

+UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina ŽNIDAR

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZBRANIH  
RASTLINSKIH IZVLEČKOV, ETERIČNIH OLJ IN  
ODPADNIH MATERIALOV PO DESTILACIJI OLJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina ŽNIDAR

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZBRANIH RASTLINSKIH  
IZVLEČKOV, ETERIČNIH OLJ IN ODPADNIH MATERIALOV PO  
DESTILACIJI OLJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**ANTIMICROBAL ACTIVITY OF SELECTED PLANT EXTRACTS,  
ESSENTIAL OILS AND WASTE MATERIAL AFTER  
DISTILLATION**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo in higieno na Inštitutu za živilstvo Univerze za naravne vire in naravoslovne vede na Dunaju.

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

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

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. Katja SEME, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo

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

Datum zagovora:

Delo 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.

Katarina Žnidar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2  
DK UDK 579.24:547.9:615.33(043)=163.6  
KG protimikrobne snovi/rastlinski izvlečki/eterična olja/patogeni mikroorganizmi/  
mikrodilucija v tekočem gojišču/minimalna inhibitorna koncentracija/MIK  
AV ŽNIDAR, Katarina, dipl. biolog (UN)  
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/SEME, Katja (somentorica)/ SEPČIČ,  
Kristina (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije  
LI 2014  
IN PROTIMIKROBNA AKTIVNOST IZBRANIH RASTLINSKIH IZVLEČKOV,  
ETERIČNIH OLJ IN ODPADNIH MATERIALOV PO DESTILACIJI OLJ  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)  
OP XII, 56 str., 16 pregl., 11 sl., 103 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Rastline in njihovi pripravki so najstarejša oblika zdravljenja mnogih bolezni. Obstaja vse več študij, ki dokazujejo njihovo protimikrobno učinkovitost. Imajo tudi ekološko vrednost, saj so med pripravke vključeni tudi izvlečki odpadnih surovin, v katerih so številne biološko aktivne snovi. V študiji smo z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču preiskovali protimikrobno učinkovitost pripravkov rastlin *Alpinia katsumadai*, *Olea europea*, *Vitis vinifera*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* na po Gramu pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) in po Gramu negativne (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*) bakterije. Najbolj občutljiv organizem je bila bakterija *H. pylori*, z vrednostmi minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) med 16 in 1000 µg/ml. Na *S. aureus* ima najboljše učinkovanje izvleček tropin *V. vinifera* (MIK = 500 µg/ml), na *C. jejuni* in *H. pylori* izvleček semena *A. katsumadai* (MIK = 125-250 oz. 16-125 µg/ml), proti *E. faecalis* in *E. faecium* pa najboljše deluje *S. officinalis* (MIK = 500- 2000 µg/ml). Najslabše so rastlinski pripravki učinkovali na seve bakterij *E. faecalis* in *E. faecium*, kjer so vrednosti MIK pri vseh pripravkih, razen pri *S. officinalis*, presegale 2000 µg/ml. Rezultati eksperimentalnega dela potrjujejo, da rastlinski izvlečki uspešno inhibirajo rast bakterijskih sevov, vključno s proti antibiotikom večkratno odpornimi sevi, ter da je protimikrobno delovanje odvisno od izvora in vsebnosti skupnih fenolnih spojin v preiskovalnem izvlečku. Hipoteze, da rastlinski pripravki bolje delujejo na po Gramu pozitivne bakterije, nismo potrdili.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 579.24:547.9:615.33(043)=163.6  
CX antimicrobials/plant extracts/essential oils/bacterial pathogens/broth  
microdilution/minimal inhibitory concentration/MIC  
AU ŽNIDAR, Katarina  
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/SEME, Katja (co-advisor)/SEPČIČ,  
Kristina (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2014  
TY ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED PLANT EXTRACTS,  
ESSENTIAL OILS AND WASTE MATERIAL AFTER DISTILLATION  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO XII, 56 p., 16 tab., 11 fig., 103 ref.  
LA sl  
Al sl/en  
AB Plants and plant extracts are one of the oldest remedies for various diseases. There is increasing evidence, that plant extracts can exert antimicrobial effects. The use of these extracts also has an ecological note, since there are a lot of plant waste products containing biologically active compounds. In the present study broth microdilution method was used for determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) of *Alpinia katsumadai*, *Olea europea*, *Vitis vinifera*, *Thymus vulgaris* and *Salvia officinalis* plant extracts on Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) and Gram negative (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*) bacteria. The most sensitive microorganism was *H. pylori* with MICs between 16 and 1000 µg/ml. *S. aureus* was most sensitive for the extract of *V. vinifera* (MIC = 500 µg/ml), *C. jejuni* and *H. pylori* were most sensitive for seed extract of *A. katsumadai* (MIC = 125-250 and MIC 16-125 µg/ml, respectively). Extract of *S. officinalis* had the highest antimicrobial effect for *E. faecalis* and *E. faecium* (MIC = 500-2000 µg/ml) however, the MICs for other extracts were higher than 2000 µg/ml. Our results confirm that the used plant extracts efficiently inhibit bacterial growth including multiple antibiotic resistant strains. Antimicrobial activity depends on the origin and content of phenol compounds. We however did not confirm the hypothesis, that tested plant extracts have a better antimicrobial action on Gram positive bacteria.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN CILJI MAGISTRSKEGA DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 IZBRANI RASTLINSKI PRIPRAVKI ZA TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI.....	3
2.1.1 Pripravki rastline <i>Alpinia katsumadai</i> .....	3
2.1.2 Pripravki timijana ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	3
2.1.3 Pripravki vinske trte ( <i>Vitis vinifera</i> ).....	4
2.1.4 Pripravki oljke ( <i>Olea europea</i> ).....	5
2.1.5 Pripravki žajblja ( <i>Salvia officinalis</i> ).....	5
2.1.6 Rastlinski odpadni material .....	6
2.1.7 Eterična olja .....	6
2.1.8 Rastlinski pripravki kot protimikrobna sredstva.....	7
2.1.9 Najpomembnejše spojine iz rastlinskih pripravkov in njihovo protimikrobno delovanje.....	7
2.1.9.1 Protimikrobna učinkovitost fenolov .....	7
2.1.9.2 Protimikrobna učinkovitost terpenoidov.....	8
2.1.10 Možnost uporabe rastlinskih pripravkov v živilstvu in medicini.....	9
2.2 MIKROORGANIZMI .....	10
2.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	10
2.2.1.1 Značilnosti bakterije <i>Campylobacter jejuni</i> , epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz.....	10
2.2.1.2 Zdravljenje kampilobakterioz in odpornost <i>Campylobacter jejuni</i> na protimikrobne snovi .....	10
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.2.2.1 Značilnosti, epidemiologija in patogeneza bakterije <i>Staphylococcus                 aureus</i> .....	11
2.2.2.2 Zdravljenje in odpornost na protimikrobne snovi.....	12
2.2.2.3 Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	12
2.2.3 <i>Helicobacter pylori</i> .....	13

2.2.3.1	Značilnosti, epidemiologija in patogeneza bakterije <i>Helicobacter pylori</i> ...	13
2.2.3.2	Zdravljenje okužb in odpornost <i>Helicobacter pylori</i> na protimikrobne snovi.....	13
<b>2.2.4</b>	<b><i>Enterococcus faecalis</i> in <i>Enterococcus faecium</i> .....</b>	<b>14</b>
2.2.4.1	Značilnosti, epidemiologija in patogeneza enterokokov .....	14
2.2.4.2	Zdravljenje okužb, povzročenih z enterokoki in njihova odpornost na protimikrobne snovi .....	14
<b>2.2.5</b>	<b>Delovanje rastlinskih pripravkov na mikroorganizme .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>DOLOČANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI RASTLINSKIH PRIPRAVKOV .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Difuzijske metode.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Metode razredčevanja v tekočem ali trdem gojišču .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Metode zaznavanja živosti bakterij.....</b>	<b>18</b>
2.3.3.1	Tetrazolijeve soli.....	18
2.3.3.2	Resazurin.....	18
2.3.3.3	ATP- bioluminiscenca .....	19
2.3.3.4	X-Glu .....	19
2.3.3.5	Primerjava metod za zaznavanje živosti bakterij.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA .....</b>	<b>21</b>
3.1	POTEK DELA.....	21
3.2	GOJIŠČA.....	23
3.2.1	Gojišče MHA .....	23
3.2.2	Gojišče MHB .....	23
3.2.3	Krvni agar Columbia.....	23
3.2.4	Brucella bujon .....	23
3.3	MATERIAL IN OPREMA.....	24
3.4	OŽIVITEV BAKTERIJ IN PRIPRAVA INOKULUMA.....	25
3.4.1	Oživitev in priprava inokuluma bakterije <i>C. jejuni</i> .....	25
3.4.2	Oživitev in priprava inokuluma bakterije <i>S. aureus</i> .....	25
3.4.3	Oživitev in priprava inokuluma bakterije <i>H. pylori</i> .....	26
3.4.4	Oživitev in priprava inokuluma bakterije <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> .....	26
3.5	PRIPRAVA RASTLINSKIH PRIPRAVKOV .....	26
3.5.1	Priprava začetnih koncentracij rastlinskih pripravkov .....	27
3.5.2	Določitev minimalne inhibitorne koncentracije.....	28
3.5.3	Določanje odpornosti <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> proti izbranim antibiotikom.....	29
3.5.3.1	Metoda difuzije z diski in E-test .....	30
3.5.3.2	Metoda mikrodilucije v bujonu.....	31
3.5.3.3	Metoda PCR.....	31
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>32</b>
4.1	KARAKTERIZACIJA MATERIALA ZA NADALJNJE DELO .....	32
4.1.1	Optimizacija gojenja in testiranja <i>H. pylori</i> v tekočem gojišču .....	32
4.1.2	Določanje antibiotične odpornosti enterokokov .....	33
4.2	DOLOČITEV NA VANKOMICIN ODPORNIH ENTEROKOKOV (VRE) PRI IZBRANIH SEVIH <i>E. faecalis</i> IN <i>E. faecium</i> .....	35

4.3 DOLOČANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) RASTLINSKIH PRIPRAVKOV ZA RAZLIČNE BAKTERIJSKE VRSTE.....	36
4.3.1 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Staphylococcus</i> .....	36
4.3.2 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Campylobacter</i> .....	36
4.3.3 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Helicobacter</i> .....	37
4.3.4 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Enterococcus</i> .....	38
4.4 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE, IZRAŽENE GLEDE NA VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN .....	39
4.4.1 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na <i>S. aureus</i> .....	39
4.4.2 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na <i>C. jejuni</i> .....	39
4.4.3 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na <i>H. pylori</i> .....	40
4.4.4 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> .....	40
5 RAZPRAVA.....	41
5.1 KARAKTERIZACIJA MATERIALA ZA NADALJNJE DELO .....	41
5.1.1 Optimizacija gojenja in testiranja <i>H. pylori</i> v tekočem gojišču .....	41
5.1.2 Določanje odpornosti enterokokov na antibiotike.....	41
5.2 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE .....	42
5.2.1 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Staphylococcus</i> ...	43
5.2.2 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Campylobacter</i> ....	43
5.2.3 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Helicobacter</i> .....	44
5.2.4 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu <i>Enterococcus</i> .....	45
5.2.5 Protimikrobno delovanje rastlinskih pripravkov na po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah .....	45
5.2.6 Protimikrobna učinkovitost rastlinskih pripravkov na večkratno odpornih sevih in proti antibiotikom občutljivih sevih .....	46
5.3 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST TESTIRANEGA MATERIALA NA <i>C.</i> <i>jejuni</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. pylori</i> , <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> , IZRAŽENA NA VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN.....	46
6 SKLEPI .....	48
7 VIRI .....	49

ZAHVALA



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Material in oprema, uporabljena pri eksperimentalnem delu naloge. ....	24
Preglednica 2. Absorbanca, valovna dolžina in število bakterij/ml različnih standardov (Berger, 2013).....	26
Preglednica 3. Izbrani sevi enterokokov, ki smo jih testirali z rastlinskimi izvlečki in antibiotiki.....	30
Preglednica 4. Temperaturni program reakcije PCR za potrjevanje prisotnosti gena za odpornost proti vankomicinu (Berger, 2013). ....	31
Preglednica 5. Testiranje enterokokov na različne antibiotike z metodo difuzije z diski. ..	34
Preglednica 6. Testiranje enterokokov na različne antibiotike z metodo mikrodilucije v bujonu in E-testom.. ....	34
Preglednica 7. MIK rastlinskih pripravkov na sevih <i>S. aureus</i> . ....	36
Preglednica 8. MIK rastlinskih pripravkov na sevih <i>C. jejuni</i> . ....	36
Preglednica 9. MIK rastlinskih pripravkov na sevih <i>H. pylori</i> .....	37
Preglednica 10. MIK rastlinskih pripravkov na sevih <i>E. faecalis</i> . ....	38
Preglednica 11. MIK rastlinskih pripravkov na sevih <i>E. faecium</i> . ....	38
Preglednica 12. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih <i>S. aureus</i> . ....	39
Preglednica 13. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih <i>C. jejuni</i> . ....	39
Preglednica 14. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih <i>H. pylori</i> . ....	40
Preglednica 15. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih <i>E. faecalis</i> . ....	40
Preglednica 16. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih <i>E. faecium</i> . ....	40

## KAZALO SLIK

Slika 1. Osnovna struktura flavonoida (Cushnie in Lamb, 2005) .....	8
Slika 2. Strukturna formula terpenoida likopena (Putignani, 2013).....	8
Slika 3. Metode določanja protimikrobnega delovanja (Klančnik in sod., 2009). .....	17
Slika 4. Obarvanje različnih sevov enterokokov s TTC in z MTT (Berger, 2013).....	20
Slika 5. Obarvanje različnih enterokokov z resazurinom (Berger, 2013). .....	20
Slika 6. Prikaz revitalizacije, inkubacije in priprave inokuluma za seve bakterij <i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i> , testnih raztopin izbranih rastlinskih pripravkov ter nadaljnega postopka mikrodilucije v tekočem gojišču. ....	21
Slika 7. Odvisnost relativne fluorescence od koncentracije testiranih rastlinskih pripravkov, iz katerega smo na podlagi RFU določili vrednosti MIK posameznih testiranih rastlinskih pripravkov .....	28
Slika 8. Določanje živosti seva <i>E. faecalis</i> En1 s pripravljeno raztopino resazurina in menadiona, v prisotnosti testiranih rastlinskih pripravkov.....	29
Slika 9. Rezultati gojenja bakterije <i>H. pylori</i> na različnih gojiščih.....	32
Slika 10. Vpliv gojišča z dodatki na relativno fluorescenco barvila CellTiter-Bluej.....	33
Slika 11. Gel s produkti PCR po elektroforezi. ....	35

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. katsumadai</i>	<i>Alpinia katsumadai</i>
AEE	<i>A. katsumadai</i> etanolni ekstrakt
AEO	<i>A. katsumadai</i> -olje
AMP	Ampicilin
AOM	<i>A. katsumadai</i> odpadni material
ATP	Adenozin-3-fosfat
BHI	Gojišče BHI (ang. brain heart infusion)
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CAN	Kanamicin
CLI	Klindamicin
CLP	Kloramfenikol
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute)
cmeABC	Izlivna črpalka <i>C. jejuni</i>
CO <sub>2</sub>	Ogljikov dioksid
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
ERY	Eritromicin
ESBL	Razširjen spekter delovanja proti β-laktamazam
GBS	Sindrom Guillain Barre
<i>H. acinonychis</i>	<i>Helicobacter acinonychis</i>
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
<i>H. mustelae</i>	<i>Helicobacter mustelae</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IVZ	Inštitut za varovanje zdravja
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
McF	McFarland standard
MDR	Na več antibiotikov odporni
mecA	Gen, ki pri <i>S. aureus</i> kodira penicilin vezavni protein
MHA	Mueller Hinton agar
MHB	Mueller Hinton bujon
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MP	Modri pinot
MRSA	Na meticilin odporni <i>S. aureus</i>
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid

ND	Nedoločeno
<i>O. europea</i>	<i>Olea europea</i>
O <sub>2</sub>	Kisik
OL	Oljčni list
OLE	Ekstrakt iz oljčnega listja
PBP	Penicilin vezavni protein
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
<i>qnrA</i>	Gen, ki nosi zapis o odpornosti proti fluorokinolonom
resazurin	7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksid
RNA	Ribonukleinska kislina
R-plazmid	Konjugacijski faktor, ki ima zapis za odpornost proti antibiotikom
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. officinalis/ SO</i>	<i>Salvia officinalis</i>
STREP	Streptomycin
<i>T. vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
TC	Tetraciklin
TEE	<i>T. vulgaris</i> -etanolni ekstrakt
TEO	<i>T. vulgaris</i> -olja
TOM	<i>T. vulgaris</i> -odpadni material
TSA	Tryptic soy agar
TTC	2,3,5-trifeniltetrazoliumklorid
<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>
VAN	Vankomicin
<i>vanA</i>	Gen, ki nosi zapis za odpornost proti vankomicinu
<i>vanB</i>	Gen, ki nosi zapis za odpornost proti vankomicinu
X-Glu	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β-D-glukopiranozid

## 1 UVOD

Rastline in njihovi pripravki so najstarejša oblika zdravljenja najrazličnejših bolezni. Še danes so dvema tretjinama človeštva zdravilne rastline glavna pomoč pri zdravljenju. Tudi številna sodobna zdravila neposredno ali v delno spremenjeni obliki izvirajo iz rastlin. Na svetu je 20 000 rastlinskih vrst in od tega je 1000 vrst dobro raziskanih (Galle-Toplak, 2002).

Farmakološko delovanje rastlin v prvi vrsti temelji na medsebojnem učinkovanju več sestavin, lahko pa določenim učinkovinam pripišemo določeno vodilno vlogo pri učinkovanju. Glavne skupine rastlinskih učinkovin so: ogljikovi hidrati, maščobe, flavonoidi, saponini, kumarini, antrakinonski in srčni glikozidi, grenčine, čreslovine, eterična olja in vitamini. Flavonoidi so pri vseh rastlinah najbolj razširjeni sekundarni produkti presnove. Njihove biološke funkcije v rastlini so različne. Privabljajo insekte za opraševanje, ščitijo pred škodljivimi insekti, virusi, bakterijami ter vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici. Eterična olja imajo širok spekter delovanja, med ostalimi tudi preprečujejo razvoj mikroorganizmov in jih uničujejo (Galle-Toplak, 2002).

Dolgotrajna uporaba posameznih rastlin v ljudskem zdravilstvu je velikokrat dala in še daje pobude za nove raziskave. Številne rastline so znane po protimikrobnem delovanju. To njihovo učinkovanje pa bi lahko izkoristili pri preprečevanju širjenja bakterij, konzerviranju hrane ter pri zdravljenju. Ravno tako imajo rastlinski pripravki širok terapevtski učinek in v primerjavi s sintetičnimi zdravili manj stranskih učinkov. Pomembni so tudi kot nov vir protimikrobnih sredstev zlasti pri bakterijah, ki so razvile odpornost na številna protimikrobna zdravila (Negi, 2012).

V nalogi smo obravnavali protimikrobno učinkovitost rastlinskih izvlečkov, eteričnih olj in odpadnih materialov, ki nastanejo kot stranski proizvod pri pridobivanju eteričnih olj. Rastlinski pripravki so bili testirani na izbranih bakterijskih vrstah, pri katerih postaja odpornost proti antibiotikom splošen in naraščajoč problem zaradi prekomerne uporabe antibiotikov, tako v humani, kot veterinarski medicini. Posebej problematično je širjenje okužb iz živali na ljudi in posledično širjenje odpornosti patogenih mikroorganizmov preko proizvodno-prehranske verige (Smole Možina in sod., 2011).

Bakterije, uporabljene v nalogi, so po Gramu pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*) in po Gramu negativne bakterije (*Campylobacter jejuni* in *Helicobacter pylori*). Med sabo se razlikujejo po sestavi celične stene, ki je prva obrambna linija bakterij pred vstopom protimikrobnih sestavin. Izbrane bakterije imajo seve z mnogokratno odpornostjo na antibiotike (MRSA; VRE), povzročajo kontaminacije v živilsko-prehranski oskrbovalni verigi (*C. jejuni*), akutne okužbe in zastrupitve (*C. jejuni*, *S. aureus*) in kronične gastrointestinalne okužbe (*H. pylori*). Kampilobakter je bil v letu 2011 podobno kot v številnih državah EU najpogostejši bakterijski povzročitelj enteritisev v Sloveniji (IVZ, 2012).

Z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču smo iskali minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) rastlinskih pripravkov. Pred tem smo morali zaradi različnih lastnosti in zahtev gojenja poiskati primerna gojišča in metode za zaznavanje živosti bakterij.

## 1.1 NAMEN IN CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Cilji magistrske naloge so bili:

- a) določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) izvlečkov grozdnih tropin kot stranskega proizvoda vinarstva, izvlečka oljčnega listja kot odpadnega materiala oljkarstva ter etanolnih izvlečkov, eteričnih olj in odpadnih materialov po destilaciji rastlin *Alpinia katsumadai*, *Thymus vulgaris* in *Salvia officinalis* na izbranih sevih rodov *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Helicobacter* in *Enterococcus*;
- b) primerjati protimikrobno učinkovitost rastlinskih pripravkov glede na vsebnost fenolnih spojin in izvor;
- c) primerjati učinkovitost protimikrobnega delovanja rastlinskih pripravkov na po Gramu pozitivne (*Staphylococcus*, *Enterococcus*) in po Gramu negativne bakterije (*Campylobacter*, *Helicobacter*);
- d) primerjati protimikrobno učinkovitost rastlinskih pripravkov na večkratno odporne seve in proti antibiotikom občutljive seve.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da:

- a) rastlinski pripravki uspešno inhibirajo rast bakterijskih sevov, vključno s proti antibiotikom odpornimi sevi;
- b) je protimikrobno delovanje rastlinskih pripravkov odvisno od izvora (sestave) in vsebnosti skupnih fenolnih spojin v preiskovanem izvlečku;
- c) rastlinski pripravki imajo boljši protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije;
- d) so rastlinski pripravki učinkoviti tudi proti večkratno odpornim bakterijskim sevom.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 IZBRANI RASTLINSKI PRIPRAVKI ZA TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

#### 2.1.1 Pripravki rastline *Alpinia katsumadai*

Rastlina *Alpinia katsumadai* spada v družino ingverjev (Zingiberaceae). Rastline iz rodu *Alpinia* imajo debele, lepo dišeče korenike z vonjem po ingverju, iz katerih spomladi poženejo novi poganjki. Listi imajo suličasto obliko z resicami (Li in sod., 2011).

Na Kitajskem uporabljajo rastlinske pripravke *A. katsumadai* v tradicionalni medicini za zdravljenje motenj v želodcu, slabosti, za zdravljenje anoreksije ter kot sredstvo proti bruhanju. Dokazano je farmakološko delovanje rastlinskih pripravkov *A. katsumadai* vključno s protivnetnim, protibakterijskim, antioksidativnim in proti-tumornim delovanjem (Li in sod., 2011).

Nan in sod. (2004) so analizirali kemijske sestavine eteričnih olj listov in cvetov *A. katsumadai*. S plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) so določili kemične sestavine, in sicer *p*-ment-1-en-ol, 1,8 cineol, terpinen kot najbolj številčne. Sledijo še kamfor, *p*-menta-1,4-dien,  $\beta$ -pinen, karen itd. Kemičnim sestavinam  $\beta$ -pinen, *p*-ment-1-en-ol in cineol so dokazali močno protimikrobno aktivnost.

Etanolni pripravek iz semen *A. katsumadai* vsebuje diarilheptanoide, kalkone, flavonoide, monoterpene in se uporablja v tradicionalni kitajski medicini (Nan in sod., 2004; Klančnik in sod., 2012).

V študijah opisujejo protimikrobno učinkovanje rastlinskih pripravkov *A. katsumadai* (Klančnik in sod., 2012; Gröblacher in sod., 2012). Dokazano je tudi, da izvleček semen *A. katsumadai* zmanjša oksidativni stres in pomaga pri astmatičnih obolenjih (Lee in sod., 2010). Kim in sod (2012) so dokazali delovanje rastlinskih pripravkov *A. katsumadai* proti rotavirusem, verjetno z blokado vstopa virusa v celico.

#### 2.1.2 Pripravki timijana (*Thymus vulgaris*)

Timijan ali materina dušica (*Thymus vulgaris*) spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Razkuževalno moč timijana so poznali že Egipčani, ki so ga uporabljali za balzamiranje mrtvih. Pri velikih epidemijah kuge v Evropi je timijan upravičeno veljal za najboljšo zaščito pred okužbo. V fitoterapiji timijan uporabljajo proti kašlju, bronhitisu, pri obolenju želodca in črevesja. Izboljšuje prebavo in žene vetrove. Spodbuja tudi izločanje urina (je diuretik) in hkrati razkužuje izločala (Galle-Toplak, 2002).

Glavni sestavini eteričnega olja sta fenolni spojini timol in karvakrol, ki ju spremljajo še terpeni, *p*-cimen, cineol, linalol in metoksi-timol (Pirbalouti in sod., 2013). Sestava

hlapnega olja, posebno razmerje obeh fenolnih sestavin timola in karvakrola, je odvisna od genetskega izvora rastlin, podnebnih in talnih pogojev ter časa nabiranja. Pri prvem rezu junija vsebuje rastline več karvakrola, pri drugem več timola (Galle-Toplak, 2002). V laboratorijski praksi uporabljajo timol za konzerviranje urina. Timijanovo hlapno olje ali timol sta velikokrat sestavni del krem in pripravkov za vtiranje v kožo pri bolečinah mišic in sklepov. Timijanove kopeli pomirjajo krče bronhijev, zato se jih uporablja tudi pri kroničnem in akutnem bronhitisu. Uporablja se ga tudi kot začimbo (Galle-Toplak, 2002).

Študije protimikrobnega delovanja kažejo na večje učinke eteričnega olja na po Gramu pozitivne bakterije, kot na po Gramu negativne bakterije (Brenes, 2010). Opravljene so študije protimikrobnega delovanja rastlinskih pripravkov timijana (Nickavar in sod., 2005; Pirbalouti in sod., 2013; Al Hashmi in sod., 2013; Nikolić in sod., 2014). Al Hashmi in sod. (2013) so kemijsko analizirali sestavo različnih izvlečkov timijana. Ekstrakti so se razlikovali tudi po deležih kemijskih snovi, vendar so vsi vsebovali velike koncentracije timola, *o*-timola, timol acetata in karvakrola. Večina izoliranih kemijskih snovi je biološko aktivnih.

### 2.1.3 Pripravki vinske trte (*Vitis vinifera*)

Grozdje je že več kot 2000 let prepoznavno po številnih bioloških lastnostih. Je dober vir hranil, kot so ogljikovi hidrati (12 – 18 %), proteini (0,5 - 0,6 %) in maščobe (0,3 - 0,4 %). Predvsem je poznana njegova antioksidativna moč, saj nevtralizira proste kisikove radikale, ki imajo sicer škodljiv učinek na proteine in nukleinske kisline (Yadav in sod., 2009). V ljudski medicini se grozdje oz. vinska trta veliko uporabljata za obkladke, za kopeli in izpiranje kože, za zdravljenje ozeblin, pri glavobolu in proti bolečinam v želodcu. Opazno je spodbudno delovanje grozdja na posamezne funkcije jeter, ledvic, črevesja in želodca (Lesinger, 2005). Opravljene so številne študije protimikrobnega učinkovanja grozdja in grozdnih tropin (Cosme in sod., 2009; Rhodes in sod., 2006; Yadav in sod., 2009; Bekhit in sod., 2011).

Iz grozdja lahko pridobimo številne rastlinske pripravke, kot je izvleček tropin, izvleček semen in sok. Pri pridelovanju vina in grozdnega soka je veliko stranskih produktov, ki so še vedno bogati z različnimi snovmi. Zato se vedno več raziskuje uporabo snovi grozdnih tropin in semen. Rhodes in sod. (2006) so preverjali protimikrobno aktivnost iz različnih grozdnih pripravkov. Grozдне tropine, izvlečki semen in sok so vsi inhibirali rast bakterije *Listeria monocytogenes*. Obreque-Siller in sod. (2013) so raziskovali vsebnost fenolov različnih grozdnih pripravkov. Ugotovili so, da izvleček tropin vsebuje več različnih fenolov, v primerjavi z ostalimi izvlečki semen in stebela. Fenolne spojine učinkujejo kot antioksidanti in imajo protimikrobne, protirakave in protivnetne lastnosti (El-Din Bekhit in sod., 2011). Sestava in koncentracija fenolov v grozdju je odvisna od podnebja, stopnje zrelosti in rastnih pogojev. Študije potrjujejo protimikrobno učinkovanje (El-Din Bekhit in sod., 2011; Rhodes in sod., 2006) in antioksidativno učinkovanje izvlečkov grozdnih tropin (El-Din Bekhit in sod., 2011; Yang in sod., 2009). Soares de Moura in sod. (2012) so ugotovili, da izvleček tropin aktivira signalno kaskado inzulina in zmanjša hiperglikemijo na modelu miške.



### 2.1.4 Pripravki oljke (*Olea europea*)

Oljka (*Olea europea*) je drevo mediteranskih predelov, znano po plodovih olivah in olivnem olju. Zdravilni deli oljke so listi, lubje, plodovi in cvetovi. Več kot 200-krat je uporaba oljke v medicinske namene omenjena v Bibliji. V ljudskem zdravilstvu so že v starih časih poznali zdravilno delovanje oljčnega olja. Olje varuje jetra pred strupi, pospešuje delo in funkcije jeter, vpliva na krčenje žolčnika, uporablja se proti bronhitisu, kašlju in hripavosti, saj ima antispazmodično delovanje ter deluje tudi proti bakterijam (Lesinger, 2005).

Ugotovljeno je bilo, da je večina zdravilnih snovi, ki se nahajajo v olivah in oljčnem olju, v še bistveno večjih količinah prisotna v oljčnih listih. Izvleček oljčnih listov lahko tako vsebuje do 40-krat več antioksidantov kot hladno stisnjeno oljčno olje. Olivni listi so eden stranskih proizvodov pri kmetovanju z oljčnimi nasadi. Glavna bioaktivna učinkovina izvlečka olivnega listja je oleuropein, ki ima antioksidativno in protimikrobno učinkovitost ter znižuje krvni tlak in krvne maščobe (Obied in sod., 2007; Pereira in sod., 2007; Van Wyk in sod., 2010). Opravljene so številne študije protimikrobnega učinkovanja oljčnih listov (Furneri in sod., 2002; Battinelli in sod., 2006).

### 2.1.5 Pripravki žajblja (*Salvia officinalis*)

Že antični pisci so visoko cenili zdravilno moč žajblja. Plinij jo je imenoval »salvia«, kar izvira iz latinske besede *salvus*, ki pomeni zdrav. Žajbelj divje raste na suhih, kamnitih tleh Sredozemlja. V fitomedicini se uporablja pri prebavnih motnjah, vetrovih, vnetju črevesne in želodčne sluznice ter pri driskah. Izboljšuje prebavo, zato je odlična začimba predvsem za mastne jedi. Žajbelj je tudi priljubljena sestavina zobnih past (Baričević in Bartol, 2000).

Najbolj poznani pripravek žajblja je eterično olje. Številni raziskovalci so proučevali kemično analizo eteričnega olja *S. officinalis*, kjer so kot glavne sestavine navedli tujon, cineol, kafro, borneol, in bornilacetat (Baričević in Bartol, 2000; Longaray Dellamare in sod., 2007; Hayouni in sod., 2008; Russo in sod., 2013). Poznano je protimikrobno (Longaray Dellamare in sod., 2007; Hayouni in sod., 2008; Bouaziz in sod., 2009), protirakavo (Russo in sod., 2013) in antioksidativno učinkovanje eteričnega olja (Baričević in Bartol, 2000; Glisić in sod., 2010). Glisić in sod. (2010) so za pripravo izvlečkov *S. officinalis* uporabili različna topila in sicer vodo, aceton, heksan, metanol in etanol. Ugotovili so, da je najbolj primerna uporaba etanola (55- 75 %), zmešanega z vodo.

Opravljene so tudi številne študije protimikrobnega učinkovanja rastlinskih pripravkov žajblja (Baričević in Bartol., 2000; Longaray Delamare in sod., 2007; Hayouni in sod., 2008; Loizzo in sod., 2008; Bouaziz in sod., 2009; Glisić in sod., 2010; Russo in sod., 2013).

### **2.1.6 Rastlinski odpadni material**

Industrija proizvodnje sadja, zelenjave in zelišč proizvede veliko količino organskih odpadkov, stranskih proizvodov in ostankov. Veliko je študij o recikliranju odpadnega materiala v agroživilstvu (Alonso in sod., 2002; Peschel in sod. 2006; Cheng in sod., 2012). V ostankih ali stranskih proizvodih so iskane bioučinkovine, ki bi se lahko uporabile kot antioksidativna sredstva, sredstva s protimikrobnim delovanjem ali pa kot dopolnilo k prehrani. Pridelki, ki imajo visoko proizvodnjo, z veliko vsebnostjo fenolov ter potrjene antioksidativne lastnosti, so jabolko (Du Pont in sod., 2002), paradižnik (Fuhrman in sod., 2000), artičoke (Jimenez in sod., 2003), grozdje (Cheng in sod., 2012) in oljke (Obied in sod., 2006).

Med proizvodnjo vina so bioaktivni fenoli iz grozdja samo delno ekstrahirani. Veliko jih ostane v stranskih produktih. Te se lahko po obdelavi ponovno uporabi, saj imajo koristen vpliv na zdravje ljudi in dokazano protimikrobno delovanje. Poleg tega pa je to material, ki je odpadni material in ne predstavlja velikega stroška (Peschel in sod., 2006; Cheng in sod., 2012).

Pri proizvodnji olivnega olja se proizvede veliko odpadnega materiala, ki pa se ga je težko znebiti. Zato so Obied in sod. (2007) naredili študijo o protimikrobnem in antioksidativnem učinkovanju biofenolov, ki se nahajajo v odpadnem materialu olivnega olja.

### **2.1.7 Eterična olja**

Eterična olja so zmesi različno hlapljivih biološko aktivnih kemičnih spojin, ki nastajajo v rastlinah kot produkt presnove. Rastline jih uporabljajo za privabljanje opraševalcev ter za obrambo pred zajedalci in mikrobi. Uporabljajo se v aromaterapiji, parfumeriji, v izdelkih za zaščito zdravja, kot sredstvo za preprečevanje pokvarljivosti živil ter kot aroma. V vodi so netopna in na njej plavajo. Od tod jim tudi ime »olja«, čeprav nimajo nič skupnega z maščobnimi olji. Lahko so prisotna po celi rastlini ali le v nekaterih delih rastlin, kot npr. v žlezniških povrhnjicah ali v posebnih oljnih celicah (Galle-Toplak, 2002).

Eterična olja lahko pridobimo z destilacijo z vodno paro, ekstrakcijo s topilom in s stiskanjem. Shranjujemo jih v temnih, dobro zaprtih steklenicah, saj kažejo spremembe pri stiku s kisikom ali izpostavitvi svetlobe (Galle-Toplak, 2002).

Številne študije dokazujejo protimikrobno delovanje eteričnih olj (Burt, 2004; Longaray Delamare in sod., 2007; Hayouni in sod., 2008; Negi, 2012; Nikolić in sod., 2014).

## 2.1.8 Rastlinski pripravki kot protimikrobna sredstva

Rastlinsko tkivo vsebuje sekundarne metabolite in lektine, ki imajo sposobnost protimikrobnega delovanja (Paiva in sod., 2010). Znano je, da so protimikrobni učinki eteričnih olj in izvlečkov odvisni od kemijske sestave, ki je posledica okolja in razvitosti obrambe rastlin. Na dobro protimikrobno učinkovitost kaže visoka vsebnost fenolov (Negi, 2012).

Sekundarni metaboliti rastlin vključujejo alkaloidne, terpenoide, flavonoide, in ostale fenolne spojine. Te spojine so povezane z obrambnim mehanizmom rastlin, z odbijajočimi ali privlačnimi lastnostmi, z obrambo pred biotičnim ali abiotičnim stresom in z vzdrževanjem strukturne integritete rastlin (Paiva in sod., 2010).

Mehanizmi delovanja sekundarnih metabolitov še niso popolnoma pojasnjeni. V študijah, kjer so raziskovali te mehanizme, so ugotovili, da bi flavonoidi lahko delovali na funkcijo citoplazemske membrane in inhibirali DNA-girazo (Cushnie in Lamb., 2005; Zhang in sod., 2008). Ulanowska in sod. (2006) so v študiji pokazali, da flavonoidi inhibirajo sintezo DNA in RNA pri bakteriji *Vibrio harveyi*.

## 2.1.9 Najpomembnejše spojine iz rastlinskih pripravkov in njihovo protimikrobno delovanje

Med spojinami, ki so najpomembnejše za protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov, izstopajo fenoli, terpeni in terpenoidi. Poleg teh pa so uporabne protimikrobne spojine še alkaloidi, lektini in polipeptidi (Burt, 2004).

### 2.1.9.1 Protimikrobna učinkovitost fenolov

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinskih celicah. Rastlina jih potrebuje za rast in reprodukcijo. Akumulirajo se predvsem v epidermalnem tkivu rastline in sodelujejo v zaščiti pred zunanjimi stresnimi dejavniki (UV-sevanje, mikrobi, insekti), učinkujejo kot vizualni markerji v cvetovih in sadežih ter vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živilskih izdelkov. V celici so bodisi v vakuoli, ali vezani na strukturne elemente celične stene (Abramović in sod., 2008). Med fenole uvrščamo flavonoide, enostavne fenole, fenolne kisline, kinolone, flavone in tanine (Burt, 2004).

Zaradi pogostega poročanja o njihovi bioučinkovitosti so tarča številnih medicinskih raziskav. Poročajo o protimikrobni (Cushnie in Lamb, 2005; Klančnik in sod., 2010; Al Hashmi in sod., 2013; Obreque-Siller in sod., 2013; Putignani in sod., 2013), antioksidativni, protivnetni in estrogenični učinkovitosti, inhibiciji encimov, citotoksično protitumorski in protialergijski učinkovitosti (Cushnie in Lamb, 2005; Putignani in sod., 2013).



### 2.1.10 Možnost uporabe rastlinskih pripravkov v živilstvu in medicini

Preiskovanje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih pripravkov (izvlečkov in eteričnih olj) je zanimivo s strani konzerviranja hrane. Ti namreč predstavljajo nove alternativne dodatke za preprečevanje razmnoževanja patogenov, ki jih lahko zaužijemo s hrano. Med predelavo surove hrane lahko pride do številnih okužb. Tveganje ostaja tudi med samo prodajo, zaradi česar je pomembna uporaba konzervansov za preprečitev rasti mikrobov. Nekateri konzervansi imajo kancerogene in teratogene lastnosti. Z iskanjem rastlinskih izvlečkov s protimikrobnim delovanjem lahko nadomestimo kemično konzerviranje. Poleg protimikrobne učinkovitosti imajo rastlinski izvlečki pogosto tudi antioksidativne lastnosti, njihova priprava pa je manj škodljiva od sintetičnih farmacevtikov (Negi, 2012).

Koncentracija rastlinskih pripravkov, s katero inhibiramo rast mikroorganizmov *in vitro*, je manjša kot tiste, ki jo je za isti učinek potrebno dodati hrani. Razlog je lahko v večji vsebnosti nutrientov v hrani glede na bakterijski medij. Na občutljivost bakterije na protimikrobno delovanje rastlinskih pripravkov vpliva tudi pH-vrednost hrane, temperatura in količina kisika, prisotna v pakiranju. Pri nižji pH vrednosti eterična olja bolje delujejo na bakterije, saj se jim zviša hidrofobnost in se tako bolje topijo v lipidih celične membrane (Burt, 2004).

Kljub dokazanemu *in vitro* protimikrobnemu učinkovanju rastlinskih pripravkov je pot do same uporabe dolga in vprašljiva. Dodatne študije so drage in dolgotrajne. Pred uporabo rastlinskih pripravkov ali spojin izoliranih iz njih je potrebno preveriti tudi učinkovanje na evkariontske celice. Rojas de la Parra in sod. (2006) so iz rastline *Dasyscyphus niveus* izolirali različne spojine, med katerimi sta dve imeli citotoksično delovanje na humane celice. V nekaterih študijah, kjer so preverjali protimikrobno učinkovanje rastlinskih izvlečkov, so hkrati preverjali še citotoksično učinkovanje na vero celice (Mathabe in sod., 2008; Toedo in sod., 2011).

## 2.2 MIKROORGANIZMI

### 2.2.1 *Campylobacter jejuni*

#### 2.2.1.1 Značilnosti bakterije *Campylobacter jejuni*, epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz

*Campylobacter jejuni* je v zadnjih letih najpogostejši vzrok okužb s hrano. Kampilobakter je bil v letu 2011, podobno kot v številnih državah EU, najpogostejši bakterijski povzročitelj enteritsov v Sloveniji. Letna incidenca kampilobakterijskih okužb je znašala 48,7/100.000 prebivalcev (IVZ, 2012).

Naravni rezervoarji te mikroaerofilne, po Gramu negativne bakterije so divje ptice, katerih črevo nudi primerno biološko nišo s temperaturo 41 °C ter posebnimi mikroaerobnimi pogoji (Dasti in sod., 2009).

Bakterije rodu *Campylobacter* povzročajo kampilobakterioze, ki spadajo med zoonoze, kar pomeni, da se prenašajo iz živali na ljudi. Najpomembnejši vir okužb ljudi so piščanci, ki jih bakterije navadno kolonizirajo kmalu po izvalitvi, vendar pri njih navadno ne povzročajo bolezenskih znakov. Za okužbo ljudi je potrebno zaužitje s kampilobaktri okuženega piščančjega mesa, kontakt z živino, zaužitev okužene govedine ali pitje okuženega surovega mleka. Ravno tako, a pri manjšem številu primerov, so vir okužbe lahko divje ptice, domače živali, kontaminirana voda in stik z ovcami. Po stiku z gostiteljem *C. jejuni* kolonizira spodnji del intestinalnega trakta in je v večini primerov asimptomatski. Pri simptomatskih primerih se kampilobakterioza pokaže z vročino, bruhanjem, glavobolom, 3-7 dnevno krvavo-vodeno drisko in bolečinami v želodcu (Dasti in sod., 2009).

Lokalni zapleti okužbe s *C. jejuni* so rezultat neposrednega širjenja iz gastrointestinalnega trakta, pri čemer lahko pride do kolitisa, pankreatitisa, peritonitisa in gastrointestinalne krvavitve. Zunajčrevesni zapleti so zelo redki. Lahko vključujejo meningitis, endokarditis, osteomielitis in septični artritis. Bakteriemiya je zaznana pri < 1 % pacientov z enteritisom. Ta se pojavi pri imunsko oslabljenih in starejših ljudeh (Acheson in sod., 2001).

Najpomembnejši postinfekcijski zaplet je sindrom Guillain-Barré (GBS). GBS je akutna bolezen perifernega živčnega sistema, kjer pride do poškodb mielinske ovojnice. Tveganje za GBS je večje pri infekcijah z določenim serotipom (Acheson in sod., 2001).

#### 2.2.1.2 Zdravljenje kampilobakterioz in odpornost *Campylobacter jejuni* na protimikrobne snovi

Osnova za zdravljenje enteritisa je hidracija in vzdrževanje elektrolitskega ravnovesja. Večina okuženih ne potrebuje antibiotičnega zdravljenja. Antibiotik se uporabi, če ima bolnik visoko telesno temperaturo, krvav iztrebek, simptome, ki potekajo dlje od enega tedna. Antibiotično zdravljenje je potrebno tudi, če gre za nosečnico, bolnika s HIV-om ali

drugimi stanji imunske oslabiljenosti. Skrajšanje bolezni ob antibiotičnem zdravljenju ni prepričljivo (Čižman in Beović, 2013).

Za zdravljenje okužb z bakterijo *C. jejuni* se kot antibiotik prve izbire uporablja azitromicin, kot alternativa pa eritromicin (Čižman in Beović, 2013).

Pojavnost odpornosti proti fluorokinolonskim antibiotikom je zelo visoka zaradi uporabe antibiotikov iz te skupine v veterini in posledične navzkrižne odpornosti (Smole in sod., 2011). V Sloveniji se pojavlja visoka odpornost *C. jejuni* na ciprofloksacin (IVZ, 2011). S točkovnimi mutacijami v specifičnih tarčnih genih pride do odpornosti proti specifičnim antibiotikom. K odpornosti poleg mutacij prispevajo tudi izlivne črpalke, ki aktivno izčrpavajo protimikrobne snovi in preprečujejo znotrajcelično kopičenje, potrebno za njihovo učinkovito delovanje. Pri bakteriji *C. jejuni* so dokazali vpliv izlivnih črpalk CmeABC in CmeDEF. Ti dve črpalki spadata v skupino RND črpalk (ang. *resistant, nodulation, division*). Izlivne črpalke so nespecifične, saj izločajo veliko število snovi. Izlivna črpalka CmeABC pri *C. jejuni* zagotavlja odpornost proti številnim antibiotikom, vključno z eritromicinom in ciprofloksacinom (Smole Možina in sod., 2011; Kurinčič in sod., 2012).

## 2.2.2 *Staphylococcus aureus*

### 2.2.2.1 Značilnosti, epidemiologija in patogeneza bakterije *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je klasična, po Gramu pozitivna patogena bakterija okrogle oblike. Je edini predstavnik koagulazno pozitivnih stafilokokov. Na krvnem agarju večinoma raste v obliki gladkih zlatorumenih kolonij, velikih do 2 mm, obdanih z ozkim pasom popolne hemolize. *S. aureus* je eden najpogostejših mikroorganizmov, ki človeka naseljuje in/ali mu povzroča okužbe. Približno 30 % zdravih ljudi nosi ta mikrob kot del normalne bakterijske flore, največkrat v nosni in žrelni sluznici ter v vlažnih in poraščenih delih kože (pazduhe, dimlje, perianalni predeli). Redko ga najdemo tudi v sečnem mehurju, danki ali vagini. Prehodno naseljuje tudi roke. Predhodna kolonizacija je pogoj za kasnejšo okužbo. *S. aureus* povzroča keratitis, gnojne okužbe ran, pljuč, kože in mehkih tkiv ter umetnih materialov (žilni katetri, srčne zaklopke in ortopedske proteze). Če preide v kri, lahko povzroči bakteriemijo in sepsa. Slednja ima visoko smrtnost in pogosto povzroča zaplete, kot so infekcijski endokarditis, septični artritis, osteomielitis, abscesi jeter, pljuč in možganov. Osebe, kolonizirane s *S. aureus*, lahko predstavljajo vir okužbe za bolnike na bolniških oddelkih, predvsem na oddelkih intenzivne nege. Možne so tudi zastrupitve s hrano, kontaminirano s sevi *S. aureus*, ki proizvajajo enterotoksine (Kocjan in sod., 2004).

Za učinkovito okužbo človeškega organizma je *S. aureus* razvil številne sposobnosti prilagoditve. Površinski polisaharidi ga s svojio protifagocitno aktivnostjo ščitijo pred makrofagi, medtem ko beljakovinski receptorji omogočajo učinkovito pritrditev na različne strukture. *S. aureus* izloča tudi glikokaliks, s katerim obda skupke bakterij in s tem učvrsti njihovo pritrditev. Številni encimi (koagulaza, lipaza, nukleaza, fibrinolizin, hialuronidaza)

omogočajo lažje prodiranje bakterije *S. aureus* v zdrava tkiva in hitrejše širjenje okužbe (Kocjan in sod., 2004).

#### 2.2.2.2 Zdravljenje in odpornost na protimikrobne snovi

Sistemske stafilokokne okužbe se zdravijo z ustreznimi antibiotiki, pri lokaliziranih gnojnih okužbah pa je pomembna tudi lokalna kirurška oskrba (Kocjan in sod., 2004).

Stafilokoki so bili prvotno občutljivi za benzilpenicilin, danes pa 90 % sevov *S. aureus* izdeluje beta laktamaze in je tako odpornih proti benzilpenicilinu in penicilinom s širokim spektrom delovanja. Proti stafilokokom, ki izdelujejo betalaktamaze delujejo cefalosporini in penicilini s širokim spektrom delovanja v kombinaciji z zaviralci laktamaz beta, kot sta klavulanska kislina in sulbaktam (Kocjan in sod., 2004).

#### 2.2.2.3 Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Zaradi izjemne učinkovitosti pri zdravljenju stafilokoknih okužb so meticilin pričeli množično uporabljati že kmalu po njegovem odkritju. Dve leti po njegovi uvedbi v klinično prakso so že poročali o prvih izolatih *S. aureus*, odpornih proti meticilinu (angl. Methicillin resistant *S. aureus*, MRSA). Po letu 1961 je MRSA postal najbolj pogost povzročitelj bolnišničnih okužb in epidemij po svetu. *S. aureus*, ki je odporen proti meticilinu, je odporen tudi proti vsem drugim betalaktamskim antibiotikom (vsem protistafilokoknim penicilinom, kombinaciji amoksicilina s klavulansko kislino in amplicilina s sulbaktamom, cefalosporinom, monobaktamom in karbapenemom). Odpornost MRSA proti vsem betalaktamom onemogoča učinkovito zdravljenje okužb s temi antibiotiki in zožuje izbor učinkovitih protimikrobnih sredstev (Kocjan in sod., 2004).

Vzrok za odpornost številnih izolatov *S. aureus* proti omenjeni skupini antibiotikov je prisotnost novega tipa penicilin vezujoče beljakovine, PBP2a (angl. *penicilin binding protein*). Beljakovino PBP2a kodira gen *mecA*, ki je prisoten na kromosomu številnih proti meticilinu odpornih sevov stafilokoknih vrst. PBP2a je po svoji funkciji transpeptidaza, ki katalizira nastanek prečnih povezav v peptidoglikanskem delu celične stene MRSA. Za razliko od ostalih PBP-jev (*S. aureus* ima 4 skupine PBP), ima PBP2a nizko afiniteto vezave za betalaktame in je sposobna učinkovite sinteze celične stene tudi takrat, ko so vsi ostali PBP zavrti (Kocjan in sod., 2004).

Pri zdravljenju okužb s sevi MRSA se uporabljajo vankomicin, linezolid in nekateri drugi antibiotiki (teikoplanin tigeciklin, ceftaroli). Ob odkritju bolnikov s sevi MRSA je potrebno pravilno zdravljenje z ustreznimi antibiotiki in preprečevanje širjenja bakterije (Čižman in Beović, 2013).



### 2.2.3 *Helicobacter pylori*

#### 2.2.3.1 Značilnosti, epidemiologija in patogeneza bakterije *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* je po Gramu negativna bakterija in meri 2-4  $\mu\text{m}$  v dolžino in 0,5-1  $\mu\text{m}$  v širino. Je mikroaerofilna in za optimalno rast potrebuje 2-5 %  $\text{O}_2$ , 5-10 %  $\text{CO}_2$ , vlažnost in temperaturo med 34 °C in 40 °C. Pred oksidativnim stresom, ki ga ustvari aktivni imunski odgovor, se brani s superoksid dizmutazo, katalazo in reduktazo. Običajno je spiralne oblike, vendar se pojavlja tudi v paličasti obliki. Ob večdnevni *in vitro* inkubaciji in po zdravljenju z antibiotiki lahko preide v manj aktivno kokoidno obliko. *H. pylori* vsebuje 2 do 6 unipolarnih flagelov, ki mu služijo za hitre premike v viskoznih raztopinah, kot je tudi plast mukusa, ki prekriva epitelne celice želodca. Za razliko od ostalih patogenov je *H. pylori* genetsko heterogen in se s tem lažje prilagodi na pogoje v želodcu in na različni imunski odziv gostitelja (Kusters in sod., 2006).

Čeprav okužbe s *H. pylori* skoraj vedno vodijo do kroničnega gastritisa, večina bolnikov ne razvije drugih zapletov in nimajo kliničnih pokazateljev okužbe. To je bilo vodilo do ideje, da so nekateri sevi bolj virulentni od drugih (Kusters in sod., 2006).

Okužba s *H. pylori* ima različne posledice, ki so odvisne od virulentnih dejavnikov, imunskega odziva gostitelja na okužbo in vplivov okolja (na primer kajenje). Pri 20 % okuženih se pojavijo zapleti, kot so vnetje želodčne sluznice, razjeda dvanajstnika in rak želodca. Gastritis ali vnetje želodčne sluznice zaradi *H. pylori* se ponavadi kaže kot topa stalna bolečina v trebuhu, napihnjenost, občutek polnosti, pekoč občutek v žlički, spahovanje, izguba apetita. Gastritis je lahko akutni ali kronični. Krvavitev iz erozij lahko povzroči slabokrvnost, sledovi krvi pa so prisotni tudi v izbruhanini. Posledica kroničnega vnetja želodčne ali dvanajstnikove sluznice zaradi *H. pylori* je peptična razjeda. Vnetje se pojavi, ko se poruši ravnovesje med dejavniki, ki lahko poškodujejo sluznico in dejavnike zaščite (Vakil in sod., 2007).

#### 2.2.3.2 Zdravljenje okužb in odpornost *Helicobacter pylori* na protimikrobne snovi

Osnova zdravljenja je kombinacija zaviralcev protonske črpalke s klaritromicinom in z amoksicilinom ali metronidazolom v primeru preobčutljivosti na peniciline. Kot alternative so predlagane trojne terapije z uporabo drugih antibiotikov kot so levofloksacin, rifabutin in furazonidol ter terapija z dodatkom bizmuta (Vakil in sod., 2007).

V zadnjih dvajsetih letih se je zmanjšala pojavnost peptičnega ulkusa in okužb s *H. pylori* zaradi uspešnega zdravljenja. A uspeh je sedaj ogrožen zaradi vse večje odpornosti bakterije na antibiotike. Potreben je nadzor nad odpornostjo, zato so potrebne raziskave in vodenje evidence. Megraud in sod. (2012) so izvedli veliko študijo, ki je vključevala 18 Evropskih držav in s katero so preverjali pojav odpornosti *H. pylori* na različne antibiotike. V študijo je bilo vključenih 2205 pacientov. Ugotovili so, da je pojavnost odpornosti na klaritromicin v zadnjih letih narastla iz 9,8 % na 17,5 % in ravno tako je hitro naraščanje odpornosti bakterije na levofloksacin. Predlagano je, da se opusti zdravljenje s klaritromicinom ali testira antibiotik za odpornost pred uporabo, kjer je prevalenca

odpornosti večja od 15-20 %. Kot nadomestilo za klaritromicin so predlagali uporabo levofloksacina, a je tudi ta vedno manj učinkovit zaradi odpornosti *H. pylori*. Pojavnost odpornosti na levofloksacin je bila 14,1 %. Ravno tako je narastla odpornost na kinolone in bo kmalu narastla na nivo odpornosti na klaritromicina. Odpornost na metronidzol ostaja na istem nivoju (34,9 %) kot deset let nazaj. Za razliko od odpornosti na klaritromicin in levofloksacin obvladamo odpornost na metronidazol s podaljšanjem zdravljenja (Megraud in sod. 2013).

## **2.2.4 *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium***

### 2.2.4.1 Značilnosti, epidemiologija in patogeneza enterokokov

Enterokoki so komezali gastrointestinalnega trakta, ženskih genitalij pri ljudeh in tudi pri nekaterih sesalcih in pticah. Nekateri sevi enterokokov se uporabljajo kot probiotiki. Pri večini pogojev enterokoki ne povzročajo škode gostitelju, lahko pa pride do porušanja odnosa med komezalom in gostiteljem in s tem do hudega poteka bolezni (Koch in sod., 2004).

Mehanizmi, preko katerih enterokoki postanejo nevarni patogeni, še niso raziskani. Obstaja hipoteza, da so enterokoki pridržani z mehanizmi gostitelja v intestinalnem traktu, vendar se v določeni točki razvije lastnost, s katero lahko zasedejo novo nišo ali pa izkoristijo priložnost oslabljenega imunskega sistema. To neravnovesje lahko vodi do prehoda mikroorganizma v krvni obtok in systemskega širjenja. Dodatni viri okužb so tudi intravenozni, urinarni katetri ter kirurške rane (Koch in sod., 2004). Veliko število virulentnih dejavnikov je bilo opisanih, a njihova povezava z razvojem bolezni ni vedno očitna.

### 2.2.4.2 Zdravljenje okužb, povzročenih z enterokoki in njihova odpornost na protimikrobne snovi

Nezapletene okužbe z *E. faecalis* zdravimo z amoksicilinom, hude okužbe pa ampicilinom in gentamicinom. Okužbe z *E. faecium* zdravimo s kombinacijo vankomicina in gentamicina. V primeru na vankomicin odpornih enterokokov (VRE) kot antibiotik prve izbire uporabljamo linezolid (Čižman in Beović, 2013).

Zaradi vedno težjega zdravljenja enterokokalnih okužb je potrebno razumevanje delovanja virulentnih dejavnikov, ki so lahko tarče zdravil. Velik problem predstavlja hitro širjenje odpornosti proti vankomicinu in drugim antibiotikom ter njihova zmožnost podajanja teh lastnosti drugim patogenom npr. *S. aureus*. S pomočjo konjugacije si izmenjavajo patogeni plazmide in transpozone in s tem lahko pridobivajo nove lastnosti (Koch in sod., 2004).

Problem zdravljenja okužb z enterokoki je njihova naravna odpornost proti številnim antibiotikom. Naravno so odporni proti cefalosporinom, stafilokoknim penicilinom, trimetoprimu in nizkim koncentracijam klindamicina ter aminoglikozidov. Poleg prirojene odpornosti se lahko razvije tudi pridobljena odpornost. Pri obeh vrstah sta za naraščajočo

odpornost proti glikopeptidom odgovorni dve skupini genov, ki ju imenujemo *vanA* in *vanB*. Skupina genov *vanA* nosi zapis za visoko stopnjo odpornosti proti vankomicinu in odpornost proti teikoplaninu. Zapis *vanB* je manj neugoden, odpornost proti vankomicinu je običajno zmerna do visoka, sevi pa so občutljivi proti teikoplaninu. Zapis *vanA* najdemo najpogosteje pri sevih vrste *E. faecium*, *vanB* pa tudi pri vrsti *E. faecalis*. Oba zapisa se nahajata na mobilnem genetskem elementu, t. i. transpozonu na konjugativnem plazmidu, zato se lahko preneseta na seve znotraj rodu enterokokov, lahko pa tudi na druge po Gramu pozitivne koke, npr. *S. aureus* (Ribič in sod., 2007).

## 2.2.5 Delovanje rastlinskih pripravkov na mikroorganizme

Tematika delovanja rastlinskih pripravkov na mikroorganizme je zanimiva na področju zdravstva in živilstva. V zdravstvu se soočajo s problemom naraščajoče odpornosti na antibiotike, poleg tega pa imajo lahko obstoječi antibiotiki škodljive učinke na gostitelja, kot so imunosupresija, hiperobčutljivost in alergijske reakcije (Thi Dung in sod., 2008). V živilstvu pa bi z rastlinskimi pripravki nadomestili kemične konzervanse (Negi, 2012).

Protimikrobna učinkovitost ter spekter delovanja rastlinskih izvlečkov so odvisni od vrste, strukture prisotnih spojin ter njihovega deleža v rastlinah. Če je prisotno več aktivnih komponent, je potrebno upoštevati tudi morebitno sinergistično delovanje (Klančnik in sod., 2009). Na Madagaskarju so v dveh različnih pokrajinah pregledovali protimikrobno učinkovitost eteričnih olj iste rastline (*Cinnamosma fragraus*) na bakterijah *S. aureus*. MIK vrednosti sta se glede na pokrajino razlikovali, in sicer so eterična olja rastline iz pokrajine Tsaramandroso imele nižjo vrednost MIK (180 µg/ml) od olja rastline iz pokrajine Mariano (Randrianarivelo in sod., 2009). Glede na dobljene rezultate te študije vidimo, da rastišče vpliva na rastlino in njene kemijske lastnosti. Al Hashmi in sod. (2013) so z različnimi topili ekstrahirali rastlinske izvlečke in ugotovili, da se posamezne spojine izločene iz rastlinskega materiala razlikujejo glede na topilo. V polarnem topilu, kot je voda, se iz rastline izločijo bolj polarne snovi, v manj polarnem topilu se izloči več nepolarnih snovi. Primerjava učinkovitosti metanolnega izvlečka z vodnim je pokazala večjo protimikrobno učinkovitost metanolnega izvlečka (Bussman in sod., 2010).

Pri pripravi rastlinskih pripravkov lahko uporabimo različna topila, kot so voda, etanol, metanol, kloroform, eter, ki ekstrahirajo različne kemične spojine (Piskernik in sod., 2011). Castillo-Juarez in sod. (2009) so v študiji ugotavljanja protimikrobne učinkovitosti 53. rastlinskih izvlečkov iz mehiških rastlin na *H. pylori* uporabili vodne in metanolne izvlečke. Njihove MIK vrednosti so se razlikovale glede na topilo uporabljeno za pripravo izvlečka. Metanolni izvlečki so bili učinkovitejši od vodnih, saj je metanol bolj nepolarno topilo s katerim se ekstrahira več nepolarnih fenolnih spojin.

Število študij o protimikrobni učinkovitosti rastlin narašča. Različni rastlinski pripravki, so bili testirani na *C. jejuni* (Baydar in sod., 2004; Lee in sod., 2004; Aslim in Yucel, 2008; Klančnik in sod., 2010). Klančnik in sod. (2010) so preverjali različne izvlečke rožmarina, grozdja, olivnih listov, zelenega čaja in žajblja ter gledali njihovo protimikrobno aktivnost. Izvlečki *A. katsumadai* izkazujejo dobro protimikrobno in modulatorno učinkovitost na bakterijah *Campylobacter* (Klančnik in sod., 2012). Narejene so številne študije

protimikrobne učinkovitosti rastlinskih pripravkov na *S. aureus* (Moussa in sod., 2012; Sakunpak in Panchayupakaranant, 2012; Thi Dung in sod., 2008; Longaray Delamare in sod., 2007; Bouaziz in sod., 2009; Nikolić in sod., 2014) in *H. pylori* (Stege in sod., 2006; Chinniah in sod., 2009). Konec 19. stoletja je bilo s *H. pylori* okuženega večina prebivalstva. Zaradi izboljšanja higiensko-socialnih razmer, razširjene uporabe hladilnika in odkritja uspešnega zdravljenja okužbe s *H. pylori* se je njena razširjenost zmanjšala. Danes je okužba v razvitih delih sveta manj pogosta, drugod po svetu je okuženih do 80 % ljudi, tako da je še vedno okužena kar polovica svetovne populacije. V nerazvitih državah je incidenca okužb s *H. pylori* največja. V teh državah si ljudje težko privoščijo antibiotike in namesto teh uporabijo razne rastlinske pripravke (Martini in sod., 2009).

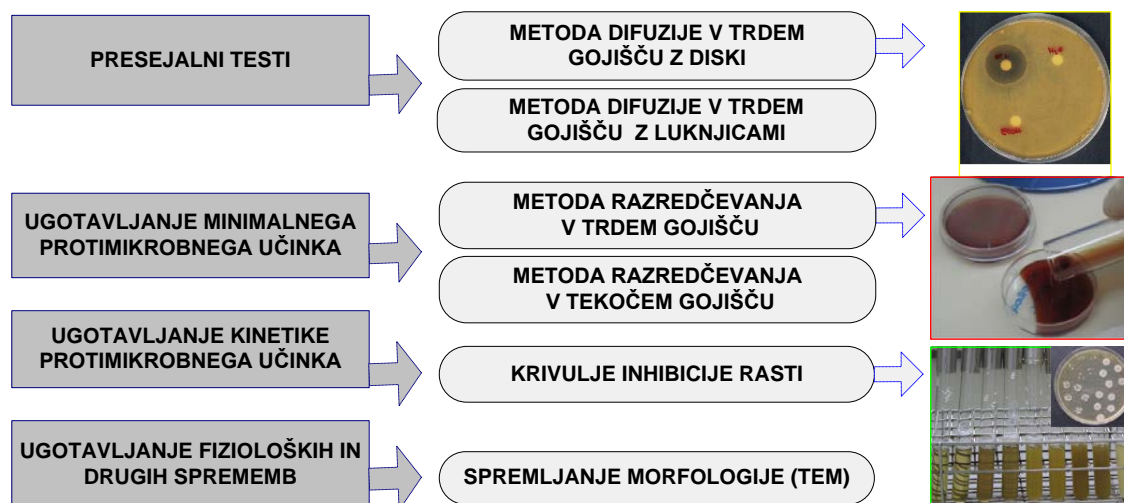
V primerjavi z ostalimi bakterijskimi vrstami, ki smo jih uporabili v nalogi, je na enterokokih testiranih veliko manj rastlinskih pripravkov. Skupaj z *S. aureus* sta *E. faecalis* in *E. faecium* vodilna med povročitelji bolnišničnih okužb in tudi pri njiju narašča odpornost na antibiotike. Zato je poraslo zanimanje za testiranje teh dveh mikroorganizmov na rastlinske pripravke (Sakagamia in sod., 2005; Zampini in sod., 2009; Madureira in sod., 2012; Gutierrez in Fernandez, 2013).

### 2.3 DOLOČANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI RASTLINSKIH PRIPRAVKOV

Protimikrobna učinkovitost ter spekter protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov sta odvisna od vrste in strukture prisotnih spojin in njihovih deležev ter morebitnega sinergističnega delovanja, če je prisotnih več aktivnih komponent. Na to sestavo in s tem učinkovitost vplivajo številni dejavniki – biološki, kot so zrelost, sorta, rastni pogoji in geografsko poreklo rastlin, kot vsi nadaljnji postopki priprave vzorcev, od ekstrakcijskih metod, vrste topil, načina koncentriranja in doseženih koncentracij do končnega načina uporabe. Na dobljene rezultate lahko močno vpliva tudi izbira mikrobiološke metode testiranja protimikrobne učinkovitosti (Klančnik in sod., 2009).

Metode za *in vitro* testiranje protimikrobne aktivnosti lahko razdelimo na difuzijske metode, metode razredčevanja in bioavtografične metode. Za določanje protimikrobne učinkovitosti ni standardnega testa. Osnova je metoda Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI) za testiranje antibiotikov, preoblikovana za testiranje rastlinskih pripravkov. Presejalni test, s katerimi lahko predhodno testiramo protimikrobno učinkovitost pripravka, je difuzijska metoda z diski. Poleg te lahko, kadar testiramo večje število pripravkov in večje število bakterijskih sevov, uporabimo presejalno metodo, ko v sam agar naredimo luknjice in dodamo preiskovalno snov. Za kvantitativno določanje pa so na voljo metode razrečevanja v tekočem in trdem gojišču (slika 3). Največkrat navedena metoda preiskovanja rastlinskih pripravkov in njihove protimikrobne aktivnosti je metoda določanja MIK rastlinskih pripravkov. To je pomembno tudi s stališča primerjave rezultatov z že znanimi. Poleg presejalnih testov pa poznamo še teste za ugotavljanje kinetike protimikrobnega delovanja in nastalih fizioloških sprememb. S krivuljo inhibicije rasti lahko določimo hitrost in trajanje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih pripravkov.

Za ugotavljanje fizioloških in drugih sprememb pa je potrebna elektronska mikroskopija (Burt, 2004).



Slika 3. Metode določanja protimikrobnega delovanja (Klančnik in sod., 2009).

### 2.3.1 Difuzijske metode

Bakterijsko občutljivost za protimikrobne snovi lahko preverimo z difuzijskimi metodami. Metoda difuzije v trdem gojišču z diski ali z luknjicami se uporablja za določanje in kategorizacijo občutljivosti posameznih mikroorganizmov. Za izvedbo lahko uporabljamo komercialno pripravljene papirnate diske, ki jih prepojimo z določeno količino protimikrobne snovi in jih položimo na površino trdih gojišč, inokuliranih s preiskovano kulturo. Namesto diskov lahko v gojišče z inokulirano preiskovano kulturo naredimo luknjice in vanje damo določeno količino protimikrobne snovi. Protimikrobna snov nato v času inkubacije prehaja iz diska v trdo gojišče. Na površinah, kjer je protimikrobno sredstvo, nastanejo inhibicijske cone, kar pomeni, da ni mikrobne rasti. Prednosti metode sta tehnična enostavnost in ponovljivost. Je cenovno ugodna in ne zahteva nobene posebne opreme, poleg tega omogoča določanje kvalitativnih rezultatov (Klančnik in sod., 2010).

### 2.3.2 Metode razredčevanja v tekočem ali trdem gojišču

Metode razredčevanja v tekočem ali trdem gojišču se uporabljajo za kvantitativno določanje protimikrobnega delovanja. Protimikrobni učinek določamo z metodami v tekočih gojiščih (klasična metoda razredčevanja v tekočem gojišču ali izvedba v mikrotitrski ploščici, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v tekočem gojišču) ali v trdih gojiščih (metoda razredčevanja v trdem gojišču, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v trdem gojišču). Metoda razredčevanja v trdem gojišču je dobro standardizirana, zanesljiva tehnika za testiranje občutljivosti, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih sistemov. Prav tako je možno hkratno testiranje posameznih

izolatov. V primerjavi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču je detekcija kontaminacije hitrejša. Največja slabost metode razredčevanja v trdem gojišču je velika poraba materiala in časa za pripravo trdih gojišč, še posebej pri velikem številu različnih protimikrobnih sredstev (Klančnik in sod., 2010).

Klančnik in sod. (2010) so primerjali uporabo različnih metod, kot so metoda razredčevanja v trdem gojišču, metoda difuzije z diski in metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici. Ugotovili so, da je metoda razredčevanja v trdem gojišču bolj občutljiva kot metoda difuzije z diski, z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici pa so bile vrednosti MIK, ki so jih dobili s to metodo enake ali pa manjše kot vrednosti, ki so jih dobili z metodo razredčevanja v trdem gojišču. Naš cilj v nalogi je določiti vrednosti MIK številnim različnim rastlinskim pripravkom, zato smo v nalogi uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči, saj je to kvantitativna metoda s katero dobimo MIK vrednosti in lahko testiramo več rastlinskih pripravkov hkrati.

Pri metodah razredčevanja v tekočem gojišču obstaja več tehnik za določanje MIK, kot so merjenje optične gostote in obarvanje z barvnimi indikatorji (Burt, 2004).

### **2.3.3 Metode zaznavanja živosti bakterij**

Za ovrednotenje bakteriostatičnega in bakteriocidnega učinkovanja je potrebno uporabiti ustrezno metodo. Mikrobnost ali inhibicijo se lahko določi na več načinov, kot so direktno štetje celic pod mikroskopom, merjenje motnosti, štetje kolonij ter z merjenjem bioluminiscence in fluoroluminiscence (Grare in sod., 2008).

#### **2.3.3.1 Tetrazolijeve soli**

V mikrotitrski ploščici se za dokazovanje bakterijske rasti v gojišču lahko uporabljajo tetrazolijeve soli, med njimi tudi TTC (2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid), INT (*p*-jodonitrotetrazolijev klorid) in MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid). Tetrazolijeve soli so indikator biološke aktivnosti, saj brezbarvna spojina deluje kot akceptor elektronov in se reducira v barvni produkt biološko aktivnih organizmov. TTC bakterije metabolizirajo v rdeči formazan, MTT pa v vijolični formazan (Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009).

#### **2.3.3.2 Resazurin**

Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi) je modro barvilo in ne fluorescira, če je v oksidiranem stanju. Metabolno aktivni mikroorganizmi ga presnovijo v fluorescenten resorufin rožnate barve, katerega intenziteto lahko kvantificiramo s fluorometrom, vizualno ali s spektrofotometrom (Burt, 2004; McNicholl in sod., 2007).

### 2.3.3.3 ATP- bioluminiscenca

ATP je molekula, prisotna v vseh živih celcah. Encim luciferaza oksidira substrat luciferin s transformacijo energije, ki jo dobi iz ATP, v svetlobo. To se zazna z luminometrom (Berger in sod., 2013).

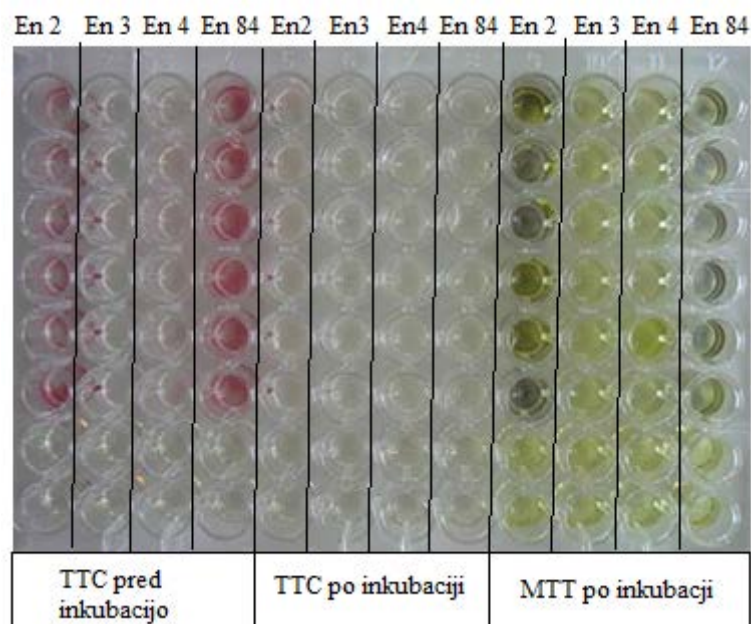
### 2.3.3.4 X-Glu

X-Glu (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-glukopiranozid) je substrat za encim  $\beta$ -glukozidazo. Encim razcepi substrat in sprosti se 5-bromo-4-kloro-3-indoksil, ki se oksidira v netopno obliko modre barve (AppliChem, 2013). Uporablja se za zaznavanje bakterij, ki imajo  $\beta$ -glukozidazo npr. enterokoke (Berger, 2013).

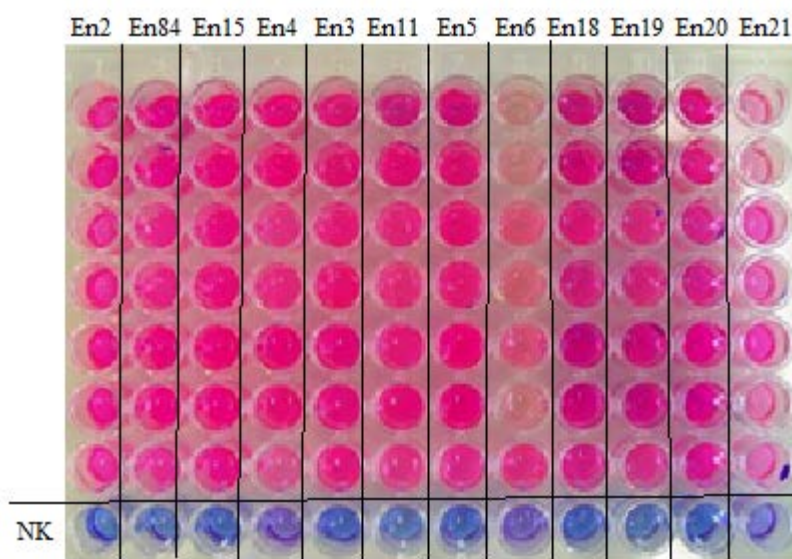
### 2.3.3.5 Primerjava metod za zaznavanje živosti bakterij

Sliki 4 in 5 prikazujeta obarvanost *Enterococcus spp.* z MTT, s TTC, z resazurinom in X-Glu. Številne študije so dokazale, da tetrazolijeve soli niso primerne za zaznavanje živosti vseh mikroorganizmov (Tsukatani in sod., 2008; Grare in sod., 2008; Berger, 2013). Berger (2013) je v svoji študiji dodala tetrazolijevim solem še elektronske mediatorje, kar je izboljšalo njihovo delovanje. Tetrazolijeve soli so ravno tako bolj obarvale mikrotitrsko ploščo, če so bile te dodane pred inkubacijo in tako inkubirane 24 h (slika 4). Za vrednotenje protimikrobne aktivnosti rastlinskih izvlečkov pa je potrebno barvilo dodati po inkubaciji, saj se preverja delovanje rastlinskih pripravkov. Tetrazolijeve soli niso primerne za mikroaerofilne bakterije, saj imajo ti manjšo redukcijsko sposobnost (Klančnik in sod., 2010). Pri uporabi resazurina lahko uporabimo spektrofotometer, saj po presnovi v resorufin, le-ta fluorescira. Z uporabo spektrofotometra omilimo interferenco barvila rastlinskih izvlečkov z resazurinom. Številne študije so dokazale uspešno uporabo resazurina za zaznavanje viabilnih bakterij (slika 5) (Martin in sod., 2003; Yemoa in sod., 2011; Berger, 2013).





Slika 4. Obarvanje različnih sevov enterokokov s TTC in z MTT. Prvi štiri stolpci so obarvani z barvilom TTC pred inkubacijo, drugi štiri stolpci so obarvani z barvilom TTC po inkubaciji. Zadnji vrstici sta negativni kontroli. Luknjice, kjer so bakterije presnovile TTC, so obarvane rožnato, kjer so luknjice kljub dodatku barvila brezbarvne, ni bilo uspešnega obarvanja enterokokov z barvilom TTC. Zadnji štiri stolpci so obarvani z MTT po inkubaciji. Kjer je barvilo delovalo, so luknjice obarvane s črno. En 2, En 84 so (Berger, 2013).

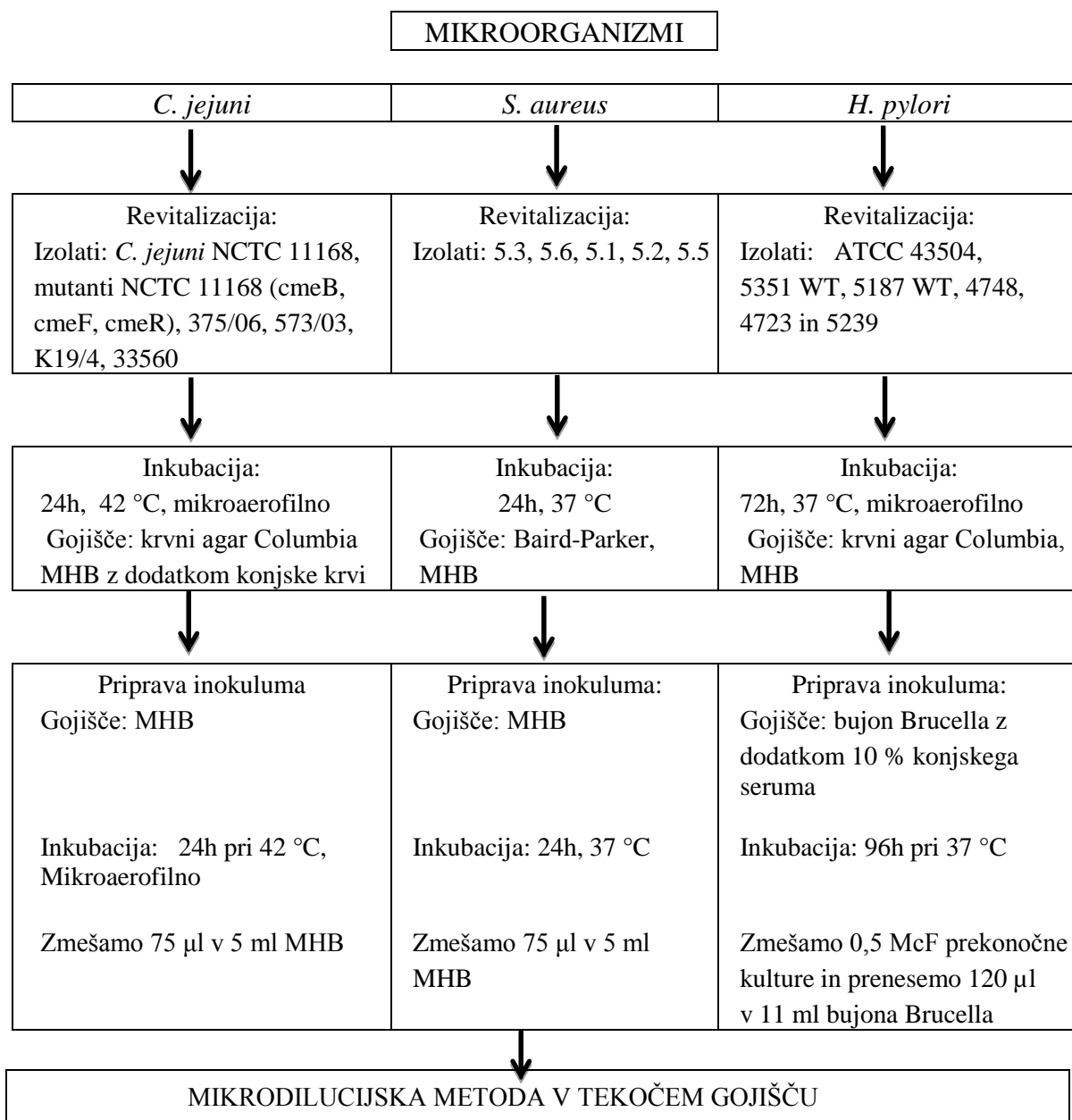


Slika 5. Obarvanje različnih enterokokov z resazurinom. Zadnja vrstica, označena z NK, predstavlja negativno kontrolo. Luknjice, obarvane z roza barvo, predstavljajo uspešno obarvanje z resazurinom, saj so ga bakterije uspešno pretvorile v resorufin. En 2, En 84, En 15 so različni sevi *E. faecalis*, En 4, En 3, En 11 so različni sevi *E. faecium*. Ostali so različni predstavniki enterokokov in sicer En 5 - *E. durans*, En 6 - *E. gallinarum*, En 18 - *E. avium*, En 19 - *E. casseliflavus*, En 20 - *E. hirae* in En 21 - *E. malodoratus* (Berger, 2013).



### 3 MATERIAL IN METODE DELA

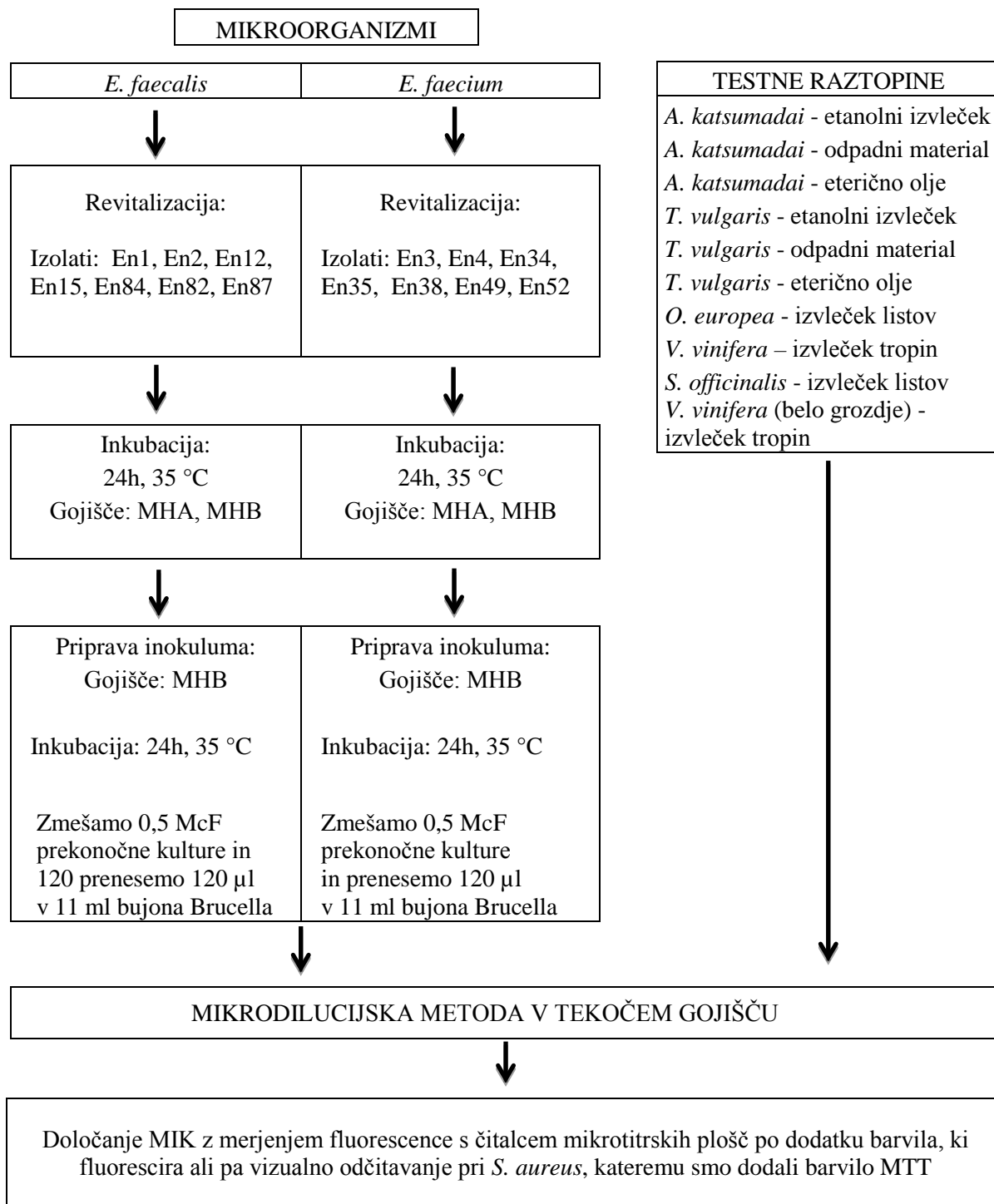
#### 3.1 POTEK DELA



Slika 6. Prikaz revitalizacije, inkubacije in priprave inokuluma za seve bakterij *C. jejuni*, *H. pylori*, *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. faecium*, testnih raztopin izbranih rastlinskih pripravkov ter nadaljnega postopka mikrodilucije v tekočem gojišču.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje slike 6.



Slika 6. Prikaz revitalizacije, inkubacije in priprave inokuluma za seve bakterij *C. jejuni*, *H. pylori*, *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. faecium*, testnih raztopin izbranih rastlinskih pripravkov ter nadaljnega postopka mikrodilucije v tekočem gojišču.

## 3.2 GOJIŠČA

### 3.2.1 Gojišče MHA

38,0 g osnovnega medija agarja Mueller-Hinton (OXOID, CM0337) smo raztopili v 1 l destilirane vode. Suspenzijo smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se niso vse sestavine stopile, in jo avtoklavirali za 15 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo agar ohladili v vodni kopeli na 50 °C in ga nato prelili v petrijevke. Ko se je agar shladil na sobno temperaturo in se strdil, smo petrijevke shranili v hladilnik.

Pri metodi difuzije v trdem gojišču z diski, kjer smo preverjali odpornost *E. faecalis* in *E. faecium* na antibiotike, smo petrijevke postavili na tehtnico in vanjo zlili  $24 \pm 0,2$  g MHA. Pri tem smo morali paziti na sterilnost okolja (CLSI, 2009).

### 3.2.2 Gojišče MHB

10,5 g osnovnega medija Mueller Hinton smo raztopili v 500 ml destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Ohlajenega smo shranili pri 4 °C.

### 3.2.3 Krvni agar Columbia

19,5 g osnovnega medija za Columbia krvni agar (Columbia Agar Base CM331, OXOID) smo raztopili v 500 ml destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C 15 minut. Medij smo ohladili na približno 45 °C in mu dodali 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi. Gojišče smo previdno premešali in ga dali v petrijevke. Ohlajenega smo shranili pri temperaturi 4 °C.

### 3.2.4 Brucella bujon

45 g osnovnega medija Brucella bujona (CM0169, OXOID) smo raztopili v enem litru destilirane vode. Ko se je medij raztopil, smo ga sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C 15 minut. Po sterilizaciji smo počakali, da se je gojišče ohladilo in mu dodali 10 % konjskega seruma.

### 3.3 MATERIAL IN OPREMA

Preglednica 1. Material in oprema, uporabljena pri eksperimentalnem delu naloge.

Material	Proizvajalec	Številka/tip proizvoda
Aerobni inkubator	Binder, Nemčija	
Ampicilin, AMP2	Oxoid, Velika Britanija	CT0002B
Ampicilin	Sigma, ZDA	A 9518
Anaerobni lonci	Oxoid, Velika Britanija	Anaerojar 2,5l
Analitična tehtnica	Sartorius, Nemčija	
Avtoklav	Certoclav, Nemčija	181
Avtoklav	Sutjeska, Srbija	Tip 500x700
Avtoklav	Sutjeska, Srbija	1-61-137
Bunsenov gorilnik	USBECK, Nemčija	tip 1330
Čitalec mikrotitrskih plošč	PerkinElmer, ZDA	EnSpire
Čitalec mikrotitrskih plošč	Tecan, Švica	TECAN Safire 2
Epruvete	Carl Roth, Nemčija	
Eritromicin, E15	Oxoid, Velika Britanija	CT0020B
Eritromicin	Sigma, ZDA	E 6376
Eza	VWR, Velika Britanija	10 µl, sterilna
Fotometer	Thermo Scientific, ZDA	Genesys 10 Bio
Kanamycin	Sigma, ZDA	K 4000
Kiveta	SARSTEDT, Nemčija	Polisterin 10x4x45 mm
Kloramfenikol, C30	Oxoid, Velika Britanija	CT0013B
Kloramfenikol	Sigma, ZDA	C 0378
Laboratorijske steklenice	Duran, Nemčija	
Laminar	Thermo Scientific, ZDA	Msc-Advantage
Merilni valj	ISO LAB, Nemčija	100 ml, 250 ml, 500 ml
Mešalec mikrotitrskih plošč	Eppendorf, Nemčija	Thermomixer comfort
Mikrocentrifugirke	Eppendorf, Nemčija	1,5 ml in 2 ml
Mikrotitrška plošča	Greiner bio-one, Nemčija	Sterilne, 96 luknjic
Mikrovalovna pečica	Sharp, Japonska	
Mikrovalovna pečica	Sanyo, Japonska	Cook n'grill 1300
Multikanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija	10-100µl
Palčke z vatko	L&R, Nemčija	Raucotupf
Petrijevke	SARSTEDT, Nemčija	92 x 16 mm
Pipeta	Eppendorf, Nemčija	20-200 µl
Pipeta	Eppendorf, Nemčija	100-1000 µl
Plinska jeklnka z mikroaerofilno atmosfero	Istragas, Slovenija	
Pokrov za mikrotitrsko ploščo	Greiner bio-one, Nemčija	Sterilna
Reakcijske epruvete	Eppendorf, Nemčija	1.5ml, 2ml
Serološka pipeta	SARSTEDT, Nemčija	1, 2, 5, 10 ml

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 1. Material in oprema, uporabljena pri eksperimentalnem delu naloge.

Material	Proizvajalec	Številka/tip proizvoda
Spatula		Sterilna
Steklene steklenice	SCHOTT, Nemčija	100 ml, 250 ml, 500 ml
Tehtnica	Sartorius, Nemčija	GP 5202
Tehtnica	Sartorius, Nemčija	Sartorius analytic
Tetraciklin, TE30	Oxoid, Velika Britanija	CT0054B
Nastavek za pipete	SARSTEDT, Nemčija	1000 µL, sterilni
Nastavek za pipete	SARSTEDT, Nemčija	200 µL, sterilni
Vankomicin, VA30	Oxoid, Velika Britanija	CT0058B
Vodna kopel	HAAKE, Nemčija	DL 30
Vorteks	VWR, Velika Britanija	VV3
Vrtinčno mešalo	Ika, Belgija	Yellowline
Zmrzovalna omara	Heto, Australia	Ultra Freeze, -80 °C

### 3.4 OŽIVITEV BAKTERIJ IN PRIPRAVA INOKULUMA

#### 3.4.1 Oživitev in priprava inokuluma bakterije *C. jejuni*

V eksperimentih smo uporabili seve *C. jejuni* 11168, cmeB, cmeF, cmeR, 375/06, 573/03, K19/4, 33560, ki so bili predhodno shranjeni v krioeprevetah na -80 °C. Sev 375/06 je odporen na antibiotik eritromicin, sev 573/03 pa na ciprofloksacin. Ostali sevi so občutljivi na eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin (Kurinčič in sod., 2013). Posamezne seve smo s plastično cepilno zanko aseptično nacepili na krvni agar Columbia in inkubirali mikroaerofilno 24h pri 42 °C. Po 24 h so na ploščah zrastle majhne, sivkaste prosojne kolonije, katere smo ponovno precepili in po 24 urah pripravili inokulum tako, da smo prenesli eno cepilno zanko kolonij prekonočne kulture v 4 ml tekočega gojišča Mueller Hinton bujon (MHB) z 0,2 ml konjske krvi in ponovno inkubirali 24 h pri 42 °C, mikroaerofilno. Po končani inkubaciji smo prenesli 75 µl prekonočne kulture v 5 ml MHB, da smo dosegli koncentracijo  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml. Tako pripravljene kulture so uporabne za izvedbo metode mikrodilucije v bujonu.

#### 3.4.2 Oživitev in priprava inokuluma bakterije *S. aureus*

Uporabljeni izolati *S. aureus* (5.3, 5.6, 5.1, 5.2, 5.5) so bili predhodno shranjeni pri -20 °C. Seva 5.1 in 5.2 sta na meticilin odporna seva. Seve smo aseptično nacepili na selektivno gojišče Baird-Parker. Po 24 h inkubacije pri 37 °C smo 1 cepilno zanko kolonij kolonij z značilno črno barvo precepili v 4 ml tekočega gojišča MHB. Po 24 urah smo pripravili kulturo v koncentraciji  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml, tako da smo v 5 ml MHB prenesli 75 µl 100-krat redčene prekonočne kulture.

### 3.4.3 Oživitev in priprava inokuluma bakterije *H. pylori*

Uporabili smo seve *H. pylori* ATCC 43504, 5351 WT, 5187 WT, 4748, 4723 in 5239, ki so bili predhodno shranjeni v krioepruveh na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sev 4748 je odporen na klaritromicin, sev 4723 na netromicin, sev 5239 pa na amoksicilin, klaritromicin in netromicin. Seve smo aseptično nacepili na krvni agar in inkubirali 3 dni v mikroaerofilnih pogojih na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po treh dneh smo iz plošč s sterilnim brisom prenesli kulturo v epruveto z MHB ter s turbidimetrom izmerili optično gostoto. Ko je bila gostota enaka 0,5 McF, smo 120  $\mu\text{l}$  prenesli v 11 ml tekočega gojišča Brucella z dodatkom 10 % konjskega seruma.

### 3.4.4 Oživitev in priprava inokuluma bakterije *E. faecalis* in *E. faecium*

Vsi testirani sevi enterokokov so bili zamrznjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v zbirki Inštituta za živilstvo, v laboratoriju za mikrobiologijo in higieno prehrane, Univerze na Dunaju, Avstrija (BOKU). Zmrznjene seve smo s sterilno cepilno zanko aseptično nanegli na Mueller Hinton agar (MHA) in jih inkubirali na  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  preko noči. Naslednji dan smo pripravili inokulum tako, da smo s sterilnim brisom prenesli kolonije v pripravljen MHB in nato omejili gostoto bakterij na 0.5 McFarland (CLSI, 2000). Motnost suspenzije je bila izmerjena s spektrofotometrom. McFarland standard 0.5 ustreza absorbanci 0.08-0.1 pri 625 nm, kar pomeni približno 1 do  $2 \cdot 10^8$  CFU/ml za sev *Escherichia coli* ATCC 25922 (CLSI, 2000). Ko je bila gostota enaka 0,5 McF, smo 120  $\mu\text{l}$  prenesli v 11 ml tekočega gojišča MHB.

Preglednica 2. Absorbanca, valovna dolžina in število bakterij/ml različnih standardov (Berger, 2013).

McFarland Standard	Absorbanca	Valovna dolžina [nm]	Število bakterij /ml
0,5	0,08 – 0,1	625	$1.5 \cdot 10^8$ CFU/ml
1	0,16 – 0,2	625	$3 \cdot 10^8$ CFU/ml
2	0,32 – 0,4	625	$6 \cdot 10^8$ CFU/ml

## 3.5 PRIPRAVA RASTLINSKIH PRIPRAVKOV

Priprava rastlinskih izvlečkov ni bil predmet te naloge. *A. katsumadai* smo dobili pri podjetju Plantasia (Oberndorf, Austria, cat. no. 680381), izvlečke in eterično olje pa so pripravili na Inštitutu za farmacevtske znanosti Univerze v Gradcu. Timijan je bil nabran na področju Gorskega kotarja (Hrvaška), oljčni listi na slovenskem Primorju, žajbelj na otoku Murter (Hrvaška), grozdne tropine pa smo pridobili iz Vipavske doline. Rastlinske izvlečke timijana in oljke so pripravili na Medicinski fakulteti v Novem Sadu. Žajbelj so predelali v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Izvlečke grozdnih tropin so pripravili v Centru za raziskovanje vina, Univerze v Novi Gorici.

Največkrat se frakcije pripravi z uporabo organskih topil, kot so etil-acetat, 97 % metanol in 70 % etanol. Izvlečki, ki so bili uporabljeni v nalogi, so bili etanolni izvlečki, odpadni materiali ter eterična olja. Pri *A. katsumadai* je bil izvleček pripravljen s 96 % etanolom,

olje je bilo hidrodestilirano neposredno iz semen, odpadni material pa je liofiliziran ostanek etanolnega izvlečka po tem, ko je bilo iz le-tega hidrodestilirano eterično olje (Klančnik in sod., 2012).

Izvleček timijana je bil pripravljen s 45 % etanolom, odpadni material timijana s hidrodestilacijo eteričnega olja iz suhega timijana, preostanek materiala pa posušen in ekstrahiran s 45 % etanolom. Listi oljke so bili pripravljeni v 70 % etanolu, katerega so po vorteksiranju sfiltrirali ter filtratu dodali heksan za odstranitev lipofilnih komponent (Kovač, neobjavljeni podatki).

Pri pridobivanju ekstrakta grozdja je najprej potekala 10 dnevna maceracija modrega pinota. Zatem so grozdje sprešali in ostanke, ki so koža grozdja in semena, zmrznili čez noč na -20 °C in jih liofilizirali na -45 °C z uporabo tlaka 0,2 mBar v liofilizatorju. Ekstrakcija je potekala z uporabo etanola v razmerju etanol : voda 1: 1 (Trošt in sod., 2013).

### 3.5.1 Priprava začetnih koncentracij rastlinskih pripravkov

Vzorci rastlinskih pripravkov večinoma niso vodotopni, zato smo jih raztopili v dimetilsulfoksidu (DMSO) in nato razredčili do ustrezne začetne koncentracije v MHB po spodaj opisanem postopku.

Za izračun potrebne mase rastlinskega pripravka smo uporabili formuli 1 in 2, kjer je c začetna koncentracija testiranega materiala na mikrotitrski plošči v µg/ml, F faktor redčitve, m masa testiranega materiala v mg in V (DMSO) volumen DMSO, v katerem je potrebno raztopiti zatehtano maso testiranega materiala.

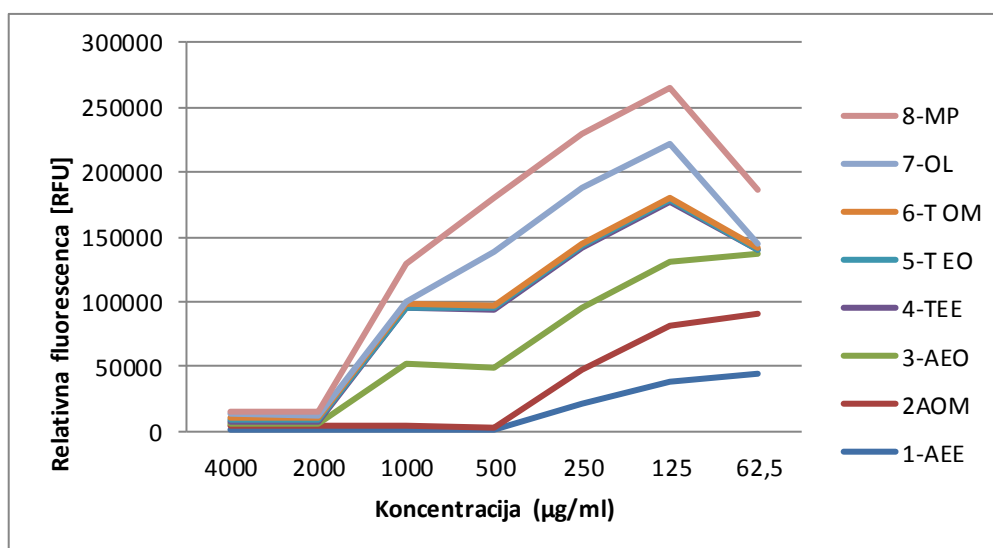
$$(c*4*1)/100=F \quad \dots(1)$$

$$V \text{ (DMSO)}=m/F \quad \dots(2)$$

Pripravljeno raztopino testiranega materiala v DMSO smo nato redčili 1:10 v gojišču MHB (za *Campylobacter*, *Staphylococcus* in *Enterococcus*) oz. Brucella z dodatkom 10 % konjskega seruma (za *Helicobacter*) in po 50 µl raztopine nanegli v prve luknjice na mikrotitrski plošči, v kateri smo predhodno vse luknjice napolnili s po 50 µl gojišča MHB oz. Brucella z dodatkom 10 % konjskega seruma. Iz prve luknjice z dodanim rastlinskim pripravkom smo nato vsebino redčili po stolpcu navzdol s prenašanjem po 50 µl vsebine. 50 µl zadnje redčitve smo zavrgli. V vsak test smo vključili negativno kontrolo (gojišče in rastlinski pripravek, brez kulture), kontrolo rasti (samo gojišče in kultura) ter slepo probo (samo gojišče). Na koncu smo v vsako luknjico, razen negativne kontrole in slepe probe, dodali po 50 µl pripravljene kulture. Mikrotitrške plošče smo inkubirali 24 ur, s kampilobaktri v mikroaerofilni atmosferi na 42 °C, s helikobaktri 72 ur v mikroaerofilni atmosferi na 37 °C, s stafilokoki in entrokoki pa v normalni atmosferi pri 37 oz. 35 °C. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Če se rezultati niso ujemali, smo test ponovili še tretjič in upoštevali višjo vrednost MIK v primeru, ko je bila razlika med meritvami dvokratna. Tolikšna je namreč sama napaka metode.

### 3.5.2 Določitev minimalne inhibitorne koncentracije

Za določitev MIK pri bakterijah *C. jejuni* in *H. pylori* smo po inkubaciji v vsako testno suspenzijo (luknjico) dodali po 10  $\mu$ l reagenta CellTiter-Blue™ (Promega, Velika Britanija). Ta vsebuje barvilo resazurin, ki ga žive, metabolno aktivne, celice spremenijo v produkt resorufin, katerega jakost fluorescence smo merili spektrofotometrično (Tecan, Mannedorf, Zurich, Švica). Po dodatku reagenta smo vsebino ploščic premešali na stresalniku mikrotitrskih plošč (Eppendorf, Nemčija) ter jih dve uri inkubirali v mikroaerofilni atmosferi na 42 °C, v temi. Intenziteto fluorescence smo pomerili na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan. Ekscitacijska valovna dolžina reagenta je 560 nm in emisijska valovna dolžina 590 nm. Minimalne inhibitorne koncentracije smo določili iz grafov odvisnosti relativnih fluorescenčnih enot od koncentracije testiranega materiala (Slika 7).



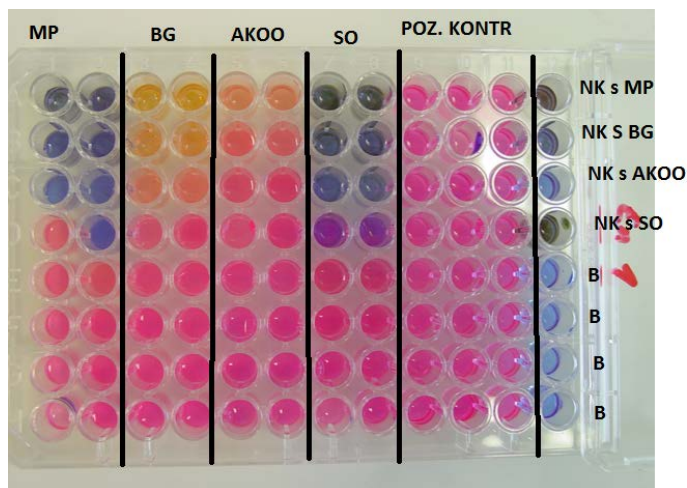
Slika 7. Odvisnost relativne fluorescence od koncentracije testiranih rastlinskih pripravkov, iz katerega smo na podlagi RFU določili vrednosti MIK posameznih testiranih rastlinskih pripravkov. MP- modri pinot, OL- olivni listi, TOM- odpadni material *T. vulgaris*, TEO- olje *T. vulgaris*, TEE- ekstrakt *T. vulgaris*, AEO- olje *A. katsumadai*, AOM- odpadni material *A. katsumadai*, AEE- ekstrakt *A. katsumadai*. RFU- relativna fluorescentna enota.

Za določitev vrednosti MIK pri enterokokih smo sami pripravili barvilo resazurin (Sigma Aldrich, Velika Britanija) skupaj z elektronskim mediatorjem. V 1,5 ml epruveto smo zatehtali 2,8 mg resazurinskega prahu in ga razredčili z 1 ml destilirane sterilne vode. To raztopino smo v razmerju 1:10 redčili z gojiščem MHB. Potem smo zatehtali 0,0014 g menadiona v 1,5 ml epruveto in ga razredčili z 1 ml DMSO (Berger, 2013).

Obe pripravljene raztopini smo zmešali v razmerju 9:1 (900  $\mu$ l resazurinske raztopine in 100  $\mu$ l menadiona z DMSO). V vsako jamico smo dodali 10  $\mu$ l raztopine resazurin-menadion in mikrotitrsko ploščo inkubirali dve uri pri 35 °C v normalni atmosferi. Slika 8 prikazuje obarvanje seva En1 *E. faecalis* z dodanim resazurinom po 2-urni inkubaciji. Živost bakterij *Enterococcus* smo določili na podlagi intenzitete razvite barve s čitalcem mikrotitrskih plošč Perkin Elmer (Waltham, ZDA) pri ekscitacijski valovni dolžini 560



nm, emisijski valovni dolžni 590 nm, višini merjenja 9.5 nm, 100 osvetlitvami na luknjico in tremi ponovitvami.



Slika 8. Določanje živosti seva *E. faecalis* En1 s pripravljeno raztopino resazurina in menadiona, v prisotnosti testiranih rastlinskih pripravkov: MP- modri pinot, BG- belo grozdje, AKOO- odpadki *A. katsumadai* po destilaciji, SO- *S. officinalis*. B- slepa proba, NK- negativna kontrola. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли različne koncentracije rastlinskih pripravkov, z najvišjo koncentracijo na vrhu plošče in najnižjo koncentracijo na dnu. Dodali smo bakterijsko kulturo in inkubirali čez noč. Naslednji dan smo določili MIK koncentracije rastlinskih pripravkov tako da smo uporabili barvilo resazurin za zaznavanje živosti bakterije *E. faecalis*. Resazurin je modro barvilo, ki pa ga žive bakterije presnovijo v močno rožnato fluorescentno barvilo in tako rožnato obarvane luknjice na mikrotitrski plošči predstavljajo metabolno aktivne bakterije. To pomeni, da ta koncentracija rastlinskega pripravka ni dovolj učinkovita.

Na podlagi izmerjenih relativnih fluorescenčnih enot smo izrisali grafe relativne fluorescence v odvisnosti od koncentracije testiranih rastlinskih pripravkov, iz katerih smo določili vrednosti MIK. V primeru stafilokokov smo vrednosti MIK odčitali vizualno na podlagi spremembe barve. Kot MIK smo upoštevali najnižjo koncentracijo testiranega pripravka, pri kateri ni bilo zaznane rasti bakterij.

Za določanje živosti bakterij *S. aureus* smo uporabili barvilo MTT, ki smo ga raztopili v metanolu (50 mg/10 ml) in hranili v hladnem in temnem prostoru. 10  $\mu$ l pripravljenega barvila smo potem vnesli v vsako luknjico, na stresalniku Eppendorf premešali in inkubirali mikrotitrsko ploščo na 37 °C v normalni atmosferi za pol ure. Barvilo MTT metabolno aktivne bakterije pretvorijo v vijolični formazan (Grare in sod., 2008). Pozitivne rezultate zato lahko odčitamo vizualno. Kjer se je jamica na mikrotitrski ploščici obarvala v črno-vijolično barvo, smo zaznali rast bakterij, kjer sprememb ni bilo, je prišlo do inhibicije rasti.

### 3.5.3 Določanje odpornosti *E. faecalis* in *E. faecium* proti izbranim antibiotikom

Pri vseh izbranih sevih *C. jejuni*, *S. aureus* in *H. pylori* smo predhodno poznali odpornost posameznih sevov proti antibiotikom, pri enterokokih pa smo odpornost na posamezne antibiotike določili v nalogi. Delo je potekalo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo in

higieno na Inštitutu za živilstvo, na Univerzi za naravne vire in naravoslovne vede na Dunaju (BOKU) na sevih iz tamkajšnje zbirke. Izbrani sevi in njihov izvor so navedeni v preglednici št. 3. Koda sevov je interna oznaka seva v laboratoriju.

Preglednica 3. Izbrani sevi enterokokov, ki smo jih testirali z rastlinskimi izvlečki in antibiotiki.

Koda seva	Vrsta	Sinonim	Izvor
En 1	<i>E. faecalis</i>	DSM 20478 ATCC 19433	Urin
En 2	<i>E. faecalis</i>	DSM 20478 ATCC 19433	Neznano
En 12	<i>E. faecalis</i>	DSM 2981 ATCC 14506	Neznano
En 15	<i>E. faecalis</i>	ATCC 27274	Iztrebek
En 84	<i>E. faecalis</i>	LMG 8222 ATCC 29212	Urin
En 85	<i>E. faecalis</i>	LMG 16216 ATCC 51299	Neznano
En 87	<i>E. faecalis</i>	LMG 19456	Neznano
En 3	<i>E. faecium</i>	DSM 2918	Neznano
En 4	<i>E. faecium</i>	DSM 20477 ATCC 19434	Neznano
En 34	<i>E. faecium</i>	LMG 12292	Prebavni trakt goveda
En 35	<i>E. faecium</i>	LMG 14407	Konjski gnoj
En 38	<i>E. faecium</i>	LMG 15079	Muflon
En 49	<i>E. faecium</i>	LMG 16268	Prašič
En 52	<i>E. faecium</i>	LMG 16478	Konjski prebavni sistem

Za kontrolne seve smo uporabili *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli*. Ti sevi so določeni v standardih (CLSI in EUCAST), kar pomeni, da so za te seve inhibicijske cone diametrov in vrednosti MIK že določeni in če rezultati niso v določenem razponu pomeni, da je prišlo do napake v poteku analize.

Protimikrobno učinkovitost enterokokov smo določali s štirimi različnimi metodami, in sicer z metodo difuzije z diski (CLSI, 2000), z metodo mikrodilucije v bujonu (CLSI, 2000). Uporabili smo tudi E-teste (bioMérieux), ki so komercialno dostopna verzija gradientne difuzijske metode.

### 3.5.3.1 Metoda difuzije z diski in E-test

V predpripravljeno suspenzijo bakterij smo pomočili bombažno palčko in jo na robu epruvete oželi. Z bombažno konico smo nanegli bakterijsko suspenzijo po vsej površini MHA gojišča v treh različnih smereh (obrat plošče z gojiščem za 60°). Po 15 minutah smo nanegli na vsako gojišče štiri z antibiotiki prepojene diske ali en trakec (bioMérieux). Nato smo gojišča inkubirali 16-18 ur na 35 °C. (CLSI, 2000).

### 3.5.3.2 Metoda mikrodilucije v bujonu

Za vsak testirani antibiotik smo pripravili založno raztopino (koncentrat) s koncentracijami 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml. Pri tem smo uporabili naslednjo enačbo (3):

$$\text{masa [mg]} = \text{volumen [ml]} * \text{koncentracija [\mu\text{g/ml}]} / \text{moč [\mu\text{g/mg}]} \quad \dots(3)$$

V jamice mikrotitrne plošče smo z večkanalno pipeto odmerili po 50 µl založne raztopine od najnižje do najvišje koncentracije. Prva vrsta vsake mikrotitrne plošče je bila namenjena pozitivni kontroli, zato so bile jamice napolnjene z destilirano vodo. V tako pripravljeno mikrotitrno ploščo smo nato dodali 50 µl raztopine z inokulumom. Gostoto inokoluma smo umerili s fotometrom na McFarland standard 1 in ga nato razredčili v gojišče MHB (1:300).

Po končani inokulaciji smo tako pripravljene mikrotitrne plošče inkubirali 16-20 ur na 35 °C.

### 3.5.3.3 Metoda PCR

S PCR metodo smo preverjali prisotnost gena *van*, ki povzroča odpornost enetrokokov na vankomicin. Temperaturni program metode PCR je opisan v preglednici 4. Začetni oligonukleotidi so imeli zaporedje za gen *vanA*, +GGGAAAACGACAATTGC in -GTACAATGCGGCCGTTA, za gen *vanB* pa +ATGGGAAGCCGATAGTC in -GATTTCGTTCTCGACC (Berger, 2013).

Preglednica 4. Temperaturni program reakcije PCR za potrjevanje prisotnosti gena za odpornost proti vankomicinu (Berger, 2013).

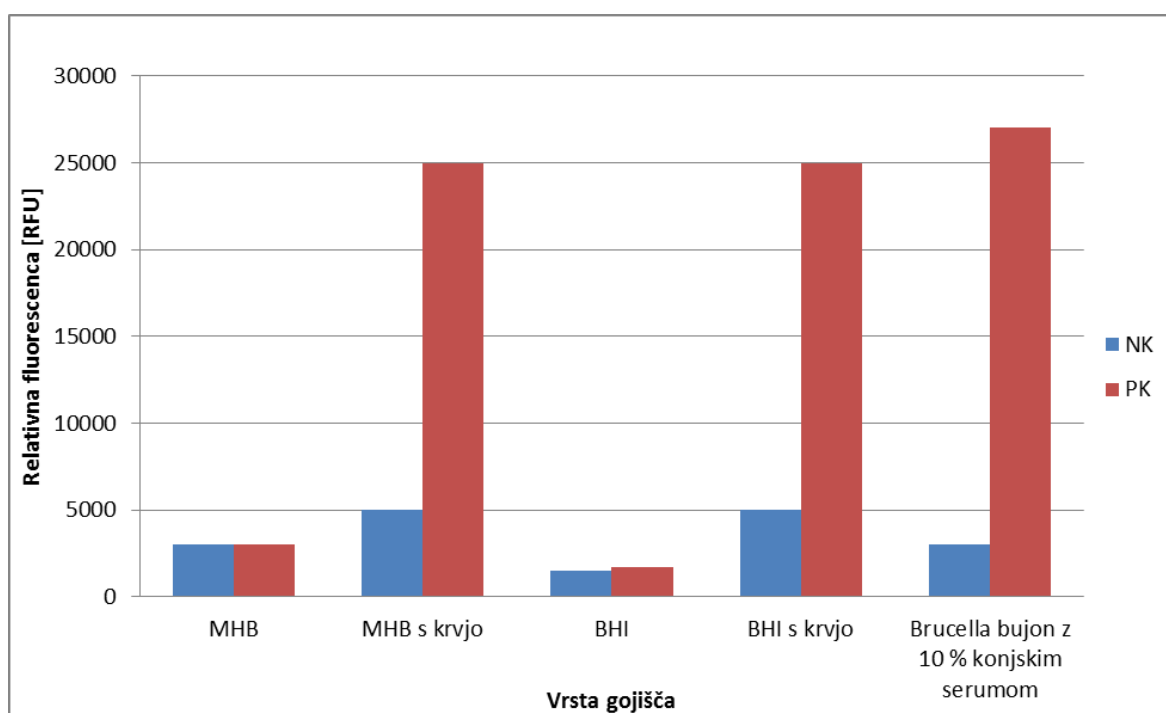
PCR program	Število ciklov
95 °C 5 min	1
95 °C 1 min	
65 °C	1
72 °C 1,5 min	
95 °C 1 min	
60 °C	5
72 °C 1,5 min	
95 °C 1 min	
55 °C	25
72 °C 1,5 min	
72 °C 8 min	1

## 4 REZULTATI

### 4.1 KARAKTERIZACIJA MATERIALA ZA NADALJNJE DELO

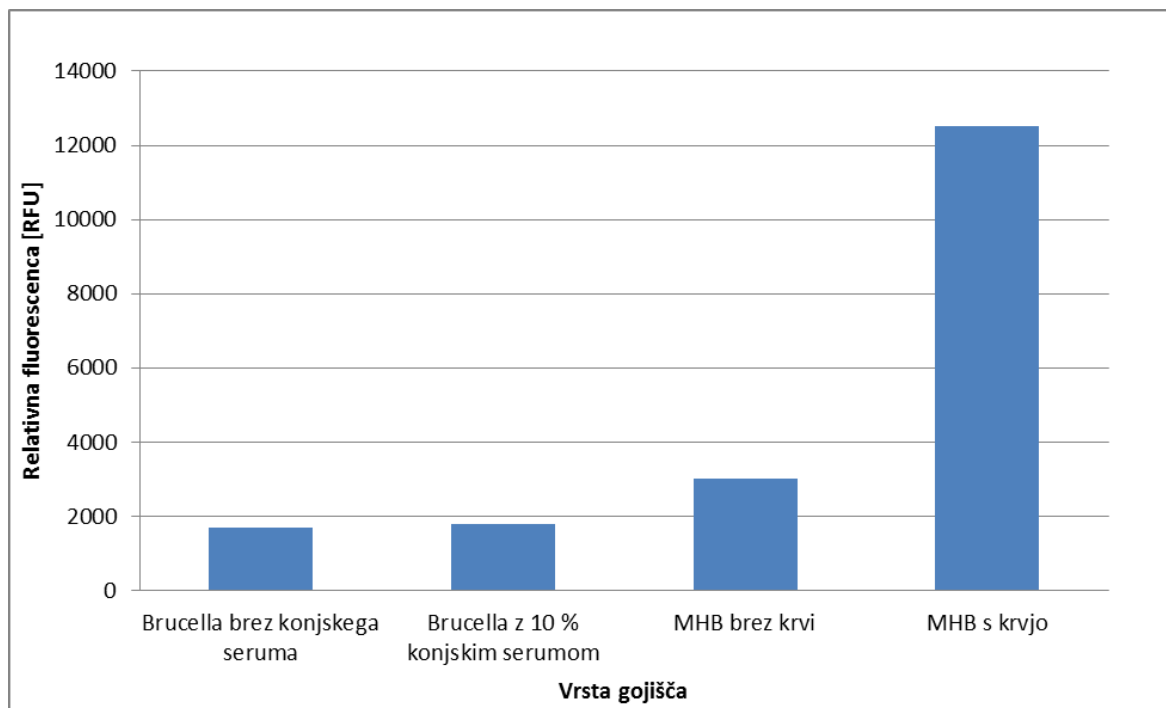
#### 4.1.1 Optimizacija gojenja in testiranja *H. pylori* v tekočem gojišču

Metoda mikrodilucije v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči zahteva gojenje bakterij v tekočem gojišču. Zaradi težav z gojenjem *H. pylori* v tekočem gojišču smo morali poiskati ustrezno gojišče. Pri tem je bilo potrebno paziti, da gojišče ne moti meritev zaznavanja živosti bakterij. Preizkusili smo gojenje na različnih gojiščih. Najprej smo testirali gojišča brez dodatkov (MHB, BHI), potem pa še gojišča z dodatki (MHB s krvjo, BHI s krvjo, ter gojišče Brucella z 10 % konjskim serumom) (Slika 9).



Slika 9. Rezultati gojenja bakterije *H. pylori* na različnih gojiščih. Rast smo potrdili s fluorescentnim barvilom Cell Titer-Blue z merjenjem fluorescence na napravi Tecan. Modri stolpci predstavljajo negativne kontrole (NK-gojišče MHB brez dodanih bakterij *H. pylori*), rdeči pa pozitivne kontrole (PK-gojišče MHB z dodanimi bakterijami *H. pylori*). RFU je relativna fluorescentna enota in odraža aktivnost mikroorganizmov, saj ti presnovijo Cell Titer-Blue v fluorescentno barvilo, katerega intenziteto lahko kvantificiramo s fluorometrom. MHB – Mueller Hinton bujon, BHI – gojišče BHI (angl. Brain Heart Infusion).

Rast bakterije je bila prisotna na vseh gojiščih z dodatki. Pred končno odločitvijo uporabe gojišča pa je bilo potrebno preveriti, ali gojišča z dodatki vplivajo na meritve fluorescence. Rezultati so pokazali, da kri vpliva na meritve in tako gojišč z dodatkom krvi nismo mogli uporabiti (slika 10).



Slika 10. Vpliv gojišča z dodatki na relativno fluorescenco barvila CellTiter-Blue. Iz stolpcev je razvidno, da kri vpliva na meritve. Pri gojišču Brucella z 10 % konjskim serumom in gojišču Brucella brez konjskega seruma pa ni opaznih večjih odstopanj. MHB – Mueller Hinton bujon.

Ker je bila prisotna rast *H. pylori* v Brucella bujonu z 10 % konjskim serumom (slika 9) in konjski serum ni vplival na naše meritve (slika 10), smo to gojišče uporabili za testiranje rastlinskih pripravkov z mikrodilucijsko metodo v tekočem gojišču.

#### 4.1.2 Določanje antibiotične odpornosti enterokokov

Za izbrane seve *E. faecalis* in *E. faecium* nismo imeli podatkov o odpornosti na antibiotike, zato smo jih testirali na različne antibiotike z disk difuzijsko metodo in z metodo mikrodilucije v bujonu. V preglednici 5 so predstavljeni rezultati testiranja enterokokov na eritromicin, tetraciklin, ampicilin, vankomicin in kloramfenikol z metodo difuzije z diski, v preglednici 6 pa rezultati testiranja enterokokov na ampicilin, eritromicin, kloramfenikol, kanamicin, streptomycin in klindamicin z metodo mikrodilucije v bujonu in E-testom. Z rdečo barvo so pobarvani sevi, ki so odporni na določen antibiotik.

Preglednica 5. Testiranje enterokokov na različne antibiotike z metodo difuzije z diski. ND - nedoločeno, z rdečo barvo so obarvani odporni sevi, z rumeno vmesni in z zeleno občutljivi sevi. ERY - eritromicin, TC - tetraciklin, AMP - ampicilin, VAN - vankomicin, CLP – kloramfenikol.

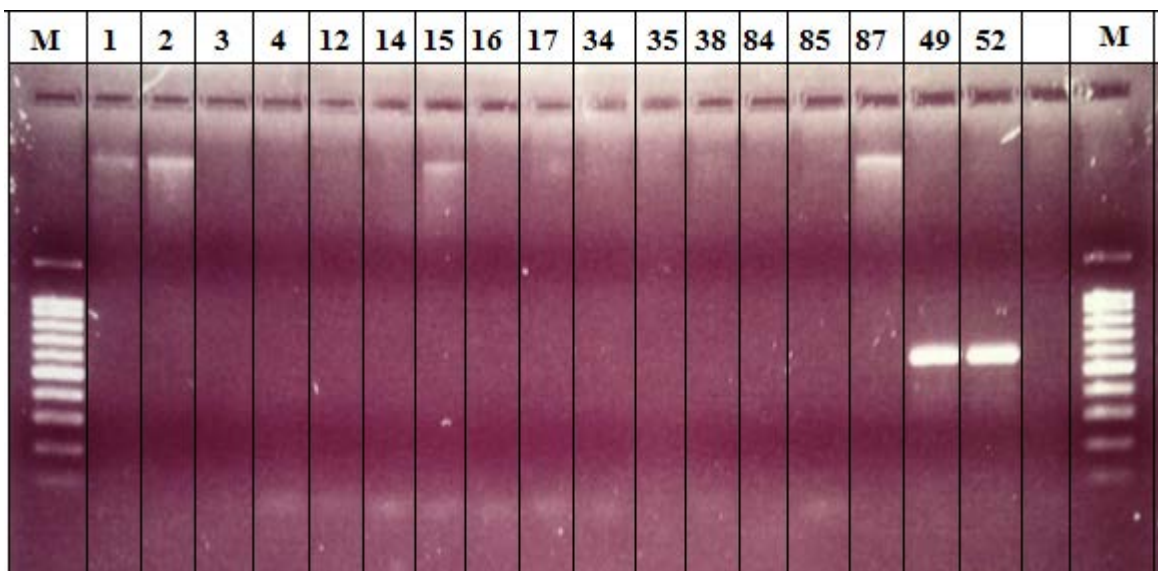
		ERY	TC	AMP	VAN	CLP
En 1	<i>E. faecalis</i>	19	12	22	18	23
En 2	<i>E. faecalis</i>	24	24	18	20	21
En 12	<i>E. faecalis</i>	20	24	23	18	23
En 15	<i>E. faecalis</i>	23	12	19	19	21
En 84	<i>E. faecalis</i>	22	14	19	19	22
En 85	<i>E. faecalis</i>	6	26	18	15	6
En 87	<i>E. faecalis</i>	26	26	19	18	26
En 3	<i>E. faecium</i>	20	24	23	21	24
En 4	<i>E. faecium</i>	15	25	19	25	24
En 34	<i>E. faecium</i>	8	8	9	20	16
En 35	<i>E. faecium</i>	18	24	18	20	22
En 38	<i>E. faecium</i>	18	23	18	23	26
En 49	<i>E. faecium</i>	6	6	6	6	18
En 52	<i>E. faecium</i>	6	ND	18	6	25

Preglednica 6. Testiranje enterokokov na različne antibiotike z metodo mikrodilucije v bujonu in E-testom. Rezultati, pridobljeni z metodo mikrodilucije v bujonu, so prikazani v prvih petih stolpcih, pri zadnjem stolpcu, kjer smo testirali antibiotik klindamicin, pa smo uporabili E-test. Z zeleno so obarvani občutljivi sevi, z rumeno vmesni sevi in z rdečo odporni sevi. AMP - ampicilin, ERY - eritromicin, CLP - kloramfenikol, KAN - kanamicin, STREP - streptomycin, CLI - klindamicin. Podane so vrednosti CLSI - Inštitut za klinične in laboratorijske standarde.

		AMP	ERY	CLP	KAN	STREP	CLI
En 1	<i>E. faecalis</i>	8	2	4	32	64	64
En 2	<i>E. faecalis</i>	8	2	4	16	128	4
En 12	<i>E. faecalis</i>	8	2	8	32	128	12
En 15	<i>E. faecalis</i>	8	2	8	32	64	8
En 85	<i>E. faecalis</i>	8	>256	128	>1024	>512	12
En 87	<i>E. faecalis</i>	4	0,5	4	64	256	>256
En 3	<i>E. faecalis</i>	2	2	4	ND	256	6
En 4	<i>E. faecium</i>	4	4	4	256	32	0,125
En 34	<i>E. faecium</i>	32	>256	16	>1024	512	0,125
En 35	<i>E. faecium</i>	8	4	4	64	32	>256
En 38	<i>E. faecium</i>	8	4	4	64	64	0,064
En 49	<i>E. faecium</i>	32	>256	16	>1024	>512	0,094
En 52	<i>E. faecium</i>	8	>256	8	64	>512	>256
	Odporni	≥16	≥8	≥32			
CLSI	Vmesni		1 do 4	16			
	Občutljivi	≤8	≤0,5	≤8			

#### 4.2 DOLOČITEV NA VANKOMICIN ODPORNIH ENTEROKOKOV (VRE) PRI IZBRANIH SEVIH *E. faecalis* IN *E. faecium*

Enterokoki so naravno odporni proti številnim antibiotikom, kar predstavlja problem pri zdravljenju enterokoknih okužb. Zaradi pridobljene odpornosti pa se težave zdravljenja še stopnjujejo. Pri nekaterih vrstah enterokokov, kot so *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus flavescens* in *Enterococcus caseliflavus*, je odpornost proti vankomicinu naravna ali prirojena. Pri medicinsko pomembnih vrstah *E. faecium* in *E. faecalis* pa je odpornost proti glikopeptidom pridobljena. Pri obeh vrstah sta za naraščajočo odpornost proti glikopeptidom odgovorni dve skupini genov - *vanA* in *vanB*. VRE smo določili z iskanjem teh genov z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Iz slike 11 je razvidno, da seva 49 in 52 vsebujeta gen za odpornost na vankomicin.



Slika 11. Gel s produkti PCR po elektroforezi. V prvi in zadnji koloni je nanešen označevalec (M). V drugi koloni je sev En1, z oznako 1. Od leve proti desni sledijo En 2, En 3, En 4, En 12, En 14, En 15, En 16, En 17, En 34, En 35, En 38, En 84, En 85, En 87, En 49 in En 52.

#### 4.3 DOLOČANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIK) RASTLINSKIH PRIPRAVKOV ZA RAZLIČNE BAKTERIJSKE VRSTE

Preverjali smo protimikrobno učinkovitost izbranih rastlinskih pripravkov *A. katsumadai*, *T. vulgaris*, *O. europea*, *V. vinifera*, *S. officinalis* na sevih *S. aureus*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *E. faecalis* in *E. faecium*. Rezultati so prikazani v preglednicah 7, 8, 9, 10, 11 in izraženi v vrednostih minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

##### 4.3.1 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Staphylococcus*

Preglednica 7. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *S. aureus*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK (µg/ml)				
		5.3	5.6	5.1	5.2	5.5
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	1000	1000	1000	1000	250
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	1000	500	1000	1000	500
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	4000	4000	250	2000	2000
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	4000	2000	4000	4000	4000
<i>T. vulgaris</i>	Eterično olje nadzemeljskega dela rastline	2000	2000	2000	2000	>4000
<i>T. vulgaris</i>	Izvl. odp. materiala nadzemeljskega dela rastline	2000	2000	2000	4000	2000
<i>O. europea</i>	Izvleček listov	4000	4000	4000	>4000	4000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	500	500	500	500	1000

##### 4.3.2 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Campylobacter*

Preglednica 8. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *C. jejuni*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK (µg/ml)			
		11168	cmeB	cmeF	cmeR
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	250	250	250	500
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	250	500	250	500
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	1000	500	1000	2000
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	500	500	1000	1000
<i>T. vulgaris</i>	Eterično olje nadzemeljskega dela rastline	/	/	500	500
<i>T. vulgaris</i>	Izvl. odp. materiala nadzemeljskega dela rastline	500	250	1000	1000
<i>O. europea</i>	Izvleček listov	1000	/	2000	2000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	4000	250	4000	4000

Se nadaljuje.



Nadaljevanje preglednice 8. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *C. jejuni*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		375/06	573/03	K19/4	33560
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	500	250	250	125
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	500	250	1000	250
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	2000	4000	2000	2000
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	2000	2000	2000	2000
<i>T. vulgaris</i>	Eterično olje nadzemeljskega dela rastline	/	2000	2000	2000
<i>T. vulgaris</i>	Izvl. odp. materiala nadzemeljskega dela rastline	4000	2000	4000	2000
<i>O. europea</i>	Izvleček listov	1000	2000	4000	2000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	2000	4000	4000	2000

### 4.3.3 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Helicobacter*

Preglednica 9. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *H. pylori*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		ATCC	5351	5187	4748	4723	5239
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	62,5	125	31,25	125	15,625	62,5
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	125	125	31,25	125	31,25	250
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	500	250	125	250	125	500
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	1000	500	125	500	125	1000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	125	62,5	250	31,25	125	62,5
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin belega grozdja	500	500	1000	250	250	250
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala po destilaciji	1000	1000	1000	1000	1000	500

#### 4.3.4 Rezultati določanja MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu

##### *Enterococcus*

Preglednica 10. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *E. faecalis*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )						
		En 1	En 2	En 12	En 15	En 84	En 85	En 87
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala iz semen	4000	4000	> 4000	> 4000	4000	> 4000	4000
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	4000	4000	4000	4000	4000	4000	> 4000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropinrdečega grozdja	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin belega grozdja	2000	2000	4000	2000	2000	2000	2000
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala po destilaciji	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
<i>S. officinalis</i>	Izvleček listov	1000	1000	1000	500	1000	500	500

Preglednica 11. MIK rastlinskih pripravkov na sevih *E. faecium*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )						
		En 3	En 4	En 34	En 35	En 38	En 49	En 52
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala iz semen	2000	> 4000	> 4000	4000	4000	> 4000	> 4000
<i>A. katsumadai</i>	Odpadni material semen	2000	> 4000	> 4000	> 4000	4000	> 4000	> 4000
<i>A. katsumadai</i>	Eterično olje iz semen	500	1000	2000	2000	2000	2000	4000
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	4000	4000	4000	4000	> 4000	4000	4000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	1000	4000	2000	4000	4000	2000	4000
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin belega grozdja	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. mat. po destilaciji	4000	> 4000	> 4000	4000	4000	> 4000	> 4000
<i>S. officinalis</i>	Izvleček listov	500	1000	2000	1000	1000	1000	1000

#### 4.4 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE, IZRAŽENE GLEDE NA VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN

V preglednicah 12, 13, 14, 15 in 16 so izražene vrednosti MIK glede na vsebnost fenolovov za vse tiste pripravke, pri katerih je bila določena vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena v ekvivalentu galne kisline (GAE/ml). Vsebnost skupnih fenolnih spojin za rastlinske pripravke *A. katsumadai* in *T. vulgaris* so določili na Medicinski fakulteti v Novem Sadu (Srbija). Vsebnost fenolnih spojin v izvlečku tropin pa so določili v Centru za raziskovanje vina na Univerzi v Novi Gorici.

##### 4.4.1 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na *S. aureus*

Preglednica 12. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih *S. aureus*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g}$ fenolov/ml)				
		5.3	5.6	5.1	5.2	5.5
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	58,0	58,0	58,0	58,0	14,5
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	33,9	17,0	33,9	33,9	17,0
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadzemeljskega dela rastline	140,4	70,2	140,4	140,4	140,4
<i>T. vulgaris</i>	Izvl. odp. materiala nadzemeljskega dela rastline	66,0	66,0	66,0	132,0	66,0
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	16,5	16,5	16,5	16,5	33,0

##### 4.4.2 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na *C. jejuni*

Preglednica 13. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih *C. jejuni*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK ( $\mu\text{g}$ fenolov/ml)							
		11168	cmeB	cmeF	cmeR	375/06	573/03	K19/4	33560
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	14,5	14,5	14,5	29,0	29,0	14,5	14,5	7,3
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala iz semen	8,5	17,0	8,5	17,0	17,0	8,5	33,9	8,5
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadz. dela rastline	17,5	17,5	35,1	35,1	70,2	70,2	70,2	70,2
<i>T. vulgaris</i>	Izvl. odp. materiala	17,5	8,76	35,05	35,05	140,2	70,1	140,2	70,1
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rd. grozdja	132	8,25	132	132	66	132	132	66

#### 4.4.3 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na *H. pylori*

Preglednica 14. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih *H. pylori*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK (µg fenolov/ml)					
		ATCC	5351	5187	4748	4723	5239
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	3,6	7,3	1,8	7,3	0,9	3,6
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček odpadnega materiala iz semen	4,2	4,2	1,1	4,2	1,1	8,5
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadz. dela rastline	35,1	17,5	4,4	17,5	4,4	2,2
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	4,13	2,03	8,25	1,03	4,125	2,06

#### 4.4.4 Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na *E. faecalis* in *E. faecium*

Preglednica 15. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih *E. faecalis*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK (µg fenolov/ml)						
		En 1	En 2	En 12	En 15	En 84	En 85	En 87
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	116,0	116,0	116,0	116,0	116,0	116,0	116,0
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala iz semen	135,6	135,6	135,6	135,6	135,6	135,6	135,6
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadz. dela rastline	132,0	132,0	132,0	132,0	132,0	132,0	132,0
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	33,0	33,0	33,0	33,0	33,0	33,0	33,0

Preglednica 16. Protimikrobna učinkovitost testiranega materiala, izražena na vsebnost fenolnih spojin, na sevih *E. faecium*.

Rastlina	Rastlinski pripravek	MIK (µg fenolov/ml)						
		En 3	En 4	En 34	En 35	En 38	En 49	En 52
<i>A. katsumadai</i>	Izvleček semen	116,0	> 232	> 232	232,0	232,0	> 232	> 232
<i>A. katsumadai</i>	Izvl. odp. materiala iz semen	67,8	135,6	135,6	135,6	135,6	135,6	135,6
<i>T. vulgaris</i>	Izvleček nadz. dela rastline	140,1	140,1	140,1	140,1	140,1	140,1	140,1
<i>V. vinifera</i>	Izvleček tropin rdečega grozdja	33,0	132,0	66,0	132,0	132,0	66,0	132,0

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 KARAKTERIZACIJA MATERIALA ZA NADALJNJE DELO

#### 5.1.1 Optimizacija gojenja in testiranja *H. pylori* v tekočem gojišču

Za vrednotenje protimikrobne aktivnosti Inštitut s kliničnimi in laboratorijskimi standardi (CLSI) priporoča dve metodi, in sicer metodo difuzije v agarju in metodo mikrodilucije v bujonu. Cellini in sod. (1996) so za vrednotenje MIK rastlinskih izvlečkov z bakterijo *H. pylori* uporabili metodo dilucije v agarju z gojiščem MHA s 7 % konjske krvi. V naši raziskavi smo se odločili za uporabo metode mikrodilucije v bujonu, saj metoda dilucije v agarju ni vedno zanesljiva metoda za določanje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih izvlečkov. Rastlinski izvlečki so različno topni in to vpliva na prehajanje skozi agar (Klančnik in sod., 2010). *H. pylori* je zaradi počasne rasti, zahteve po hranilih in mikroaerofilnih pogojih zahteven za gojenje v laboratorijih. Za izvedbo poiskusa smo morali izbrati tekoče gojišče, kjer bi bakterija *H. pylori* uspešno rastle. Gojišče ni smelo vsebovati snovi, ki bi ovirale detekcijo živosti z resazurinom. Testirali smo gojišča MHB, MHB s 5 % konjsko krvjo, BHI in BHI s 5 % konjsko krvjo (slika 9). Večina tekočih gojišč, ki se uporabljajo za gojenje *H. pylori*, je obogatena s krvjo (Nakhaei in sod., 2006; Ndip in sod., 2007). Najprej smo testirali dve gojišči, MHB in BHI, vendar rasti *H. pylori* ni bilo, razen ko smo jima dodali 5 % konjske krvi. Kri pa je vplivala na naše meritve in tako teh gojišč nismo mogli uporabiti za nadaljnje študije rastlinskih izvlečkov (slika 10). Kobayashi in sod. (2004) za metodo mikrodilucije v bujonu za *H. pylori* priporočajo MHB s 5% konjskega seruma, ravno tako so Chinnianh in sod. (2009) gojili *H. pylori* v gojišču MHB s 5 % telečjim serumom. Piccoliomini in sod. (1997) in Kumaran Asha in sod. (2013) so za gojenje uporabili gojišča Brucella z 10 % konjskim serumom. Nakhaei in sod. (2006) so gojili *H. pylori* na Brucella agarju. Odločili smo se preizkusiti Brucella bujon z 10 % konjskim serumom. Ker je bila rast *H. pylori* v Brucella broth z 10 % konjskim serumom prisotna in ker tudi serum ni vplival na meritve smo to gojišče lahko uporabili za nadaljnje raziskave protimikrobne učinkovitosti rastlinskih pripravkov (slika 9, 10).

#### 5.1.2 Določanje odpornosti enterokokov na antibiotike

Eden od namenov raziskave je primerjati protimikrobno učinkovitost rastlinskih pripravkov na večkratno odporne seve in proti antibiotikom občutljive seve. Ker podatkov o odpornosti testiranih bakterij rodu *Enterococcus* nismo imeli, smo jih morali pridobiti.

Z metodo difuzije z diski smo ugotovili odpornost na eritromicin pri 4 od 13 preiskovanih sevov (En 85, En 34, En 49 in En 52), kar se ujema z rezultati testiranja po metodi mikrodilucije v bujonu. Z metodo mikrodilucije v bujonu smo zaznali le en občutljiv sev (En 87), z metodo difuzije z diski pa tri (En 2, En 15, En 87). Vsi ostali sevi so bili vmesno občutljivi (preglednici 5 in 6). Odpornost na eritromicin pri enterokokih ni naravna, ampak pridobljena. Najbolj pogost določitelj odpornosti je gen *erm(B)*. Ta povroči spremembo v vezavnem mestu ribosoma, kamor se sicer veže antibiotik (Murray, 1990).

Murray (1990) poroča o naravno nizki stopnji odpornosti enterokokov na  $\beta$ -laktamske antibiotike. To potrjujejo tudi naši rezultati saj je enajst od trinajstih preiskovanih sevov občutljivih na ampicilin (preglednica 6). Po slovenskih smernicah za protimikrobno zdravljenje v bolnišnicah je ampicilin prva izbira pri zdravljenju endokarditisa in drugih hudih okužb z *E. faecalis* (Čižman in Beović, 2013).

Tudi kloramfenikol se je izkazal kot učinkovit antibiotik pri zaviranju rasti enterokokov. Z obema metodama smo namreč ugotovili le en na kloramfenikol odporni sev (En 85) (preglednici 5 in 6). Ker odporni sevi vsebujejo gene *cat*, ki kodirajo encim kloramfenikol-acetiltransferazo (Murray, 1990; Franz in sod., 2003), bi lahko odpornost ugotavljali tudi z molekularnimi metodami.

Odpornost enterokokov proti vankomicinu se hitro širi. Za odpornost sta odgovorni dve skupini genov – *vanA* in *vanB*. Oba zapisa se nahajata na transpozonu konjugativnega plazmida, zato se lahko preneseta na seve znotraj rodu enterokokov, lahko pa tudi na druge po Gramu pozitivne koke (Ribič in sod., 2007). Seva En 49 in En 52 sta se izkazala kot na vankomicin odporna pri določanju z metodo difuzije z diski (preglednica 5), kar pa smo tudi naknadno potrdili z metodo PCR (slika 11). Vankomicin se danes uporablja za zdravljenje vseh hudih okužb z enterokoki.

Delovanje tetraciklina na enterokoke smo preverili samo z metodo difuzije z diski. Štirje sevi (En 1, En 15, En 34 in En 49) od dvanajstih so pokazali odpornost na antibiotik. V literaturi poročajo, da je že več kot 60% vseh enterokokov odpornih na tetraciklin. Gene, ki povzročajo odpornost, bi lahko potrdili z metodo PCR (Franz in sod., 2003).

Enterokoki so tudi naravno odporni proti nizkim koncentracijam klindamicina in aminoglikozidov (Ribič in sod., 2007). Z E-testom smo preverjali odpornost na klindamicin, z metodo mikrodilucije v bujonu pa na kanamicin in streptomycin. Streptomycin ima glede na ostale aminoglikozide najvišjo prevalenco odpornosti (Murray, 1990). To je razvidno tudi iz naših rezultatov, saj je kar šest od trinajstih sevov (En 85, En 87, En 3, En 34, En 49, En 52) odpornih na streptomycin, dva (En 2, En 12) pa sta vmesno občutljiva (preglednica 6). Na kanamicin, ki je prav tako aminoglikozid, so odporni le trije sevi (En 85, 34, 49).

## 5.2 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE

V nalogi smo preverjali protimikrobno učinkovitost rastlinskih pripravkov *A. katsumadai*, *T. vulgaris*, *O. europea*, *V. vinifera* in *S. officinalis* na po Gramu pozitivne (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*) in po Gramu negativne bakterije (*C. jejuni*, *H. pylori*). Rastlinske pripravke *S. officinalis* smo testirali samo na enterokokih.

### 5.2.1 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Staphylococcus*

Med samimi sevi *S. aureus* ni opaznih večjih razlik v odpornosti proti testiranim izvlečkom (preglednica 7). Seva 5.1 in 5.5, ki sta odporna proti meticilinu, sta glede na ne-MRSA seve, bolj občutljiva na testirane pripravke iz semen *A. katsumadai*. Thi Dung in sod. (2008) so preverjali protimikrobno učinkovitost etanolnega izvlečka rastline *Cleistocalys operculatus* na bakterijah *S. aureus*. MIK vrednosti za MRSA seve v tej raziskavi so 4000  $\mu\text{g/ml}$  in ne kažejo pomembnejših razlik med MRSA in ne-MRSA sevi, kar se sklada tudi z našimi rezultati. Naše vrednosti MIK z etanolnim izvlečkom *T. vulgaris* so enake vrednostim, dobljenim v študiji. MIK vrednosti etanolnih izvlečkov *A. katsumadai* pa so v primerjavi z etanolnima izvlečkoma *C. operculatus* in *T. vulgaris* pri MRSA sevih manjše (1000  $\mu\text{g/ml}$ ), kar pomeni da ima etanolni izvleček *A. katsumadai* boljše protimikrobno učinkovanje. Zaradi enakega topila lažje primerjamo rezultate, razlike v rezultatih različnih rastlinskih vrst pa so seveda pričakovane, saj se te razlikujejo po kemijski sestavi.

Najbolj učinkovito je inhibiral rast bakterije izvleček tropin modrega pinota, z MIK vrednostmi med 500-1000  $\mu\text{g/ml}$ . Shrestha in sod. (2012) so z metodo razredčevanja v trdem gojišču za izvleček semen grozdja pridobili vrednosti MIK 625  $\mu\text{g/ml}$ . Kljub različni metodi in različnih pripravkov grozdja (tropine, seme) rezultati ne odstopajo.

Adwan in sod. (2011) so z metodo razredčevanja v tekočem gojišču preverjali protimikrobno delovanje etanolnega izvlečka rastline *Ecballium elaterium*, na MRSA in ne-MRSA seve. MIK vrednosti za MRSA seve so se gibale med 195-1563  $\mu\text{g/ml}$ , pri ne-MRSA sevih pa med 195-780  $\mu\text{g/ml}$  in tudi tu ni opaziti odstopanj v vrednostih MIK med MRSA in ne-MRSA sevi. MIK vrednosti etanolnega pripravka *E. elaterium* so v istem razponu kot nekateri naši pripravki in sicer etanolni izvleček in odpadni material *A. katsumadai* ter grozdne tropine. MIK vrednosti ostalih testiranih pripravkov so višje (2000 ali 4000  $\mu\text{g/ml}$ ) od etanolnega izvlečka *E. elaterium*. Razlike so tu pričakovane, saj gre za drugo rastlino.

### 5.2.2 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Campylobacter*

Poleg *H. pylori* smo kot po Gramu negativno bakterijo vključili referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168 in mutirane različice tega seva *cmeB*, *cmeF*, *cmeR*, ki so okvarjene v genih za izlivne črpalke. Izlivne črpalke *cmeABC* in *cmeDEF* so namreč sposobne izčrpavanja raznolikih spojin iz celice. S tem smo hoteli ovrednotiti vlogo posameznih izlivnih črpalk (*CmeABC* in *CmeDEF*) ter transkripcijskega represorja *CmeR* v zagotavljanju odpornosti *C. jejuni* proti testiranim pripravkom. Sev z mutacijo v genu *cmeB* ima okvarjeno izlivno črpalko *CmeABC*, kar pomeni zmanjšano sposobnost izčrpavanja protimikrobnih snovi, ki so substrat *CmeABC*. Pri pripravkih, ki so substrat omenjenih črpalk, smo zato pričakovali nižji MIK v primerjavi z divjim sevom NCTC 11168. Ta razlika se opazi samo pri modrem pinotu, kjer obstaja 16-kratna razlika v občutljivosti med referenčnim sevom 11168 in sevom z mutacijo v *cmeB*. Iz tega lahko sklepamo, da izlivne črpalke *cmeABC* nimajo bistvenega pomena pri mehanizmu zagotavljanja odpornosti *C. jejuni* proti ostalim testiranim materialom. Sev z mutacijo v *cmeF* ima okvarjen gen za protein druge izlivne

črpalka, CmeDEF. Glede na referenčni sev 11168 ni opaznik razlik v odpornosti, torej izlivna črpalka CmeDEF ne zagotavlja odpornosti *C. jejuni* proti testiranim izvlečkom. Sev z mutacijo v *cmeR* ne izraža transkripcijskega represorja CmeR. Če je ta gen okvarjen, se poveča izražanje genov za črpalke in tako naj bi bilo povečano izčrpavanje različnih protimikrobnih snovi. Tudi tukaj so opazne večinoma zanemarljive razlike v vrednostih MIK. Vrednosti MIK za *C. jejuni* so v območju med 250 µg/ml in 4000 µg/ml, z najboljšim delovanjem izvlečka *A. katsumadai* in odpadnega materiala iz semen *A. katsumadai* (preglednica 8). Lee in Tsau (2004) sta preverjala protimikrobno učinkovitost pora, česna in čebule proti *C. jejuni* z metodo difuzije z diski. Dobljene vrednosti MIK za por so 2000 µg/ml, za česen 4000 in 5000 µg/ml ter čebulo 10000 µg/ml, vendar jih zaradi uporabe različnih metod ne moramo primerjati. Naše vrednosti MIK referenčnega seva 11168 so 250 µg/ml za izvleček semen in odpadni material rastline *A. katsumadai*, 500 µg/ml za etanolni izvleček in odpadni material *T. vulgaris*, 1000 µg/ml za eterično olje *A. katsumadai* in oljke, najslabšo učinkovitost pa je pokazal modri pinot z vrednostjo MIK 4000 µg/ml. Aslim in Yucel (2007) sta preverjala protimikrobno učinkovitost eteričnih olj divjega origana *Origanum minutiflorum* proti ciprofloksacin rezistentnim sevom *C. jejuni* z metodo mikrodilucije v bujonu. MIK vrednosti divjega origana so bile nižje (12,5 – 700 µg/ml) od naših. Naša eterična olja *A. katsumadai* in *T. vulgaris* so pokazala protimikrobno učinkovitost na ciprofloksacin odporni *C. jejuni*, sev 573/03 z vrednostjo MIK 2000 in 4000 µg/ml. Višje dobljene vrednosti MIK lahko pojasnimo z različno kemijsko sestavo eteričnih olj, ki je odvisna tudi od klime in geografskih pogojev. S plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo so pregledali sestavo olja *O. minutiflorum* in našli 29 različnih spojin. Sestava je pokazala glavno spojino, ki je s 73,9 % fenol karvakrol. Eterična olja z visokim deležem fenolnih spojin, kot je karvakrol, kažejo na višjo protimikrobno učinkovitost (Baydar in sod., 2004).

### 5.2.3 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Helicobacter*

Naši rezultati glede protimikrobne učinkovitosti rastlinskih pripravkov na *H. pylori* so primerljivi z že znanimi študijami, kjer so uporabljali pripravke drugih rastlin (Sudjana in sod., 2009; Chinniah in sod., 2009; Ndip in sod., 2007; Castillo-Juarez in sod., 2009). Ugotavljamo, da je *H. pylori* med vsemi izbranimi bakterijskimi vrstami najbolj občutljiv na testirane rastlinske pripravke. Najučinkovitejši je bil izvleček semen *A. katsumadai* z vrednostmi MIK med 16 in 125 µg/ml. Isti izvleček je bil tudi najbolj učinkovit proti sorodni bakteriji *C. jejuni*, z vrednostmi MIK med 125 in 500 µg/ml (preglednica 9). Čeprav so bile bakterije *H. pylori* najbolj občutljive na protimikrobna sredstva *in vitro*, to ne pomeni vedno učinkovitega delovanja *in vivo*. Na protimikrobno delovanje *in vivo* pri bakterijah *H. pylori* vpliva tudi zmanjšanje pH v želodcu in mukozni sloj, kjer se bakterija nahaja (Sudjana in sod., 2009).



#### 5.2.4 MIK rastlinskih pripravkov na izbranih sevih rodu *Enterococcus*

Najmanj učinkoviti so bili rastlinski pripravki pri enterokokih. Pri etanolnem izvlečku *T. vulgaris* so bile MIK vrednosti 4000 µg/ml ali več. Berger (2013) je testirala 21 sevov *E. faecium* z etanolnim izvlečkom *T. vulgaris* in dobila MIK vrednosti nad 4000 µg/ml, kar pomeni slabo inhibitorno delovanje. Ti rezultati so enaki našim, saj so tudi naše MIK vrednosti za iste rastlinske pripravke nad 4000 µg/ml. Essawi in Srour (2000) sta z metodo difuzije z diski preverjala protimikrobno aktivnost metanolnega izvlečka *T. vulgaris* na *E. faecalis*. Izvleček ni inhibiral rasti bakterije. Naša študija in študija, ki sta jo opravila Essawi in Srour (2000) se razlikujeta v metodi preiskovanja protimikrobne aktivnosti *T. vulgaris* na *E. faecalis*, a obe kažeta na slabe inhibicijske lastnosti rastlinskih pripravkov proti enterokokom.

Etanolni izvleček *S. officinalis* je bil najbolj uspešen pri inhibiciji rasti enterokokov. Pri *E. faecalis* je bila vrednost MIK z izvlečkom *S. officinalis* med 500 in 1000 µg/ml, pri *E. faecium* pa med 500 in 2000 µg/ml. Vrednost MIK 2000 µg/ml je imel sev En 34, pri katerem smo ugotovili odpornost na antibiotike eritromicin, streptomycin, klindamicin in kanamicin. Izvleček tropin je inhibiral rast *E. faecalis* z vrednostmi MIK 1000 µg/ml, kar je v primerjavi z drugimi rastlinskimi pripravki *A. katsumadai*, *T. vulgaris* in belega grozdja (MIK vrednosti 2000 µg/ml, 4000 µg/ml ali >4000 µg/ml), uspešno delovanje na *E. faecalis* (preglednici 10 in 11).

Če primerjamo *E. faecalis* in *E. faecium*, lahko iz danih rezultatov povzamemo, da imata oba dobro odpornost proti rastlinskim izvlečkom in da je *E. faecium* še bolj odporen od vrste *E. faecalis*. Ta odpornost pa ni prisotna samo pri rastlinskih izvlečkih, saj so enterokoki naravno odporni na število antibiotike, poleg teh pa se pojavlja vedno več sevov, ki so odporni na skoraj vse obstoječe antibiotike in tako je zdravljenje bolnikov z enterokoknimi okužbami zelo oteženo (Koch, 2004).

#### 5.2.5 Protimikrobno delovanje rastlinskih pripravkov na po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah

Študije opisujejo slabšo učinkovitost rastlinskih izvlečkov na po Gramu negativne bakterije zaradi dodatne zunanje membrane v celični ovojnici, ki omejuje vstop substratov v celico (Burt, 2004; Klančnik, 2009; Sudjana in sod., 2009; Zampini in sod., 2009). Po Gramu pozitivne bakterije so v splošnem tudi bolj dovzetne za eterična olja, kot po Gram negativne. Odpornost po Gramu negativnih bakterij na eterična olja pripisujejo prisotnosti hidrofilne zunanje membrane, ki preprečuje prehod hidrofobnih eteričnih olj v notranjost celice (Zampini in sod., 2009). Naši rezultati kažejo, da je protimikrobna učinkovitost rastlinskih izvlečkov najboljša na po Gramu negativnih bakterijah *H. pylori* (preglednica 9), najslabša pa na po Gramu pozitivnih enterokokih (preglednici 10 in 11). Vrednosti MIK na bakterijah *H. pylori* so v območju od 15,6 µg/ml do 1000 µg/ml, z najboljšo učinkovitostjo etanolnega izvlečka semen *A. katsumadai*. Vrednosti MIK na enterokokih pa so v območju med 500 µg/ml in več kot 4000 µg/ml. Ravno tako so do manjše

vrednosti MIK pri po Gramu negativnih bakterijah, glede na po Gramu pozitivne, ugotovili Longaray Delamare in sod. (2007).

Naše hipoteze, da so po Gramu negativne bakterije bolj odporne na rastlinske pripravke kot po Gramu pozitivne, ne moremo potrditi, saj je *H. pylori* bolj, *C. jejuni* pa primerljivo občutljiva kot po Gramu pozitivne bakterije. To bi lahko pripisali veliki občutljivosti bakterij *H. pylori* in *C. jejuni* na okoljske razmere. Ti dve po Gramu negativni bakteriji sta netipični v svojih ekoloških značilnostih.

### **5.2.6 Protimikrobna učinkovitost rastlinskih pripravkov na večkratno odpornih sevih in proti antibiotikom občutljivih sevih**

Zaradi vse večje odpornosti posameznih sevov bakterij na antibiotike smo ugotavljali, ali je pri teh bakterijah zmanjšano tudi učinkovanje rastlinskih izvlečkov. Ugotovili smo, da ni bilo večjih odstopanj med bakterijami, ki so odporne na antibiotike, in bakterijami, ki niso. Tudi Zampini in sod., 2009 so dokazali učinkovanje rastlinskih pripravkov na za antibiotike občutljive seve in na večkratno odporne seve. Številne študije potrjujejo, da učinkovitost rastlinskih pripravkov ni manjša pri bakterijah, ki so odporne na antibiotike (Sakagamiya in sod., 2005; Tohidpour in sod., 2010; Adwan in sod., 2011).

### **5.3 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST TESTIRANEGA MATERIALA NA *C. jejuni*, *S. aureus*, *H. pylori*, *E. faecalis* in *E. faecium*, IZRAŽENA NA VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN**

Mehanizem protimikrobnega delovanja rastlinskih pripravkov ni pojasnjen, saj je težko prepoznati specifična mesta delovanja. Pri rastlinskih pripravkih, ki so mešanica različnih sestavin, sočasno poteka več reakcij. Opazili so, da snovi, ki delujejo na membrano, lahko tudi zmanjšajo pridobivanje energije iz ATP, se vmešajo v aktivni transport ali v delovanje metaboličnih encimov. Fenoli spremenijo delovanje membrane in vplivajo na vsebovanost razmerja med proteini in lipidi ter lahko sprožijo izčrpavanje kalijevih ionov. Terpeni se kopičijo v membrani in povzročijo izgubo njene integritete (Negi., 2012). Številne študije nakazujejo na dobro protimikrobno delovanje fenolov (Negi, 2012; Al Hashmi in sod., 2013; Kumaran Asha in sod., 2013; Nikolić in sod., 2014). Kumaran Asha in sod. (2013) so iz rastlin izolirali različne spojine in ugotovili, da imajo med le-temi fenoli najnižje vrednosti MIK in torej najboljše protimikrobno učinkovanje.

Med fenole uvrščamo flavonoide, enostavne fenole, fenolne kisline, kinolone, flavone in tanine (Burt, 2004). Fenoli se med seboj kemijsko razlikujejo in tako različno delujejo na bakterijske vrste. Včasih je potrebna manjša koncentracija za inhibicijo rasti bakterij, drugič večja. Delovanje rastlinskih pripravkov je tako odvisno od sestave ter razmerja spojin. Zaradi vsebnosti različnih fenolov v posameznih rastlinskih pripravkih smo rezultate izrazili kot vrednost MIK glede na vsebnost fenolnih spojin. S tem smo ugotovili v katerih pripravkih je bila potrebna manjša koncentracija fenolov za protimikrobno

učinkovanje in lahko sklepali, v katerih pripravkih so za inhibicijo bakterijske rasti bolj učinkoviti fenoli.

Protimikrobno učinkovitost materialov, katerih skupni delež fenolnih spojin je poznan, smo izrazili glede na vsebnost fenolnih spojin (preglednice št. 12, 13, 14, 15, 16). Za pripravke rastlin *A. katsumadai* in *T. vulgaris* smo imeli podatke za vsebnost fenolnih spojin tako za etanolni izvleček kot za izvleček odpadnega materiala. Rezultati kažejo, da je za obe rastlini pri izvlečku odpadnega materiala potreben manjši MIK (izražen na vsebnost fenolnih spojin) za inhibicijo bakterijske rasti. Nižje vrednosti MIK so verjetno posledica večje koncentracije fenolnih spojin v odpadnem materialu in različne sestave ter razmerja spojin. Tudi številne študije dokazujejo prisotnost bioučinkovin v izvlečkih odpadnih materialov rastlin. Cheng in sod. (2012) so iz odpadnega materiala grozdja pridobili še številne fenole, ravno tako Obied in sod. (2007) iz odpadnega materiala olivnega olja.

Naši rezultati kažejo, da je učinkovitost rastlinskih pripravkov glede na vsebnost fenolnih pripravkov različna pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah. Tako je vrednost MIK izvlečka grozdnih tropin pri po Gramu pozitivni bakteriji *S. aureus* manjša (1,0 - 8,3 µg fenolov/ml), kot pri po Gramu negativni bakteriji *C. jejuni* (66 - 132 µg fenolov/ml). Bakteriji se razlikujeta po sestavi celične stene, kar je najverjetneje razlog za slabšo učinkovitost fenolnih spojin na po Gramu negativne organizme.

## 6 SKLEPI

Glede na ugotovljene minimalne inhibitorne koncentracije preiskovanih rastlinskih izvlečkov lahko povzamemo naslednje:

- Rastlinski izvlečki uspešno inhibirajo rast bakterijskih sevov. Pokazale pa so se velike razlike v učinkovitosti glede na tarčni organizem. V splošnem so bili vsi izvlečki najbolj učinkoviti proti bakteriji *H. pylori* in najmanj proti bakterijam rodu *Enterococcus*.
- Protimikrobno delovanje je odvisno od izvora in vsebnosti skupnih fenolnih spojin v preiskovanem izvlečku. Iz primerjalne analize rezultatov lahko povzamemo, da največjo protimikrobno učinkovitost izkazujejo izvlečki odpadnega materiala po destilaciji eteričnega olja, tako timijana kot semen *A. katsumadai*.
- Rastlinski pripravki so enako učinkoviti na bakterije, ki so večkratno odporne na antibiotike.
- Hipotezo, da imajo rastlinski fenolni izvlečki boljši protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije, moramo glede na rezultate ovreči, saj smo najnižje vrednosti MIK ugotovili pri bakteriji *H. pylori*, ki spada med po Gramu negativne bakterije.

## 7 VIRI

- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave - funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in uporaba v živilstvu - uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17.-18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Acheson D. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 8: 1201-1206
- Adwan G., Salameh Y., Adwan K. 2011. Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 5: 456-460
- Ahmad I., Aqil F. 2007. *In vitro* efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162: 264—275
- Al Hashmi L., Hossain M.A., Weli A.H., Al-Riyami Q., Al Sabahi J. 2013. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of different organic crude extracts from the local medicinal plant of *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal for Tropical Biomedicine*, 3,1: 69-73
- Alonso A., Guilleán D., Barroso C., Puertas D., Garcia A. 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 21: 5832 - 5836
- Aslim B., Yucel N. 2008. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, 107: 602–606
- Baričević D., Bartol T. 2000. The biological/pharmacological activity of *Salvia* genus. V: Sage: The genus *Salvia*. Kintzios S.E (ed.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 143-184
- Battinelli L., Danielea C., Cristianib M., Bisignanob G., Saijab A., Mazzanti G. 2006. *In vitro* antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea*. *Phytomedicine*, 13: 558–563
- Baydar H., Sağdıç O., Özkan G., Karadoğan T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15, 3: 169–172
- Berger A. 2013. Antimicrobial activity testing of plant-derived compounds - specific focus on *enterococci*. Diplomaarbeit. Wien, Universität für Bodenkultur (BOKU): 208 str.
- Bouaziz M., Yangui T., Sayadi S., Dhouib A. 2009. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2755–2760
- Brenes A., Roura E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158: 1–14
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253
- Bussmann R.W., Malca-García G., Glenn A., Sharon D., Chait G., Díaz D., Pourmand K., Jonat B., Somogy S., Guardado G., Aguirre C., Chan R., Meyer K., Kuhlman A., Townesmith A., Effio-Carbajal J., Frías-Fernandez F., Benito M. 2010.

- Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 101–108
- Castillo-Juarez I., Gonzáles V., Jaime-Aguilar H., Martínez G., Linares E., Bye R., Romero I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 2: 402-405
- Cellini L., Di Campli E., Masulli M., Di Bartolomeo S., Allocati N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *Immunology and Medical Microbiology*, 13: 273-277
- Cheng V., Bekhit A., McConnell M., Mros S., Zhao J. 2012. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134: 474–482
- Chinniah A., Mohapatra S., Goswamia S., Mahapatra A., Kar S., Mallavadhani U.V., Das P. 2009. On the potential of *Tephrosia purpurea* as anti-*Helicobacter pylori* agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 642–645
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, M2-A7, 2: 26 str.
- Cosme F., Ricardo-Da-Silva J.M., Laureano O. 2009. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112:197–204
- Cushnie T.P., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356
- Čižman M., Beović B. 2013. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. 2. dopolnjena izd. Ljubljana, Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva: 233 str.
- Dasti J.I., Tareen A., Lugert L., Zautner A., Gross U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 205–211
- Du Pont M.S., Bennett R.N., Mellon F.A., Williamson G. 2002. Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *Journal of Nutrition*, 132: 172–175
- El-Din Bekhit A., Cheng V.J., McConnell M., Zhao J., Sedcole R., Harrison R. 2011. Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion. *Food Chemistry*, 129: 837–845
- Essawi T., Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 343–349
- Franz C. M. A. P., Stiles M. E., Schleifer K. H., Holzappel W. H. 2003. *Enterococci* in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 105-122
- Fuhrman B., Volkova N., Rosenblat M., Aviram M. 2000. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxidant Redox Signal*, 2, 3: 491–506
- Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N., Bisignano G. 2002. *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20: 293-296
- Galle-Toplak K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. 2. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.

- Glisić S., Ivanovic J., Ristic M., Skala D. 2010. Extraction of sage (*Salvia officinalis*) by supercritical CO<sub>2</sub>: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpens. *Journal of Supercritical Fluids*, 52: 62-70
- Grare M., Fontanay S., Cornil C., Finance C., Duval R.E. 2008. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? *Journal of Microbiological Methods*, 75: 156-159
- Gröblacher B., Kunert O., Bucar F. 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 20: 2701-2706
- Gutierrez-Fernandez J., García-Armesto M.R., Álvarez-Alonso R., Valle P., Arriaga D., Rúa J. 2013. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dairy Science*, 96: 4912-4920
- Hayouni A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J., Mohammed M., Hamdi M. Tunisian *Salvia officinalis* and *Schinus molle* essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 242-251
- Hua S.Z., Luo J.G., Wang X.B., Wang J.S., Kong L. 2009. Two novel monoterpene-chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19: 2728-2730
- IVZ. 2012. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2011. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 46-47  
[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=6179.pdf&\\_5\\_MediaId=6179&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=6179.pdf&_5_MediaId=6179&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2013)
- Jimenez-Escrig A., Dragsted L., Daneshvar B., Pulido R., Saura-Calixto F. 2003. *In vitro* antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5540-5545
- Kim H., Kwon H.J., Ryu Y.B., Chang J.S., Cho K., Hosmillo D.T., Rho M.C., Park S.J., Lee W.S. 2012. Antiviral activity of *Alpinia katsumadai* extracts against rotaviruses. *Research in Veterinary Science*, 92: 320-323
- Klančnik A., Gröblacher B., Kovač J., Bucar F., Smole Možina S. 2012. Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 5: 1249-1262
- 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*, 81: 121-126
- Kobayashi I., Muraoka H., Saika T., Nishida M., Fujioka T., Nasu M. 2004. Micro-broth dilution method with air-dried microplate for determining MICs of clarithromycin and amoxicillin for *Helicobacter pylori* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 403-406
- Koch S., Huebner J., Hufnagel M., Theilacker C. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22: 822-830

- Kocjan B., Seme K., Poljak M. (2004). Genetska osnova odpornosti *Staphylococcus aureus* proti meticilinu. Medicinski razgledi, 43: 411-418
- Kumaran Asha M., Debraj D., Prashanth D., Edwin J.R., Srikanth H.S., Muruganantham N., Dethle S.M., Anirban B., Jaya B., Deepak M., Agarwal A. 2013. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of aflavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. Journal of Ethnopharmacology, 145: 581-586
- Kurinčič M., Klančnik A., Smole Možina S. 2012. Epigallocatechin gallate as a modulator of *Campylobacter* resistance to macrolide antibiotics. International Journal of Antimicrobial Agents, 40, 5: 467-471
- Kusters G.J., Van Vliet A., Kuiperst J.E. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology Reviews, 19, 3: 449- 490
- Lee C.F., Han C.H., Tsau J.L. 2004. *In vitro* inhibitory activity of chinese leek extract against *Campylobacter* species. International Journal of Food Microbiology, 94: 169-174
- Lee J. H., Koo T. H., Yoon H., Jung H. S., Jin H. Z., Lee K. 2006. Inhibition of NF-kappa B activation through targeting I kappa B kinase by celastrol, a quinone methide triterpenoid. Biochemical Pharmacology, 72: 1311–1321
- Lesinger I. 2005. Zdravilnost zelenjave, sadja in začimb. 1. izd. Ljubljana. Založba Modrijan: 275 str.
- Li G., Xiao X., Si X., Tong X. 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
- Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Statti G.A., Menichini F., Lampronti I., Gambari R., Cinatl J., Doerr H.W., 2008. Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. Chemistry and Biodiversity, 5, 3: 461–470
- Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry, 100: 603–608
- Madureira A.M., Duarte A., Teixeira. 2012. Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* (Proteaceae) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains. South African Journal of Botany, 81: 40-43
- Martin A., Camacho M., Portaels F., Palomino J.C. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47,11: 3616-3619
- Martini S., D'Addario C., Colacevich A., Focardi S., Borghini F., Santucci A., Figura N., Rossi C. 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 1: 50-59
- Mathabe M.C., Hussein A.A., Nikolova R., Basson A., Marrion Mayen J.J., Lall N. 2008. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. Journal of Ethnopharmacology, 116: 194-197



- McNicholl B.P., McGrath J.W., Quinn J.P. 2007. Development and application of a resazurinbased biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Research*, 41: 127-133
- Megraud F., Coenen S., Versporten A., Kist M., Lopez-Brea M., Hirschl A.M., Andersen L.P., Goossens H., Glupczynski Y. 2012. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62, 1: 34-42
- Moussa A., Noureddine D., Mohamed H., Abdelmelek M. 2012. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10: 773-776
- Mulaudzi R.B., Ndhlala A., Kulkarni M.G., VanStaden J. 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 185-193
- Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3: 46-65
- Nakhaei M., Malekzadeh F., Khaje-Karamoddin M., Ramezani M. 2006. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* effects of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) and purple basil (*Ocimum basilicum* var.purpurascens. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9, 15: 2887-2891
- Nan P., Hu Y., Zhao J., Feng Y., Zhong Y., Nan P., Hu Y., Zhao J., Feng Y., Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of two *Alpinia* species from Hainan Island, China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59, 3/4: 157-160
- Ndip R.N., Malange Tarkang A.E., Mbullah S.M., Luma H.N., Malongue A., Ndip L.M, Nyongbela K., Wirmum C., Efange S.M.N. 2007. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 452-457
- 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
- Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R. 2005. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90: 609-611
- Nikolić M., Glamoclić J., Ferreira I., Calhella R.C., Fernandes A., Marković T., Marković D., Giwelie A., Soković M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-190
- Obied H.K., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1238-1248
- Obreque-Siller E., Peña-Neira A., López-Solís R., Cáceres-Mella A., Toledo-Araya H., López-Rivera A. 2013. Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Food Science and Technology*, 54: 404-413
- Paiva P.M.G., Gomes F.S., Napoleão T.H., Sá R.A., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B. 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants.

Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Current Research

- Pereira J.A., Ferreira I., Barros I., Soares M.S., Lourdes Bastos M. 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103: 188-195
- Peschel W., Sanchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzia I., Jimenez D., Lamuela-Ravento R., Buxaderas S., Codina C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97: 137-150
- Piccoliomini R., Bonaventura G., Catamo G., Carbone F., Neri M. 1997. Comparative evaluation of E Test, agar dilution and microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 7: 1842-1846
- Pirbalouti P.G., Hashemi M., Ghahfarokhi F.T. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis celak* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 48: 43-48
- Piskernik S., Klančnik A., Riedel C.T., Bronsded L., Smole Možina S. 2011. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, 22, 8: 718-724
- Putignani L., Massa O., Alisi A. 2013. Engineered *Escherichia coli* as new source of flavonoids and terpenoids. *Food Research International*, 54, 1: 1084-1095
- Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H., Raherimandimby M., Danthu P. 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114, 2: 680-684
- Rhodes P.L., Mitchell J.W., Wilson M.W., Melton L.D. 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera*. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 281-286
- Ribič H., Grmek-Košnik I., Kramar Z., Rus I. 2007. Naše izkušnje s proti vankomicinu odpornim enterokokom v splošni bolnišnici Jesenice. *Zdravniški vestnik*, 76: 701-707
- Rojas de la Parra, Mierau V., Anke T., Sterner O. 2006. Cytotoxic terpenoids from *Dasyscyphus niveus*. *Tetrahedron*, 62: 1828-1832
- Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfino S., Cardile V., Rosselli S., Bruno M. 2013. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 42-47
- Sakagami Y., Inuma M., Piyasena K.G.N.P., Dharmaratne H.R.W. 2005. Antibacterial activity of a-mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine*, 12: 203-208
- Sakunpak A., Panichayupakaranant P. 2012. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry*, 130: 826-831
- Shrestha B., Srithavaj Theerathavaj M.L., Thaweboon S., Thaweboon B. 2012. *In vitro* antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in

- craniofacial implants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 10: 822-825
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 91-98
- Stege P.W., Davicino R.C., Vega A.E., Casali Y.A, Correa S., Micalizzi B. 2006. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine*, 13: 724-727
- Sudjana A., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T., Hammer K. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 461-463
- Thi Dung N., Min Kim J., Chul Kang S. 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 12: 3632-3639
- Toedo C., Britta E., Ceole L., Silva E., Mello J., Filho B.P., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T. 2011. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachac, as extractor liquid. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 : 420-425
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plant against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17: 142-145
- Trošt K., Sternad Lemut M., Jug K., Raspor P., Smole Možina S. 2013. Phenolic profile, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts from grape skins and seeds winery by-products in the Vipava Valley (Slovenia) – neobjavljeni podatki
- Tsukatani T., Suenaga H., Higuchi T., Akao T., Ishiyama M., Ezoe K., Matsumoto K. 2008. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 109-116
- Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G., Węgrzyn G. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 184: 271-278
- Ulubelen A. 2003. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64: 395-399
- Vakil N., Megrau F. 2007. Reviews in basic and clinical gastroenterology. *Gastroenterology*, 133: 985-1001
- Van Wyk B.E., Long H.S., Tilney P.M. 2010. The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (*Oleaceae*). *South African Journal of Botany*, 76: 324-331
- Yadav M., Jain S., Bhardwaj A., Nagpal R., Puniya M., Tomar R., Singh V., Parkash O., Prasad G., Marotta F., Yadav H. 2009. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *Journal of Medicinal Food*, 12, 3: 473- 484.
- Yemoa A., Gbenou J., Affolabi D., Moudachirou M., Bigot A., Anagonou S., Portael F., Quetin-Leclercq J., Martin A. 2011. A review of *in vitro* tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans*. *Planta Medica*, 77: 641-646

- Zampini I.C., Cuelloa S., Alberto M.R., Ordoneza R.M., Almeidaa R., Solorzanoa E., Isla M.I. 2009. Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 499-505
- Zhang L., Kong Y., Wu D., Zhang H., Wu J., Chen J., Ding J., Hu L., Jiang H., Shen X. 2008. Three flavonoids targeting the  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Science*, 17: 1971-1978

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se iskreno zahvaljujem za pomoč, spodbude, usmerjanja, ki sem jih rabila pri izvajanju in pisanju magistrske naloge, ter za vse priložnosti in izkušnje, ki sem jih pridobila med pripravo magistrske naloge. Asistentki Jasni Kovač za pomoč v laboratoriju, strokovne nasvete in koristne napotke. Prav tako sta odgovorni, da sem se odločila za delo v laboratoriju na dunajski univerzi, kar je bila ena najboljših izkušenj, s katero sem pridobila ogromno novega znanja tako na področju mikrobiologije kot tudi življenja.

Samu Jeverici, dr. med. in Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih infekcij Inštituta za mikrobiologijo v Ljubljani (IMI) se zahvaljujem za vso pomoč, motivacijo in usmerjanje pri delu z bakterijo *H. pylori*.

Prof. dr. Konradu Domigu in dr. Sigrid Mayrhofer, ki sta me sprejela v Laboratorij za mikrobiologijo in higieno prehrane Univerze na Dunaju in sta mi bila v pomoč pri delu z bakterijami *Enterococcus* spp. ter me seznanila z novimi metodami.

Kolegici Agnes Berger, s katero sva skupaj odpravljali težave pri zaznavanju enterokokov, za pomoč, motivacijo in družbo.

Mojima študijskima kolegoma Simonu Zidarju in Moniki Štimac za vse, kar smo skupaj doživeli in za podporo pri premagovanju izpitov.

Mami Metki, očetu Janiju, stari mami Francki, sestri Urški, bratu Janinu in mojemu Klemenu, ker so mi vedno stali ob strani in mi popestrili odmore med pisanjem naloge.