

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Živa RUPNIK

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV
IN SEVA BAKTERIJ VRSTE
Escherichia coli NA TVORBO BIOFILMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Živa RUPNIK

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV
IN SEVA BAKTERIJ VRSTE
Escherichia coli NA TVORBO BIOFILMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF ENVIRONMENTAL
FACTORS AND *Escherichia coli* STRAINS
ON BIOFILM FORMATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana izr. prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko izr. prof. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Živa RUPNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24.083 + 579.26: 579.842 (043)=163.6
KG bakterijski biofilmi / *Escherichia coli* / tvorba biofilma / delovne površine / polistiren / metoda barvanja s kristal violetom / nerjaveče jeklo / inhibicija tvorbe biofilma / razkužila / benzalkonijev klorid / klorheksidin diacetat monohidrat
AV RUPNIK, Živa
SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2013
IN VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV IN SEVA BAKTERIJ VRSTE *Escherichia coli* NA TVORBO BIOFILMA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 49 str., 3 pregl., 13 sl., 16 pril., 61 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Namen naše diplomske naloge je bil preveriti vpliv okoljskih dejavnikov in sevov bakterij vrste *Escherichia coli* na tvorbo biofilma. Kot relativno hitro metodo za določanje biofilma na polistirenski površini smo optimizirali metodo barvanja s kristal violetom. S to metodo smo nato analizirali 13 humanih in živilskih sevov bakterij vrste *E. coli* tako, da smo tvorbo biofilma spremljali od 24 do 72 ur. Seve smo glede na relativno količino biofilma na polistirenski površini uvrstili v 5 skupin, in sicer na seve, ki ne tvorijo biofilma, na šibke, srednje močne, močne in zelo močne tvorce biofilma. Ugotovili smo, da je tvorba biofilma na polistirenski površini pri bakterijah vrste *E. coli* odvisna od samega seva bakterije in časa. Po 24 urah je največ biofilma tvoril sev *E. coli* ŽMJ135, po 48 in 72 urah pa sev *E. coli* ŽMJ128. Humani sevi so bili močnejši tvorci biofilma kot živilski sevi. Za nadaljnje delo smo izbrali seva *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135, ki sta bila uvrščena v skupino močnih oziroma srednje močnih tvorcev biofilma. Z izbranimi sevoma smo proučevali tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu in vpliv razkužil. Ugotovili smo, da na količino biofilma na nerjavečem jeklu vpliva vrsta seva bakterij *E. coli* in čas. Razkužili benzalkonijev klorid (2 µg/mL) in klorheksidin diacetat monohidrat (4

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24.083 + 579.26: 579.842 (043)=163.6
CX bacterial biofilms / *Escherichia coli* / biofilm formation / working surfaces / polystyrene / crystal violet assay / stainless steel / inhibition on formation biofilm / disinfectants / benzalkonium chloride / chlorhexidine diacetate monohydrate
AU RUPNIK, Živa
AA JERŠEK, Barbara (supervisor) / JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2013
TI EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND *Escherichia coli* STRAINS ON BIOFILM FORMATION
TD Graduation thesis (University studies)
NO XI, 49 p., 3 tab., 13 fig., 16 ann., 61 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The aim of our thesis was to examine the influence of environmental factors and *Escherichia coli* strains on biofilm formation. We optimised crystal violet assay in as a relatively fast method for the determination of biofilm formation on a polystyrene surface. We then, analyzed 13 human and food *E. coli* strains by monitoring biofilm formation from 24 to 72 hours. We classified strains based on the relative amount of biofilm on the polystyrene surface into 5 groups: strains which do not form biofilm, weak, medium, medium strong, strong and very strong biofilm formers. We found that the formation of biofilm on the polystyrene surface in *E. coli* depends on the bacterial strain and time. Human strains were stronger biofilm formers than food strains. *E. coli* ŽMJ135 strain formed the maximum amount of biofilm after 24 hours and *E. coli* ŽMJ128 strain after 48 and 72 hours. For further work, we selected *E. coli* ŽMJ128 and *E. coli* ŽMJ135 strains which were classified into a group of strong or medium strong biofilm formers. We used the selected strains to study the formation of biofilm on stainless steel and the impact of disinfectants on biofilm. We found that *E. coli* strain and time affect the amount of biofilm on stainless steel. Benzalkonium chloride (2 µg/mL) and chlorhexidine diacetate monohydrate (4 µg/mL) had no effect on biofilm formation in *E. coli* ŽMJ128 and *E. coli* ŽMJ135 strains. We then determined the influence of these disinfectants on *E. coli* cells in biofilm and planktonic cells. By *E. coli* ŽMJ128 strain, the added benzalkonium chloride did not affect the concentration of cells in biofilm and the concentration of planktonic cell. By *E. coli* ŽMJ135 strain added chlorhexidine diacetate monohydrate decreased the concentration of cells in biofilm, but it had no effect on the concentration of planktonic cells. The growth and development of biofilm was also monitored through the qualitative observation of microcolonies on a polystyrene surface.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOST BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>	3
2.2 BIOFILMI BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>	5
2.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>	6
2.3.1 Vpliv seva	7
2.3.2 Vpliv okoljskih dejavnikov	8
2.3.2.1 Pomen uporabe razkužil.....	9
2.4 OPIS IZBRANIH METOD ZA DOLOČANJE BIOFILMA	11
2.4.1 Določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom.....	11
2.4.2 Določanje biofilma s štetjem celic na kupončkih iz nerjavečega jekla.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 POTEK DELA	14
3.2 MATERIALI.....	16
3.2.1 Bakterije.....	16
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	16
3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem	18
3.2.4 Druge kemikalije in dodatki.....	19
3.2.5 Laboratorijska oprema.....	19
3.3 METODE DELA	20
3.3.1 Revitalizacija sevov	20
3.3.2 Priprava inokoluma	20
3.3.3 Določanje učinkovite koncentracije razkužil.....	20
3.3.3.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB	20
3.3.3.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici.....	22
3.3.4 Določanje biofilma.....	23
3.3.4.1 Določanje biofilma v mikrotiterski ploščici	23
3.3.4.2 Določanje biofilma na kupončkih iz nerjavečega jekla	24
3.3.4.3 Določanje tvorbe biofilma v petrijevih ploščah.....	25
3.3.5 Vpliv okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma	26

3.3.6	Vpliv razkužil na biofilm	27
3.3.7	Statistično vrednotenje rezultatov	29
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	30
4.1	OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA BIOFILMA S KRISTAL VIOLETOM..	30
4.2	VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i> IN ČASA NA TVORBO BIOFILMA NA POLISTIRENSKI POVRŠINI.....	31
4.3	VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i> NA TVORBO BIOFILMA NA NERJAVEČEM JEKLU	33
4.4	DOLOČITEV MINIMALNE KONCENTRACIJE RAZKUŽIL TRIKLOSAN, BENZALKONIJEV Klorid IN Klorheksidin diacetat monohidrat	34
4.5	DOLOČANJE UČINKOVITE KONCENTRACIJE RAZKUŽILA TRIKLOSAN	35
4.6	VPLIV RAZKUŽILA NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i> NA NERJAVEČEM JEKLU	36
4.6.1	Vpliv razkužil benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat na tvorbo biofilma	36
4.6.1.1	Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na tvorbo biofilma bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128.....	36
4.6.1.2	Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na tvorbo biofilma bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ135	38
4.7	VPLIV RAZKUŽIL BENZALKONIJEV Klorid IN Klorheksidin DIACETAT MONOHIDRAT NA BIOFILM	39
4.8	DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA V 14-DNEVNEM POSKUSU V PETRIJEVIH PLOŠČAH	41
5	SKLEPI.....	45
6	POVZETEK.....	46
7	VIRI	47

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> uporabljeni pri eksperimentalnem delu	16
Preglednica 2: Razvrstitev sevov bakterij vrste <i>E. coli</i> glede na količino tvorjenega biofilma.....	32
Preglednica 3: Vpliv različnih koncentracij razkužila triklosan na rast bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128.....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema določitve vpliva vrste seva bakterij vrste <i>E. coli</i> na količino biofilma na polistirenski površini.	14
Slika 2: Shema določitve vpliva okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma in na že tvorjen biofilm	15
Slika 3: Shema mikrotiterske ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije razkužil.	22
Slika 4: Shema določitve biofilma s štetjem celic na kupončkih iz nerjavečega jekla.	25
Slika 5: Določitev vpliva razkužil na tvorbo biofilma.	27
Slika 6: Shema določitve vpliva razkužil na biofilm	28
Slika 7: Realativna količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste <i>E. coli</i> določena z metodo barvanja s kristal violetom.	31
Slika 8: Koncentracija celic vezanih v biofilm in koncentracija planktonskih celic sevov bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128 in <i>E. coli</i> ŽMJ135.	34
Slika 9: Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na koncentracijo celic bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in na koncentracijo planktonskih celic	37
Slika 10: Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na koncentracijo celic bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ135 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in na koncentracijo planktonskih celic.....	38
Slika 11: Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na celice bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1- in 10-minutni izpostavitvi	39
Slika 12: Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na celice bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ135 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1- in 10-minutni izpostavitvi.....	40
Slika 13: Spremljanje tvorbe biofilma bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽMJ128 v gojišču TSB pri 30 °C na polistirenskih petrijevih ploščah	43

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 24-urni inkubaciji
- Priloga B:** Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 48-urni inkubaciji
- Priloga C:** Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 72-urni inkubaciji
- Priloga D:** Količina biofilma pri različnih sevih bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini določena z barvanjem s kristal violetom
- Priloga E:** Koncentracija celic sevov *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135 v biofilmu na nerjavečem jeklu
- Priloga F:** Koncentracija planktonskih celic sevov *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135
- Priloga G:** Določevanje MIC razkužila triklosan za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ128 z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici
- Priloga H:** Določevanje MIC razkužila triklosan za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ135 z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici
- Priloga I:** Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128 v tekočem gojišču TSB ob dodatku razkužila triklosan
- Priloga J:** Rast bakterij seva *E. coli* ŽMJ128 pri različnih koncentracijah razkužila triklosan
- Priloga K:** Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu ob dodatku razkužila benzalkonijev klorid
- Priloga L:** Koncentracija planktonskih celic seva *E. coli* ŽMJ128 ob dodatku razkužila benzalkonijev klorid
- Priloga M:** Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ135, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu, ob dodatku razkužila klorheksidin diacetat monohidrat
- Priloga N:** Koncentracija planktonskih celic seva *E. coli* ŽMJ135 ob dodatku razkužila klorheksidin diacetat monohidrat

Priloga O: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma razkužilu benzalkonijev klorid

Priloga P: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ135, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma razkužilu klorheksidin diacetat monohidrat

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔA	povprečna razlika absorbanc
ANOVA	analiza variance
BF	biofilm
BHI	gojišče BHI (ang. Brain Heart Broth)
BK	razkužilo benzalkonijev klorid
CFU	kolonijska enota (ang. colony forming unit)
H_0	ničelna domneva
H_1	alternativna domneva
KDM	razkužilo korheksidin diacetat monohidrat
KV	barvilo kristal violet
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
N	koncentracija celic
P	verjetnost
PC	planktonske celice
TSA	gojišče triptični soja agar (ang. Tryptone soya agar)
TSB	gojišče triptični soja bujon (ang. Tryptone soya broth)
ŽM	oznaka seva
ŽMJ	oznaka seva

1 UVOD

Varnost živil je ob prehranski vrednosti in senzorični kakovosti eden temeljnih kakovostnih parametrov hrane. Vsako leto veliko ljudi v industrializiranih državah, trpi zaradi bolezni, ki jih povzročajo patogeni organizmi v hrani. Tveganje, ki ga ti mikroorganizmi predstavljajo se še povečuje, če so jim omogočene razmere za rast in tvorbo biofilma.

Bakterije vrste *E. coli* so najbolj številčne fakultativno anaerobne bakterije v črevesni mikrobioti. Bakterije rastejo pri temperaturi med 10 in 45 °C, optimalna temperatura pri kateri rastejo pa je 37 °C. Nekatere vrste rastejo tudi v kislih živilih (pH 4,4 in manj). Večina sevov je nepatogenih za gostitelje, vendar pa so nekateri sevi pridobili različne virulentne dejavnike in tako postali patogeni, zato lahko pri ljudeh povzročajo različne nalezljive bolezni, najpogostejše okužbe sečil in črevesne okužbe. Najpogostejši je prenos z različnimi onesnaženimi živili in vodo. Možen pa je tudi neposreden prenos z dotikom.

Verotoksigeni sevi bakterij vrste *E. coli* se lahko prenašajo z okuženim mesom, zlasti mleto govedino, mesnimi izdelki, nepasteriziranim mlekom, nepasteriziranimi sadnimi sokovi, različno zelenjavo, vodo, lahko pa tudi ob stiku z okuženimi ljudmi in živalmi. Pomemben vir verotoksigenih sevov bakterij vrste *E. coli* so tudi prežvekovalci, zlasti govedo, ponekod tudi ovce.

Prisotnost bakterij vrste *E. coli* v živilih, ki so pripravljena za uživanje, kaže na nezadostno osebno higieno, posebno ne dovolj temeljito umivanje rok, nezadostno vzdrževanje higiene v kuhinji, nezadostno čiščenje opreme, pribora in naprav, križanje surovin in termično obdelanih živil, kar pogojuje sekundarno (naknadno kontaminacijo). Obolevajo vse starostne skupine, najbolj pa so prizadeti otroci do 5. leta starosti in starejši ljudje. Za okužbo je značilna majhna infektivna doza-manj kot 100 bakterijskih celic (Reid in sod., 1991).

Biofilm sestavlja skupina na površino pritrjenih mikroorganizmov, ki je zavita v polisaharidni matriks lastne izdelave. Nastanek biofilma daje zaščito mikroorganizmom pred neugodnimi razmerami in zagotavlja hranila, ki se lovijo v biofilm. Le ta se lahko tvori na trdnih površinah, ki so v stiku s tekočino ali na površini tekočin, ki so v stiku z zrakom. Strukture biofilma zato povzročajo probleme v industrijskih tankih z vodo, na neravnih in hrapavih površinah, ter na napravah in pripomočkih v živilsko pridelovalni industriji. V naši diplomski nalogi smo raziskovali tvorbo biofilma pri bakterijah vrste *Escherichia coli*.

Sevi bakterij vrste *E. coli* imajo sposobnost tvoriti biofilme na različnih površinah. Zaradi tega predstavljajo velik problem v živilski industriji. Obstoje biofilmov brez zunajceličnih polisaharidov (EPS) ne bi bil mogoč. EPS igrajo namreč ključno vlogo pri razvoju biofilma hkrati pa predstavljajo fizično bariero, ki ščiti celice v biofilmu pred okoljskim stresom in različnimi protibakterijskimi razkužili (Ryu in Beuchat, 2005). V biofilmu so bakterije vrste *E. coli* zaščitene proti delovanju protimikrobnih snovi. Na ta način bakterije vrste *E. coli* preživijo protimikrobno terapijo ter tvorijo nov biofilm.

V diplomski nalogi smo obravnavali različne humane in živalske seve bakterij vrste *E. coli*. Želeli smo namreč ugotoviti, kateri izmed sevov bakterij vrste *E. coli*, ki smo jih obravnavali, so močni tvorci biofilma in na kakšen način lahko zmanjšamo ali preprečimo tvorbo biofilma pri teh sevih.

Odpornost celic bakterij vrste *E. coli* v biofilmih proti protimikrobnim snovem in sposobnost prilagoditve na različne okoljske dejavnike je precejšen problem, zato so poznavanje in razumevanje različnih vplivov na tvorbo biofilma, ter proučevanje mehanizmov odpornosti pomembni dejavniki pri obvladovanju kontaminacij in okužb s temi bakterijami.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo naslednje delovne hipoteze:

- Za primerjavo količine biofilma bakterij vrste *E. coli* je primerna metoda barvanja s kristal violetom.
- Različni sevi bakterij vrste *E. coli* tvorijo glede na izvor seva različne količine biofilma.
- Tvorba biofilma bakterij vrste *E. coli* je manjša v prisotnosti razkužila.
- Celice bakterij vrste *E. coli* v biofilmu so bolj odporne na razkužilo kot planktonske celice.
- Rast in razvoj biofilma lahko spremljamo s kvalitativnim opazovanjem mikrokolonij na polistirenski površini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOST BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

Escherichia coli je gramnegativna bakterija paličaste oblike. Leta 1885 jo je prvi opisal Theodor Escherich. Spada med γ -proteobakterije in je tipska vrsta družine Enterobacteriaceae.

Za bakterije te družine je značilno da so gibljivi, fakultativno anaerobni organizmi katerih optimalna temperatura za rast je 37 °C. Razgrajujejo glukozo in laktozo ob tvorbi kisline in plina. Posamezne tipe ločimo na osnovi O (somatičnih), K (ovojničnih) in H (flagelarnih) antigenov. Najdemo jih kot del normalne črevesne flore ljudi in živali s stalno telesno temperaturo. Bakterije vrste *E. coli* so komenzali, saj fermentirajo za nas neprebavljive snovi, v prebavilih ščitijo pred vdorom patogenih bakterij in sintetizirajo vitamin K in biotin (Madigan in sod., 2003; Nataro in Kaper, 1998).

Bakterije vrste *E. coli* (tip I) so najpogosteje uporabljen indikatorski mikroorganizem sveže fekalne kontaminacije. Tvorijo plin in kislino iz laktoze pri temperaturi 44 °C do 45,5 °C in sodijo med fekalne koliformne bakterije. Na mesu, ribah, v mleku ipd. se hitro razmnožujejo in povzročajo zakisanje ter kvar (Adamič in sod., 2003). Bakterije vrste *E. coli* uporabljamo tudi kot indikatorski mikroorganizem za onesnaženje s fekalijami (Scott in sod., 2002).

Virulentni sevi bakterij vrste *E. coli* povzročajo zunajčrevesne okužbe in okužbe v prebavilih pri ljudeh in živalih. Največkrat povzročajo infekcije urinarnega trakta, sepsa, meningitis, pljučnico, vnetje rodil in različne oblike drisk. Glede na okužbe, ki jih povzročajo, jih delimo v naslednje skupine (Andlovic, 2002):

- Enterohemoragične bakterije vrste *E. coli* (EHEC): proizvajajo Šigove toksine, najbolj znana bakterija, ki spada v to skupino je bakterija vrste *E. coli* 0157:H7
- Enterotoksigene bakterije vrste *E. coli* (ETEC): nekatere izdelujejo toplotno obstojen toksin EAST1
- Enteropatogene bakterije vrste *E. coli* (EPEC): zapis za glavne virulene dejavnike je na otoku patogenosti LEE (lokus izbrisa enterocitov)
- Enteroagregativne bakterije vrste *E. coli* (EAEC, EAggEC): lahko izdelujejo enterotoksine ShET1 (Shigella enterotoxin 1) in EAST1 (ast1) ter citotoksine
- Enteroinvazivne bakterije vrste *E. coli* (EIEC): zelo so podobne bakterijam rodu *Shigella*, z virulenco so povezani številni geni na kromosomu in plazmidih, poznano je omejeno število serotipov EIEC
- Uropatogeni sevi bakterij vrste *E. coli* (UPEC)

Patogenost pri bakterijah vrste *E. coli* danes pripisujejo toksinom, ki jih izločajo posamezni serotipi. Največkrat gre za dve vrsti toksinov in sicer enterotoksini in endotoksini. Za enterotoksine velja, da učinkujejo v črevesju in povzročajo profuzno drisko. Izločajo jih le nekateri patogeni sevi bakterij vrste *E. coli*. Za razliko od enterotoksinov, imajo endotoksini več komponent in s tem povezano tudi mnogostransko delovanje. Poglavitna dejavnika patogenosti sta dobra sposobnost pritrjevanja na črevesno steno in izločanje le-teh.

Razlikovanje med posameznimi sevi bakterij vrste *E. coli* je zelo pomembno, saj lahko na ta način ugotovimo vir okužbe, pot prenosa in tudi kontaminacije. Vsi patogeni sevi povzročajo drisko, nekateri med njimi pa tudi bruhanje.

Prenos okužbe na človeka je največkrat z okuženo hrano ali vodo, prek stika z živalmi, možen pa je tudi neposreden prenos z dotikom človek-človek. V literaturi se kot najpogostejši vir okužbe pojavljajo naslednja živila: surovo (nepasterizirano mleko) in siri, goveje meso, različne vrste zelenjave in nepasterizirani sadni sokovi (IVZ, 2011).

Verotoksigeni sevi bakterij vrste *E. coli* se lahko prenašajo z okuženim mesom, zlasti mleto govedino, mesnimi izdelki, nepasteriziranim mlekom, nepasteriziranimi sadnimi sokovi, različno zelenjavo in vodo, lahko pa tudi ob stiku z okuženimi ljudmi in živalmi. Pomemben vir verotoksigenih sevov bakterij vrste *E. coli* so tudi prežvekovalci, zlasti govedo, ponekod tudi ovce. Za verotoksigene seve bakterij vrste *E. coli* (VTEC) je značilno, da izdelujejo verotoksine, pri okužbi pa lahko pride do zelo nevarnih zapletov kot sta hemolitično-uremični sindrom (HUS) in trombotična trombocitopenična purpura (TTP) (Trkov in sod., 2012).

Po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ang. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) in Evropske organizacije za varno hrano (ang. European Food Safety Authority, EFSA) se je incidenca okužb z VTEC v evropskih državah v letu 2011 povečala za kar 160 % v primerjavi z letom 2010. Povečanje incidence je povezano z izbruhom infekcije z verotoksigenimi sevi bakterij vrste *E. coli* O104:H4 leta 2011 v Nemčiji. Okuženih je bilo več tisoč ljudi, mnogi od njih so kot posledico tega imeli krvavo drisko in HUS, 40 % ljudi pa je za posledicami te okužbe umrlo. Kot najverjetnejši vzrok okužbe z bakterijo vrste *E. coli* O104:H4 so bili navedeni kontaminirani kalčki. Ta izbruh je pokazal potrebo po kontrolnih ukrepih za zagotovitev mikrobiološke varnosti surove hrane in skrbne higiene pri že vnaprej pripravljeni hrani (EFSA, 2013; ECDC, 2011).

Po podatkih ECDC in EFSE za leto 2011 je bilo večje število okužb z VTEC v poletnih mesecih (julij, avgust), zlasti s sevi serološke skupine O157, medtem ko so bile okužbe z drugimi serološkimi skupinami manj odvisne od letnega časa. Vir okužbe z VTEC pri sevu bakterij vrste *E. coli* O157 je bilo govedo in goveje meso. Bakterije pa so bile najdene še v mleku in mlečnih izdelkih, semenih, kalčkih, zelenjavi ter ostali hrani. Slovenija za dokazovanje okužbe z VTEC v hrani uporablja PCR v realnem času (EFSA, 2013; ECDC 2011).

Glede na podatke ECDC in EFSE je bilo v letu 2011 največ bolnikov okuženih z VTEC starih do 4 leta, pri drugih starostnih skupinah pa je bila incidenca okužb nižja (EFSA 2013; ECDC 2011).

V pričujoči raziskavi ECDC in EFSE je bilo ugotovljeno, da je prišlo do težjih oblik poteka bolezni, kot so krvava driska, HUS (hemolitično-uremični sindrom) in TTP (trombotična trombocitopenična purpura) predvsem pri majhnih otrocih (starih manj kot pet let). So pa bili ugotovljeni primeri tudi v starostni skupini med 5. in 14. letom in pri starejših ljudeh.

Najpogostejše serološke skupine povezane s HUS in tudi s krvavo drisko so bile poleg O157 še O104, O26, O103, O91, O145 (EFSA 2013; ECDC 2011).

Pri tolmačenju podatkov iz letnega poročila o nadzoru živil v letu 2011 (ang. FoodNet 2011 Surveillance Report), ter po podatkih letnega epidemiološkega poročila (ang. Annual Epidemiological Report 2012) je potrebno upoštevati uporabljeni sistem spremljanja in metodologijo odkrivanja VTEC v posameznih državah, saj sta se oba s časom spreminjala (CDC, 2012; ECDC, 2011).

Nekatere države so v določenih letih poročale vse okužbe z bakterijami vrste *E. coli*, vključno z VTEC, nekatere pa zgolj okužbe z VTEC O157. Odkrivanje patogenih bakterij vrste *E. coli* vključno z verotoksigenimi sevi bakterij vrste *E. coli* je v primerjavi z odkrivanjem nekaterih drugih črevesnih bakterij dokaj zahtevno, pogosto dolgotrajnejše in tako povezano z večjimi stroški. Podatki o okužbah s temi bakterijami zato v Sloveniji in v svetu ne odražajo dejanskega stanja (Trkov in sod., 2012).

2.2 BIOFILMI BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

Biofilmi so mikrobni skupki obdani z zunajceličnim matriksom. Le tega v največji meri sestavljajo izvencelične polisaharidne snovi in proteini. Komponente, ki obdajajo matriks biofilma imenujemo zunajcelične polimerne substance (ang. Extracellular polysaharide substances, EPS). Te ščitijo bakterije v biofilmu pred okoljskimi stresnimi dejavniki kot so razkužila, temperatura, kislost in drugi. Biofilmi se tvorijo povsod, kjer so v stiku trdna podlaga, voda in za življenje sposobni mikroorganizmi (Smole Možina, 2004).

Razvoj biofilma v splošnem poteka v večih fazah (Kumar in Anand, 1998):

1. Ustvarjanje ugodnih razmer za razvoj mikroorganizmov. Višja kot je koncentracija hranil na površini, ugodnejše so razmere za rast. Pomembna je tudi sama struktura površine. Če le ta ni gladka, se celice vanjo lažje ujamejo (les, nerjaveče jeklo, guma).
2. Sledi reverzibilno pritrjevanje celic s pomočjo površinskih adhezinov in nastanek enojnega sloja bakterij. Te s svojim premikanjem tvorijo večslojno mikrokolonijo.
3. Ireverzibilno pritrjevanje celic je vezano na mehanizme bakterijskega pritrjevanja, kamor uvrščamo gibljivost celic, oziroma prisotnost flagel in drugih površinskih izrastkov. Pomembno vlogo v tej fazi imajo tudi mulekule EPS, ki povečajo interakcije med mikroorganizmi in omogočajo pritrjevanje planktonskih celic v okolici.

Rezultat vseh treh procesov je nastanek zrelega biofilma tridimenzionalne strukture (Lemon in sod., 2008). Zgradba biofilma je zelo heterogena in odvisna od mnogih dejavnikov. V največji meri vplivajo na zgradbo biofilma mikroorganizmi in njihove medsebojne interakcije.

Biofilm sestavlja mešanica bioloških komponent in vode (< 97 %), mikrobne celice različnih vrst (<1 – 2 %), zunajcelični polisaharidi (EPS 1 – 2 %), zunajcelični proteini (< 1

– 2 %), nukleinske kisline (< 1 – 2 %) in vezani ter prosti ioni (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007).

Biofilm so sposobne tvoriti mnoge po Gramu pozitivne kot tudi po Gramu negativne bakterije in nekatere glive. Tvorba biofilmov je njihova strategija preživetja v težkih razmerah (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007). Bakterije v biofilmu so pokazale večjo odpornost na antibiotike, detergente in biocide za razliko od planktonskih celic (Lewis 2001; Mah&O'Toole 2001; Stewart&Costerton, 2001). Razvoj biofilma zahteva koordinacijo, interakcijo in komunikacijo med mnogimi bakterijskimi vrstami. Proces je visoko reguliran in nanj vplivajo tudi dejavniki okolja (temperatura, osmolarnost, pH, kisik in železo) (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007).

Biofilmi so največkrat škodljive strukture v industrijskih sistemih. Obračanje z mikroorganizmi je posebj problematično v sistemih, kjer so materiali v stalnem stiku z vodo kar vključuje na primer toplotne izmenjevalce, ladijske trupe in ribje kletke (Braithwaite in McEvoy, 2005; Coetser in Cloete, 2005; Flemming, 2002). Biofilmi pa lahko z zagotavljanjem ugodnega okolja patogenim mikroorganizmom, kot so bakterije vrste *Legionella pneumophila* in *E. coli* predstavljajo tudi zdravstveno tveganje za ljudi (Flemming, 2002; Juhna in sod., 2007).

V pitni vodi so biofilmi odgovorni za večino prisotnih bakterij. Po drugi strani pa so zaželeni v prehrambeni industriji, na primer v proizvodnji jogurta, kjer so odgovorni za njegovo konsistenco.

Sevi bakterij vrste *E. coli* imajo sposobnost tvoriti biofilme na različnih površinah. Zaradi tega predstavljajo velik problem v živilski industriji. Obsto biofilmov brez zunajceličnih polisaharidov ne bi bil mogoč. EPS igrajo namreč ključno vlogo pri razvoju biofilma, hkrati pa predstavljajo fizično bariero, ki ščiti celice v biofilmu pred okoljskim stresom (Ryu in Beuchat, 2005). Poleg tega so celice vezane v biofilm veliko bolj odporne na antibiotike in dezinfekcijska sredstva, kakor prosto živeče planktonske celice (Lewis, 2001).

2.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

Biofilm je funkcionalna združba mikroorganizmov, pritrjenih na podlago in obdanih z zunajceličnimi polisaharidnimi snovmi, ki jih proizvajajo mikroorganizmi sami (Kumar in Anand, 1998). Bakterije, ki rastejo v biofilmu, se občutno razlikujejo od odgovarjajočih planktonskih oblik po ekspresiji genov, celični fiziologiji in po močno povečani odpornosti proti zunanjim vplivom okolja. Biofilmi zato predstavljajo velik problem v industriji in najboljši pristop za reševanje tega problema je preprečevanje nastanka biofilma.

Sem sodi v prvi vrsti dobra higienska praksa, s katero preprečujemo nastajanje mikrobnih biofilmov in s tem možnosti razvoja odpornejših oblik mikroorganizmov. Poleg izbora ustreznih postopkov čiščenja (od klasičnih mehanskih, do kemijskih in celo bioloških kot

je uporaba bakteriocinov) in pogostosti čiščenja je zelo pomemben tudi izbor opreme z ustrezno konstrukcijsko oblikovanostjo, hidrofilnostjo in topografijo površine, ki je obstojna tudi po številnih čiščenjih. Med pomembne uspešne načine preprečevanja razvoja odpornejših oblik mikroorganizmov sodi uporaba kombiniranih postopkov konzerviranja, ter ustrezna uporaba protimikrobnih sredstev (Smole Možina, 2004).

Bakterije vrste *E. coli* so prevladujoča vrsta med fakultativnimi anaerobnimi bakterijami gastrointestinalnega trakta, kjer s svojimi strukturnimi lastnostmi vplivajo na več vrst biofilmov v okolju (Costerton in sod., 1995; Probert in Gibson, 2002).

2.3.1 Vpliv seva

Tvorba biofilma pri bakterijah vrste *E. coli* je odvisna od samega seva bakterij, vpliva pa seveda tudi vrsta materiala na katerem se ta biofilm tvori in lastnosti tega materiala (Rivas in sod., 2007)

Pri gramnegativnih bakterijah kot so bakterije vrste *E. coli* in bakterije rodu *Salmonella* je nastanek biofilma odvisen od flagel, ki jih te bakterije uporabljajo za širjenje po površini (Pratt in Kolter, 1998). Po navedbah Pratt in Kolter (1998) prispeva k oblikovanju biofilma bakterij vrste *E. coli* tudi sama gibljivost bakterij. V produkciji s tankimi, navitimi fimbriji (ang. Curli production) so bile flagele nepogrešljiv del za pritrjevanje in nastanek biofilma (Prigent-Combaret in sod., 2000). Komunikacija med celicami je prav tako pomembna za razvoj samega biofilma pri gramnegativnih bakterijah. Pilusi, ki sodelujejo pri celični komunikaciji so namreč odgovorni za obliko zrelega biofilma pri bakterijah vrste *E. coli* K-12 (Davies in sod., 1998; Huber in sod., 2001; Lynch in sod., 2002).

Za stabilizacijo in izgradnjo biofilma je pomembna tudi izmenjava genskega materiala med bakterijami. Med fiziološko različnimi tipi mehanizmov izmenjave DNA med bakterijami so najbolj poznane konjugacija, transdukcija in transformacija.

Reisner in sod. (2003) so raziskovali vpliv flagel na tvorbo biofilma in eden od zaključkov njihove raziskave je bil, da so flagele, fimbrije tipa 1 in antigen 43 (Ag43) nepomembni za zorenje in oblikovanje biofilma pri bakterijah vrste *E. coli*. Prigent Combaret in sod. (2000) so prav tako preučevali gibljivost celic in zaključili, da prisotnost flagel ni nujna za njihovo pritrjevanje na površino, niti za oblikovanje biofilma. So pa na podlagi dobljenih rezultatov Reisner in sod. (2003) dokazali da je razvoj biofilma odvisen od dejavnikov celičnega pritrjevanja, ki delujejo kot indikatorji samozdruževalnih procesov in so v različno strukturiranih biofilmih odvisnih od samih pritrjevalnih lastnosti na površini celic. Pratt in Kolter (1998) sta v svojih raziskavah pokazala, da gibljivost bakterij v gojišču z minimalno količino glukoze vpliva na oblikovanje biofilma pri bakterijah vrste *E. coli*. Prav tako sta ugotovila, da vstavljanje mutantskih celic v biofilm moti gibljivost bakterij vrste *E. coli*.

Nasprotno so Sauer in sod. (2000) ugotovili, da so najbolj pomemben dejavnik za nastanek in oblikovanje biofilma pri bakterijah vrste *E. coli* fimbrije tipa 1. Le-te so izražene pri komenzalnih kot tudi pri patogenih sevih bakterij vrste *E. coli*. Ključne naj bi bile

predvsem za pritrdjevanje bakterij vrste *E. coli* na nežive podlage (Harris in sod., 1990; Prat in Kolter, 1998; Cookson in sod., 2002; Moreira in sod., 2003; Orndorff in sod., 2004). Njihovo izražanje je v največji meri odvisno od celične sestave zunanje membrane (Orndorff in sod., 2004). Prisotnosti različnih zunaj-membranskih proteinov namreč zmanjša izražanje fimbrijev tipa 1 pri bakterijah vrste *E. coli* (Otto in sod., 2001)

Bakterije prav tako izdelujejo posebne površinske molekule MSCRAMM (angl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), ki jim omogočajo naselitev in pritrditev na različne površine gostitelja v področju, kjer so najbolj zaščitene pred škodljivimi vplivi iz okolja, kot so osmozni šok, izsušitev ali vdor baktericidnih sredstev. Ključna zaščitna sestavina v mikrookolju biofilma pa še vedno ostaja zunajcelični matriks (Davey in O'Toole, 2000).

Povečana odpornost bakterij v biofilmu verjetno ni toliko rezultat difuzijske bariere biofilma, ampak v večji meri zgoraj omenjenih fizioloških mehanizmov bakterij na okoljske razmere življenja (Potočnik, 2009).

2.3.2 Vpliv okoljskih dejavnikov

Na tvorbo biofilma bakterij vrste *E. coli* vplivajo mnogi okoljski dejavniki kot so pH, temperatura in hranila (Chaturongkasarumit in sod., 2010).

Morfologija biofilma niha glede na uporabljen sev in okoljske razmere (Corona-Izquierdo in sod., 2002). Okolje vpliva na številne lastnosti biofilma, med katere sodijo poroznost, gostota, vsebnost vode, naboj, adsorbcija, ionsko izmenjevalne lastnosti, hidrofobnost in mehanska stabilnost (Wingender in sod., 1999).

Za rast celic v biofilmu velja, da je le ta največja na površini, medtem ko je znotraj biofilma manjša. Glavni vzrok za zmanjšano rast je pomankanje hranil znotraj samega biofilma.

V naravi lahko biofilm nastane na različnih površinah, na primer na trdnih površinah, ki so v stiku s tekočino ali na površini tekočin, ki so v stiku z zrakom (Keevil, 2003).

Različne študije kažejo, da se bakterije vrste *E. coli* 0157:H7 zlahka pripnejo in tvorijo biofilm na različnih podlagah kot so: nerjaveče jeklo, steklo in polistiren. Pauer in sod. (2005) so ugotovili, da se določeni sevi bakterij vrste *E. coli* bolje pripenjajo na hidrofobno površino (polistiren), kot pa na hidrofilno površino (kovina in steklo). Za klinične seve pa velja, da tvorijo malo biofilma na nerjavečem jeklu in skoraj nič biofilma na mikrotiterskih ploščah v obliki planktonskih celic (Djordjevic in sod., 2002).

Vpliv hranil na tvorbo biofilma se v objavljenih izsledkih razlikuje od avtorja do avtorja. Po navedbah Ryu in sod. (2004) in Dewanti in Wong (1995) bakterije vrste *E. coli* 0157:H7 razvijejo biofilm hitreje in tudi v večjih količinah, če rastejo v okolju z manj hranilnimi snovmi. Ito in sod. (2008) so prav tako opisovali, da je za razvoj biofilma

pomembna faza stradanja, oziroma stacionarna faza. Spet drugi (Buhler in sod., 1998) navajajo, da je bila tvorba biofilma bakterij vrste *E. coli* v gojišču z dodano glukozo večja kot v gojišču brez dodane glukoze. Portenier in sod. (2005) pa so ugotovili, da bakterije v biofilmu z zmanjšanjem dejavnikov (hranil in energije), ki so odgovorni za presnovne procese preidejo v počasi rastočo oziroma nerastočo stanje. Bakterije se na stresne dejavnike prilagodijo tudi tako, da okoljski dejavniki spodbudijo izražanje genov, ki sintetizirajo posebne beljakovine, ki bakterijam omogočajo spremembo fenotipa (Fux in sod., 2005). Horn in sod. (2001) pa navajajo, da so za razvoj biofilma v največji meri krive dinamične razmere in hranila v okolju. Le-ti vplivajo na strukturo, gostoto in tudi debelino biofilma.

Veliko avtorjev je dokazalo, da oblikovanje biofilma oziroma bakterijsko pritrjevanje povečuje odpornost bakterij na različne fizikalne strese, kot so vpliv različnih razkužil in pH-ja. Rast bakterij v biofilmu se tako kaže v izčrpavanju hranil v samem biofilmu, v zmanjšanem dostopu protimikrobnih sredstev celicam v biofilmu, produkciji razgradnih encimov in tudi v nevtraliziranju kemikalij (Fazlara in sod., 2012).

2.3.2.1 Pomen uporabe razkužil

Sanitacija v živilstvu je pomemben parameter za zagotavljanje zdravstvene ustreznosti končnih proizvodov. Pri tem je zelo pomembna sama kontrola kakovosti živilskega proizvoda, kakor tudi samega proizvodnega okolja. Razkuževanje, ki je del sanitacije, je postopek, s katerim zmanjšamo število mikroorganizmov, zlasti patogenih do te mere, da je možnost okužbe znatno manjša. Z razkuževanjem pri večini okužb ne moremo odstraniti bakterijskih spor, nekatere vrste razkužil pa ne uničijo niti vseh vrst vegetativnih bakterijskih celic.

Razkužila so kemične snovi, ki delujejo bakteristatično (zavirajo rast mikroorganizmov) in baktericidno (ubijajo mikroorganizme). Spor ponavadi ne uničijo. Ker so te snovi bolj toksične kot antiseptiki, jih uporabljamo le na delovnih površinah. Pomembno je, da je razkužilo pravilno izbrano glede na spekter delovanja, tip okolja, ter čas in temperaturo optimalnega delovanja razkužila. Pri izbiri moramo upoštevati varnost, učinkovitost in kompatibilnost (Crawford in sod., 2000).

Bakterije v biofilmu imajo povečano odpornost proti protimikrobnimi snovem (Gilbert in sod., 2001; Saginur in sod., 2006). Za povečano odpornost celic v biofilmu so odgovorne polisaharidne komponente pripete na zunajcelični polimerni material, ki reagirajo z antimikrobnimi snovmi in tako preprečijo njihovo penetracijo.

Ryu in Beuchat (2005) sta preučevala občutljivost celic bakterij vrste *E. coli*, ki sta jih izpostavila kloru. Pri tem sta ugotovila, da so celice seva *E. coli* 43895-EPS bolj odporne na klor, kot celice sevov *E. coli* ATTC 43895- in celice sevov *E. coli* ATTC 43895+. Prav tako so bile te celice v biofilmu bolj odporne, kot planktonske celice v suspenziji. To se sklada s teorijo, da EPS ščitijo celice pred biocidnim učinkom klora. Preučevala sta tudi vpliv temperature na celice seva *E. coli* 43895-EPS pri tretiranju s klorom in prišla do zaključkov, da se je populacija celic pri 22 °C izrazito zmanjšala, medtem ko pri istem

tretiranju s klorom pri 12 °C ni bilo mogoče opaziti znatnega zmanjšanja celic. Pri tretiranju celic seva *E. coli* 43895-EPS s 25 µg/mL klora, so bile celice, ki so zrastle pri 22 °C inaktivirane v 3 minutah, medtem ko so celice zrastle pri 12 °C ostale žive še po 10 minutni obdelavi s klorom.

Ryu in Beuchat (2005) sta proučevala tudi vpliv gojišča in prišla do zaključkov, da so bile celice, ki so zrastle na gojišču mTSA (modificiran triptični soja agar) bolj odporne na klor, kot celice, ki so zrastle na gojišču HLJA (angl. heated lettuce juice agar). Nižja temperatura (12 °C proti 22° C) in manj hranil (gojišče HLJA proti gojišču mTSA) je pomenila večjo tvorbo zunajceličnih ogljikohidratnih kompleksov (EEC angl. extracellular carbohydrate complexes), ki podobno kot EPS zaradi svojih mehanizmov delovanja pomenijo večjo odpornost na klor.

Namen raziskave Fazlare in sod. (2012) je bilo preučiti občutljivost grampozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* in *Bacillus cereus*) in gramnegativnih bakterij (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*) na razkužilo benzalkonijev klorid. Njihovi rezultati so pokazali, da so grampozitivne bakterije veliko bolj občutljive na razkužilo benzalkonijev klorid kot gramnegativne bakterije. To lahko povežemo s tem, da imajo gramnegativne bakterije notranjo membrano in zunanjo membrano v katero so vgrajeni lipopolisaharidi. Narava in zgradba celične površine se razlikujeta glede na tip celice in glede na spremembe okolja celice. Interakcija s celično površino je tako lahko ključnega pomena za celični obstoj. Nekatera razkužila namreč reagirajo z zunanjimi celičnimi komponentami in pri tem povzročijo spremembo celične hidrofobnosti. Tako poškodujejo celično steno, kar jim omogoči dostop do celične membrane ali vstop v celico, kjer delujejo na svoja tarčna mesta.

Braoudaki in sod. (2004) so proučevali odpornost sevov bakterij vrste *E. coli* K-12, *E. coli* O55 in *E. coli* O157:H7. Prišli so do zaključka, da neustrezna in hkrati prevelika uporaba antibiotikov in protimikrobnih sredstev, na primer triklosana, vodijo v vedno večjo odpornost sevov na le te. To pa predstavlja veliko grožnjo tako živilski industriji, kot tudi vsem ostalim. Zato je priporočljiva uporaba širokega spektra različnih razkužil, da se izognemo razvoju odpornosti, oziroma selekciji odpornih sevov v okolju, ki je pogosto dezinficiran.

Poleg tega vpliva na povišano odpornost tudi dejstvo, da lahko celice v spodnjih slojih biofilma sprožijo številne stresne odzive, ki jih tudi naredijo bolj odporne na antibiotike (Sauer, 2003; Beloin in Ghigo, 2005).

Bakterije vrste *E. coli* so v biofilmu zaščitene pred protimikrobnimi snovmi kar jim omogoča, da preživijo protimikrobno terapijo ter tvorijo nov biofilm. Lahko zaključimo, da so mehanizmi odpornosti tako zelo različni kot so različni tudi načini njihovega preprečevanja. Poleg dobre higienske prakse, je dovolj pogosta uporaba ustreznih postopkov čiščenja poglavitni dejavnik pri preprečevanju nastajanja mikrobnih biofilmov in s tem tudi razvoja odpornejših oblik mikroorganizmov.

2.4 OPIS IZBRANIH METOD ZA DOLOČANJE BIOFILMA

V zadnjih desetletjih je bilo za *in vitro* preučevanje nastanka in razvoja biofilmov objavljenih veliko metod (McLean in sod., 2004). Le-te vključujejo:

- direktne metode za štetje bakterijskih celic, med katere spadajo različne mikroskopske tehnike (presvetlitvena mikroskopija, epifluorescenčna mikroskopija in vrstično elektronska mikroskopija (angl. SEM Scanning Electron Microscopy))
- in indirektne metode, med katere uvrščamo določitev števila kolonijskih enot, radioaktivno označevanje, spektrofotometrijo za obarvane bakterije, ATP-bioluminiscenčni test in verižno reakcijo s polimerazo z uporabo specifičnih sond (Yuehwei in Friedman, 1997).

Za naše delo smo glede na namen diplomske naloge izbrali dve metodi:

- Metodo določanja biofilma bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini z barvanjem s kristal violetom in spektrofotometričnim merjenjem absorbance (Burton in sod., 2007; Stepanovič in sod., 2007; Harvey in sod., 2007; Wakimoto in sod., 2004; Rivas in sod., 2007).
- Metodo določanja količine biofilma s štetjem bakterij vrste *E. coli* na kupončkih iz nerjavečega jekla (Belessi in sod., 2011; Rivas in sod., 2007; Ryu in sod. 2004; Chavant in sod., 2004).

2.4.1 Določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom

V zadnjih letih se za študij biofilmov različnih bakterijskih celic vse bolj uveljavlja metoda, pri kateri se biofilme spremlja v mikrotiterskih ploščicah. Sistem proučevanja je podoben kot v zaprtem bioreaktorju, kjer ni pritoka oziroma odtoka snovi med samimi poskusom (Heersink in Goeres, 2003).

Barvanje s kristal violetom (KV) je prvič opisal Christensen in sod. (1985). KV je osnovna barva, ki se veže na negativno nabite površinske mulekule in polisaharide v zunajceličnem matriksu (Li in sod., 2003). Postopek barvanja s KV ne omogoča vizualizacije celic, saj obarva tako žive, kot tudi mrtve celice (Stepanovic in sod., 2000). Njegove prednosti so nizka cena, ker je majhna poraba materialov, saj se vse faze izvajajo v mikrotiterski ploščici in da je postopek uporaben za širok spekter mikroorganizmov v relativno kratkem času. Prednost te metode je tudi, da zagotavlja zanesljive rezultate. Metoda je bila preizkušena za določanje vplivov različnih antibiotikov, razkužil in tudi izvlečkov rastlin (Heilmann in sod., 1996; O'Toole in Kolter, 1998).

Metoda omogoča raziskovalcem enostavno spremljanje tvorbe biofilma pri spreminjanju različnih parametrov, kot so sestava rastnega medija, temperatura inkubacije, vlažnost, prisotnost ali odsotnost strižne napetosti ter koncentraciji kisika in ogljikovega dioksida (Krom in sod., 2007; Stepanovic in sod., 2003).

Slabost metode barvanja s kristal violetom je v dejstvu, da ne razlikuje med živimi in mrtvimi celicami (Pitts in sod., 2003), ter da je ponovljivost rezultatov slaba, kar se je

pokazalo tudi pri poskusu tvorbe biofilma pri sevih bakterij vrste *P. aeruginosa* (Peeters in sod., 2007). Zato je potrebno večje število paralelnih vzorcev.

Metode za določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom se od avtorja do avtorja razlikujejo (Burton in sod., 2006; Stepanović in sod., 2007; Harvey in sod., 2007; Wakimoto in sod., 2004; Rivas in sod., 2007; Djordevic in sod., 2002). Razlike med objavljenimi metodami so bile v uporabljenih koncentracijah barvila kristal violet, različne so bile tudi temperature in časi inkubacije, ter načini merjenja absorbance in valovna dolžina pri kateri so merili absorbanco.

Glavne faze določanja biofilma s KV pa se med omenjenimi avtorji niso bistveno razlikovale. Namnoženo kulturo bakterij vrste *E. coli* so avtorji po večini razredčili z gojiščem TSB. Nekateri med njimi (Rivas in sod., 2007) so uporabili gojišče NB (hranljivi bujon, angl. nutrition broth), spet drugi (Djordevic in sod., 2002) pa gojišče MWB (modificirano Welshimer gojišče, ang. Modified Welshimer's broth). Kulturo razredčeno v izbranem gojišču so nato prenesli v luknjice na mikrotitrski ploščici. Zadnji stolpec na mikrotitrski ploščici je predstavljala negativna kontrola v kateri je bilo le gojišče. Ploščico so nato inkubirali pri določeni temperaturi. Čas in temperatura inkubacije se je med opisi avtorjev razlikovala. Tako so Rivas in sod. (2007) namnoženo kulturo inkubirali pri 25 °C za 24 in 48 ur, Wakimoto in sod. (2004) pri 37 °C za 18 ur, Burton in sod. (2006) pa pri 26 °C in 37 °C za 24 ur. V obzir smo vzeli tudi podatke raziskav Harvey in sod. (2007), ki so namnoženo kulturo inkubirali pri 20 °C za 24, 48 in 72 ur, Stepanovića in sod. (2007), ki so namnoženo kulturo inkubirali 24 ur pri 35 °C - 37 °C ter Djordevica in sod. (2002), ki so namnoženo kulturo inkubirali 20 in 40 ur pri 32 °C.

Po inkubaciji kulture na polistirenski površini mikrotitrski ploščice je bila kultura odstranjena. Sledilo je spiranje s sterilno fiziološko raztopino, oziroma sterilno destilirano vodo in nato 15- do 30-minutno sušenje mikrotitrski ploščice pri sobni temperaturi.

V osušene luknjice mikrotitrski ploščice so nato dodali kristal violet. Same koncentracije in časi učinkovanja kristal violeta so se med avtorji očitno razlikovale. Rivas in sod. (2007), Harvey in sod. (2007) ter Djordevic in sod. (2002) so uporabili 1 % kristal violet, ki so ga pustili učinkovati 45 minut, Wakimoto in sod. (2004) so uporabili 0,5 % kristal violet, ki so ga pustili učinkovati 5 min, Burton in sod. (2006) so uporabili 0,4 % kristal violet, ki so ga pustili učinkovati 15 min, Stepanović in sod. (2007) pa so uporabili 2 % kristal violet, katerega so pustili učinkovati 15 minut. Po odstranitvi kristal violeta je ponovno sledilo spiranje s sterilno fiziološko raztopino, oziroma sterilno destilirano vodo.

Količino tvorjenega biofilma so Rivas in sod. (2007) ter Harvey in sod. (2007) določali z dodatkom 95 % etanola v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici, kateri so potem izmerili absorbanco pri 595 nm. Djordevic in sod. (2002) so prav tako v luknjice dodali 95 % etanol, le da so potem 100 µl vsebine prenesli iz stare v novo mikrotitrsko ploščico, kateri so potem izmerili absorbanco pri 595 nm. Burton in sod. (2006) pa so v osušene luknjice na mikrotitrski ploščici dodali 33 % ocatno kislino in izmerili absorbanco pri 630 nm.

Vse je bilo delano v paralelkah. Iz dobljenih absorbanc so kasneje izračunali povprečje absorbanc ter standardno napako. Z metodo določanja biofilma z barvanjem s kristal

violetom so tako Burton in sod. (2007), Stepanovič in sod. (2007), Harvey in sod. (2007), Wakimoto in sod. (2004) ter Rivas in sod. (2007) razdelili seve na šibke, srednje močne in močne tvorce biofilma.

2.4.2 Določanje biofilma s štetjem celic na kupončkih iz nerjavečega jekla

Z metodo določanja biofilma s štetjem celic so Belessi in sod. (2011), Rivas in sod. (2007), Ryu in sod. (2004) in Chavant in sod. (2004) določali le žive celice v že formiranem biofilmu.

Določanje količine samega biofilma na nerjavečem jeklu so avtorji opisovali različno. Mi smo se oprli na metodo Belessi in sod. (2011), ki so v svojem poskusu za določitev v biofilm vezanih celic uporabili epruvete s steklenimi kroglicami, v katere so dali kupončke iz nerjavečega jekla z biofilmom. Biofilm so nato odstranili z mešanjem na vrtinčniku. Opisana metoda naj bi bila sodeč po rezultatih ena izmed najbolj primernih za izvedbo le tega, saj popolna odstranitev biofilma v praksi tako ni mogoča.

Ostali spodaj opisani koraki določanja količine biofilma s kvantifikacijo celic na nerjavečem jeklu so bili med avtorji (Rivas in sod., 2007; Ryu in sod., 2004; Chavant in sod., 2004) podobni.

Po 24-urni inkubaciji kulture in kupončkov iz nerjavečega jekla v gojišču TSB pri 37 °C naj bi se na kupončkih tvoril biofilm. Za odstranjevanjem biofilma je sledilo spiranje kupončkov.

Sam način ločevanja celic biofilma od nerjavečega jekla se je med avtorji razlikoval. Belessi in sod. (2011) so kupončke iz nerjavečega jekla spirali z 15 mL MRD raztopine (ang. maximum recovery diluent). Rivas in sod. (2007) so kupončke iz nerjavečega jekla dvakrat namakali v 100 mL fosfatnega pufra (PBS, ang. phosphate buffered saline), Ryu in sod. (2004) so prav tako spirali kupončke iz nerjavečega jekla z fosfatnim pufrom. Chavant in sod. (2004) pa so kupončke iz nerjavečega jekla 2-krat po 1 minuto spirali z 2-krat po 35 mL sterile TS raztopine (ang. TS-Tryptone salt).

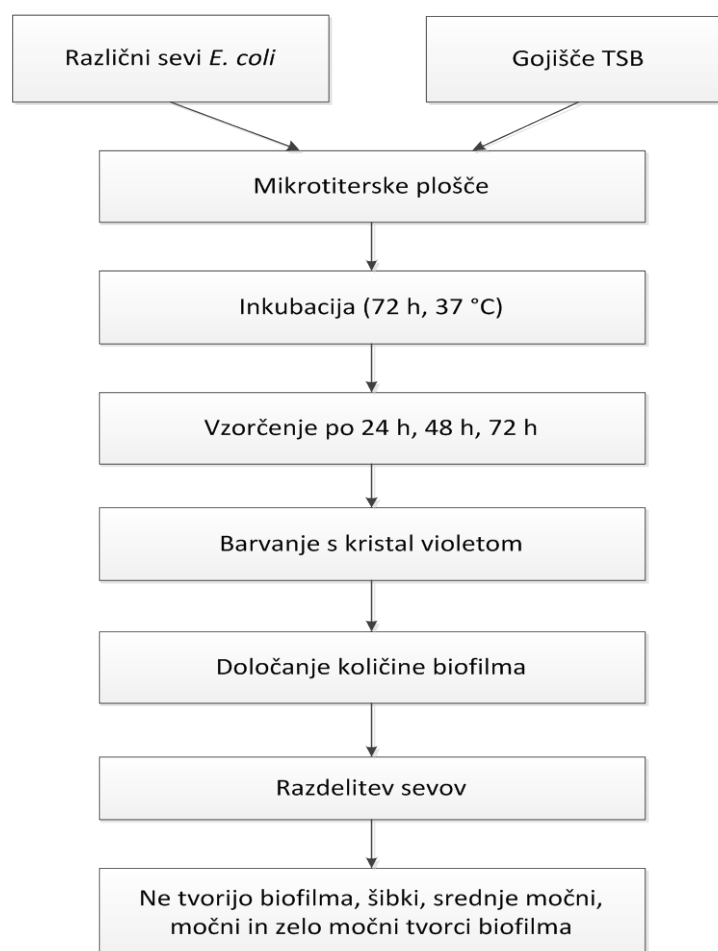
Za določitev v biofilm vezanih celic so uporabili epruvete s steklenimi kroglicami, v katere so dali kupončke iz nerjavečega jekla z biofilmom. Biofilm so nato odstranili z mešanjem na vrtinčniku. Na ta način so bile celice vezane na nerjaveče jeklo odstranjene in tako sproščene v suspenzijo. V suspenziji so Belessi in sod. (2011) z metodo štetja na trdnem gojišču TSA določili koncentracijo aktivnih celic vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

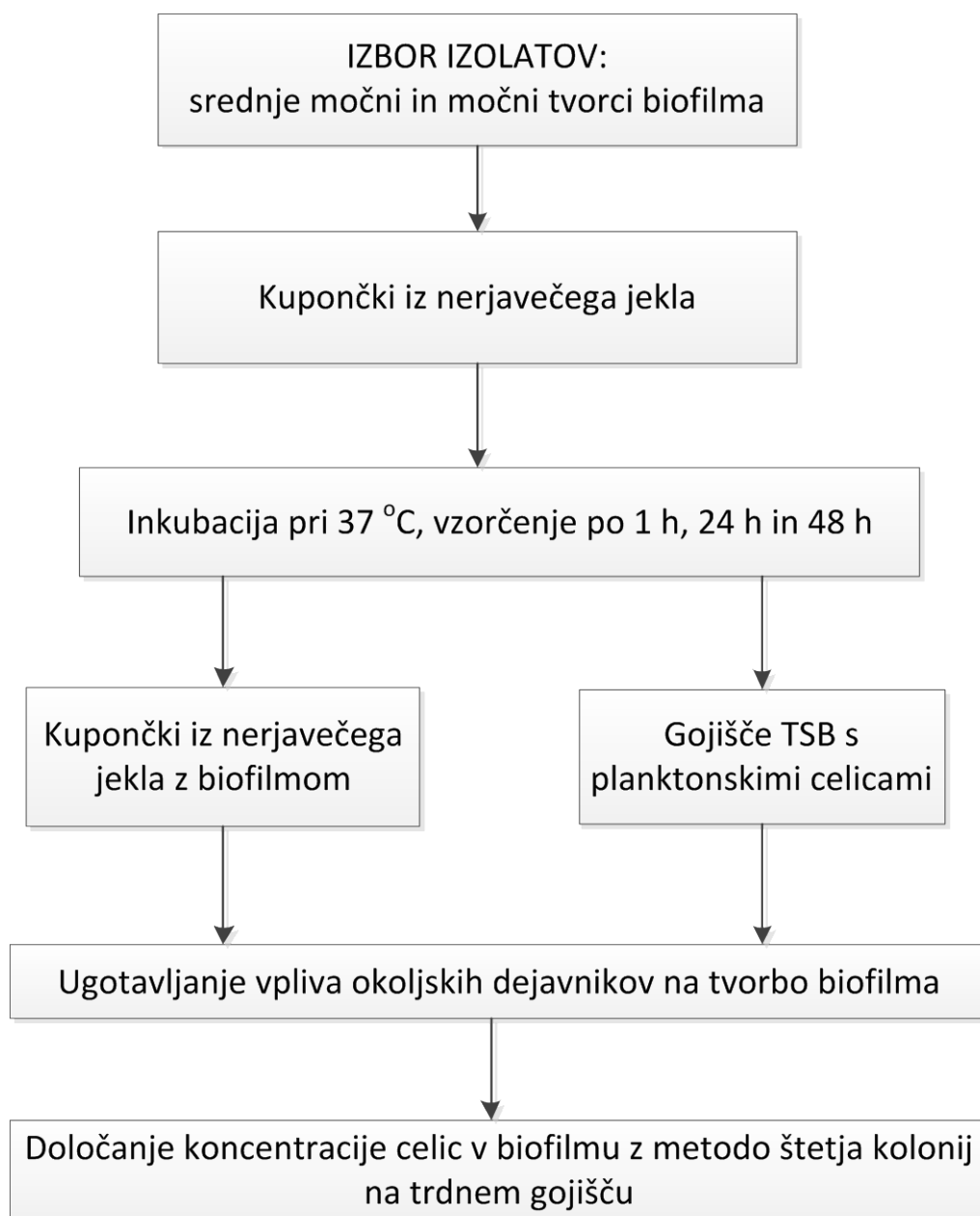
Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti, ali različni sevi bakterij vrste *Escherichia coli* (živilski in humani izolati) tvorijo različne količine biofilma. Želeli smo tudi določiti vpliv razkužil na tvorbo biofilma in vpliv razkužil in različnega časa delovanja na celice vezane v biofilmu.

Najprej smo glede na izvor izbrali različne seve bakterij vrste *E. coli* (humani-blato in živilski). Z metodo barvanja s kristal violetom smo določili količino biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih. Na sliki 1 je prikazano določanje vpliva vrste seva na tvorbo biofilma. Izbrane seve bakterij vrste *E. coli* smo nato glede na tvorbo biofilma razdelili v tri skupine in sicer: šibki, srednje močni, ter močni tvorci biofilma.



Slika 1: Shema določitve vpliva vrste seva bakterij vrste *E. coli* na količino biofilma na polistirenski površini

V drugem delu smo izmed sevov, ki so se uvrstili v skupino srednje močnih, ter močnih tvorcev biofilma za nadaljnje poskuse izbrali dva izolata. Ugotavljali smo vpliv okoljskih dejavnikov in različnih vrst razkužil na tvorbo biofilma, ter vpliv razkužil na celice v biofilmu (Slika 2). Koncentracijo celic v biofilmu na nerjavečem jeklu smo določili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču.



Slika 2: Shema določitve vpliva okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma in na že tvorjen biofilm

3.2 MATERIALI

3.2.1 Bakterije

V preglednici 1 so navedene bakterijske kulture, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

Preglednica 1: Sevi bakterij vrste *Escherichia coli* uporabljeni pri eksperimentalnem delu

Oznaka seva	Serotip	Izvor seva
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ128	0157:H7	Humani (blato)
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ131	017	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ132	026	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ133	026	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ135	0113	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ136	026	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ137	0157:H7	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ138	0157:H7	
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ139	0157:H7	Hrana
<i>Escherichia coli</i> ŽMJ143	0157:H7	
<i>Escherichia coli</i> ŽM510	/	
<i>Escherichia coli</i> ŽM511	/	
<i>Escherichia coli</i> ŽM512	/	Surovo kravje mleko

Legenda: ŽMJ, ŽM: mikrobiološki zbirki Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete ; /: ni določen.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

- **Gojišče BHI**

Sestavine: Brain Heart Broth (BHI, Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.10493.0500)

Priprava: 18,5 g osnovnega medija Brain Heart Broth smo raztopili v 500 mL destilirane vode. Vsebinsko smo dobro premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

- **Gojišče MHB**

Sestavine: Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.10.293.0500)

Priprava: 10,5 g osnovnega medija Mueller Hinton Broth smo raztopili v 500 mL destilirane vode. Vsebinsko smo dobro premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

- **Gojišče MHA**

Sestavine: Mueller Hinton Agar (MHA, Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.05435.0500).

Priprava: 19 g osnovnega medija Mueller Hinton Agar smo raztopili v 500 mL destilirane vode. Vsebino smo dobro premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

- **Gojišče TSA (triptično soja gojišče)**

Sestavine: 20 g gojišča TSA (triptično soja gojišče, Oxoid, CM0131, Anglija), 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija), 1,25 g dikalijev hidrogenfosfat K_2HPO_4 (Kemika, 1116108, Hrvaška), 1,25 g D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška)

Priprava: Zgoraj navedene sestavine gojišča TSA smo zatehtali v 1000 mL steklenico, v katero smo nato dodali 500 mL destilirane vode. Tako pripravljeno gojišče smo najprej dobro premešali, nato pa 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

- **Tekoče gojišče TSB (triptični soja bujon)**

Sestavina: 15 g gojišča TSB (Tryptone Soy Broth, Oxoid, CM0129, Anglija)

Priprava: V 1000 mL steklenico smo zatehtali 15 g gojišča in mu dodali 500 mL destilirane vode. Dobro raztopljeno gojišče smo 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

- **Fiziološka raztopina**

Sestavine: osnovna raztopina KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.04873.0250)

Priprava: V 1000 mL bučko smo nalili 1,25 mL fiziološke raztopine s koncentracijo 0,034 g KH_2PO_4 / mL destilirane vode in dopolnili bučko z destilirano vodo do oznake. Tako pripravljeno fiziološko raztopino smo nato sterilizirali 20 minut pri 121 °C.

3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem

- **Razkužilo benzalkonijev klorid:**

Sestavine: Benzalkonijev klorid (Sigma-Aldrich, Stainheim, Nemčija, B6295).

Priprava razkužila za metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici: Razkužilo smo zatehtali (približno 60 mg) ter zapisali točno maso. Nato smo izračunali volumen topila (etanol) po enačbi (1) in ga dodali razkužilu.

- **Razkužilo triklosan:**

Sestavine: Triclosan (Calibiochem, 647950).

Priprava: Razkužilo smo pripravili po enakem postopku kot banzalkonijev klorid.

Priprava razkužila za metodo razredčevanja v gojišču TSB: 5 mg razkužila smo dodali 1 mL etanola. 10,1 μ L te raztopine smo zopet dodali 1 mL etanola in dobili osnovno raztopino razkužila. To osnovno raztopino smo dodajali gojišču TSB in sicer tako, da smo dobili naslednje koncentracije razkužila v gojišču 0,25 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 0,75 μ g/mL in 1 μ g/mL.

3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- Barvilo INT (ang. Iodonitrotetrazolium klorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O.1120, 89552 Stainheim, Nemčija, 14096LJ).
- Kristal violet (ang. Gram

Poleg navedene opreme smo uporabljali še naslednje laboratorijske pripomočke: cepilne zanke, steklene epruvete, stojalo za epruvete, različne erlenmajerice, merilne valje, petrijeve plošče, pipetor, parafilm, pincete, štoparica, steklene kroglice.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija sevov

Posamezne izolate bakterij vrste *E. coli*, ki so bili shranjeni v krioepruvetkah (v gojišču BHI in glicerolu) pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo najprej odmrznili, nato pa smo jih prenesli v 4 mL gojišča BHI, ter vsebino premešali na vrtinčniku. Suspenzijo smo potem 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Priprava inokoluma

Po 24 urni inkubaciji bakterij vrste *E. coli* (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139, ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512), smo kulturo s cepilno zanko aseptično prenesli iz tekočega gojišča BHI na trdo gojišče MHA, ter 24 ur inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na gojišču MHA so zrastle belo-rumene obarvane kolonije. V sveže sterilno tekoče gojišče TSB smo nato s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz gojišča MHA, vsebino premešali na vrtinčniku in suspenzijo 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako smo pripravili vse čiste kulture različnih sevov bakterij vrste *E. coli* v tekočem gojišču TSB.

Na ta način smo dobili inokolum s predvideno koncentracijo 10^8 CFU/mL. Za določitev točne koncentracije smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču TSA.

3.3.3 Določanje učinkovite koncentracije razkužil

3.3.3.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo določali učinkovito koncentracijo razkužila triklosan (preizkušene koncentracije 0,25, 0,50, 0,75 in $1\text{ }\mu\text{g/mL}$). V vsakem gojišču TSB z dodanim razkužilom smo določali število bakterij vrste *E. coli* v času 0 in po 24 urah. Tisto koncentracijo razkužila, kjer je bila rast po 24 urah manjša kot pri pozitivni kontroli, smo označili kot učinkovito koncentracijo razkužila triklosan. Priprava negativne kontrole je potekala tako, da smo zmešali 4 mL gojišča TSB, kateremu smo dodali 100 μL kulture brez dodatka razkužila.

3.3.3.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici smo določali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) razkužil triklosan, benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat.

Osnovne raztopine razkužil triklosan, benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat so imele začetno koncentracijo 16,384 mg/mL. Delovno raztopino smo pripravili tako, da smo osnovno raztopino 4x razredčili. To smo naredili tako, da smo 125 µL razkužila s koncentracijo 16,384 mg/mL dodali 375 µL gojišča TSB. Tako smo dobili koncentracijo delovne raztopine 4,096 mg/mL. Pripravili smo tudi delovno raztopino absolutnega etanola in sicer tako, da smo 125 µL absolutnega etanola dodali 375 µL gojišča TSB in vse skupaj premešali.

Po 24-urni inkubaciji kulture bakterij vrst *E. coli* v gojišču TSB (1.3.2), smo namnoženo kulturo razredčili tako, da smo 150 µL te kulture prenesli v 10 mL svežega gojišča TSB.

Priprava mikrotiterske ploščice je potekala tako, da smo v vsako luknjico najprej odpipetirali po 50 µL gojišča TSB razen v prvi stolpec (Slika 3).

RAZKUŽILO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Koncentracija razkužila (mg/mL)											
A	Triklosan	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
B	Triklosan	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
C	Benzalkonijev klorid	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
D	Benzalkonijev klorid	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
E	Klorheksidin diacetat monohidrat	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
F	Klorheksidin diacetat monohidrat	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
G	Etanol	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,006
H		PC	NC	B									

Slika 3: Shema mikrotiterske ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije razkužil

Legenda: PC: pozitivna kontrola, NC: negativna kontrola, B: slepi vzorec

Nato smo 100 µL delovne raztopine razkužila triklosan odpipetirali v A1 in B1. V C1 in D1 smo nato odpipetirali po 100 µL delovne raztopine benzalkonijevega klorida. V E1 in F1 pa smo odpipetirali po 100 µL delovne raztopine klorheksidin diacetat monohidrat. Nadaljevali smo tako, da smo 50 µL vsebine iz A1 prenesli v A2 in osemkrat premešali z

nastavkom avtomatske pipete, ter tako nadaljevali do konca vrstice. Zadnjih 50 μL vsebine smo zavrgli zato, da je bil volumen v vseh luknjicah enak. Ta postopek smo ponovili za vsa tri razkužila in kontrolo etanola, ki jo je predstavljala vrstica G. Pripravili smo tudi pozitivno in negativno kontrolo. Priprava negativne kontrole je potekala tako, da smo zmešali 50 μL gojišča TSB in 50 μL kulture brez dodatka razkužila. Pozitivno kontrolo pa smo pripravili tako, da smo 50 μL gojišča TSB dodali še 50 μL razkužila. V vsako luknjico na mikrotiterski ploščici smo nato dodali še 50 μL delovne raztopine kulture z izjemo negativne kontrole, tam kulture nismo dodali. Na mikrotiterski ploščici smo imeli tudi slepi vzorec, pri katerem smo v luknjico dali le tekoče gojišče TSB. Tako pripravljeno mikrotitersko ploščico smo nato inkubirali 24 ur, pri 37 °C.

Po tako pripravljeni mikrotiterski ploščici je sledila priprava barvila iodonitrotetrazolium klorid (INT). Barvilo INT smo pripravili tako, da smo 0,004 g tega barvila raztopili v 20 mL sterilne destilirane vode in ga nato po 10 μL dodali v vsako luknjico mikrotiterske ploščice. Vsebino ploščice smo premešali za 1 minuto na stresalniku in jo inkubirali 30 minut pri 37 °C. Glede na obarvanost suspenzije (pomeni metabolično aktivne celice) smo potem določili MIC za posamezno razkužilo pri najnižji koncentraciji razkužila kjer ni bilo aktivnih celic.

3.3.4 Določanje biofilma

3.3.4.1 Določanje biofilma v mikrotiterski ploščici

Uporabili smo 13 različnih sevov bakterij vrste *E. coli* (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139, ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512).

Posamezen sev bakterij vrste *E. coli*, smo nacepili v 5 mL TSB in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po 24 urah smo kulturo bakterij razredčili tako, da smo v 125 μL kulture prenesli v 5 mL gojišča TSB in vse skupaj premešali na vrtinčniku. V prvi stolpec (8 luknjic) mikrotiterske ploščice smo prenesli 100 μL razredčene kulture določenega seva, kar je predstavljalo dvakrat po štiri paralelke. Za drugi stolpec smo postopek priprave mikrotiterske ploščice ponovili, le da smo uporabili drug sev bakterij vrste *E. coli*. Zadnji stolpec je predstavljal slepi vzorec, kamor smo dodali le 100 μL gojišča TSB.

Ta postopek smo ponovili trikrat in tako dobili 3 enake mikrotiterske ploščice; prvo smo inkubirali 24 ur, drugo 48 ur in tretjo 72 ur pri temperaturi 37 °C.

Po inkubaciji kulture na polistirenski površini mikrotiterske ploščice smo kulturo odstranili. Sledilo je spiranje s fiziološko raztopino tako, da smo v vsako luknjico dodali 200 μL fiziološke raztopine, trikrat premešali z nastavkom avtomatske pipete in nato vsebino zavrgli. Ta postopek smo ponovili trikrat. Za tem je sledilo še 30 minutno sušenje mikrotiterske ploščice pri sobni temperaturi.

V osušene luknjice mikrotiterske ploščice smo dodali po 150 μ L barvila kristal violet. V prve štiri luknjice vsakega stolpca smo dodali 0,1 % raztopino barvila kristal violet, v druge štiri luknjice vsakega stolpca pa 1 % raztopino barvila kristal violet. Sledila je 15 minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Kristal violet smo nato odstranili in ponovili trikratno spiranje z 200 μ L fiziološke raztopine (prvič smo vsebino v mikrotiterski ploščici trikrat premešali z nastavkom avtomatske pipete in nato vsebino zavrgli, drugič in tretjič pa smo vsebino najprej dali na stresanje, nato pa vsebino zavrgli).

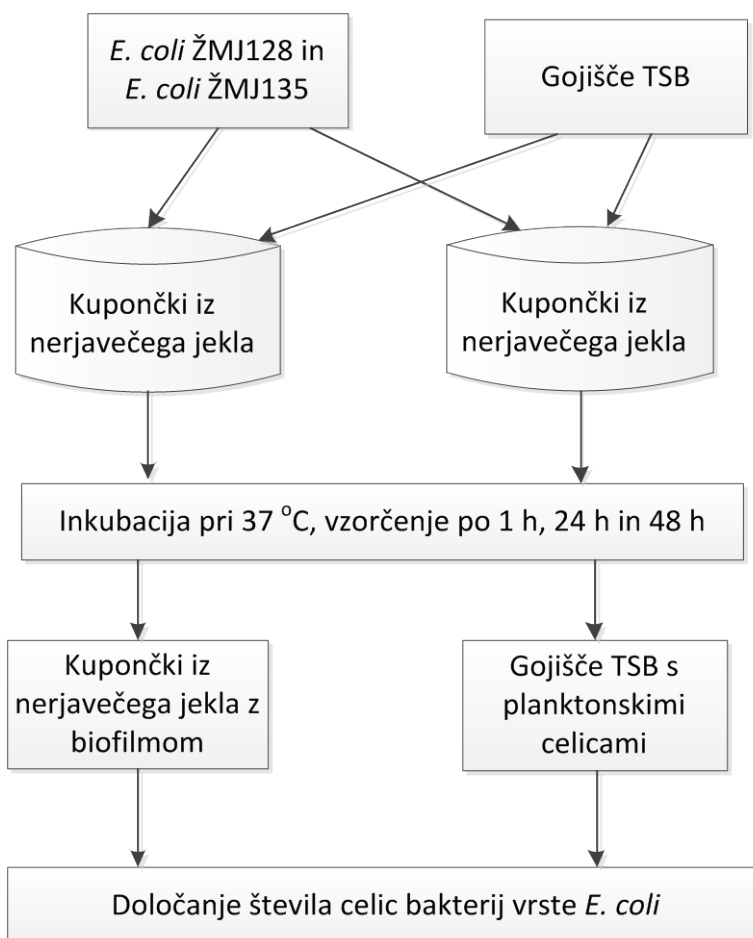
V vsako luknjico na mikrotiterski plošči smo nato dodali 200 μ L 95 % etanola in 2 minuti stresali. Potem smo iz vsake luknjice 100 μ L vsebine prenesli v novo mikrotitersko ploščico.

Sledilo je določanje količine tvorjenega biofilma s spektrofotometričnim merjenjem absorbanca pri 582 nm. Za vrednotenje količine biofilma, smo dobljeni absorbanci za posamezen vzorec odšteli povprečno absorbanco slepega vzorca in nato izračunali povprečje med štirimi paralelkami (Harvey in sod., 2007).

3.3.4.2 Določanje biofilma na kupončkih iz nerjavečega jekla

Za štetje celic v biofilmu smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Po 24-urni inkubaciji bakterij vrste *E. coli* v gojišču TSB (1.3.2), smo 0,5 mL kulture dodali v plastični lonček, ki je vseboval 10 mL gojišča TSB in 12 kupončkov iz nerjavečega jekla. Vsebino smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Prvo vzorčenje smo izvedli po 1 uri, nato pa smo vzorčili še po 24 in 48 urah. Potek poskusa je razviden na sliki 4.

Pri vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic v gojišču (planktonske celice), to so bile ne-vezane celice v gojišču TSB in koncentracijo celic v biofilmu, celice, ki so bile pritrjene na kupončke iz nerjavečega jekla. Vzorčili smo v paralelkah. Najprej smo z nastavkom avtomatske pipete premešali vsebino in nato vzeli dvakrat po 0,75 mL suspenzije. Z metodo štetja na trdnem gojišču TSA smo nato določili koncentracijo v biofilmu ne vezanih celic. Vzoredno smo s sterilno pinceto iz plastičnega lončka vzeli po dva kupončka iz nerjavečega jekla in vsakega posebj sprali s 5 mL sterilne destilirane vode, ter ju dali v epruveto z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Obe epruveti smo nato 1 minuto mešali na vrtničniku pri 2300 obratih/s. Na ta način smo odstranili celice vezane na nerjaveče jeklo in jih tako sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdnem gojišču TSA določili koncentracijo celic vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011).



Slika 4: Shema določitve biofilma s štetjem celic na kupončkih iz nerjavečega jekla

3.3.4.3 Določanje tvorbe biofilma v petrijevih ploščah

Tvorbo biofilma smo določili z metodo, ki so jo opisali Harvey in sod. (2007). Za tvorbo biofilma v 30 mm polistirenskih petrijevih ploščah smo uporabili sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128.

Sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 smo nacepili v 5 mL gojišča TSB in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Suspenzijo smo nato 1 minuto mešali na vrtinčniku. 3 mL te suspenzije smo prenesli v 30 mm polistirensko petrijevo ploščo in jo inkubirali na stresalniku pri temperaturi 30 °C. Vzoredno smo naredili še negativno kontrolo, ki je vsebovala le 3 mL sterilnega tekočega gojišča TSB s kulturo. Na ta način smo pripravili petrijeve plošče s kulturo (3 mL kulture), ki smo jih uporabljali za spremljanje biofilma v 14 dnevem poskusu. Vzorčenje smo izvedli po 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 in 14 dnevu.

Pri vsakem vzorčenju smo suspenzije seva bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 in kontrole zavrgli. Sledilo je trikratno spiranje petrijevke s 3 mL sterilne vode in za tem 30 minutno sušenje pri 30 °C. Po sušenju smo v vsako petrijevo ploščo dodali 3 mL 1 % raztopine barvila kristal violeta ter 45 minut inkubirali pri 20 °C. Po barvanju s kristal violetom, smo

vsebino v petrijevih ploščah zavrgli, nato pa vsako petrijevo ploščo trikrat sprali z 3 mL sterilne vode in zopet sušili 30 minut na 30 °C.

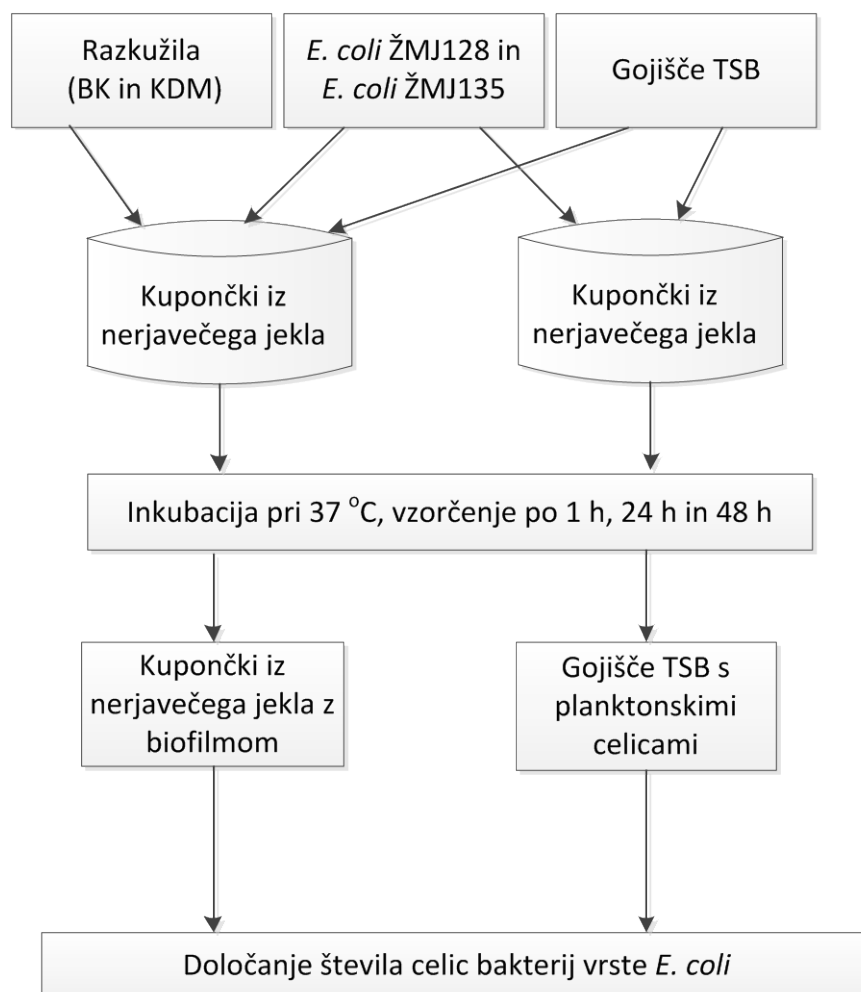
Del petrijevke, ki smo jo barvali, smo pokrili s krovnim stekelcem, na katerega smo kanili kapljico imerzijskega olja. Tako pripravljen preparat smo opazovali s svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi. Rezultate smo grafično dokumentirali s računalniškim programom Motic Images Plus 2.0 ML in iz njih razbrali tvorbo biofilma po določenem času inkubacije.

3.3.5 Vpliv okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili vpliv različnih okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma. Preizkusili smo različne vrste in koncentracije razkužil.

V 10 mL gojišča TSB smo dodali 0,5 mL 24-urne kulture (1.3.2), 12 kupončkov iz nerjavečega jekla in našo učinkovito koncentracijo za dve različni razkužili (benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat). Kot negativno kontrolo smo uporabili suspenzijo z gojiščem TSB, kulturo in kupončke brez dodatka razkužil. Inkubacija je trajala 24 ur pri 37 °C, pri čemer smo vzorčenje izvedli po prvi uri in po 24 ter 48 urah.

Ob vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic v gojišču TSB in koncentracijo celic pritrjenih na nerjaveče jeklo. Vzorčili smo v paralelkah. Iz plastičnega lončka smo najprej vzeli dvakrat po 0,75 mL suspenzije in tako z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču TSA določili koncentracijo v biofilmu nevezanih celic. Vzoredno smo iz vsake suspenzije vzeli po 2 kupončka iz nerjavečega jekla, katera smo sprali s 5 mL sterilne destilirane vode in ju nato dali v epruvete z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Vse epruvete smo nato 1 minuto mešali na vrtinčniku pri 2300 obratih/s. Na ta način smo odstranili celice vezane na nerjaveče jeklo in jih tako sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdnem gojišču TSA določili koncentracijo celic vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011) (slika 5).



Slika 5: Shema določitve vpliva okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma

Legenda: BK: razkužilo benzalkonijev klorid, KDM: razkužilo klorheksidin diacetat monohidrat

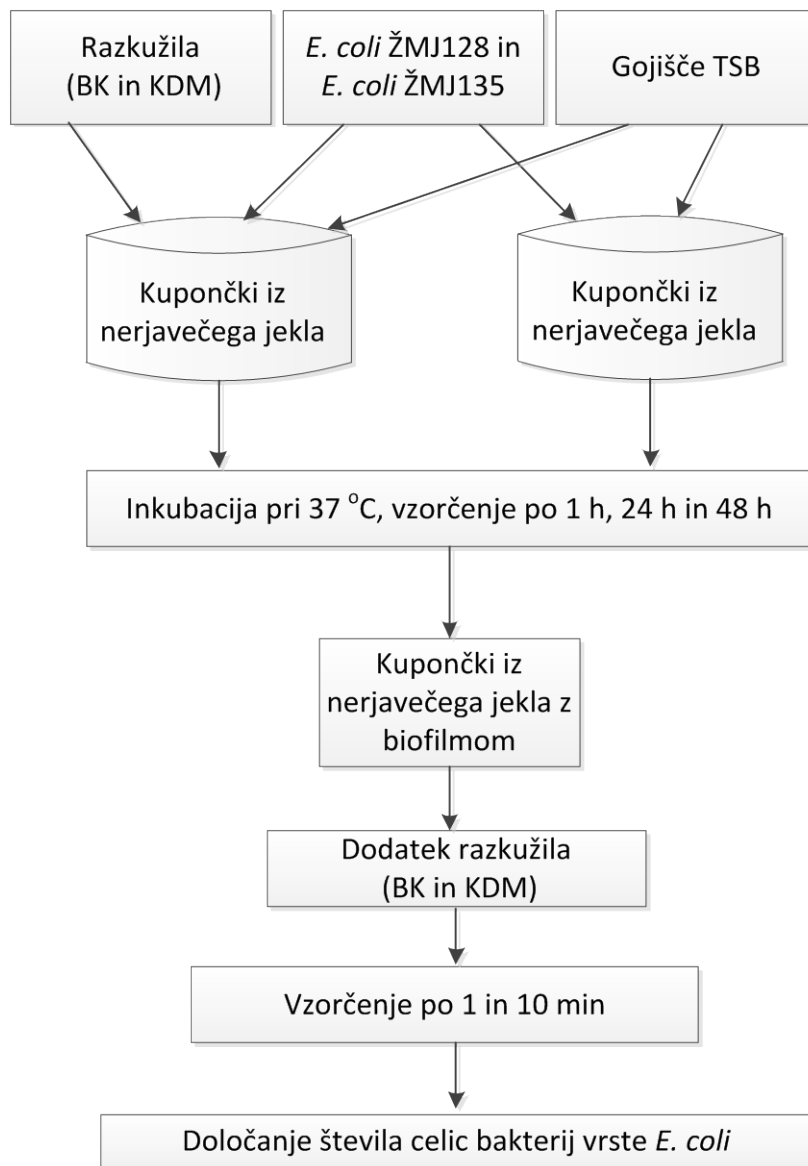
3.3.6 Vpliv razkužil na biofilm

Biofilm bakterij vrste *E. coli* (ŽMJ128, ŽMJ135) smo izpostavili dobljeni učinkoviti koncentraciji dveh različnih razkužil (benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat) za 1 minuto in 10 minut. Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo celic.

V 10 mL gojišča TSB smo dodali 0,5 mL 24-urne kulture (1.3.2) in 12 kupončkov iz nerjavečega jekla. Vpliv razkužil na že tvorjen biofilm smo testirali po prvi uri, nato pa še po 24 in 48 urah. Potek poskusa je razviden na sliki 2.

Ob vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic v gojišču TSB in koncentracijo celic pritrjenih na nerjaveče jeklo. Iz suspenzije smo s sterilno pinceto v paralelkah vzeli po 2 kupončka iz nerjavečega jekla, ter vsakega dali v 2 mL naše učinkovite koncentracije

razkužila. Nato smo pustili, da je razkužilo učinkovalo 1 minuto za prva dva kupončka, ter 10 minut na druga dva kupončka. Po eno in deset minutnem učinkovanju razkužil smo vsak kuponček posebj sprali s 5 mL sterilne destilirane vode, ter ga nato dali v epruveto z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Vse epruvete smo nato 1 minuto mešali na vrtinčniku pri 2300 obratih/s. Na ta način smo odstranili celice vezane na nerjaveče jeklo in jih tako sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdnem gojišču TSA določili koncentracijo celic vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011) (slika 6).



Slika 6: Shema določitve vpliva razkužil na tvorbo biofilma

Legenda: BK: razkužilo benzalkonijev klorid, KDM: razkužilo klorheksidin diacetat monohidrat

3.3.7 Statistično vrednotenje rezultatov

Za statistično vrednotenje rezultatov smo uporabili test ANOVA. Ta test uporabljamo takrat, kadar analiziramo značilnost razlik med povprečnimi vrednostmi za več kot dva neodvisna vzorca. Pri interpretaciji rezultatov smo glede na število vzorcev in število dejavnikov, ki smo jih upoštevali uporabili dve vrsti testa ANOVA in sicer, test ANOVA za en dejavnik in test ANOVA za dva dejavnika s ponovitvami. ANOVA za en dejavnik naredi preprosto analizo variance za dva ali več vzorcev. S tem testom smo določili veljavnost hipoteze, da je vsak vzorec izbran iz enake temeljne verjetnostne porazdelitve proti alternativni hipotezi in da temeljne verjetnosti niso enake za vse vzorce.

Za razvrščanje podatkov v dve različni dimenziji je najbolj uporaben test ANOVA za dva dejavnika s ponovitvami.

Pri obravnavi vsake skupine dobljenih rezultatov smo postavili statistično domnevo. Statistična domneva je še nedokazana trditev o lastnostih slučajne spremenljivke. Opredelili smo dve statistični domnevi: ničelno domnevo H_0 in alternativno domnevo H_1 . S testom ANOVA je nato sledilo preizkušnje teh dveh statističnih domnev. Določili smo, da bo α , vrednost za stopnjo značilnosti, v našem primeru 0,05. Postavili in zapisali smo ničelno domnevo H_0 in alternativno domnevo H_1 . Predpostavili smo, da ničelna hipoteza H_0 velja. Nato smo s pomočjo testa ANOVA določili območje, kjer H_0 sprejmemo in območje kjer H_0 zavrnemo v korist H_1 . Sledil je izračun P-vrednosti, ki je najmanjša stopnja pomembnosti, pri kateri ničelno hipotezo še lahko zavrnemo pri dobljeni vrednosti statistike testa hipoteze. Iz podatkov slučajnega vzorca, izračunamo vrednost posebej izbrane statistike, pravimo ji statistika testa hipoteze. Postopek testiranja je torej zgrajen na delitvi vseh možnih vrednosti statistike testa hipoteze v dve območji, in sicer območje sprejemanja ničelne hipoteze in območje njenega zavračanja.

P-vrednost je vezana na vzorec. Izraža v kolikšni meri so vzorčni podatki v skladu z ničelno domnevo in tako na njeni osnovi v prvi fazi postavimo statistični sklep. Pri nas je to pomenilo, da če je bila P-vrednost večja od α ($p > 0,05$), smo ničelno domnevo obdržali. Če pa je bila P-vrednost manjša od α ($p < 0,05$), pa ničelno domnevo zavrnemo v korist alternativne domneve. Pomeni, da vzorčni podatki ne nasprotujejo ničelni hipotezi in, da so rezultati statistično značilni. Tako lahko trdimo, da je alternativna domneva pravilna in verjetnost da smo se zmotili največ α (Košmelj, 2007).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Z izvedbo eksperimentov smo želeli potrditi domnevo, da različni sevi bakterij vrste *E. coli* tvorijo različne količine biofilma. Z metodo barvanja s kristal violetom na polistirenski površini smo določili, kateri sevi bakterij vrste *E. coli* so močni in kateri šibki tvorci biofilma. Tako smo izbrali dva seva bakterij vrste *E. coli*, ki smo jih glede na količino tvorjenega biofilma uvrstili med močne oziroma srednje močne tvorce biofilma in z njima izvedli vse nadaljne poskuse. V nadaljevanju smo ugotavljali koncentracijo celic v biofilmu s štetjem celic na nerjavečem jeklu in štetjem v biofilm nevezanih celic. Nato smo proučevali vpliv razkužil na tvorbo biofilma in na celice v že tvorjenem biofilmu. Tu smo analizirali vpliv različnih razkužil in koncentracije le teh, ter različen čas izpostavitve določenim razkužilom. Izbranim sevoma bakterij vrste *E. coli* smo zato predhodno določili učinkovito koncentracijo razkužil bezalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat.

4.1 OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA BIOFILMA S KRISTAL VIOLETOM

Pri optimizaciji metode barvanja biofilma s kristal violetom smo določali vpliv meritve absorbance kristal violeta kot relativnega merila za določitev količine biofilma bakterij vrste *E. coli* v mikrotiterski ploščici na polistirenski površini.

Z metodo barvanja s kristal violetom smo izbranim sevom bakterij vrste *E. coli* (preglednica 1) (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139, ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512) določili količino biofilma v mikrotiterski ploščici na polistirenski površini. Kot smo opisali v poglavju 1.3.4.1 smo po barvanju z 1 % raztopino barvila kristal violet iz vsake luknjice v mikrotiterski ploščici, ki je vsebovala 150 µL kristal violeta, 100 µL vsebine prenesli v novo mikrotitersko ploščico. Sledilo je določanje količine tvorjenega biofilma s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 582 nm pri vseh vzorcih v originalni in v novi mikrotiterski ploščici. Vsak sev je bil narejen v štirih paralelkah.

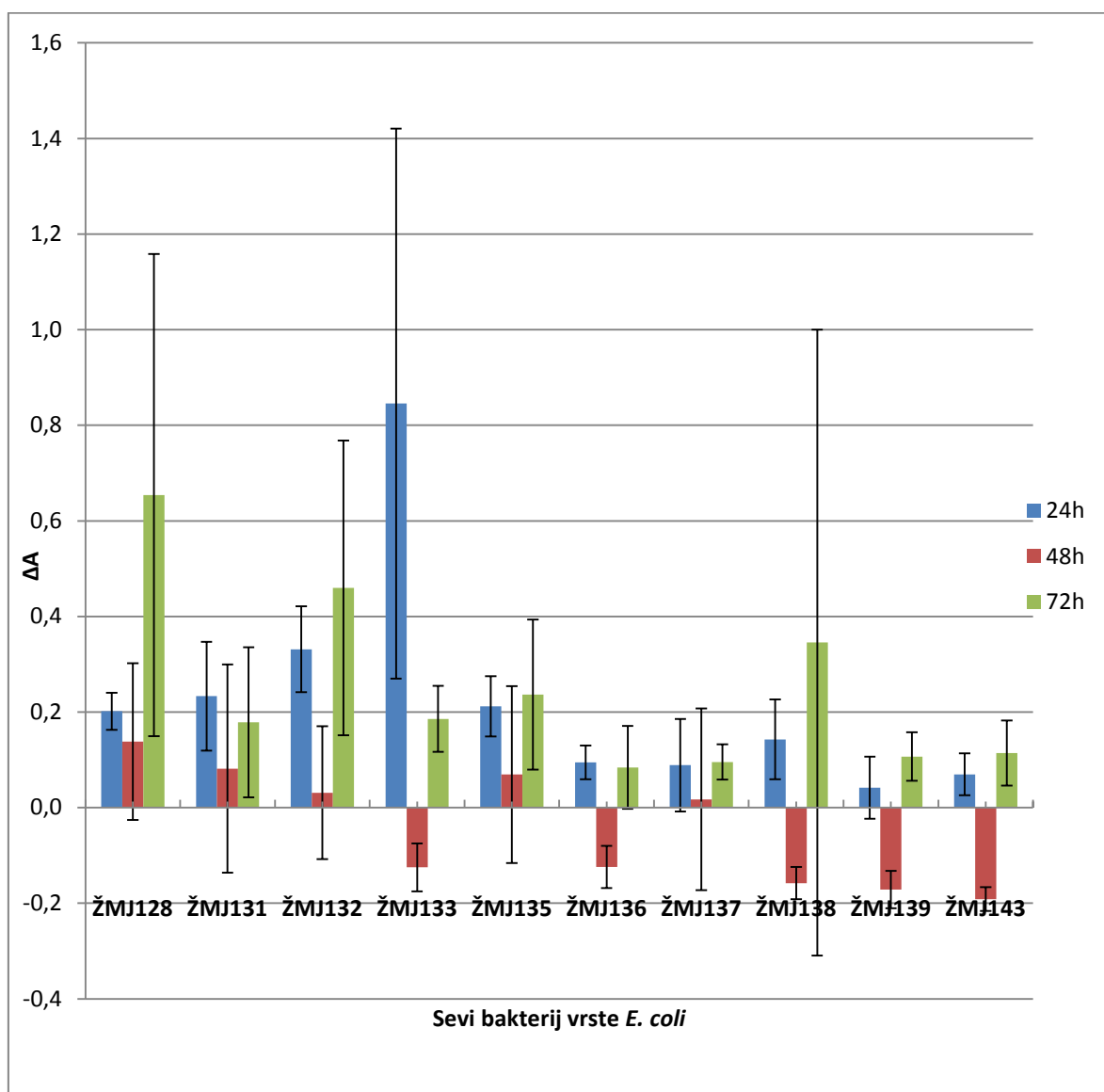
S to metodo smo hoteli primerjalno določiti količino biofilma z merjenjem absorbance kristal violeta. Ob pregledu znanstvene literature smo ugotovili, da so različni avtorji uporabljali različne metode za določanje biofilma z merjenjem absorbance. Djordevic in sod. (2002) opisujejo, da so absorbanco merili v ploščici, ki so jo pripravili tako, da so 100 µL vsebine prenesli iz stare v novo mikrotitersko ploščico. Spet drugi, kot na primer Harvey in sod. (2007), pa so količino biofilma določali z merjenjem absorbance v prvotni mikrotiterski ploščici.

Primerjava naših rezultatov meritve absorbance v originalni in novi mikrotiterski ploščici je pokazala, da je bil pri vseh preizkušanih sevih bakterij vrste *E. coli* rezultat neodvisen od tega, kje smo merili absorbanco (v originalni in v novi mikrotiterski ploščici). Rezultati so prikazani v prilogi A, B in C.

4.2 VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE *E. coli* IN ČASA NA TVORBO BIOFILMA NA POLISTIRENSKI POVRŠINI

Količino biofilma za različne seve bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini mikrotitrerske ploščice smo ugotavljali z metodo barvanja z 1 % raztopino barvila kristal violet. Uporabili smo seve iz preglednice 1 (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139, ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512). Tvorbo biofilma smo spremljali 72 ur tako, da smo vzorčili po 24, 48 in 72 urah.

Rezultati so prikazani na sliki 7 in prilogi D.



Slika 7: Količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste *E. coli* določena z metodo barvanja s kristal violetom
Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽMJ: oznaka seva

Preglednica 2: Razvrstitev sevov bakterij vrste *E. coli* glede na količino tvorjenega biofilma.

Sev	ΔA		
	24h	48h	72h
<i>E. coli</i> ŽMJ128	0,202	0,138	0,654
<i>E. coli</i> ŽMJ131	0,233	0,082	0,179
<i>E. coli</i> ŽMJ132	0,331	0,031	0,460
<i>E. coli</i> ŽMJ 133	0,845	-0,125	0,186
<i>E. coli</i> ŽMJ 135	0,212	0,069	0,236
<i>E. coli</i> ŽMJ 136	0,095	-0,124	0,084
<i>E. coli</i> ŽMJ137	0,089	0,017	0,096
<i>E. coli</i> ŽMJ138	0,143	-0,158	0,345
<i>E. coli</i> ŽMJ139	0,042	-0,171	0,107
<i>E. coli</i> ŽMJ143	0,070	-0,191	0,114
<i>E. coli</i> ŽM510	-0,001	0,048	0,017
<i>E. coli</i> ŽM511	0,011	0,047	0,011
<i>E. coli</i> ŽM512	0,024	0,033	0,039

Legenda: razvrstitve sevov *E. coli*

	24 h	48 h	72 h
Ne tvorijo biofilma	< 0,042	< 0,017	< 0,084
Šibki tvorci biofilma	0,042 – 0,285	0,017 – 0,054	0,084 – 0,257
Srednje močni tvorci biofilma	0,286 – 0,528	0,055 – 0,091	0,258 – 0,430
Močni tvorci biofilma	0,528 – 0,771	0,092 – 0,128	0,431 – 0,603
Zelo močni tvorci biofilma	> 0,771	> 0,128	> 0,603

ΔA : povprečna razlika absorbanc

Ugotovili smo, da je tvorba biofilma odvisna od seva bakterij vrste *E. coli* (priloga D). Seve bakterij vrste *E. coli* (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139, ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512) smo na podlagi dobljenih rezultatov (priloga D) po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji razdelili na seve, ki ne tvorijo

biofilma, na šibke tvorce biofilma, srednje močne tvorce biofilma, na močne tvorce biofilma in na zelo močne tvorce biofilma (preglednica 2). Živilski sevi bakterij vrste *E. coli* ŽM510, ŽM511 in ŽM512 niso tvorili skoraj nič biofilma (preglednica 2), zato njihove rezultate nismo prikazali na sliki 7.

Glede na dobljene rezultate (preglednica 2) smo izbrali dva seva bakterij vrste *E. coli*, za katera smo se odločili, da spadata v skupino močnih oziroma srednje močnih tvorcev biofilma: *E. coli* ŽMJ128 (humani-blato) in *E. coli* ŽMJ135 (humani-blato). Z njima smo izvedli vse nadaljne poskuse.

Do podobnih zaključkov so prišli tudi Harvey in sod. (2007), saj so izmed 138 analiziranih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes*, določili samo dva seva, ki so jih uvrstili med močne tvorce biofilma (1,5 %), 9 sevov med srednje močne (6,5 %), medtem ko so ostalih 127 sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* uvrstili med šibke tvorce biofilma (92,0 %). Rivas in sod. (2007) so podobno ugotovili, da je tvorba biofilma odvisna od seva bakterij vrste *E. coli*, ki izdeluje Šigove toksine (STEC).

S slike 7 in priloge D je razvidno, da je bila tvorba biofilma pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 največja po 72-urni inkubaciji, najmanjša pa po 48-urni inkubacijski dobi. Pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 pa lahko iz slike 7 razberemo, da je bila tvorba biofilma največja po 24- in 72-urni inkubacijski dobi, medtem ko po 48 urah le-ta ni imela vpliva na tvorbo biofilma. Iz tega lahko sklepamo, da je tvorba biofilma odvisna od časa inkubacije, vendar pa se le ta razlikuje od seva do seva. Tako lahko vidimo, da so sevi, ki so bili izolirani iz humanega materiala v splošnem boljši tvorci biofilma (ŽMJ128, ŽMJ131, ŽMJ132, ŽMJ133, ŽMJ135, ŽMJ136, ŽMJ137, ŽMJ138, ŽMJ139), kot pa živilski sevi (ŽMJ143, ŽM510, ŽM511, ŽM512).

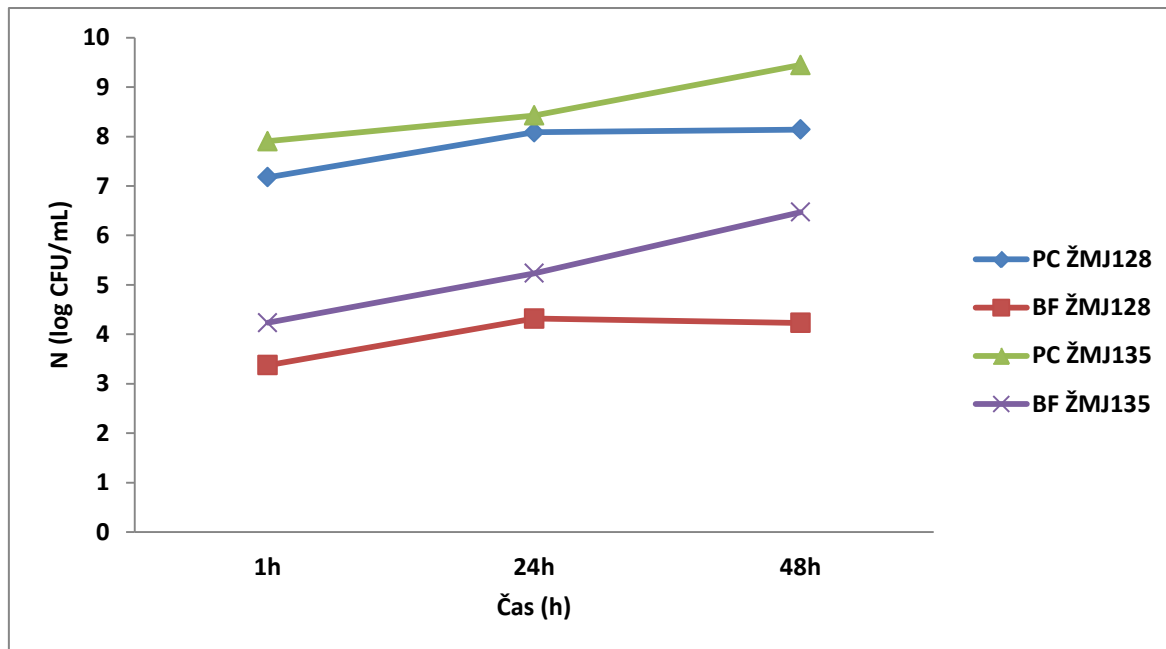
Iz priloge F in preglednice 2 lahko zaključimo, da živilski sevi bakterij vrste *E. coli* ŽM510, ŽM511 in ŽM512 ne tvorijo biofilma, oziroma ga tvorijo zelo malo.

4.3 VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE *E. coli* NA TVORBO BIOFILMA NA NERJAVEČEM JEKLU

V nadaljnjih poskusih smo glede na rezultate, ki smo jih dobili z metodo barvanja s kristal violetom (poglavje 2.2) izmed vseh trinajstih preizkušenih sevov bakterij vrste *E. coli* izbrali dva seva *E. coli* ŽMJ128 (humani-blato) in *E. coli* ŽMJ135 (humani-blato) in z njima določili tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu.

Na sliki 8 in prilogah E in F so prikazane povprečne koncentracije celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in povprečne koncentracije planktonskih celic pri sevih *E. coli* ŽMJ128 (humani-blato) in *E. coli* ŽMJ135 (humani-blato) pri 37 °C. Razvidno je, da koncentracija celic v biofilmu in količina planktonskih celic pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 v odvisnosti od časa raste. Pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 pa koncentracija celic prvih 24 ur inkubacije raste, medtem ko se po 48-urni inkubaciji koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic ustali. Iz tega lahko sklepamo, da je koncentracija celic bakterij vrste *E. coli* v biofilmu tvorjenem na nerjavečem jeklu odvisna od seva *E. coli*

ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135, ter od časa inkubacije (priloga E). Za planktonske celice bakterij vrste *E. coli* pa glede na rezultate, ki smo jih dobili s testom ANOVA ne moremo trditi, da je njihova koncentracija odvisna od vrste seva ter od časa inkubacije (priloga F).



Slika 8: Koncentracija celic vezanih v biofilm in koncentracija planktonskih celic sevov bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽMJ: oznaka seva

4.4 DOLOČITEV MINIMALNE KONCENTRACIJE RAZKUŽIL TRIKLOSAN, BENZALKONIJEV KLORID IN KLOHEKSIDIN DIACETAT MONOHIDRAT

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici smo določali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) razkužil triklosan, benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat. MIC za določeno razkužilo predstavlja prva neobarvana suspenzija v posamezni razredčitveni seriji pri metodi razredčevanja v mikrotiterski ploščici (Klančnik in sod., 2010).

V našem primeru smo dobili pri vseh testiranih koncentracijah razkužila (od 2048 do 1 µg/mL) na mikrotiterski ploščici neobarvane suspenzije, kar je pomenilo, da nobena od testiranih koncentracij razkužila ni bila MIC. Učinkovito koncentracijo za določeno razkužilo smo zato določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču (poglavje 2.5). Rezultati so prikazani v prilogi G in H.

4.5 DOLOČANJE UČINKOVITE KONCENTRACIJE RAZKUŽILA TRIKLOSAN

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo določali učinkovito koncentracijo razkužila triklosan (preizkušene koncentracije 0,25, 0,50, 0,75 in 1 µg/mL) pri izbranem sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128.

V preglednici 3 in prilogi I in J so prikazane izbrane koncentracije razkužila triklosan (od 0,25 do 1 µg/mL), ki učinkujejo na sev bakterij *E. coli* ŽMJ128.

Preglednica 3: Vpliv različnih koncentracij razkužila triklosan na rast bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128

Čas (h)	N (log CFU/mL) pri izbranih koncentracijah razkužila				
	0 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,75 µg/mL	1 µg/mL
0	7,41±0,01	7,38±0,05	7,30±0,01	7,25±0,02	7,28±0,02
24	8,94±0,06	8,66±0,04	8,67±0,00	8,63±0,01	8,56±0,02

Legenda: N: koncentracija celic

Glede na rezultate predstavljene v preglednici 3 in v prilogi I in J lahko zaključimo, da je bila rast bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 odvisna od časa inkubacije in vpliva koncentracije dodanega razkužila triklosan.

Do podobnih zaključkov so prišli tudi Braoudaki in sod. (2004), ki so preučevali odpornost bakterij vrste *E. coli* K-12 na triklosan in *E. coli* O55 na protimikrobna sredstva in vse skupaj primerjali z odpornostjo bakterij vrste *E. coli* O157:H7. Ugotovili so, da je bila navzkrižna odpornost pri sevih bakterij vrste *E. coli* K-12 in *E. coli* O55 manjša, kot pri sevu bakterij vrste *E. coli* O157:H7. Triklosan je pri sevu bakterij vrste *E. coli* K-12 pokazal navzkrižno odpornost na kloramfenikol, medtem ko je triklosan pri sevu bakterij vrste *E. coli* O55 pokazal navzkrižno odpornost na trimetoprim. Za razliko od sevov bakterij vrste *E. coli* K-12 in *E. coli* O55 pa so bile bakterije vrste *E. coli* O157:H7 odporne na kloramfenikol, tetraciklin, amoksiklin, trimetoprin, benzalkonijev klorid in klorheksidin. Ugotovili so, da so sevi, ki so odporni na razkužilo triklosan, odporni še na cel spekter protimikrobnih snovi in biocidov, kot sta benzalkonijev klorid in klorheksidin. Sev bakterij vrste *E. coli* O157:H7 je pri sedmih izmed petnajstih testiranih protimikrobnih sredstev pokazal dovzetnost za njihovo učinkovitost.

Tako kot Braoudaki in sod. (2004), smo tudi mi ugotovili, da razkužilo triklosan učinkuje na sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128. Učinkovite koncentracije razkužila triklosan so se v njihovem primeru gibale med 0,25 do 2048 µg/mL, medtem ko smo mi vzeli razpon med 0,25 do 1 µg/mL. Iz tega lahko sklepamo, da že majhne koncentracije razkužila triklosan učinkovito zavirajo rast bakterij vrste *E. coli*.

Ker smo že z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici (poglavje 2.4) določili, da koncentracije posameznih razkužil v koncentracijah od 1 do 2048 µg/mL popolnoma zavrejo rast bakterij vrste *E. coli*, smo pri iskanju učinkovite koncentracije posameznih razkužil vzeli manjše začetne koncentracije, in sicer od 0,25 do 1 µg/mL.

Tako smo ugotovili, da je bila za sev bakterije vrste *E. coli* ŽMJ128 učinkovita koncentracija razkužila benzalkonijev klorid 2 µg/mL. Pri sevu bakterije vrste *E. coli* ŽMJ135 pa je bila učinkovita koncentracija razkužila klorheksidin diacetat monohidrat 4 µg/mL.

4.6 VPLIV RAZKUŽILA NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE *E. coli* NA NERJAVEČEM JEKLU

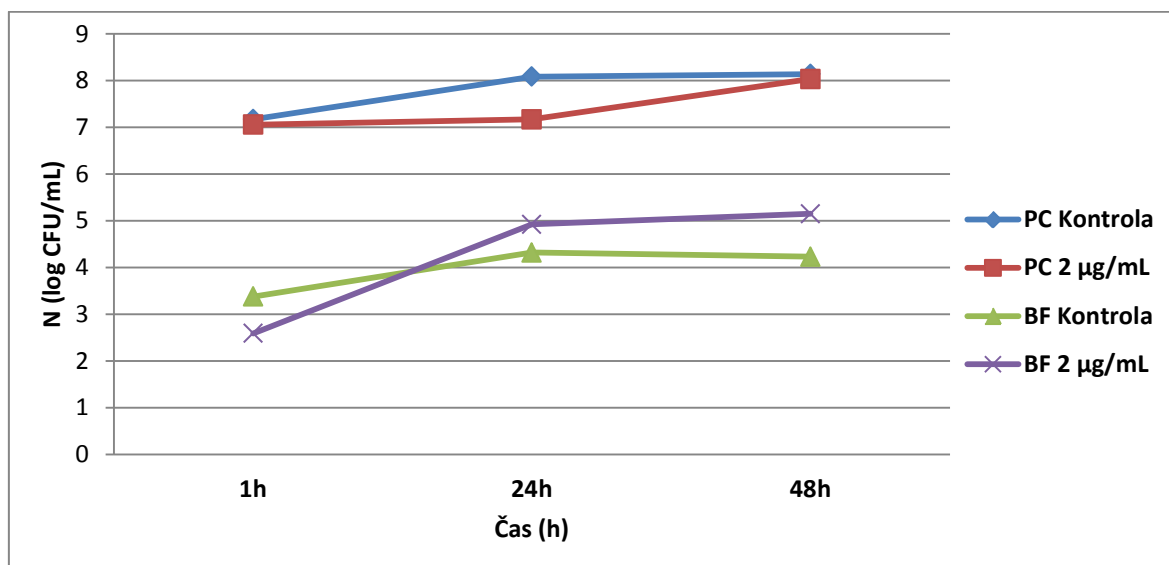
4.6.1 Vpliv razkužil benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat na tvorbo biofilma

Z izbranimi razkužiloma smo izvedli poskus na dveh sevih bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135. V poskusu smo uporabili različne koncentracije in vrste razkužil za izbrana seva. Tako smo za sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 uporabili razkužilo benzalkonijev klorid s koncentracijo 2 µg/mL. Za sev bakterije vrste *E. coli* ŽMJ135 pa smo uporabili razkužilo klorheksidin diacetat monohidrat s koncentracijo 4 µg/mL. Izbrano razkužilo smo dali v 10 mL gojišča TSB, kateremu smo dodali še 12 kupončkov iz nerjavečega jekla in 0,5 mL pripravljene kulture izbranega seva bakterij vrste *E. coli*. Naredili smo tudi kontrolni vzorec, ki je bil pripravljen po istem postopku, le da nismo dodali razkužila. Inkubacija je trajala 48 ur pri 37 °C, pri čemer smo vzorčenje izvedli po prvi uri in po 24, ter 48 urah. Ob vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic v gojišču TSB in koncentracijo celic pritrjenih na nerjaveče jeklo. Vzorčili smo v paralelkah.

4.6.1.1 Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na tvorbo biofilma bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128

Z metodo štetja na trdnem gojišču TSA smo določili koncentracijo celic seva *E. coli* ŽMJ128 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracijo celic, ki biofilma niso tvorile, tako imenovane planktonske celice.

Vsi rezultati so prikazani na sliki 9 ter v prilogah K in L.



Slika 9: Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na koncentracijo celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in na koncentracijo planktonskih celic
Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽMJ: oznaka seva

Glede na rezultate prikazane na sliki 10 ter v prilogah K in L lahko zaključimo, da koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic seva *E. coli* ŽMJ128 s časom raste ($p < 0,05$). Iz prilog K in L je razvidno, da dodatek razkužila (2 µg/mL) ni vplival na tvorbo biofilma in planktonske celice ($p > 0,05$). Predvidevamo, da je bila preizkušena koncentracija razkužila prenizka, da bi delovala inhibitorno na koncentracijo celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128.

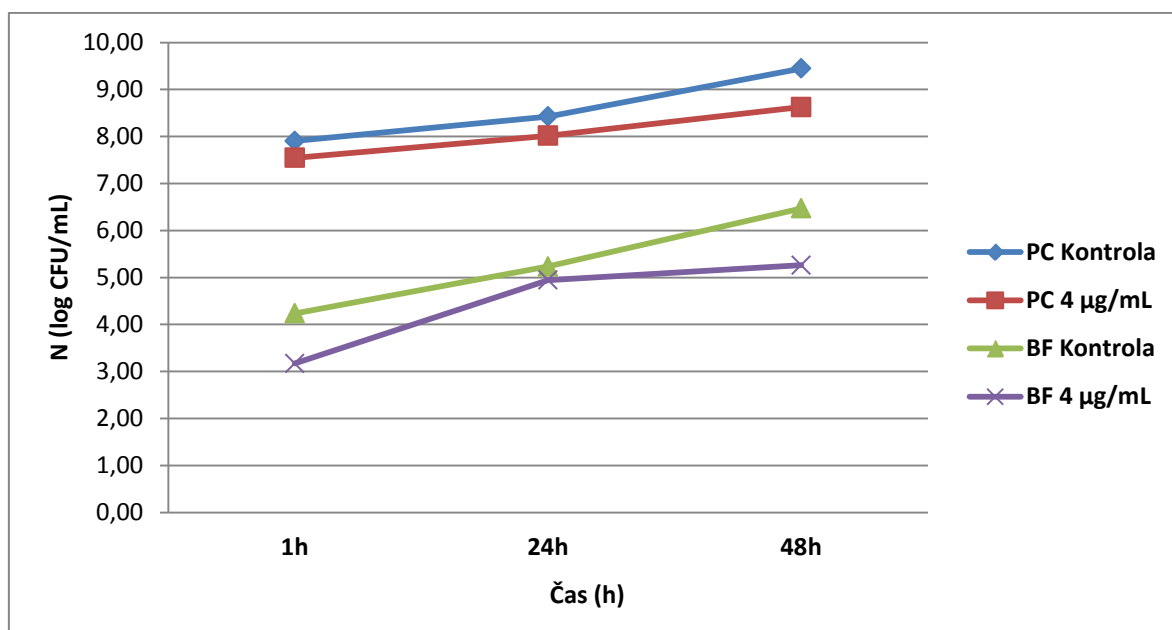
Opermann in Goll (1984) sta ugotovila, da je za doseganje baktericidnega učinka pri fakultativno anaerobnih bakterijah, kot so v našem primeru bakterije vrste *E. coli* potrebno dodati več biocida kot pri aerobnih bakterijah. Chapman (2003) opisuje, da se lahko odpornost proti določenim protimikrobnim sredstvom razvije s pridobitvijo novega genetskega materiala, z mutacijo, z razvitjem utišanih genov, z rastjo v biofilmu in tudi s slabše definiranim spremembam fenotipa. Ker komponente v biofilmu zmanjšajo difuzijo protimikrobnega sredstva do tarčnega mesta, je s tem omejeno tudi delovanje določenega protimikrobnega sredstva. Možnost pojava odpornosti je tudi izpostavitve subinhibitornim koncentracijam protimikrobnega sredstva (King, 1995). McBain in Gilbert (2001) navajata, da je občutljivost celic v biofilmih 1000krat manjša, kar lahko vidimo tudi v našem primeru.

Rezultate, ki smo jih dobili v našem primeru, si lahko razlagamo s prenizko koncentracijo razkužila.

4.6.1.2 Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na tvorbo biofilma bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135

Koncentracijo celic, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in planktonskih celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 ob dodatku razkužila klorheksidin diacetat monohidrat (4 µg/mL), smo določali z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču.

Rezultati so prikazani na sliki 10 ter v prilogah M in N.



Slika 10: Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na koncentracijo celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in na koncentracijo planktonskih celic

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽMJ: oznaka seva

Glede na rezultate predstavljene na sliki 10, lahko zaključimo, da je bila tvorba biofilma bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 odvisna od časa (daljši kot je bil čas inkubacije, več je bilo biofilma), medtem ko preizkušena koncentracija razkužila (4 µg/mL) ni imela vpliva na njegovo tvorbo (priloga M).

Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 je bila neodvisna od dodatka razkužila klorheksidin diacetat monohidrat (4 µg/mL) in časa inkubacije (priloga N). Tudi tu lahko zaključimo, da je bila preizkušena koncentracija razkužila klorheksidin diacetat monohidrat prenizka, da bi delovala inhibitorno na celice bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135.

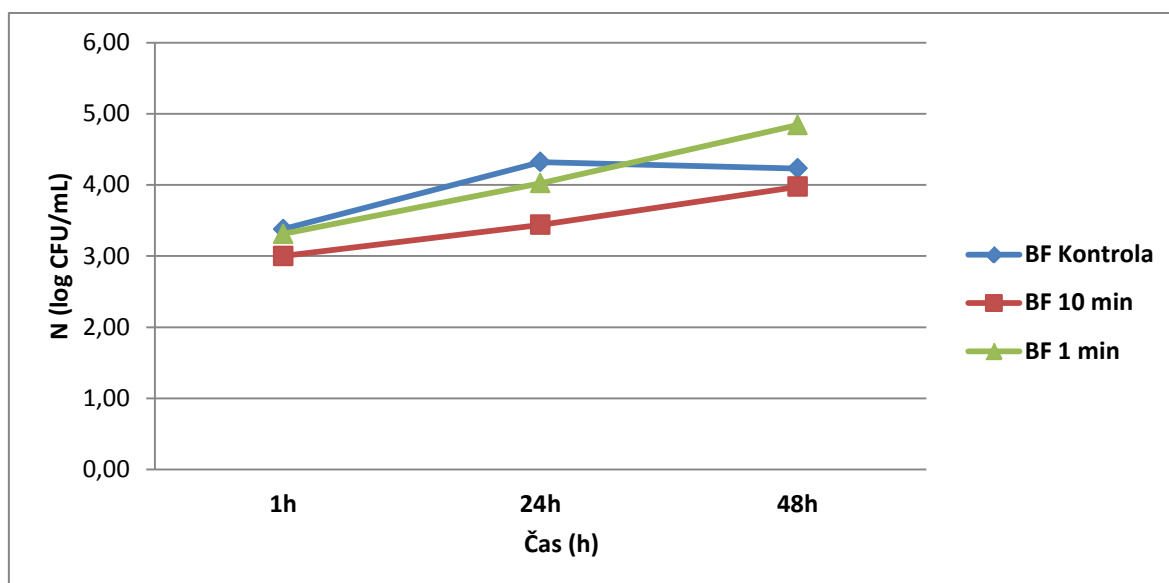
Poleg naštetih trditev, ki smo jih navedli pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128, lahko neučinkovitost razkužila klorheksidin diacetat monohidrat povežemo tudi z odpornostjo na razkužilo. Možen razlog je tudi ta, da bakterije vrste *E. coli* spadajo med gramnegativne bakterije, za katere je znano, da so manj občutljive na delovanje protimikrobnih snovi v

primerjavi z grampozitivnimi bakterijami. Razlog zato naj bi bil v sestavi celične stene. Z našimi eksperimenti smo to tudi potrdili.

4.7 VPLIV RAZKUŽIL BENZALKONIJEV KLORID IN KLOORHEKSIDIN DIACETAT MONOHIDRAT NA BIOFILM

Vpliv razkužila na že tvorjen biofilm bakterij sevov *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135 smo določili tako, da smo že tvorjen biofilm izpostavili razkužilu benzalkonijev klorid in razkužilu klorheksidin diacetat monohidrat za 1 minuto in 10 minut. Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo celic in s tem preverili učinkovitost razkužila benzalkonijev klorid in klorheksidin diacetat monohidrat na celice bakterij vrste *E. coli* v odvisnosti od časa.

Na sliki 12 in prilogi O so prikazani rezultati za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ128.

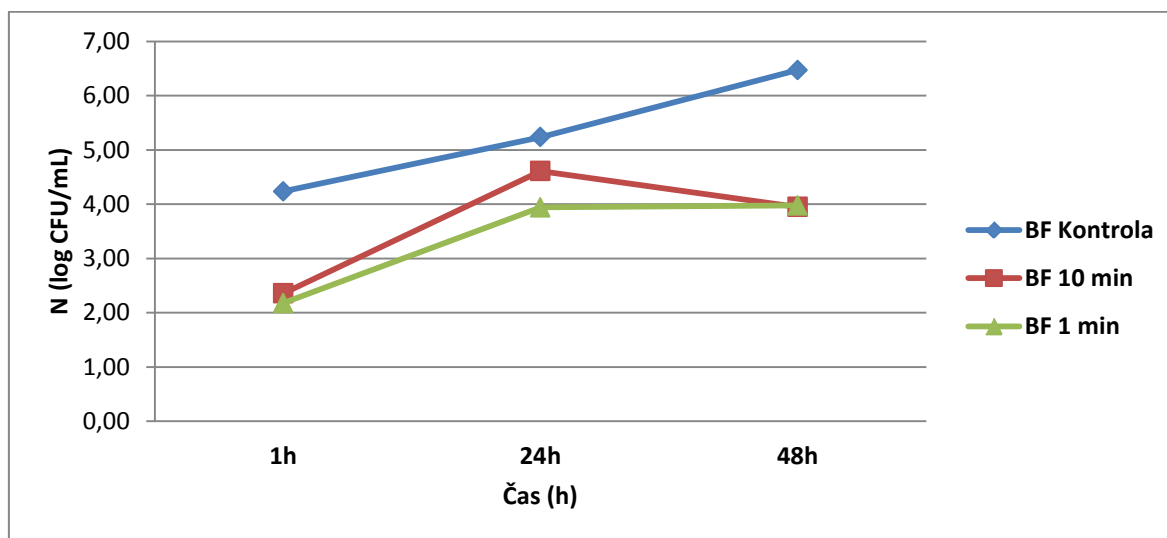


Slika 11: Vpliv razkužila benzalkonijev klorid na celice bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1- in 10-minutni izpostavitvi

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, BF 1 min: biofilm po 1 minutni izpostavitvi, BF 10 min: biofilm po 10 minutni izpostavitvi, BF kontrola: biofilm ni bil izpostavljen razkužilu

Kot lahko razberemo s slike 11 in priloge O, preizkušena koncentracija razkužila (2 µg/mL) benzalkonijev klorid ne vpliva na koncentracijo celic bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 v biofilmu, ne glede na čas izpostavitve biofilma razkužilu (1 minuta in 10 minut).

Na sliki 12 in prilogi P so prikazani rezultati za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ135. Vidimo, da je učinkovitost preizkušene koncentracije razkužila (4 µg/mL) klorheksidin diacetat monohidrat (za 1 minuto in 10 minut) odvisna od starosti biofilma in od uporabe samega razkužila klorheksidin diacetat monohidrat.



Slika 12: Vpliv razkužila klorheksidin diacetat monohidrat na celice bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1- in 10-minutni izpostavitvi

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, BF 1 min: biofilm po 1 minutni izpostavitvi, BF 10 min: biofilm po 10 minutni izpostavitvi, BF kontrola: biofilm ni bil izpostavljen razkužilu

Rezultat, ki smo ga dobili pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128, lahko pripišemo temu, da so bile uporabljene koncentracije prenizke ali pa, da samo razkužilo ni bilo dovolj učinkovito. Razvitje odpornosti lahko povežemo tudi z rastjo v biofilmu, namreč le-ta se v biofilmu poveča za 1000 krat (McBain in Gilbert, 2001). Možna je tudi razlaga, ki sta jo opisala Opperman in Goll (1984), da bi bilo za doseganje bakteriocidnega učinka pri fakultativno anaerobnih bakterijah, kar velja v našem primeru, treba dodati več razkužila kot pri aerobnih. Sandossi in sod. (1999) pa navajajo, da je pojav odpornosti odvisen tudi od intrinzičnih lastnosti samega mikroorganizma in pa samega režima dodajanja razkužila.

Pri bakterijah vrste *E. coli* ŽMJ135 pa lahko iz rezultatov zaključimo, da je bila preizkušena koncentracija dovolj učinkovita, da je vplivala na zmanjšanje števila celic v biofilmu. Lahko vidimo, da je imel daljši čas učinkovanja razkužila (10 minut) večji vpliv na odmiranje celic v biofilmu, v primerjavi z eno minutno izpostavitvjo razkužilu.

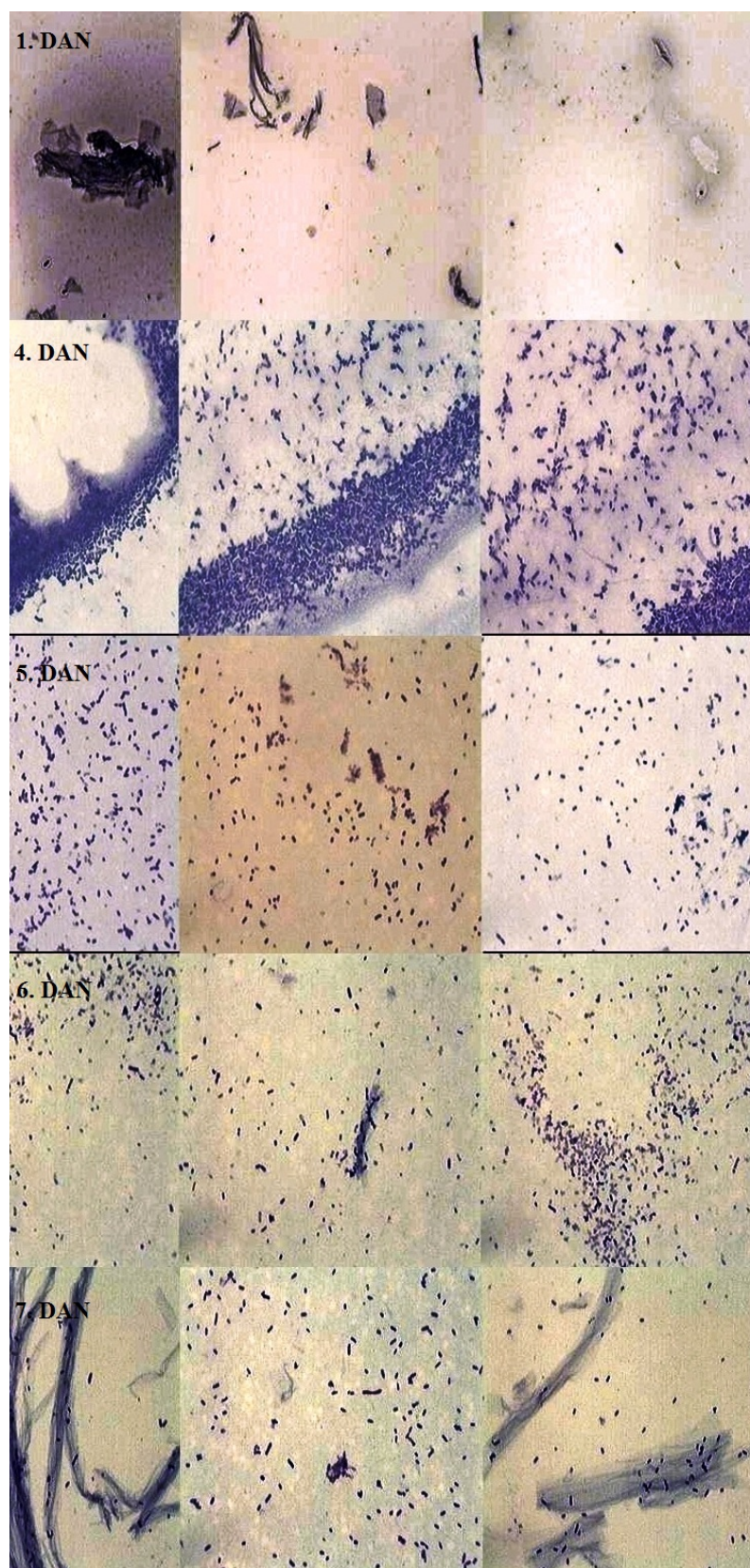
Fazlara in Ekhtelat (2012) sta prav tako dokazala, da se je pri bakterijah vrste *E. coli* in *S. aureus* pri izpostavitvi razkužila benzalkonijev klorid za 10 minut zmanjšalo število celic pritrjenih na nerjaveče jeklo iz 6 na 2 log CFU/kuponček. Do podobnih zaključkov smo prišli tudi mi, le da je bila redukcija v našem primeru manjša.

4.8 DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA V 14-DNEVNEM POSKUSU V PETRIJEVIH PLOŠČAH

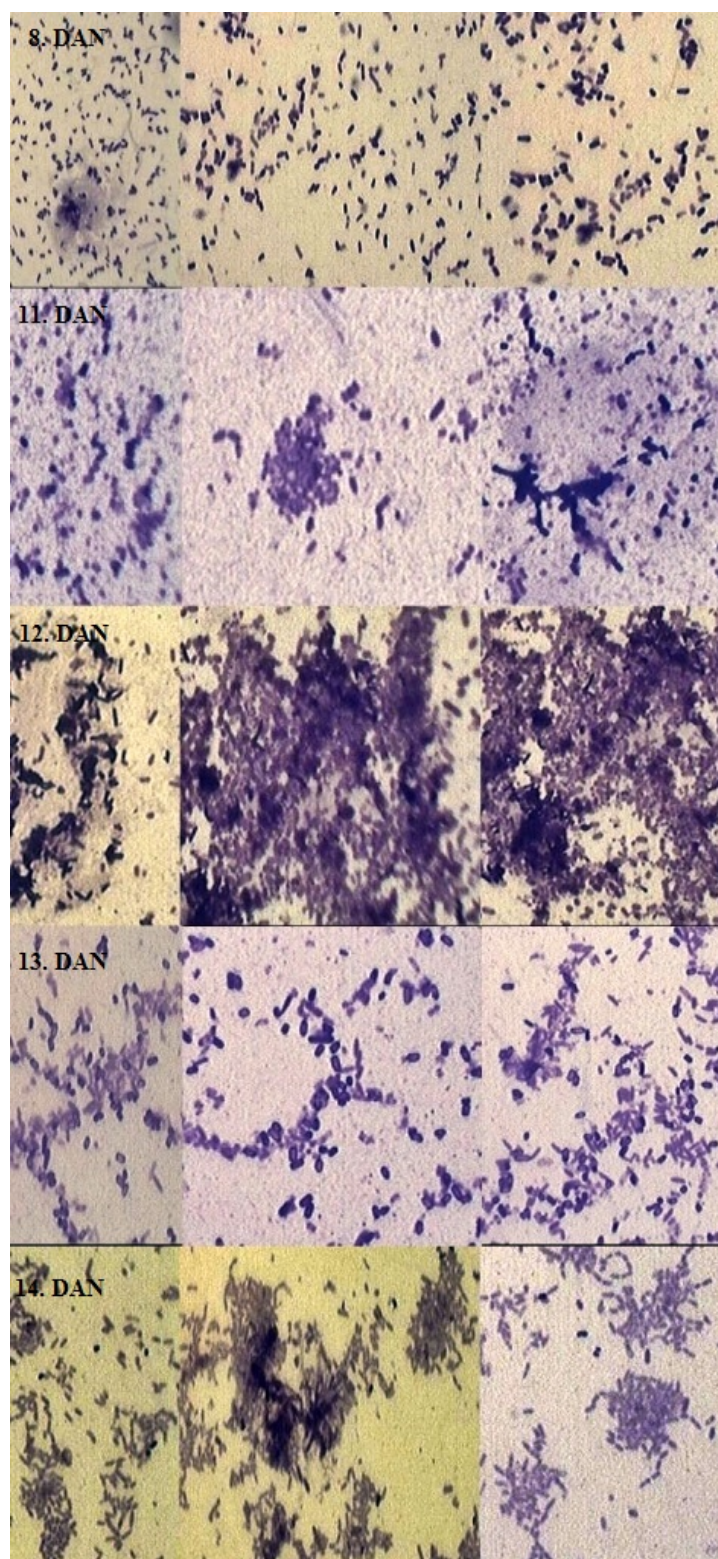
Določanje tvorbe biofilma smo izvedli z metodo, kot so jo opisali Harvey in sod. (2007). Za tvorbo biofilma v 30 mm polistirenskih petrijevih ploščah smo uporabili sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128.

S sterilno ezo smo sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 prenesli v 5 mL vnaprej pripravljenega gojišča TSB in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Suspenzijo smo nato za 1 minuto premešali na vrtinčniku. Sledila je priprava 30 mm polistirenskih petrijevih plošč v katere smo prenesli 3 mL te suspenzije katero smo inkubirali na stresalniku pri temperaturi 30 °C. Kontrolni vzorec je vseboval le 3 mL sterilnega tekočega gojišča TSB. Tako pripravljene petrijeve plošče s kulturo (0,1 mL kulture) smo uporabili za spremljanje biofilma v 14-dnevnem poskusu. Vzorčenje smo izvedli po 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 in 14 dnevu.

Na sliki 13 in 14 so prikazani različni mikrografi bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 ki so zrastle v gojišču TSB pri 30 °C na polistirenskih petrijevih ploščah.



Slika 13: Spremljanje tvorbe biofilma bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 v gojišču TSB pri 30 °C na polistirenskih petrijevih ploščah (povečava: 1000x) od 1 do 7 dneva inkubacije



Slika 14: Spremljanje tvorbe biofilma bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 v gojišču TSB pri 30 °C na polistirenskih petrijevih ploščah (povečava: 1000x) od 8 do 14 dneva inkubacije

Tvorba biofilma se je pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 pokazala v osmem dnevu inkubacije (slika 14), kar smo lahko sklepali na podlagi morfoloških značilnosti, ki smo jih opazili pri pregledu s svetlobnim mikroskopom.

Lahko rečemo, da se do osmega dneva biofilm kot sama struktura vidna pod svetlobnim mikroskopom ne tvori (slika 13), po tem pa se tvori, vendar slabo, kar lahko povežemo s tem, da so bili izbrani sevi na splošno slabi tvorci biofilma.

Sama tvorba biofilma, ki je prikazana na slikah po določenih dnevih inkubacije, je odvisna tudi od tega, na katerem delu smo slikali te strukture. Mi smo za prikaz na sliki 14 izmed desetih slik izbrali tri najbolj značilne.

Ugotovitve do katerih smo prišli, so bile v skladu z zaključki Harvey in sod. (2007), ki so izvedli mikroskopsko raziskavo biofilma z namenom proučiti formacijo biofilma z izbranimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB v 14 dnevem poskusu pri 20 °C. Rezultati so pokazali da podaljšana inkubacija nekatere seve bakterij vrst *L. monocytogenes* uvršča med šibke tvorce biofilma.

Razvoj biofilma je šel po stopnjah, in sicer je bila tvorba biofilma v prvih dneh inkubacije zelo slaba, kar kaže na to, da je površina prikazana na sliki skoraj neposeljena z mikrokolonijami biofilma, ki jih je tvoril posamezen sev. Z nadaljno inkubacijo pa le ta postane gostejše poseljena in tako 11- in 12-dan inkubacije sev razvije v celoti vidno strukturo biofilma.

Tudi iz našega primera vidimo, da sev bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128, ki smo ga analizirali do 8 dneva inkubacije ne tvori jasne strukture biofilma, medtem ko so le te 12, 13 in 14 dan že lepo vidne.

V obzir moramo vzeti tudi dejstvo, da je bila metoda preizkušena le na enem sevu, zato bi bilo dobro poskus še nekajkrat ponoviti.

5 SKLEPI

- Optimizirana metoda barvanja s kristal violetom je primerna za določitev količine biofilma pri bakterijah vrste *E. coli*.
- Tvorba biofilma na polistirenski površini je pri bakterijah vrste *E. coli* odvisna od samega seva. Humani izolati so bili določeni kot boljši tvorci biofilma kot živilski izolati.
- Tvorba biofilma na polistirenski površini je pri bakterijah vrste *E. coli* odvisna od časa in seva.
- Pri sevu *E. coli* ŽMJ128 dodatek razkužila benzalkonijev klorid (2 µg/mL) ni imel vpliva na koncentracijo celic v biofilmu in planktonskih celic.
- Pri sevu *E. coli* ŽMJ135 je dodatek razkužila klorheksidin diacetat monohidrat (4 µg/mL) vplival na zmanjšanje koncentracije celic v biofilmu, medtem ko na planktonske celice ni imel vpliva.
- Rast in razvoj biofilma lahko opazujemo s kvalitativnim opazovanjem mikrokolonij na polistirenski površini.

6 POVZETEK

Kljub vse bolj modernim izboljšavam na področju procesnih tehnologij v živilstvu je varnost živil bistvenega pomena pri zahtevah potrošnikov. To še posebej velja za patogene bakterije, ki se prenašajo s hrano. Le-te so se sposobne prilagoditi na številne okoljske razmere in prav razumevanje teh dejavnikov, bi lahko omogočilo boljši nadzor nad mikroorganizmi, ki se pogosto pojavljajo v prehranski verigi.

Biofilmi, kot ena izmed oblik zaščite bakterij pred neugodnimi razmerami predstavljajo velik problem v živilski industriji. Tvorijo se na različnih površinah, zato je pomembno, da je procesna oprema narejena iz čim manj korozivnih materialov in da so površine čimbolj gladke in brez razpok. Sama struktura mikrobne združbe in njihovih izvenceličnih produktov pa biofilmu zagotavlja zaščito pred protimikrobnimi sredstvi, kar predstavlja veliko nevarnost kontaminacije živil in s tem posledično okužbe ljudi.

V naši diplomski nalogi smo spremljali razvoj biofilmov različnih sevov bakterij vrste *Escherichia coli*. Bakterije so v svoji dolgotrajni evoluciji razvile več mehanizmov izmenjave genetskih zapisov, kar jim skupaj z drugimi lastnostmi, omogoča izredno učinkovito prilagajanje spremembam v okolju, vključno s spremembami, ki jih povzroča človek, kot so na primer uporaba velikih količin antibiotikov, razkužil in tudi težkih kovin. Poleg omenjenega jih pred okoljskim stresom ščiti tudi zmožnost tvorbe biofilmov.

Na različnih površinah (polistiren in nerjaveče jeklo), smo analizirali tvorbo biofilma pri humanih in živilskih sevih bakterij vrste *E. coli*. Z barvanjem s kristal violetom smo seve razdelili na seve, ki ne tvorijo biofilma, na šibke, srednje močne, močne in zelo močne tvorce biofilma. Tvorba biofilma je bila odvisna od seva bakterij vrste *E. coli* in časa. Humani sevi izbrani za naše delo so bili močnejši tvorca biofilma kot živilski sevi. Za nadaljnje delo smo izbrali dva humana seva, s katerima smo potem določevali sposobnost tvorbe biofilma na nerjavečem jeklu.

Z izbranimi sevoma smo testirali vpliv okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma pri bakterijah vrste *E. coli*. Biofilm bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128 smo tako izpostavili razkužilu benzalkonijev klorid in biofilm bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135 razkužilu klorheksidin diacetat monohidrat.

Ugotavljali smo vpliv omenjenih razkužil na celice bakterij vrste *E. coli* vezane v biofilm in na planktonske celice. Pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ128, dodatek razkužila benzalkonijev klorid ni vplival na koncentracijo celic v biofilmu in na koncentracijo planktonskih celic. Pri sevu bakterij vrste *E. coli* ŽMJ135, pa je dodatek razkužila klorheksidin diacetat monohidrat zmanjšal koncentracijo celic v biofilmu, medtem ko na koncentracijo planktonskih celic ni imel vpliva.

Rast in razvoj biofilma smo spremljali tudi s kvalitativnim opazovanjem mikrokolonij na polistirenski površini.

7 VIRI

- An Y.H., Friedman R.J. 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 141-152
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-46
- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli*. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188
- Batis J., Brglez I. 1992. *Mikrobiologija za veterinarje*. Ljubljana, Univerzitetna tiskarna v Ljubljani: 42-47
- Belessi C.E.A., Gounadaki A.S., Psomas A.N., Skandais P.N. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, Suppl.1: S46-S52
- Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 249-289
- Braoudaki M., Hilton A. C. 2004. Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* 055 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 305-309
- Burton E., Yakandawala N., LoVetri K., Madhyastha M. S. 2006. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 34: 1-4
- CDC. 2012. FoodNet surveillance report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia. U.S. Department of Health and Human Services, Foodborne diseases active surveillance Network (FoodNet): 52 str.
- Chapman J.S. 2003. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 2: 133-138
- Chaturongkasumrit Y., Takahashi H., Keeratipibul S., Kuda T., Kimura B. 2010. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22: 1893-1899
- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Hebraud M. 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters*, 236: 241-248
- Coenye T., Nelis H.J. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83: 89-105

- Corona-Izquierdo F. P., Membrillo-Hernandez J. 2002. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Research in Microbiology*, 153: 181-185
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745
- Czaczyk K., Myszka K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environment*, 16, 6: 799-806
- Danevčič T., Mandić-Mulec I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63-64
- Dewanti R., Wong A.C.L. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 147-164
- Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L.A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6: 2950-2958
- ECDC. 2013. Annual epidemiological report. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 266 str.
- EFSA. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11, 4: 3129, doi: 10.2903/j.efsa.2013: 250 str.
- Fazlara A., Ekhtelat M. 2012. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Euroasian Journal Agricultural & Environmental Science*, 12: 23-29
- Flemming H.C. 2002. Biofouling in water system-cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 629-640
- Harvey J., Keenan K. P., Gilmour A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24: 380-392
- Houari A., Di Martino P. 2007. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 652-656
- IVZ. 2011. Okužbe z enterohemoragično *E.coli* (EHEC) in zapleti (hemolitično uremični sindrom kot posledica okužbe z EHEC). Ljubljana, Inštitut za Varovanje Zdravja Republike Slovenije : 2 str.
<http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=140&pi=5&id=1627&PageIndex=0&groupId=273&newsCategory=&action=ShowNewsFull&pl=140-5.0> (maj 2013)
- Jeršek B. 2007. Osnovni principi identifikacije bakterij in kvasovk v živilih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 16 str.

- Juhna T., Birzniece D., Larsson S., Zulenkovs D., Sharipo A., Azevedo N.F., Menard-Szczebara F., Castagnet S., Feliars C., Keevil C.W. 2007. Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7456-7564
- King V. M. 1995. Bactericides, fungicides and algicides. V: Paint and coating testing manual. 14th ed. of the Garden-Sword handbook. Koleske J.V. (ed.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials: 261-267
- 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
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dopolnjena izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (marec 2013)
- Kumar C.G., Anand S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C., Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 1-16
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4: 999-1007
- Mah T. F., O'Toole G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9: 34-39.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Education, Inc: 1019 str.
- Mahdavi M., Jalali M., Kasra Kermanshahi R. 2007. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2, 2: 113-118
- Mravasi M., Visscher P.T., Martinez L.C. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters*: 1-9
- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201
- McBain A.J., Gilbert P. 2001. Biocide tolerance and harbingers of doom. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47: 55-61
- McCoy W.F., Bryers J.D., Robbins J., Costerton J.W. 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 910-917

- Opermann R.A., Goll M. 1984. Presence and effects of anaerobic bacteria in water based paint. *International Journal of Coatings Technology*, 56, 712: 51-56
- Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. 2008. Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Journal of Hospital Infection*, 70: 361-368
- Pitts B., Hamilton M. A. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 2: 269-276
- Potočnik I. 2009. Vloga biofilma pri endodontskem zdravljenju. Ljubljana, Zobozdravstveni vestnik, 64: 15-20
- Pratt L.A., Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30, 2: 285-293
- Reid S.D., Herbelin C.J., Whitman T.S. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 406: 64-67
- Reisner A., Haagenensen J.A.J., Schembri M.A., Zechner E.L., Molin S. 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, 48, 4: 933-946
- Rivas L., Dykes G.A., Fegan N. 2007. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxinogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 44-51
- Romanova N.A., Gawande P.V., Brovko L.Y., Griffiths M.W. 2007. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 231-237
- Russel A.D. 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36, 3-4: 247-265
- Ryu J.H., Beuchat L.R. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1: 247-254
- Ryu J.H., Kim H., Beuchat L.R. 2004. Attachment and biofilm formation by *E. coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability and temperature. *Journal of Food Protection*, 67: 2123-2131
- Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. 2007. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19: 1070-1075
- Sauer K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4: 219, doi: 10.1186/gb-2003-4-6-219: 5 str.

- Scott T.M., Rose J. B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J. 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 5796-5803
- Smole Možina S. 2004. Odpornost mikoorganizmov v hrani. V: *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71-82
- Stepanovic S., Irkovi I., Mija V., Vabi-Vlahovi M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* sp. *Food Microbiology*, 20: 339-343
- Trkov M., Andlovic A., Berce I., Štorman A., Ravnik M., Paragi M. 2012. Verotoksigeni sevi bakterije *Escherichia coli*, osamljeni v Sloveniji iz humanih vzorcev. *Zdravstveni vestnik*, 81: 32-43
- Wakimoto N., Nishi J., Sheikh J., Nataro J.P., Sarantuya J., Iwashita M., Manago K., Tokuda K., Yoshinaga M., Kawano Y. 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 5: 687-690
- Wingender J., Neu T. R., Flemming H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? V: *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds.). New York, Springer: 1-20

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici izr. prof. dr. Barbari Jeršek za nasvete in vodenje med eksperimentalnim delom v laboratoriju, za koristne napotke, strokovne popravke in preglede diplomskega dela.

Izr. prof. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za izredno strokoven in natančen pregled diplomske naloge, ki ga je opravila v vlogi recenzenta. Hvala za vse nasvete in strokovne popravke, ki so dali moji diplomski nalogi še dodatno težo.

Posebna zahvala je namenjena še družini in prijateljem za spodbudo, podporo in razumevanje v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 24-urni inkubaciji

Sev	$\Delta A \pm SD$		P sev
	ORIGINALNA M. P.	NOVA M. P.	
<i>E. coli</i> ŽMJ128	$0,195 \pm 0,086$	$0,208 \pm 0,081$	0,015
<i>E. coli</i> ŽMJ131	$0,267 \pm 0,284$	$0,200 \pm 0,193$	
<i>E. coli</i> ŽMJ132	$0,411 \pm 0,217$	$0,252 \pm 0,108$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 133	$0,680 \pm 0,821$	$1,011 \pm 1,531$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 135	$0,278 \pm 0,137$	$0,147 \pm 0,083$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 136	$0,125 \pm 0,078$	$0,065 \pm 0,057$	
<i>E. coli</i> ŽMJ137	$0,120 \pm 0,260$	$0,058 \pm 0,132$	
<i>E. coli</i> ŽMJ138	$0,150 \pm 0,168$	$0,136 \pm 0,192$	
<i>E. coli</i> ŽMJ139	$0,024 \pm 0,143$	$0,059 \pm 0,135$	
<i>E. coli</i> ŽMJ143	$0,078 \pm 0,125$	$0,061 \pm 0,044$	
P original/odpipetirano	0,889		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost, M. P.: mikrotiterska ploščica

Priloga B: Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 48-urni inkubaciji

Sev	$\Delta A \pm SD$		P sev
	ORIGINALNA M. P.	NOVA M. P.	
<i>E. coli</i> ŽMJ128	$0,114 \pm 0,221$	$0,162 \pm 0,112$	$2,1 \times 10^{-6}$
<i>E. coli</i> ŽMJ131	$-0,005 \pm 0,159$	$0,168 \pm 0,257$	
<i>E. coli</i> ŽMJ132	$-0,025 \pm 0,129$	$0,087 \pm 0,141$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 133	$-0,131 \pm 0,063$	$-0,119 \pm 0,043$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 135	$0,047 \pm 0,228$	$0,091 \pm 0,164$	
<i>E. coli</i> ŽMJ 136	$-0,134 \pm 0,054$	$-0,114 \pm 0,038$	
<i>E. coli</i> ŽMJ137	$0,026 \pm 0,202$	$0,009 \pm 0,208$	
<i>E. coli</i> ŽMJ138	$-0,156 \pm 0,041$	$-0,150 \pm 0,031$	
<i>E. coli</i> ŽMJ139	$-0,166 \pm 0,042$	$-0,177 \pm 0,040$	
<i>E. coli</i> ŽMJ143	$-0,193 \pm 0,020$	$-0,190 \pm 0,032$	
P original/odpipetirano	0,215		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost, M. P.: mikrotiterska ploščica

Priloga C: Količina biofilma različnih sevov bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini v originalni in novi mikrotiterski ploščici določena z barvanjem s kristal violetom po 72-urni inkubaciji

Sev	$\Delta A \pm SD$		P sev
	ORIGINALNA M. P.	NOVA M. P.	
<i>E. coli</i> ŽMJ128	0,765 $\pm$ 0,587	0,544 $\pm$ 0,466	0,003
<i>E. coli</i> ŽMJ131	0,248 $\pm$ 0,200	0,109 $\pm$ 0,068	
<i>E. coli</i> ŽMJ132	0,605 $\pm$ 0,393	0,315 $\pm$ 0,107	
<i>E. coli</i> ŽMJ 133	0,219 $\pm$ 0,085	0,153 $\pm$ 0,033	
<i>E. coli</i> ŽMJ 135	0,267 $\pm$ 0,164	0,206 $\pm$ 0,168	
<i>E. coli</i> ŽMJ 136	0,034 $\pm$ 0,077	0,135 $\pm$ 0,070	
<i>E. coli</i> ŽMJ137	0,099 $\pm$ 0,054	0,093 $\pm$ 0,017	
<i>E. coli</i> ŽMJ138	0,557 $\pm$ 0,938	0,134 $\pm$ 0,035	
<i>E. coli</i> ŽMJ139	0,116 $\pm$ 0,067	0,098 $\pm$ 0,035	
<i>E. coli</i> ŽMJ143	0,119 $\pm$ 0,074	0,110 $\pm$ 0,072	
P original/odpipetirano	0,092		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost, M. P.: mikrotiterska ploščica

Priloga D: Količina biofilma pri različnih sevih bakterij vrste *E. coli* na polistirenski površini določena z barvanjem s kristal violetom

Sev	$\Delta A \pm SD$			P sev
	24h	48h	72h	
<i>E. coli</i> ŽMJ128	0,202 $\pm$ 0,039	0,138 $\pm$ 0,164	0,654 $\pm$ 0,504	8,6x10 ⁻¹²
<i>E. coli</i> ŽMJ131	0,233 $\pm$ 0,114	0,082 $\pm$ 0,218	0,179 $\pm$ 0,157	
<i>E. coli</i> ŽMJ132	0,331 $\pm$ 0,090	0,031 $\pm$ 0,139	0,460 $\pm$ 0,308	
<i>E. coli</i> ŽMJ 133	0,845 $\pm$ 0,575	-0,125 $\pm$ 0,050	0,186 $\pm$ 0,069	
<i>E. coli</i> ŽMJ 135	0,212 $\pm$ 0,063	0,069 $\pm$ 0,185	0,236 $\pm$ 0,157	
<i>E. coli</i> ŽMJ 136	0,095 $\pm$ 0,035	-0,124 $\pm$ 0,044	0,084 $\pm$ 0,087	
<i>E. coli</i> ŽMJ137	0,089 $\pm$ 0,097	0,017 $\pm$ 0,190	0,096 $\pm$ 0,037	
<i>E. coli</i> ŽMJ138	0,143 $\pm$ 0,083	-0,158 $\pm$ 0,034	0,345 $\pm$ 0,655	
<i>E. coli</i> ŽMJ139	0,042 $\pm$ 0,065	-0,171 $\pm$ 0,039	0,107 $\pm$ 0,051	
<i>E. coli</i> ŽMJ143	0,070 $\pm$ 0,044	-0,191 $\pm$ 0,025	0,114 $\pm$ 0,068	
<i>E. coli</i> ŽM510	-0,001 $\pm$ 0,015	0,048 $\pm$ 0,085	0,017 $\pm$ 0,011	
<i>E. coli</i> ŽM511	0,011 $\pm$ 0,019	0,047 $\pm$ 0,076	0,011 $\pm$ 0,012	
<i>E. coli</i> ŽM512	0,024 $\pm$ 0,023	0,033 $\pm$ 0,143	0,039 $\pm$ 0,025	
P čas inkubacije	8,8x10 ⁻¹⁰			

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽMJ: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost

Priloga E: Koncentracija celic sevov *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135 v biofilmu na nerjavečem jeklu

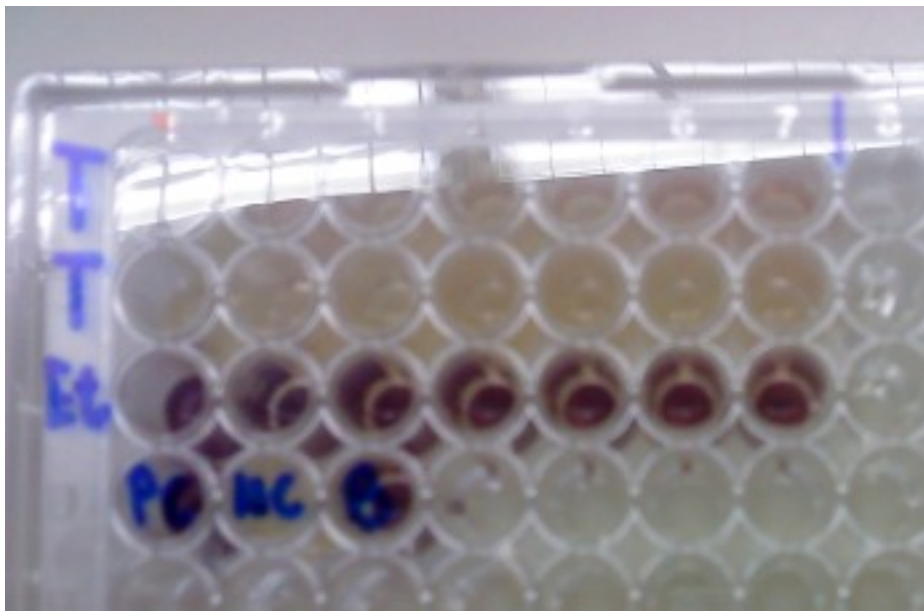
Sev		Čas (h)			P sev
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	ŽMJ128	3,38	4,32	4,23	0,05
	ŽMJ135	4,24	5,24	6,47	
P čas inkubacije		0,01			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost

Priloga F: Koncentracija planktonskih celic sevov *E. coli* ŽMJ128 in *E. coli* ŽMJ135

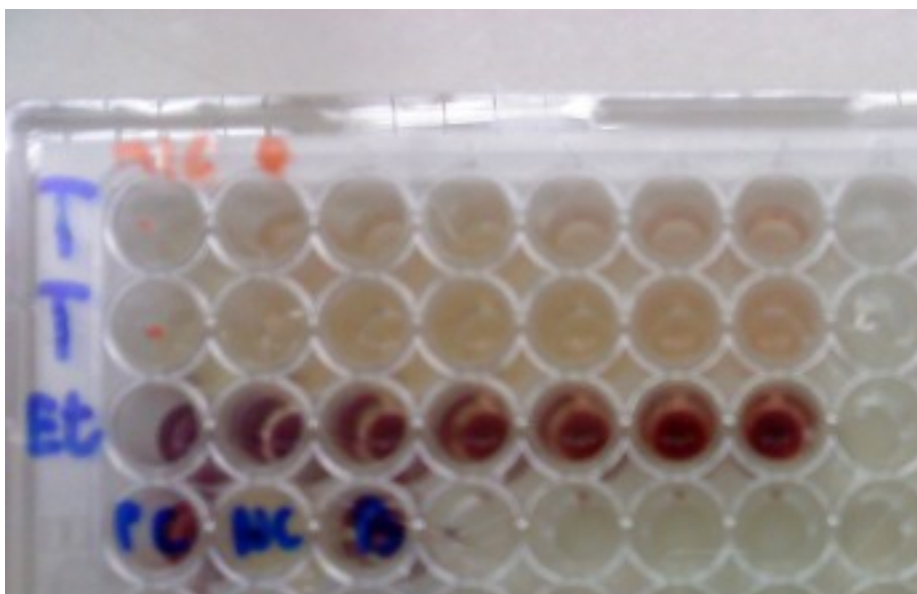
Sev		Čas (h)			P sev
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	ŽMJ128	7,18	8,09	8,14	0,15
	ŽMJ135	7,90	8,42	9,45	
P čas inkubacije		0,12			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost



Priloga G: Določevanje MIC razkužila triklosan za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ128 z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici

Legenda: PC: pozitivna kontrola, NC: negativna kontrola, B: slepi vzorec, T: triklosan, Et: etanol



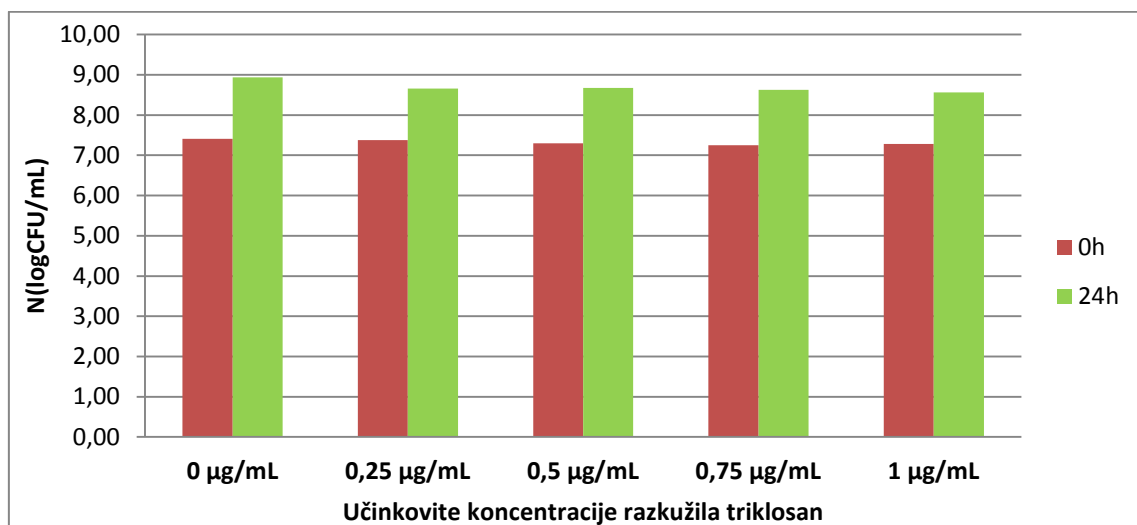
Priloga H: Določevanje MIC razkužila triklosan za bakterije vrste *E. coli* ŽMJ135 z metodo razredčevanja v mikortiterski ploščici

Legenda: PC: pozitivna kontrola, NC: negativna kontrola, B: slepi vzorec, T: triklosan, Et: etanol

Priloga I: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128 v tekočem gojišču TSB ob dodatku razkužila triklosan

	C (µg/mL)	Čas (h)		P razkužila
		0	24	
N (log CFU/mL)	0	7,41	8,94	9,73x10 ⁻⁶
	0,25	7,38	8,66	
	0,50	7,30	8,67	
	0,75	7,25	8,63	
	1	7,28	8,56	
P čas inkubacije		1,14x10 ⁻¹⁵		

Legenda: N: koncentracija celic, C: koncentracija razkužila, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost



Priloga J: Rast bakterij seva *E. coli* ŽMJ128 pri različnih koncentracijah razkužila triklosan

Priloga K: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu, ob dodatku razkužila benzalkonijev klorid

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	0 µg/mL	3,38	4,32	4,23	0,446
	2 µg/mL	2,59	4,93	5,15	
P čas inkubacije		0,006			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost

Priloga L: Koncentracija planktonskih celic seva *E. coli* ŽMJ128 ob dodatku razkužila benzalkonijev klorid

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	0 µg/mL	7,18	8,09	8,14	0,160
	2 µg/mL	7,06	7,17	8,04	
P čas inkubacije		0,042			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost

Priloga M: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ135, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu, ob dodatku razkužila klorheksidin diacetat monohidrat

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	0 µg/mL	4,24	5,24	6,47	0,15
	4 µg/mL	3,17	4,95	5,26	
P čas inkubacije		0,04			

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost

Priloga N: Koncentracija planktonskih celic seva *E. coli* ŽMJ135 ob dodatku razkužila klorheksidin diacetat monohidrat

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	0 µg/mL	7,90	8,42	9,45	0,5
	4 µg/mL	7,55	8,02	8,63	
P čas inkubacije		0,4			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost

Priloga O: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ128, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma razkužilu benzalkonijev klorid

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	BF KONTROLA	3,38	4,32	4,23	0,5
	BF 1 min	3,31	4,03	4,84	
	BF 10 min	3,00	3,44	3,98	
P čas inkubacije		0,2			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi 2 µg/mL razkužila benzalkonijev klorid za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi 2 µg/mL razkužila benzalkonijev klorid za 1 minuto, BF kontrola: kontrola biofilma

Priloga P: Koncentracija celic seva *E. coli* ŽMJ135, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma razkužilu klorheksidin diacetat monohidrat

Sev		Čas (h)			P razkužilo
		1	24	48	
N (log CFU/mL)	BF KONTROLA	4,24	5,24	6,47	0,006
	BF 1 min	2,18	3,94	3,98	
	BF 10 min	2,36	4,61	3,95	
P čas inkubacije		0,008			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽMJ: oznaka seva, P: verjetnost, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi 4 µg/mL razkužila klorheksidin diacetat monohidrat za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi 4 µg/mL razkužila klorheksidin diacetat monohidrat za 1 minuto, BF kontrola: kontrola biofilma.