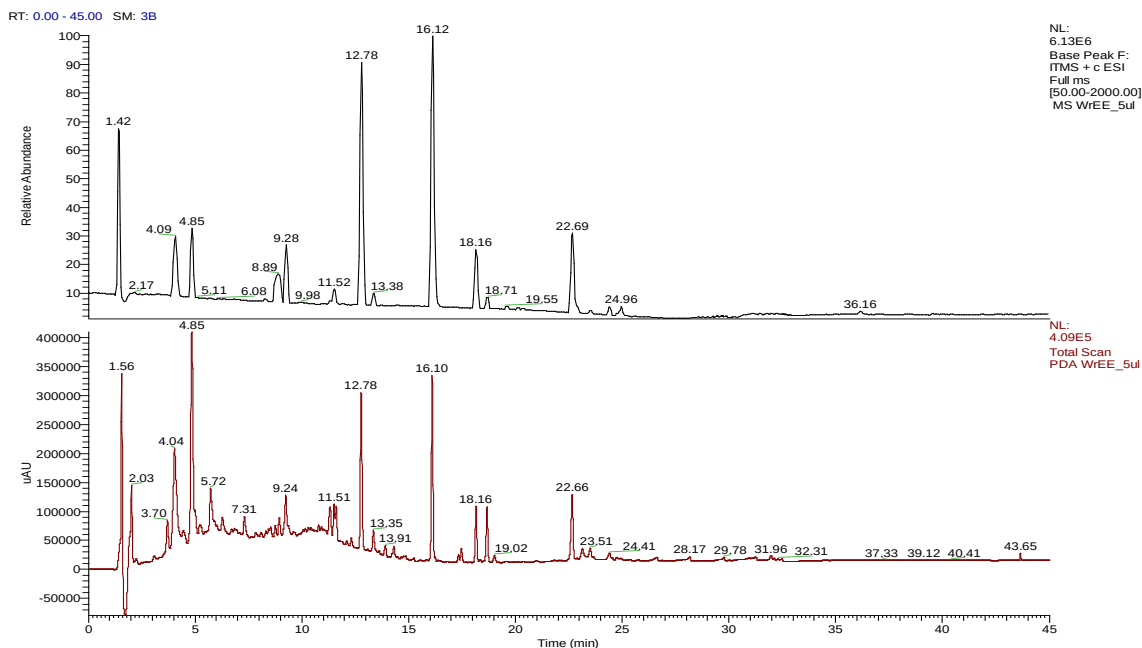
11/22/2012 3:08:39 PM



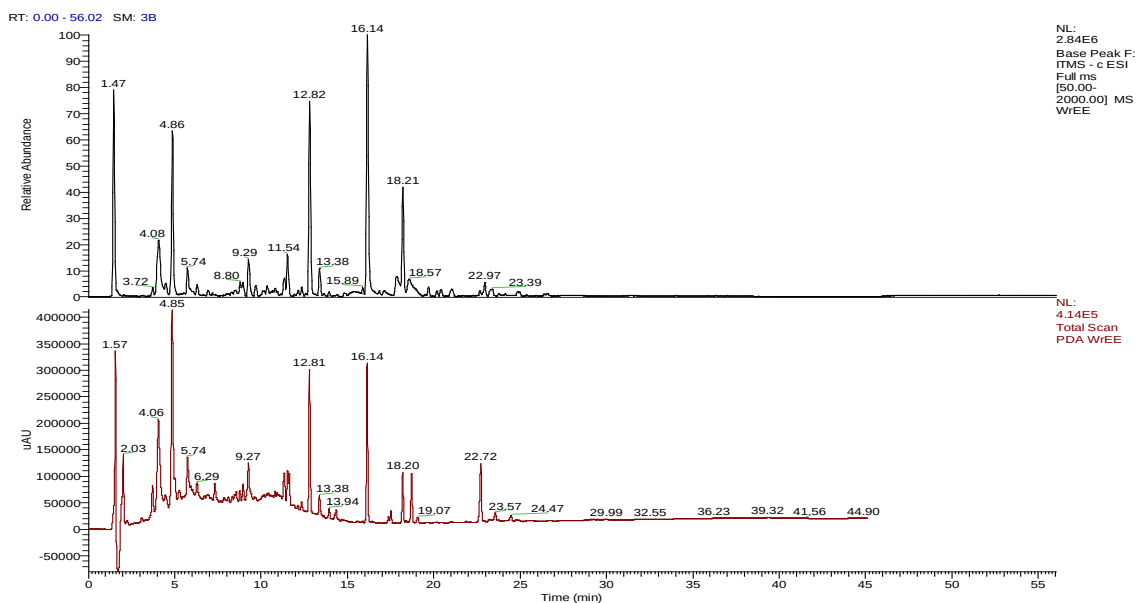
**Priloga A:** Prikaz rezultatov kemijske analize izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS, s pozitivnim ionskim načinom. Zgoraj levo-kromatogram masnih pikov (base peak); spodaj levo-PDA kromatogram. Desno-masni spektri in UV spekter za primer alpinetina (RT 12,78).



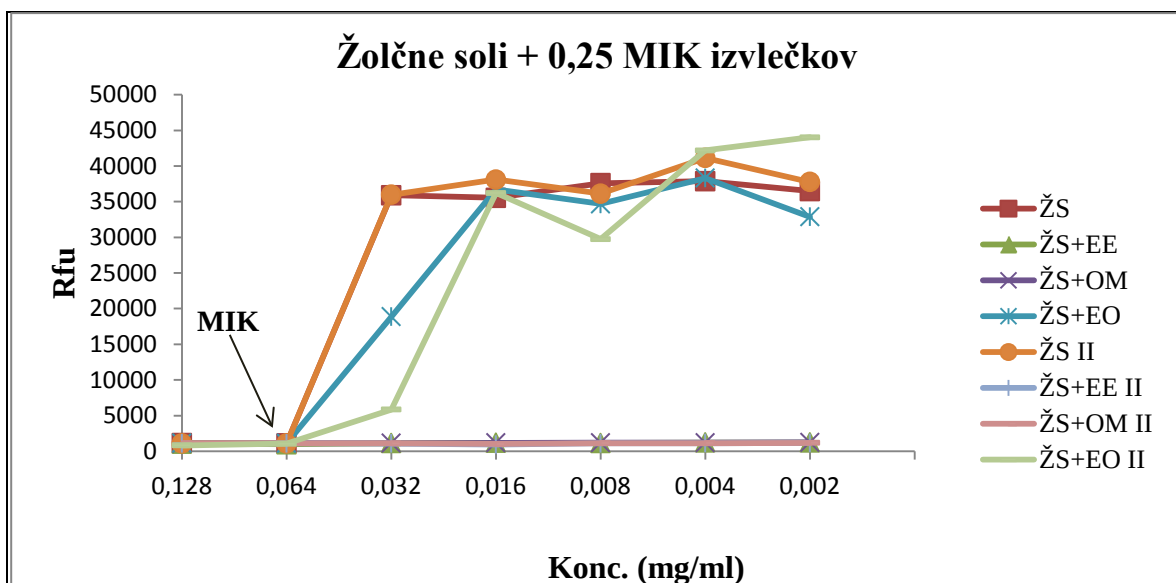
**Priloga B:** Prikaz rezultatov kemijske analize izvlečka odpadnega materiala z LC-PDA-MS, z negativnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.



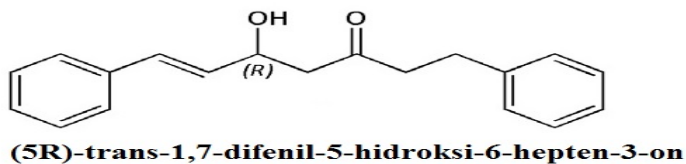
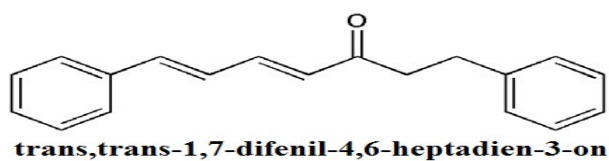
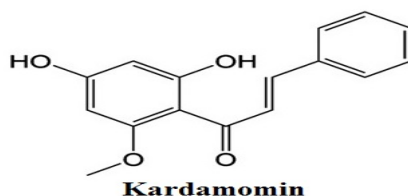
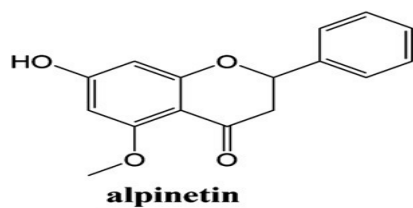
**Priloga C:** Prikaz rezultatov kemijske analize filtrata izvlečka odpadnega materiala (vodna faza) z LC-PDA-MS, s pozitivnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.



**Priloga D:** Prikaz rezultatov kemijske analize filtrata izvlečka odpadnega materiala (vodna faza) z LC-PDA-MS, z negativnim ionskim načinom. Zgoraj-kromatogram masnih pikov, Spodaj-PDA kromatogram.



**Priloga E:** Prikaz določanja MIK žolčnih soli samih in v kombinaciji z izvlečki v subinhibitorni koncentraciji 0,25 MIK na primeru mutante *cmeB* seva *C. jejuni* 11168. Oznaka ŽS pomeni žolčne soli, Rfu pomeni relativne fluorescenčne enote.



**Priloga F:** Strukturne formule nekaterih spojin izoliranih iz semen *A. katsumadai* (Xiao in sod., 2011; Gröblacher in sod., 2012).

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Tina CVETKOVIĆ

**MODULATORJI ODPORNOSTI BAKTERIJ  
*Campylobacter* IN *Staphylococcus* V SEMENIH  
RASTLINE *Alpinia katsumadai***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014