

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja CERKVENIK

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV IN SEVA
BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes* NA
TVORBO BIOFILMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja CERKVENIK

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV IN SEVA BAKTERIJ VRSTE
Listeria monocytogenes NA TVORBO BIOFILMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND STRAINS OF
Listeria monocytogenes ON BIOFILM FORMATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

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 prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja CERKVENIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD** Dn
- DK** UDK 579.24.083 + 579.26: 614.3 (043) = 163.6
- KG** bakterijski biofilmi / *Listeria monocytogenes* / tvorba biofilma / delovne površine / polistiren / nerjaveče jeklo / inhibicija tvorbe biofilma / razkužila / triklosan / rastlinski ekstrakti / *Evodia rutaecarpa*
- AV** CERKVENIK, Maja
- SA** JERŠEK, Barbara (mentorica) / KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
- KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI** 2012
- IN** VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV IN SEVA BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes* NA TVORBO BIOFILMA
- TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP** XI, 50 str., 5 pregl., 24 sl., 51 vir.
- IJ** Sl
- JI** sl/en
- AI** Namen naloge je bil preveriti zmožnost tvorbe biofilma različnih sevov bakterij vrste *Listeria monocytogenes*. Izbrali smo 20 živilskih, humanih in referenčnih izolatov. Glede na rezultate dobljene z metodo barvanja s kristal violetom smo seve razdelili v tri skupine: močni, srednje močni in šibki tvorci biofilma. Ugotovili smo, da je tvorba biofilma na polistirenski površini odvisna od seva, vendar ni odvisna od vira izolacije. Za nadaljne delo smo izbrali seve, ki so bili močni oz. srednje močni tvorci biofilma *L. monocytogenes* ŽM84 (humani izolat), *L. monocytogenes* ŽM58 (referenčni sev) in *L. monocytogenes* ŽM198 (živilski izolat). Določili smo vpliv različnih okoljskih dejavnikov (temperatura, različne koncentracije razkužila in ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*) najprej na tvorbo biofilma in nato na celice bakterij vrste *L. monocytogenes* v že formiranem biofilmu na nerjavečem jeklu. S kvantifikacijo živih celic v biofilmu smo ugotovili, da imata razkužilo triklosan (MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) in $\frac{1}{2}$ MIC) in ekstrakt *Evodia rutaecarpa* ($\frac{1}{4}$ MIC, pri temperaturi 8 °C in 37 °C) inhibitorni učinek na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Razlika v temperaturi inkubacije ni pokazala vpliva na inhibicijo biofilma z ekstraktom *Evodia rutaecarpa*. Razkužilo triklosan (MIC) je pokazalo inhibitorni učinek tudi na že tvorjen biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN** Dn
- DC** UDC 579.24.083 + 579.26: 614.3 (043) = 163.6
- CX** bacterial biofilms / *Listeria monocytogenes* / biofilm formation / working surfaces / polystyrene / stainless steel / inhibition on formation of biofilm / disinfectants / triclosan / plant extracts / *Evodia rutaecarpa*
- AU** CERKVENIK, Maja
- AA** JERŠEK, Barbara (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY** 2012
- TI** EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND STRAINS OF *Listeria monocytogenes* ON BIOFILM FORMATION
- TD** Graduation thesis (University studies)
- NO** XI, 50 p., 5 tab., 24 fig., 51 ref.
- LA** Sl
- AL** sl/en
- AB** The aim of our research was to verify the ability of biofilm formation of different strains of *Listeria monocytogenes*. We selected 20 food, human and animal isolates. According to the results obtained by cristal violet assay we divided strains into three groups: strong, medium strong and weak biofilm producers. We have found out that biofilm formation on polystyrene surface depends on the strains, but it doesn't depend on the source of isolation. For further work, we selected strains that were strong or medium-strong owners of biofilm *L. monocytogenes* ŽM84 (human isolate), *L. monocytogenes* ŽM58 (terms of reference strain) and *L. monocytogenes* ŽM198 (food isolate). We determined the influence of different environmental factors (temperature, different concentrations of disinfectants and plant extract *Evodia Rutaecarpa*) on formation of biofilm of *L. monocytogenes* in the already formed biofilm on stainless steel. With the quantification of viable cells in the biofilm on stainless steel we have found out the inhibitory effects of disinfectant triclosan (MIC (minimal inhibitory concentration) and ½ MIC) and extract *Evodia Rutaecarpa* (¼ MIC, at the temperature of 8 °C and 37 °C) on bacterial biofilm formation of *L. monocytogenes*. The different temperatures of incubation showed no effects on biofilm inhibition by extract *Evodia Rutaecarpa*. Disinfectant triclosan (MIC) showed also inhibitory effects on already formed biofilm bacteria of *L. monocytogenes*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	IIII
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	IIIX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Listeria</i>	3
2.2 BIOFILMI IN BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	4
2.3 NAČINI PREPREČEVANJA TVORBE BIOFILMA	5
2.3.1 Vpliv okoljskih dejavnikov	6
2.3.2 Uporaba razkužil	6
2.3.3 Uporaba eteričnih olj in ekstraktov	7
2.4 ODPORNOST BAKTERIJ V BIOFILMU	8
2.5 DOLOČANJE BIOFILMA Z BARVANJEM S KRISTAL VIOLETOM IN KVANTIFIKACIJO AKTIVNIH CELIC NA NERJAVEČEM JEKLU	9
2.5.1 Določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom	9
2.5.2 Določanje biofilma s kvantifikacijo aktivnih celic na nerjavečem jeklu	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 POTEK DELA	11
3.2 MATERIALI	13
3.2.1 Bakterije	13
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	14
3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem	15
3.2.4 Druge kemikalije	16
3.2.5 Laboratorijska oprema	16
3.3 METODE DELA	17
3.3.1 Revitalizacija bakterij	17
3.3.2 Priprava inokuluma	17
3.3.3 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici	18
3.3.3.1 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije razkužil	18
3.3.3.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta <i>Evodia</i> <i>rutaecarpa</i>	19
3.3.4 Določanje biofilma	20

3.3.4.1	Določanje biofilma v mikrotitrski ploščici z barvanjem celic s kristal violetom.....	20
3.3.4.2	Določanje biofilma s kvantifikacijo aktivnih celic na nerjavečem jeklu.....	21
3.3.4.3	Določanje vpliva različnih okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma.....	21
3.3.4.4	Določanje vpliva različnih okoljski dejavnikov na biofilm.....	22
3.3.5	Statistično vrednotenje rezultatov	23
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	25
4.1	OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM.....	25
4.1.1	Vpliv koncentracije kristal violeta.....	25
4.1.2	Vpliv meritev absorbcije kristal violeta v mikrotitrski ploščici.....	28
4.2	VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> IN ČASA NA TVORBO BIOFILMA NA POLISITIRENSKI POVRŠINI.....	30
4.3	VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> NA TVORBO BIOFILMA NA NERJAVEČEM JEKLU.....	33
4.4	DOLOČITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE RAZKUŽIL IN EKSTRAKTA <i>Evodia rutaecarpa</i>	34
4.5	VPLIV RAZKUŽILA IN EKSTRAKTA <i>Evodia ruteacarpa</i> NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> NA NERJAVEČEM JEKLU	34
4.5.1	Vpliv različnih koncentracij razkužila triklosan na tvorbo biofilma.....	34
4.5.1.1	Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM198 ob dodatku razkužila triklosan.....	35
4.5.1.2	Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 ob dodatku razkužila triklosan.....	36
4.5.2	Vpliv ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> in temperature na tvorbo biofilma ..	37
4.5.2.1	Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 ob dodatku ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i>	37
4.5.2.2	Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> L4 ob dodatku ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i>	39
4.6	VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ RAZKUŽILA TRIKLOSAN NA BIOFILM, TVORJEN NA NERJAVEČEM JEKLU	42
5	SKLEPI	44
6	POVZETEK.....	45
7	VIRI.....	46
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Živilski proizvodi povezani s prenosom bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (Dongyou in sod., 2008).....	4
Preglednica 2: Sevi bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> uporabljeni pri eksperimentalnem delu.....	13
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.....	17
Preglednica 4: Razdelitev sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na šibke, srednje in močne tvorce biofilma na polistirenski površini	32
Preglednica 5: MIC razkužil in ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> za izbrane seve bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema predposkusa.	11
Slika 2: Shema osnovnih stopenj eksperimentalnega dela.	12
Slika 3: Shema mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije razkužil.	19
Slika 4: Shema mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta rastline <i>Evodia rutaecarpa</i>	20
Slika 5: Shema mikrotitrne ploščice za določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom.	20
Slika 6: Shematski prikaz določanja vpliva razkužil in ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> na tvorbo biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ter vpliva razkužil na celice v biofilmu.	23
Slika 7: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.	26
Slika 8: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.	26
Slika 9: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.	27
Slika 10: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.	28
Slika 11: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.	29
Slika 12: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.	29
Slika 13: Relativna količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> določena z metodo barvanja s 0,1 % kristal violetom.	31
Slika 14: Koncentracija celic vezanih v biofilm in koncentracija planktonskih celic sevov bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58, <i>L. monocytogenes</i> ŽM84 in <i>L. monocytogenes</i> ŽM198.	33

Slika 15: Koncentracija celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM198 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.....	35
Slika 16: Koncentracija celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.....	36
Slika 17: Koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 8 °C.	37
Slika 18: Koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 37 °C.	38
Slika 19: Koncentracija celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 8 °C in 37 °C.....	39
Slika 20: Koncentracija celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 8 °C.....	40
Slika 21: Koncentracija celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonski celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 37 °C.....	40
Slika 22: Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta <i>Evodia rutaecarpa</i> pri 8 °C in 37 °C.....	41
Slika 23: Koncentracija celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.	42
Slika 24: Koncentracija celic bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.	43

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.
- Priloga B:** Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja z barvilom kristal violet.
- Priloga C:** Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.
- Priloga D:** Relativna količina biofilna pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določen z metodo barvanja s kristal violetom (0,1 %).
- Priloga E:** Relativna količina biofilna pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določen z metodo barvanja s kristal violetom (1 %).
- Priloga F:** Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.
- Priloga G:** Vpliv meritve absorbance v osnovni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.
- Priloga H:** Vpliv meritve absorbance v osnovni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.
- Priloga I:** Relativna količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določena z barvanjem s kristal violetom.
- Priloga J:** Koncentracija celic sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM84 in *L. monocytogenes* ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu.
- Priloga K:** Koncentracija v biofilm nevezanih celic sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM84 in *L. monocytogenes* ŽM198.
- Priloga L:** Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

- Priloga M:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.
- Priloga N:** Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.
- Priloga O:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.
- Priloga P:** Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.
- Priloga Q:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.
- Priloga R:** Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.
- Priloga S:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.
- Priloga T:** Koncentracija celic v biofilmu seva bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.
- Priloga U:** Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.
- Priloga V:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ekstrakta $\frac{1}{4}$ MIC *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.
- Priloga W:** Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.
- Priloga X:** Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.
- Priloga Y:** Koncentracija celic v biofilmu seva bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.
- Priloga Z:** Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1 minutni in 10 minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.
- Priloga AA:** Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM 58 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1 minutni in 10 minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔA	razlika absorbanc
a_w	vodna aktivnost
$\frac{1}{4}$ MIC	četrtingska minimalna inhibitorna koncentracija
$\frac{1}{2}$ MIC	polovična minimalna inhibitorna koncentracija
ALOA	ALOA agar - Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti
ANOVA	analiza variance
BF	biofilm
BHI	ang. Brain Heart Broth
CFU	kolonijska enota / colony forming unit
H_0	ničelna domneva
H_1	alternativna domneva
KV	barvilo kristal violet
MHA	ang. Mueller Hinton Agar
MHB	ang. Mueller Hinton Broth
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
N	koncentracija celic
P	verjetnost
PC	planktonske celice
SD	standardna deviacija
TSB	Triptični soja bujon
ŽM	oznaka seva

1 UVOD

V naravi je 99 % vseh mikroorganizmov v obliki biofilma. Prisotni so skoraj v vseh okoljih. V določenih primerih lahko biofilmi odigrajo zelo koristno vlogo, na primer v proizvodnji jogurta, vendar v večini primerov biofilmi povzročajo veliko škode v industriji, zaradi česar niso zaželeni. Težave se kažejo v slabšem prevajanju toplote, mehaničnih ovirah, biološkem obremenjevanju kovinskih delov opreme in delov iz umetne snovi z mikroorganizmi, kar še posebej v živilski industriji predstavlja problem, saj lahko pride do mikrobiološke kontaminacije živil. Ravno zato smo v diplomski nalogi raziskali problem tvorjenja biofilma bakterij vrste *Listeria monocytogenes* in preverili nekatere od načinov preprečevanja tvorbe biofilma.

Eden pomembnejših biofilmov je biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*. Proučene bakterije so ubikvitarni mikroorganizmi, saj jih najdemo v zemlji, vodi in drugod. Za človeka so bakterije vrste *L. monocytogenes* patogene in povzročajo oportunistično okužbo, imenovano listerioza. Najpogostejši vir okužbe je kontaminirana hrana. Zaužitje kontaminirane hrane s temi bakterijami ogrozi zdravje rizičnemu delu populacije, kot so imunsko oslabljeni ljudje, nosečnice, otroci in starejši. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so zelo odporne proti neugodnim dejavnikom okolja. Zmožne so preživeti v ekstremnih razmerah, kot so temperatura zmrzovanja in temperatura hlajenja, vakuumsko pakiranje, soljenje in razsoljevanje. Razmnožujejo se v širokem temperaturnem območju od 1 °C do 45 °C, najbolj aktivno rast imajo pri človekovi telesni temperaturi 37 °C. Rastejo do vrednosti a_w 0,92 in vrednosti pH med 4,4 in 9,6. Posledica je relativno pogosta prisotnost teh bakterij v živilih.

Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko tvorijo biofilme na vseh površinah, ki se običajno uporabljajo v živilsko-predelovalni industriji. Te bakterije se lahko v živilski obrat vnesejo po številnih poteh in se naselijo na opremi ter kasneje kontaminirajo hrano. Z razvojem biofilma se bakterije zaščitijo in tako zmanjšajo učinkovitost čiščenja in razkuževanja delovnih in ostalih površin. Na ta način lahko patogene bakterije veliko lažje pridejo v stik s hrano in povzročijo smrtonosno okužbo, ki ima najvišjo smrtnost med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano (20-60 %). Poseben problem pa predstavlja tudi razvoj sevov s povečano odpornostjo proti protimikrobnim sredstvom.

Glavni namen diplomskega dela je bil ugotoviti koncentracijo celic v biofilmu različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes*, med katerimi so bili zajeti živilski, humani in referenčni izolati, pri različnih temperaturah, različnih koncentracijah razkužila, različnem času izpostavitve razkužilu ter izpostavitvi ekstraktu rastline *Evodia rutaecarpa*.

V praktični del smo vključili klasično metodo določanja koncentracije celic v biofilmu na nerjavečem jeklu z metodo razredčevanja na trdnem gojišču in določanje količine biofilma na polistirenski površini z metodo barvanja s kristal violetom in spektrofotometričnem merjenju absorbance. Želeli smo ugotoviti, kateri izmed izbranih sevov so močni tvorci biofilma in na kakšen način lahko zmanjšamo ali preprečimo tvorbo biofilma pri teh sevih.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

- Različni sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* tvorijo različne količine biofilma, ker je obseg tvorbe biofilma odvisen od seva oziroma izvora izolacije seva.
- Razkužilo vpliva na manjšo tvorbo biofilma pri bakterijah vrste *L. monocytogenes*.
- Večja koncentracija razkužila močnejše inhibira tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* kakor manjša.
- Razkužilo zmanjša število celic bakterij vrste *L. monocytogenes* v samem biofilmu.
- Ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa* in temperatura vplivata na zmanjšano tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Listeria*

Bakterije rodu *Listeria* so ubikvitarne po Gramu pozitivne paličaste bakterije, sicer nesporogene, a relativno odporne proti neugodnim dejavnikom okolja (Adamič in sod., 2003). Pogosto jih izoliramo iz okoljskih virov kot so zemlja, silaža, voda in kanalizacija ter iz najmanj 37 različnih divjih in domačih sesalcev, ptičev, rib in morskih sadežev (Sun, 2011). So aerobne do mikroaerofilne, katalaza-pozitivne in citokrom-oksidaza-negativne. Sladkorje razgrajujejo do kislin, brez plina. Značilne biokemijske reakcije listerij so: metil-rdeče pozitivno, Voges-Proskauer negativno, citrat negativno in indol negativno. Značilno je, da tvorijo β -hemolizo na krvnem agarju, izkoriščajo ramnozo in ne ksiloze, ter imajo pozitiven test CAMP (Adamič in sod., 2003)

Bakterije rodu *Listeria* tvori šest različnih vrst. Dve izmed šestih vrst sta za ljudi patogeni (*L. monocytogenes* in *L. ivanovii*) in štiri so nepatogene (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* in *L. grayi*) (Dongyou in sod., 2008).

Celice bakterij rodu *Listeria* ponavadi tvorijo verige iz treh do petih celic. Bakterije rodu *Listeria* so filogenetsko povezane z bakterijami rodu *Lactobacillus* in kakor homofermentativne mlečnokislinske bakterije iz glukoze tvorijo kislino vendar ne plina. Prave mlečnokislinske bakterije so sposobne rasti v striktno anaerobnih razmerah in ne tvorijo encima katalaza. V nasprotju, bakterije rodu *Listeria* potrebujejo mikroaerofilne ali aerobne razmere za rast in proizvajajo encim katalaza (Madigan in sod., 2009).

Približno 5-10 % ljudi ima bakterije *L. monocytogenes* v prebavnem traktu. Zaradi njihove velike razširjenosti v naravi je tudi pogosta prisotnost v človekovi prehranjevalni verigi. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja. Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v mnogih živilih je posledica navzkrižne kontaminacije končnih izdelkov. Ker bakterije lahko rastejo pri nizkih temperaturah hlajenja in so relativno odporne proti večjim koncentracijam soli, so živila ugodno okolje za njihov razvoj (Jeršek, 2007).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko kontaminirajo hrano in jo tako uporabijo kot posrednik pri prenosu listerioze. Listerije rastejo v širokem izboru vrst hrane, ki imajo relativno visoke aktivnosti vode ($a_w > 0,92$) in v širokem temperaturnem območju (od $-0,15$ °C do 45 °C) (Dongyou in sod., 2008). Ohranjanje živil s hlajenjem, ki ponavadi upočasni mikrobno rast, je neučinkovito pri omejevanju rasti teh psihrofilnih bakterij. Meso, pripravljeno za neposredno uživanje, sveži mehki siri, nepasterizirani mlečni izdelki in neustrezno pasterizirano mleko so najbolj pomembni prenosniki tega patogenega organizma, čeprav so lahko bila ta živila pravilno shranjena pri temperaturi hladilnika (4 °C) (Madigan in sod., 2009). Rast pri temperaturi hladilnika je relativno počasna, v mlečnih izdelkih je največji generacijski čas pri 4 °C en do dva dneva. Podobni generacijski časi so bili zaznani tudi pri vakuumsko pakirani narezani govedini pri enakih razmerah rasti, pri temperaturi $-0,15$ °C pa je bil podvojitveni čas 100 ur. Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko preživijo v prisotnosti do 10 % NaCl in do 200 mg/L NaNO₂, kot

tudi v vlažnih in suhih predelih na posameznih lokacijah znotraj živilskega obrata tudi do nekaj let. Kljub prisotnosti v visokem številu v živilu pa ne proizvajajo neprijetnih vonjav, nestabilnosti ali kvarjenja živila. Razmnoževanje v hrani je omejeno na pH območje med 4,3 do 9,4. Bakterije vrste *L. monocytogenes* niso toplotno najbolj obstojne in ne preživijo pasterizacije mleka (Dongyou in sod., 2008). V preglednici 1 je razviden širok izbor vrst hrane, ki je povezan s prenosom bakterij vrste *L. monocytogenes* in s tem okužbe, ki jo povzročajo.

Preglednica 1: Živilski proizvodi povezani s prenosom bakterij vrste *L. monocytogenes* (Dongyou in sod., 2008).

Mlečni izdelki	Meso	Ribe	Zelenjava	Gotove jedi
Mehki siri	Kuhan piščanec	Ribe	Zeljna solata	Sendviči
Mleko	Puranje hrenovke	Školjke	Rastlinski sir	
Sladoled	Klobase	Kozice	Vložene gobice	
Maslo	Pašteta	Dimljene ribe	Surova zelenjava	
	Prašičji jezik	Kaviar	Vložene olive	
			Riževa solata	
			Narezano sadje	

Gastrointestinalni znaki listerioze, ki vključujejo slabost, bruhanje in diarejo, so ponavadi edini znaki preden nastopi bolezen (Sun, 2011). Listerioza se lahko pojavi v različnih oblikah, je oportunistična okužba, ki ogroža predvsem rizične skupine, kamor prištevamo tudi nosečnice. Smrtnost zaradi listerioze je najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca zelo nizka. Listerioza povzroča abortus pri nosečnicah, sicer pa nastopa kot lokalna infekcija (endokarditis, konjunktivitis) ali generalizirana infekcija (meningitis). Infekcijska doza je že 100 bakterij (Milohnoja, 2003).

Preventivni ukrepi vključujejo umik kontaminirane hrane in sprejemanje ukrepov za omejitev kontaminacije z bakterijami vrste *L. monocytogenes* v živilsko predelovalnih prostorih. Ker so bakterije vrste *L. monocytogenes* občutljive na toploto in sevanje, lahko surovo hrano in naprave za predelavo hrane takoj dekontaminiramo. Brez pasterizacije končnega živilskega proizvoda ne moremo izključiti tveganja kontaminacije, saj je ta patogeni organizem široko razširjen (Madigan in sod., 2009).

2.2 BIOFILMI IN BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes*

Biofilmi so običajno sluzaste površine v katerih najdemo veliko mikroorganizmov. V naravnih okoljih približno 99 % vseh mikroorganizmov živi v biofilmih. Mikroorganizmi v biofilmih se fenotipsko znatno razlikujejo od mikroorganizmov v planktonski obliki. Tvorijo veliko ekstracelularnih polimerov, ki jim omogočajo vezavo na površino in izgradnjo matriksa biofilma. Mikroorganizmi v biofilmih so podvrženi zelo različnim fizikalnim in kemijskim gradientom. Biofilm ni nujno samo tanka kontinuirna plast mikrobnih celic. Struktura biofilma je lahko zelo različna; od dvodimenzionalnega

površinskega sloja celic do kompleksnih 3D-struktur. Med biofilme prištevamo tudi suspendirane mikrobne floke in agregate, mikrobne preproge na sedimentih in mrenice na površini tekočin. Biofilmi so pomembni pri biorazgradnji. Lahko povzročajo veliko škode v industriji, kjer pride do korozije in razpada struktur, zamašitve cevi in filtrov. Biofilmi so odgovorni za večino bakterij, ki jih najdemo v pitni vodi. Biofilmi pomembno prispevajo k kroničnim okužbam z mikroorganizmi, zmanjšujejo učinkovanje antibiotikov. Po drugi strani pa so zelo koristni v živilski industriji npr. proizvodnja jogurta, ki mu dajejo konsistenco. Biofilmi so neobhodni pri čiščenju odpadnih vod (Stopar, 2007).

Biofilmi so strukturirane združbe mikrobnih celic ujete v polimerni matriks in pripete na abiotske ali biotske površine. Biofilm je sestavljen iz mešanice bioloških komponent kot so voda (< 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 glive. Tvorba biofilmov je njihova strategija preživetja v težkih razmerah. Bakterije so v biofilmu bolj odporne na protimikrobne snovi kot planktonske celice. Te celice so na fiziološkem nivoju različne od planktonskih in imajo izražene druge gene. Razvoj biofilma zahteva koordinacijo, interakcijo in komunikacijo med mnogimi bakterijskimi vrstami. Proces je visoko reguliran in nanj vplivajo tako dejavniki okolja (temperatura, osmolarnost, pH, kisik in železo) kot tudi hranila (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007).

Glavni problem bakteriji vrste *L. monocytogenes* v obratih živilske industrije je njihova sposobnost tvorjenja biofilma na veliko različnih površinah. Celice vezane v biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes* so veliko bolj odporne na detergente, biocide in antibiotike, kakor prosto živeče planktonske celice (Borucki in sod., 2003). Odpornost bakterij v biofilmu na biocide in ostale dejavnike je povezana s sintezo eksocelularnih polisaharidov in okoliških hranil, ki so bistvene pri prilagajanju celic biofilma na okoljski stres (kisline, oksidativni stres, stradanje) (Morton in sod., 1998).

Nastanek in razvoj biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* je odvisen od različnih dejavnikov, kot so: sev, lastnosti površine materiala (vrsta in hrapavost materiala) ter okoljski dejavniki, kot so temperatura in pH (Chaturongkasumrit in sod, 2010). Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko tvorijo biofilm bodisi v obliki monokulture ali v obliki mešane biokulture, npr. z bakterijami rodu *Flavobacterium*. Razne študije so tudi pokazale, da je stopnja pritrjenosti na nerjavče jeklo bakterij vrste *L. monocytogenes* v biofilmu mešane kulture večja kot v biofilmu monokulture (Bremer in sod., 2001).

2.3 NAČINI PREPREČEVANJA TVORBE BIOFILMA

Dejavniki okolja kot so pH, vodna aktivnost, temperatura in hranila so pomembni pri fenotipski transformaciji planktonskih celic v celice vezane v biofilm (Aarnisalo in sod., 2007). Pritrditev mikroorganizmov na biotske ali abiotske površine in posledično nastanek

biofilma, povečuje odpornost celic na okoljske obremenitve in tudi zagotovi zaščito pred razkužili (Krysinski in sod., 1992). Celice v biofilmu so bolj odporne tudi proti sušenju. Boljše razumevanje dejavnikov, vpletenih v formacijo biofilmov na površini, bi lahko bilo koristno pri oblikovanju boljših metod razkuževanja delovne opreme in izdelkov ter tako preprečevanja tvorbe biofilma. Razkuževanje živil in opreme je pomemben poseg za zmanjšanje pojava okužb s hrano (Oh in sod., 2005). Povečana protimikrobna odpornost bakterijskih celic združenih v biofilm pa še povečuje nevarnost okužbe in prispeva k neučinkovitosti sistemov čiščenja (Barnes in sod., 1999). Na drugi strani pa se pojavi problem povečanja odpornosti na protimikrobna sredstva, kot so antibiotiki in razkužila (Sorum in L'Abée-Lund, 2002).

2.3.1 Vpliv okoljskih dejavnikov

Različne študije so pokazale, da je tvorba biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* odvisna od temperature. Djordevic in sodelavci (2002) so že po 20 urah opazili pri 32 °C bistveno večjo tvorbo biofilma, kakor pri 20 °C. Opazili so tudi vpliv hranil na tvorbo biofilma. Tvorba biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* je bila v gojišču z dodano glukozo večja kot v gojišču brez dodane glukoze.

Tudi Harvey in sodelavci (2007) so preizkusili vpliv različnih gojišč na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* na polistirenski površini ter tako kot Djordevic in sodelavci (2002) ugotovili, da je tvorba biofilma večja v gojišču MWB (modificirano Welshimer-gojišče) kakor v TSB (triptični soja bujon). Pokazali so tudi, da se količina biofilma na polistirenski površini med različnimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* razlikuje med seboj. Do podobnih rezultatov pri študiju tvorbe biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* na nerjavečem jeklu so prišli tudi Kalmokoff in sodelavci (2001).

2.3.2 Uporaba razkužil

Patogeni mikroorganizmi pritrjeni na površino, ki je v stiku z živili, predstavljajo potencialno nevarnost kontaminacije oziroma okužbe. Razkuževanje kontaktnih površin je je eden od načinov preprečevanja kontaminacije. Na žalost pa sedanji načini razkuževanja velikokrat slabše učinkujejo na celice v biofilmu kakor na planktonske celice (Hood in Zottola, 1995).

Planktonske celice bakterij vrste *L. monocytogenes* hitro inaktiviramo z uporabo različnih komercialnih razkužil. Vendar so različne študije pokazale, da je odpornost biofilma sestavljenega iz monokulture bakterij vrste *L. monocytogenes* in tvorjenega na steklu 10-krat večja, kot odpornost planktonskih celic pri izpostavitvi celic benzalkonijevem kloridu, razkužilu iz anionske kisline ali toploti (50 °C in 70 °C) (Frank in Koffi, 1990).

Zmanjšana učinkovitost razkužil na celice vezane v biofilm se je pokazala tudi na ostalih vrstah površin. Porozne površine, kot so gume, je še toliko težje učinkovito razkužiti. Mafu in sodelavci (1990) so določili, da je koncentracija razkužila pri sanitaciji poroznih površin 5- do 10-krat večja kakor koncentracija, potrebna za nerjaveče jeklo. Podobni rezultati so bili opaženi pri biofilmih, tvorjenih na polistirenski površini (Krysinski in sod., 1992).

Starost biofilma tudi vpliva na odpornost samega biofilma na razkužilo. Lee in Frank (1991) sta pokazala, da je biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes* po 8 dneh 100-krat bolj odporen na kloridne anione kakor enaki biofilm star 4 dni. Prav tako sta ugotovila, da 24 ur ni bilo dovolj za razvoj biofilma. Za popoln razvoj biofilma naj bi bilo potrebnih najmanj 48 ur, vendar se že prej opazijo pritrjene celice.

Številni avtorju so pokazali, da različna razkužila inhibirajo tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Namen raziskave Chavanta in sodelavcev (2004) je bil ugotoviti učinkovitost posameznih ali skupnih učinkov razkužil na planktonske celice in celice v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ter tako oceniti zmogljivost preživetja te patogene bakterije. Uporabili so naslednja razkužila: očetna kislina (pH 5,0), NaOH (pH 12,0), 10 % Na₂SO₄, 10 % mešanico Na₂SO₄ in očetne kisline (pH 5,0), 10 % mešanico Na₂SO₄ in NaOH (pH 12,0), kvartne amonijeve spojine (20 mg/L) in glicerol monolaurat (75 mg/L). Njihovi rezultati so pokazali visoko učinkovitost inhibicije planktonskih celic in celic vezanih v biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes* z uporabo kvartnih amonijevih spojin. Le 6-urni biofilm je bil nekoliko bolj odporen. Kvartne amonijeve spojine so pokazale 98 % učinkovitost pri inhibiciji celic bakterije vrste *L. monocytogenes*, vendar pa je bila opažena odpornost 7-dnevnega biofilma. Druga razkužila niso bila tako učinkovita v inhibiciji bakterij vrste *L. monocytogenes*, na planktonske celice in celice v biofilmu so delovala na enak način.

2.3.3 Uporaba eteričnih olj in ekstraktov

Ekstrakti, pridobljeni iz rastlin, so spojine, ki dobivajo vedno širši interes v iskanju alternativnih možnosti za mikrobiološki nadzor (Essawi and Srour, 2000). Omenjene spojine so splošno zelo dobro sprejete zaradi prevladujočega mnenja, da so varne in ker imajo dolgo uporabo v ljudskem zdravstvu za preprečevanje in zdravljenje bolezni ter okužb (Guarrera, 2005). Ekstrakti in eterična olja različnih rastlin, zelišč, začimb in sadja so pokazali dober protimikrobni potencial (Oussalah in sod., 2006; Setanni in sod., 2012).

Eterična olja vsebujejo kompleksno mešanico mnogih različnih spojin. Ker je delovanje aktivnih spojin eteričnih olj usmerjeno v zaviranje patogenih bakterij prisotnih v hrani, jih lahko uporabimo kot naravne konzervanse, če so le ti splošno priznani kot zdravi (Viuda-Martos in sod., 2008). Uporaba eteričnih olj in ekstraktov bi lahko bila naravna alternativa kemijskim konzervansom v hrani.

Raziskave so pokazale, da so različni ekstrakti veliko bolj učinkoviti pri zaviranju pritrjevanja celic na samo površino kakor pa pri zaviranju rasti že nastalega biofilma (Cerca in sod., 2005).

Sandasi in sodelavci (2007, 2010) so v svojih raziskavah pokazali, da z uporabo različnih rastlinskih ekstraktov lahko inhibiramo tudi do 50 % živih celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes*.

2.4 ODPORNOST BAKTERIJ V BIOFILMU

Bakterije v biofilmu tvorijo posebne površinske molekule MSCRAMM (ang. 'microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules'), ki jim omogočajo naselitev in pritrnitev na površino, kjer so najbolj zaščitene pred škodljivimi vplivi iz okolja, kot so osmotski šok, izsušitev ali vdor baktericidnih sredstev. Najbolj pomembna zaščitna sestavina v biofilmu je zunajcelični matriks (Davey in O'Toole, 2000).

Raziskovalci so ugotovili, da se pri tvorbi in ohranitvi biofilma pojavijo oblike nesebičnega vedenja med celicami bakterij, ki je sicer škodljivo za posamezno celico, vendar koristno za biofilm. Pojavi se horizontalna izmenjava genskega materiala med bakterijami, ki prispeva k preživetju bakterijske vrste (Kreft, 2004). Bakterije v biofilmu lahko zmanjšajo potrebe po količini hrane in porabi energije za presnovne procese ter tako preidejo v stanje upočasnjene rasti (Portenier in sod., 2005). Na biofilm lahko gledamo kot na strategijo preživetja bakterij.

Biofilm ima visoko organizirano mozaično strukturo, prepleteno z vodnimi kanali, skozi katere lahko z difuzijo prehajajo protimikrobna sredstva (Wagner in sod., 2006). Protitelesa, fagociti in molekule komplementa sicer lahko prodrejo skozi zgradbo biofilma, vendar so bakterije v biofilmu odpornejše od enakih bakterij v planktonski obliki. To lastnost avtorji (Wagner in sod., 2006) povezujejo s prisotnostjo eksocelularnih polisaharidov, ki sestavljajo del zunajceličnega matriksa. Nanje se vežejo protitelesa ter jih s tem deaktivirajo.

Poleg pasivne obrambe pred antimikrobnimi sredstvi z difuzijsko pregrado in sposobnostjo bakterij, da preidejo v stanje upočasnjene rasti, se bakterije prilagodijo na stresne dejavnike iz okolja tudi tako, da okoljski dejavniki spodbudijo gene, ki sintetizirajo posebne beljakovine, ki omogočajo bakteriji spremembo fenotipa (Fux in sod., 2005).

Hefford in sodelavci (2005) so proučevali fiziološke razlike planktonskih celic in celic vezanih v biofilm s pomočjo primerjave izraženih beljakovin. Ugotovili so, da 19 proteinov kaže višjo ekspresijo genov za tvorbo biofilma. Veliko od teh pa je vključenih v sintezo beljakovin in drugih regulativnih funkcij v celici, ki povečujejo odpornost na stresne dejavnike samega biofilma (Hefford in sod., 2005).

Pomembna prilagoditev bakterij na življenje v biofilmu in spremembe življenjskih okoliščin je prenos genskega materiala. Bakterije lahko pridobijo genski material drugih bakterij s transdukcijo, konjugacijo in transformacijo. Posledica izmenjave genskega materiala je predvsem stabilizacija strukture biofilma (Molin in Tolker-Nielsen, 2003).

Odpornost bakterij v biofilmu je tako odvisna od difuzijske bariere biofilma in fizioloških prilagoditev bakterij na okoljske razmere življenja.

Bae in sodelavci (2011) pa so z uporabo razkužil poskušali inhibirati že tvorjen biofilm na kuponih iz nerjavečega jekla. Uporaba alkoholnega razkužila za inaktivacijo celic v biofilmu bakterij vrste *Escherichia coli* se je pokazala za zelo učinkovito. Alkoholno

razkužilo je zmanjšalo število živih celic bakterij vrste *E. coli* iz 5-7 log CFU/kupon na 1,48 log CFU/kupon.

2.5 DOLOČANJE BIOFILMA Z BARVANJEM S KRISTAL VIOLETOM IN KVANTIFIKACIJO AKTIVNIH CELIC NA NERJAVEČEM JEKLU

Površine v živilski industriji, ki lahko pridejo v stik z živilom in so tako odgovorne za morebitno kontaminacijo živila s patogenimi bakterijami, so iz zelo različnih materialov: steklo, polistiren, nerjaveče jeklo in drugi. In ravno na teh materialih se tvorijo biofilmi mikroorganizmov. Ravno tako poznamo različne metode določanja biofilma glede na material, kjer je biofilm formiran.

Različni avtorji (Djordevic in sod., 2002; Burton in sod., 2006; Harvey in sod., 2007; Rodrigues in sod., 2010) so določali biofilm na polistirenski površini z metodo barvanja s kristal violetom in spektrofotometričnim merjenjem absorbance. Bae in sodelavci (2011), Belessi in sodelavci (2011) ter Chavant in sodelavci (2004) pa so količino biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* določali na nerjavečem jeklu.

2.5.1 Določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom

Med različnimi avtorji so vidne razlike v protokolu določanja biofilma z metodo barvanja s kristal violetom (Djordevic in sod., 2002; Burton in sod., 2006; Harvey in sod., 2007; Rodrigues in sod., 2010). Razlike med njimi so bile predvsem v temperaturi inkubacije, času inkubacije, koncentraciji uporabljenega barvila kristal violet, valovni dolžini, pri kateri so izmerili absorbance in načinu merjenja absorbance.

Osnovni protokol se med omenjeni avtorji ni bistveno razlikoval. 24-urno kulturo bakterij so avtorji razredčili z TSB, le Djordevic in sodelavci (2002) so uporabili gojišče MWB. Razredčeno kulturo so prenesli na mikrotitrsko ploščico. Negativno kontrolo pa je predstavljala luknjica z gojiščem TSB oz. v primeru Djordevic in sodelavci (2002) gojišče MWB. Sledila je inkubacija mikrotitrsko ploščice pri določeni temperaturi. Tako so Djordevic in sodelavci (2002) inkubirali mikrotitrsko ploščice pri 32 °C, Burton in sodelavci (2006) pri 26 °C in 37 °C, Harvey in sodelavci (2007) pri 20 °C in Rodrigues in sodelavci (2010) pri 36 °C. Med avtorji se je razlikoval tudi čas inkubacije: 20 in 40 ur (Djordevic in sod., 2002), 24 ur (Burton in sod., 2006; Rodrigues in sod., 2010) in 24, 48 ter 72 ur (Harvey in sod., 2007).

Po pretečeni dobi inkubacije kulture na polistirenski površini mikrotitrsko ploščice je bil medij odstranjen in sledilo je spiranje s PBS ali s sterilno destilirano vodo ali s sterilno fiziološko raztopino. Sledilo je 15- do 30-minutno sušenje mikrotitrsko ploščice.

Nato je sledilo barvanje s kristal violetom. Med omenjenimi avtorjem so bile očitne razlike v koncentraciji kristal violeta. Djordevic in sodelavci (2002) ter Harvey in sodelavci (2007) so uporabili 1 % barvilo kristal violet, Burton in sodelavci (2006) 0,4 %, Rodrigues in sodelavci (2010) pa 2 % koncentracijo barvila kristal violet. Razlikovali so se tudi časi

učinkovanja kristal violeta. Rodrigues in sodelavci (2010) so 2 % kristal violet pustili učinkovati 5 minut, Burton in sodelavci (2006) so 0,4 % kristal violet pustili učinkovati 15 minut, Djordevic in sodelavci (2002) ter Harvey in sodelavci (2007) pa so 1 % kristal violet pustili učinkovati 45 minut. Sledilo je ponovno spiranje s PBS ali s sterilno destilirano vodo ali s sterilno fiziološko raztopino.

Rodrigues in sodelavci (2010) so posušenim mikrotitrskim ploščicam izmerili absorbanco pri 550 nm z ELISA čitalnikom plošč. Harvey (2007) so v vsako luknjico dodali 95 % etanol in nato izmerili absorbanco pri 595 nm. Burton in sodelavci (2006) pa so v posušene luknjice na mikrotitrski ploščici dali 33 % očetno kislino in izmeril absorbanco pri 630 nm. Djordevic in sodelavci (2002) so po dodatku 95 % etanola 100 μ L vsebine prenesli v novo mikrotitrsko ploščico in šele nato izmerili absorbanco pri 595 nm.

V vseh štirih primerih zgoraj omenjenih avtorjev so bile med seboj paralelke iz katerih so kasneje izračunali povprečno absorbanco ter standardno deviacijo. V zgoraj opisanemu načinu določanja biofilma na polistirenski površini, so omenjeni avtorji določali žive in mrtve celice v biofilmu, tvorjenemu na polistirenski površini.

2.5.2 Določanje biofilma s kvantifikacijo aktivnih celic na nerjavečem jeklu

S kvantifikacijo aktivnih celic v biofilmu na nerjavečem jeklu smo določili le žive celice formiranega biofilma.

Protokol določanja biofilma na nerjavečem jeklu se je pri številnih avtorjih razlikoval v načinu ločevanja biofilma iz kuponov iz nerjavečega jekla. Mi smo se odločili uporabiti metodo z vrtičnim mešalnikom in steklenimi kroglicami (Belessi in sod., 2011). Omenjena metoda naj bi bila ena izmed najbolj primernih, čeprav 100 % odstranitev biofilma ni mogoče zagotoviti. Ostali koraki določevanja biofilma s kvantifikacijo aktivnih celic na nerjavečem jeklu so med številnimi avtorji bili podobni (Belessi in sod., 2011; Bae in sod., 2011; Chavant in sod., 2004).

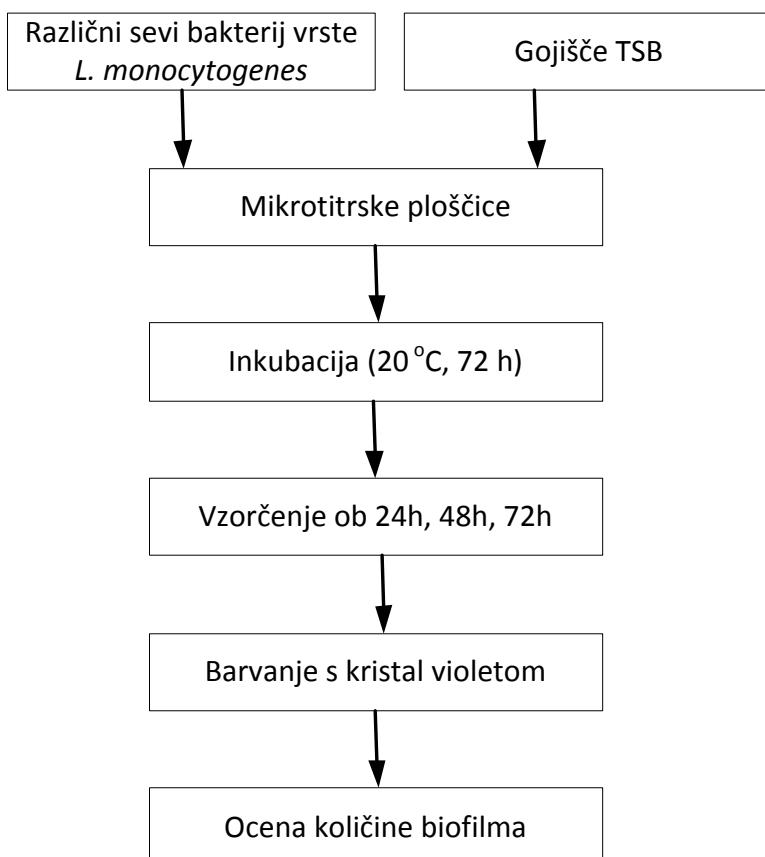
Pripravi izbrane kulture je sledila dezinfekcija kuponov iz nerjavečega jekla. Tukaj so bile tudi vidne razlike med omenjenimi avtorji. Belessi in sodelavci (2011) so kot dezinfekcijsko sredstvo uporabili aceton. Kupone iz nerjavečega jekla so pustili v acetonu 3 ure in jih nato 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C. Bae in sodelavci (2011) so kupone iz nerjavečega jekla za 20 minut izpostavili 15 % raztopini fosforne kisline pri 80 °C. Nato pa še za 20 minut raztopini alkalnih reagentov pri temperaturi 80 °C. Sledilo je spiranje z destilirano vodo in 20-minutna sterilizacija v avtoklavu pri temperaturi 121 °C. Chavant in sodelavci (2004) pa so kupone izpostavili 2 % raztopini TFD4 razkužila. Nato pa kupone oprali 5-krat po 5 minut pod vročo vodovodno vodo, pranje ponovil še 5-krat po 5 minut z destilirano vodo ter nato kupone 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C. Sledila je inkubacija izbrane kulture v mediju s steriliziranimi kuponi iz nerjavečega jekla. Po določenem času inkubacije je sledila odstranitev biofilma iz kuponov iz nerjavečega jekla ter določanje aktivnih celic v biofilmu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

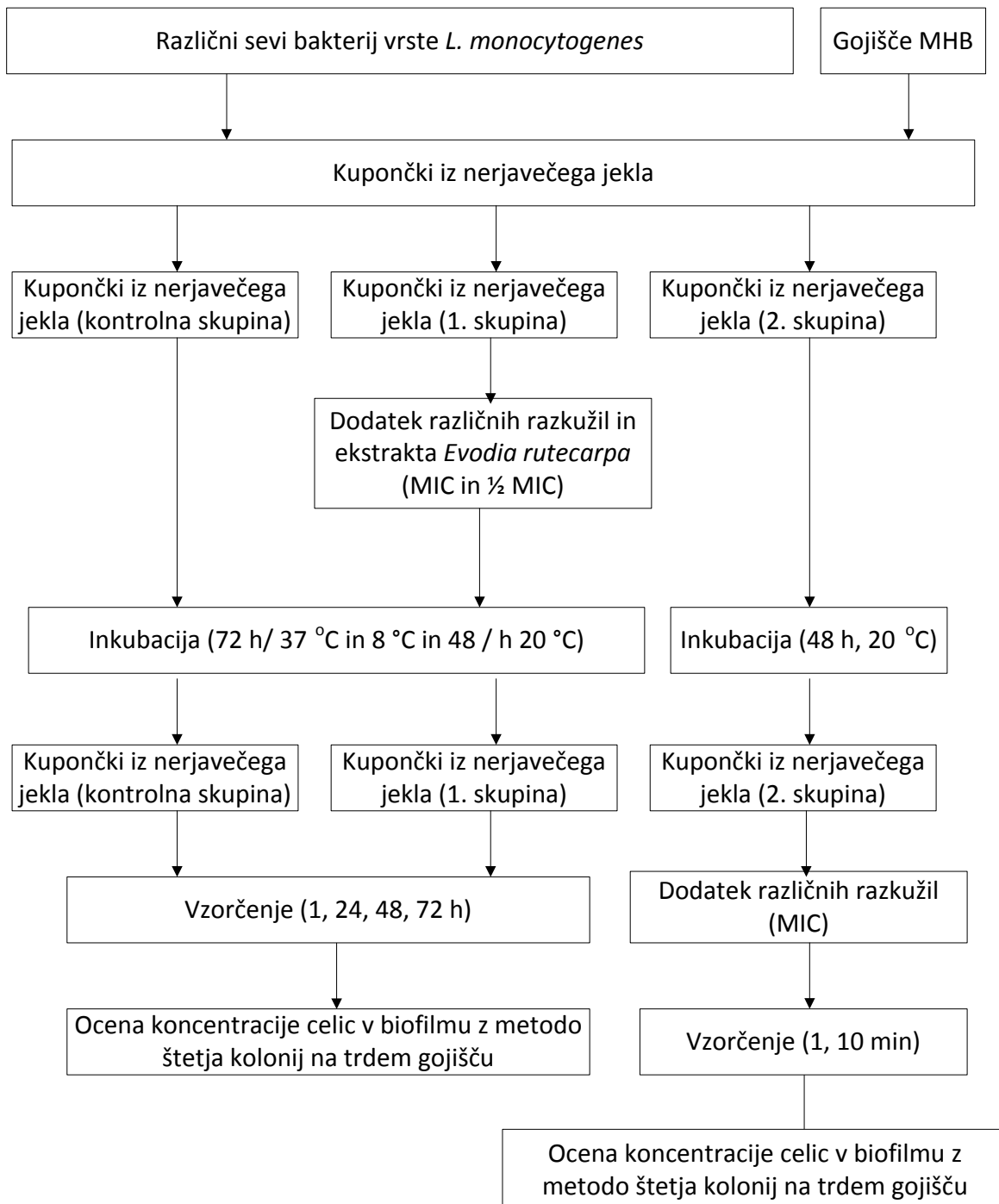
Namen našega dela je bil ugotoviti količine biofilma različnih sevov bakterij vrste *Listeria monocytogenes* (živilski, humani in referenčni izolati) pri različnih temperaturah, različnih koncentracijah razkužila, različnem času izpostavitve razkužilu ter pri izpostavitvi ekstraktu rastline *Evodia rutaecarpa*. Problema smo se lotili sistematično. Prvo smo izbrali različne seve bakterij vrste *L. monocytogenes* glede na izvor (živilski, humani in referenčni izolati). Z metodo barvanja s kristal violetom smo določili količino biofilma na polistirenski površini ter tako izbrane seve bakterij vrste *L. monocytogens* razdelili v tri skupine; močni, srednji in šibki tvorci biofilma. Izmed močnih oz. srednje močnih tvorcev biofilma smo za nadaljnje eksperimente izbrali po en živilski, humani in referenčni izolat. Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo celic v biofilmu na nerjavečem jeklu. V nadaljevanju poskusa smo ugotavljali tudi vpliv okoljskih dejavnikov, vpliv razkužila, temperature in naravnega ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* na tvorbo biofilma ter vpliv razkužila na celice v biofilmu.

Potek predposkusa je shematsko prikazan na sliki 1. Namen predposkusa je bil vpeljati metodo določanja biofilma z barvanjem s kristal violetom in preizkušanje različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* ali so močni, srednji ali šibki tvorci biofilma.



Slika 1: Shema predposkusa.

Namen eksperimentalnega dela je bil proučiti vpliv različnih okoljskih dejavnikov ter seva na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Potek eksperimentalnega dela je shematsko prikazan na sliki 2.



Slika 2: Shema osnovnih stopenj eksperimentalnega dela.

Legenda: MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, 1/2 MIC polovična minimalna inhibitorna koncentracija.

Določili smo tudi MIC – minimalno inhibitorno koncentracijo razkužil ter ekstrakta *Evodia rutaecarpa* za izbrane seve bakterij vrste *L. monocytogenes* ter te podatke uporabili pri določanju vpliva različnih okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma in na že tvorjen biofilm. Uporabili smo metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici, kjer smo 1. skupini sevov določili MIC razkužil, 2. skupini sevov pa MIC naravnega ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*. Dobljene rezultate smo primerjali s kontrolno skupino v kateri ni bilo ekstrakta oz razkužila.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 21 različnih referenčnih, humanih in živilskih izolatov bakterij vrste *Listeria monocytogenes* (preglednica 2).

Preglednica 2: Sevi bakterije vrste *L. monocytogenes* uporabljeni pri eksperimentalnem delu.

Oznaka seva	Vir seva	Izvor seva
<i>Listeria monocytogenes</i> L4	Madžarski sev	/
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM51	IHM (1/2a)	Referenčni sev
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM52	IHM (1/2b)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM53	IHM (1/2c)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM57	IHM (4a)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58	IHM (4b)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM62	IHM (6a)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM69	Likvor	Klinični humani sev
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM72	Oči	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM83	Cerviks	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM84	Hemokultura	Živilski izolat
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM45	Parjeno piščančje meso	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM97	Solata	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM103	Sir z zelenjavo	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM112	Alpska solata	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM113	Jajčni namaz	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM116	Tatarski biftek	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM198	Goveji zrezek	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM199	Prekajeni losos	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM220	Piščančje meso	
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM221	Piščančje meso	

Legenda: ŽM: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete. IHM: Institut za Higieno in Mikrobiologijo, Wuerzburg, Nemčija, /: ni določeno.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Gojišče ALOA:

Sestavine:

- ALOA agar - Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (Biolife Milano, Italija, 4016052).
- Selektivni dodatek ALOA enrichment selective supplement (Biolife Milano, Italija, 423501).

Priprava:

35,3 g gojišča ALOA smo raztopili v 500 mL destilirane vode, dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na temperaturo 45 °C in sterilno dodali selektivni dodatek ALOA, ki smo mu primešali 2,5 mL 96 % etanola in 2,5 mL sterilne destilirane vode. Tako pripravljeno gojišče smo v brezprašni komori razlili v sterilne petrijevke.

Neselektivno gojišče BHI:

Sestavine:

- Brain Heart Broth (BHI, Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.10493.0500).

Priprava:

18,5 g gojišča BHI smo zatehtali v 1000 mL steklenico in dodali 500 mL destilirane vode. Dobro smo premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C.

Neselektivno gojišče TSB:

Sestavine:

- Triptični soja bujon (TSB, Oxoid, Hampshire, Anglija, CM0129).

Priprava:

15 g gojišča TSB smo zatehtali v 1000 mL steklenico in dodali 500 mL destilirane vode. Dobro smo premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C.

Neselektivno gojišče MHB:

Sestavine:

- Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.10.293.0500).

Priprava:

10,5 g gojišča MHB smo zatehtali v 1000 mL steklenico in dodali 500 mL destilirane vode. Dobro smo premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C.

Neselektivno gojišče MHA:

Sestavine:

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

Priprava:

19 g gojišča MHA smo zatehtali v 1000 mL steklenico in dodali 500 mL destilirane vode. Dobro smo premešali in gojišče 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C.

Fiziološka raztopina:

Sestavine:

- Kalijev dihidrogen fosfat – KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Nemčija, 1.04873.0250).

Priprava:

3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 mL destilirane vode. 1,25 mL te raztopine smo v 1000 mL steklenici razredčili z 1000 mL destilirane vode. Tako pripravljeno fiziološko raztopino smo 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C.

3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem

Ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa*:

Sestavine:

- ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa* (Department of Pharmacognosy, Institute of Pharmaceutical Sciences, Karl-Franzens-University Graz, Avstria).

Priprava:

Pripravili smo raztopino ekstrakta s koncentracijo 32,77 mg/mL. Zatehtali smo 20 mg ekstrakta, zapisali točno maso in izračunali volumen absolutnega etanola, v katerem smo raztopili ekstrakt.

Razkužilo triklosan:

Sestavine:

- Triclosan (Calibiochem, 647950).

Priprava:

Zatehtali smo 60 mg razkužila ter zapisali točno vrednost. Iz nje smo izračunali volumen dodanega topila, ki je bil v tem primeru absolutni etanol. $V=m/16,384$ mg/mL (V =volumen dodanega topila, m =masa razkužila v mg). Dobili smo razkužilo s koncentracijo 16,384 mg/mL, kar je bila osnovna raztopina. Osnovno raztopino smo razredčili v razmerju 1:4 (4,096 mg/mL).

Razkužilo benzalkonijev klorid:

Sestavine:

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

Priprava:

Zatehtali smo 60 mg razkužila ter zapisali točno vrednost. Iz nje smo izračunali volumen dodanega topila, ki je bil v tem primeru destilirana voda. $V=m/16,384$ mg/mL (V =volumen dodanega topila, m =masa razkužila v mg). Dobili smo razkužilo s koncentracijo 16,384 mg/mL, kar je bila osnovna raztopina. Osnovno raztopino smo razredčili v razmerju 1:4 (4,096 mg/mL).

Razkužilo kloroheksidin diacetat monohidrat:

Sestavine:

- Kloroheksidin diacetat monohidrat (Fluka, Bio Chemika, 24800).

Priprava:

Zatehtali smo 60 mg razkužila ter zapisali točno vrednost. Iz nje smo izračunali volumen dodanega topila, ki je bil v tem primeru destilirana voda. $V=m/16,384$ mg/mL (V =volumen dodanega topila, m =masa razkužila v mg). Dobili smo razkužilo s koncentracijo 16,384 mg/mL, kar je bila osnovna raztopina. Osnovno raztopino smo razredčili v razmerju 1:4 (4,096 mg/mL).

3.2.4 Druge kemikalije

- Kristal violet: (Gram`s crystal violet solution, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Nemčija, 1.09218.2500).
- DMSO: Dimetil sulfoksid (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, CH – 9471 Buchs, 135 6126).
- Glicerol: Glicerol, redestiliran, p.a. (Kemika, Heinzlova, Zagreb, Hrvaška, 0711901).
- Etanol: Absolutni etanol za analizo (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Nemčija, 1.00983.1000).
- 96 % etanol, denaturirani, tip B (ITRIJ d.o.o., Kropa 87a, 4245 Kropa, Slovenija, 1170).
- Barvilo INT, Iodonitrotetrazolium klorid (Sigma – Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, 89552 Stainheim, Nemčija, 14096LJ).

3.2.5 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu so navedene v preglednici 3.

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.

Aparat	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Inkubator	I - 115	Kambič, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Vrtični mešalnik	Vibromix 104 EV	Tehtnica, Slovenija
Spektrofotometer	Magellan	Tecan, Avstrija
Izpiralec	Instrument hydroflex tecan	Mediline, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB 1502 - S	Mettler Toledo, Švica
Stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Zamrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Tehtnica	Sartorius analytic	Sartorius, Nemčija
Polistirenske mikrotitrne ploščice	/	Nunc, Danska
Kupončki iz nerjavečega jekla	/	OCG d.o.o., Godovič, Slovenija

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Izolati bakterij vrste *L. monocytogenes* so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri -20 °C kot suspenzija glicerola (0,15 mL) in kulture (0,85 mL v tekočem gojišču BHI). Vse izolate, uporabljene v eksperimentalnem delu, smo najprej odmrznili, nato smo jih prenesli v 4 mL gojišča BHI ter vsebino premešali na vrtičnem mešalu. Sledila je 24-urna inkubacija na stresalniku (100 obratov/minuto) pri 37 °C.

3.3.2 Priprava inokuluma

24-urno kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* (3.3.1) smo s cepilno zanko aseptično prenesli iz tekočega gojišča BHI na selektivno gojišče ALOA ter 24 ur inkubirali pri 37 °C. Na gojišču ALOA so zrastle za listerije značilno modro zeleno obarvane kolonije s prosojno cono. Iz gojišča ALOA smo nato s cepilno zanko aseptično prenesli eno kolonijo na gojišče MHA ter gojišče nato 24 ur inkubirali pri 37 °C. Tako pripravljene seve bakterij vrste *L. monocytogenes* smo shranili v hladilniku pri 5 °C ter jih tedensko ponovno precepili iz gojišča MHA na novo gojišče MHA, 24 ur inkubirali pri 37 °C ter jih nato shranili v hladilniku.

Za pripravo inokuluma smo po 24-urni inkubaciji smo eno kolonijo iz gojišča MHA s cepilno zanko aseptično prenesli v 4 mL gojišča MHB. Gojišče s kulturo smo premešali na vrtičnem mešalniku in 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri 37 °C.

Tako smo pripravili čisto kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču MHB. Predvidevali smo, da so se bakterije namnožile do koncentracije 10^8 CFU/mL. Točno koncentracijo smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču MHA. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot inokulum za nadaljnji potek eksperimentalnega dela.

3.3.3 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici

V eksperimentalnem delu smo uporabili metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici za določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) razkužil triklosan, benzalkonijev klorid in kloroheksidin diacetat monohidrat ter ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*.

3.3.3.1 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije razkužil

Osnovne raztopine razkužil triklosan, benzalkonijev klorid in kloroheksidin diacetat monohidrat so imele koncentracijo 4,096 mg/mL. Delovno raztopino razkužila smo pripravili za vsak eksperiment tako, da smo osnovno raztopino 4x razredčili (250 μ L razkužila s koncentracijo 4,096 mg/mL in 750 μ L gojišča TSB) in dobili koncentracijo 1,024 mg/mL. 24-urno kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes*, namnoženo v gojišču TSB (3.3.2), smo razredčili tako, da smo prenesli 150 μ L namnožene kulture v 10 mL svežega gojišča TSB. Pripravili smo si tudi delovno raztopino absolutnega etanola in sicer tako, da smo 125 μ L absolutnega etanola zmešali s 375 μ L gojišča TSB.

V vsako luknjico mikrotitrski ploščice smo odpipetirali po 50 μ L gojišča TSB, razen v prvi stolpec (slika 3). V A1 in B1 smo odpipetirali 100 μ L delovne raztopine razkužila triklosana. V C1 in D1 smo odpipetirali po 100 μ L delovne raztopine benzalkonijevega klorida. V E1 in F1 pa smo odpipetirali po 100 μ L delovne raztopine razkužila kloroheksidin diacetat monohidrat. 50 μ L iz A1 smo prenesli v A2 in osem krat premešali ter tako nadaljevali do konca vrstice. Na koncu smo zadnjih 50 μ L zavržli, tako da je bil volumen v vseh luknjicah enak. Enak postopek smo nato ponovili za vsa razkužila ter za kontrolo etanola, ki je bila v vrstici G. Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo tako, da smo zmešali 50 μ L TSB in 50 μ L kulture brez dodanega razkužila ter negativno kontrolo kjer je bilo 50 μ L TSB in 50 μ L razkužila. Nato smo v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici dodali 50 μ L delovne raztopine kulture. V negativno kontrolo kulture nismo dodali. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico smo 24 ur inkubirali pri 37 °C.

Razkužilo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Koncentracija razkužila (µg/mL)											
A	Triklosan	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
B	Triklosan	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
C	Benzalkonijev klorid	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
D	Benzalkonijev klorid	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
E	Kloroheksidin diacetat monohidrat	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
F	Kloroheksidin diacetat monohidrat	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
G	Etanol	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,24	0,01	0,01
		PC	NC	B	NC								

Slika 3: Shema mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije razkužil.

Legenda: PC: pozitivna kontrola, NC: negativna kontrola, B: slepi vzorec, 100 µL gojišča TSB.

Naslednji dan je sledila priprava barvila INT: 0,04 g INT smo raztopili v 20 mL sterilne destilirane vode. V vsako luknjico mikrotitrne ploščice smo nato dodali 10 µL barvila INT. Ploščico smo 1 minuto stresali na stresalniku in 30 minut inkubirali pri 37 °C. Potem smo določili MIC glede na obarvanost suspenzije v posamezni luknjici mikrotitrne ploščice. Prva neobarvana suspenzija v posamezni vrstici je predstavljala MIC za določeno razkužilo (Klančnik in sod., 2010).

3.3.3.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta *Evodia rutaecarpa*

Osnovna raztopina ekstrakta *Evodia rutaecarpa* je imela koncentracijo 32,77 mg/mL etanola. Delovno raztopino ekstrakta smo pripravili za vsak eksperiment tako, da smo 125 µL osnovne raztopine ekstrakta dodali 375 µL gojišča MHB in tako dobili koncentracijo 8,193 mg/mL. 24-urno kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes*, koncentracije 10⁸ CFU/mL namnoženo v gojišču MHB, smo razredčili tako, da smo 150 µL namnožene kulture prenesli v 10 mL svežega gojišča MHB. Pripravili smo si tudi delovno raztopino absolutnega etanola in sicer tako, da smo 125 µL absolutnega etanola zmešali z 375 µL gojišča MHB in tako dobili 25 % koncentracijo etanola.

V vsako luknjico mikrotitrne ploščice smo odpipetirali po 50 µL gojišča MHB, razen v prvo luknjico (slika 4). V A1 smo odpipetirali 100 µL delovne raztopine ekstrakta. 50 µL iz A1 smo prenesli v A2 in osem krat premešali s tipsom ter tako nadaljevali do konca vrstice. Zadnjih 50 µL na koncu vrstice smo zavrgli tako, da je bil volumen v vseh luknjicah enak. Enak postopek smo nato ponovili za kontrolo etanola, ki je bila v vrstici B. Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo tako, da smo zmešali 50 µL MHB in 50 µL kulture brez dodanega ekstrakta ter negativno kontrolo kjer je bilo 50 µL MHB in 50 µL ekstrakta. Nato smo v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici dodali 50 µL delovne raztopine kulture. V negativno kontrolo kulture nismo dodali. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico smo 24 ur inkubirali pri 37 °C.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Koncentracija ekstrakta ($\mu\text{g/mL}$)											
A	Ekstrakt	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
B	Ekstrakt	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
D	Etanol	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,2	0,1	0,05	0,24	0,01	0,01
		PC	NC	B									

Slika 4: Shema mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*.

Legenda: PC: pozitivna kontrola, NC: negativna kontrola, B: slepi vzorec, 100 μL gojišča TSB, Ekstrakt: ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa*.

Naslednji dan smo pripravili barvilo INT: 0,04 g INT smo raztopili v 20 mL sterilne destilirane vode. V vsako luknjico mikrotitrne ploščice smo dodali 10 μL barvila INT. Ploščico smo 1 minuto stresali na stresalniku in 30 minut inkubirali pri 37 °C. Potem smo določili MIC glede na obarvanost suspenzije v posamezni luknjici mikrotitrne ploščice. Prva neobarvana suspenzija v posamezni vrstici je predstavljala MIC ekstrakta (Klančnik in sod., 2010).

3.3.4 Določanje biofilma

3.3.4.1 Določanje biofilma v mikrotitrski ploščici z barvanjem celic s kristal violetom

Uporabili smo 20 različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 2). Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo nacepili v 5 mL TSB in 24 ur inkubirali pri 20 °C (3.3.2). 24-urno kulturo bakterij smo razredčili tako, da smo 125 μL kulture dodali 5 mL TSB in premešali na vrtilnem mešalniku. V prvi stolpec (8 luknjic) mikrotitrne ploščice smo prenesli 100 μL razredčene kulture določenega seva, kar nam je predstavljalo dvakrat po štiri paralelke. Za druge stolpce smo postopek ponovili z drugimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes*. V zadnji stolpec smo prenesli 100 μL gojišča TSB, kar je predstavljalo našo negativno kontrolo (slika 5). Celoten postopek smo ponovili trikrat tako, da smo dobili 3 enake mikrotitrne ploščice; prvo smo inkubirali 24 ur, drugo 48 ur in tretjo 72 ur pri 20 °C.

	Sevi bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>										
	ŽM84	ŽM83	ŽM72	ŽM69	ŽM62	ŽM58	ŽM57	ŽM53	ŽM52	ŽM51	NK
0,1 % k.v.	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par
0,1 % k.v.	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par
0,1 % k.v.	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par
0,1 % k.v.	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par
1 % k.v.	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par	1.par
1 % k.v.	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par	2.par
1 % k.v.	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par	3.par
1 % k.v.	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par	4.par

Slika 5: Shema mikrotitrne ploščice za določanje biofilma z barvanjem s kristal violetom.

Legenda: par: paralelka; KV: barvilo kristal violet; par.: paralelka; NK: negativna kontrola

Po 24-urni inkubaciji kulture na polistirenski površini mikrotitrne ploščice smo kulturo odstranili s stresanjem na papirnato brisačko. Sledilo je spiranje s fiziološko raztopino. V vsako luknjico smo dali 200 μ L fiziološke raztopine, premešali s pomočjo pipete in nato fiziološko raztopino zavrgli. Postopek smo ponovili trikrat. Nato smo mikrotitrsko ploščico 30 minut sušili v inkubatorju pri 30 °C.

Nato smo v prve štiri luknjice vsakega stolpca dodali 150 μ L 0,1 % kristal violet, v ostale štiri luknjice vsakega stolpca pa 150 μ L 1 % kristal violet. Sledila je 15-minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ponovili trikratno spiranje z 200 μ L fiziološke raztopine. Nato smo v vsako luknjico dodali 200 μ L 95 % etanola. Potem smo iz vsake luknjice odpipetirali 100 μ L vsebine ter jo prenesli v novo mikrotitrsko ploščico. Sledilo je še spektrofotometrično merjenje absorbance pri 582 nm in tako določanje količine tvorjenega biofilma. Za vrednotenje količine biofilma smo dobljeni absorbanci za posamezen vzorec (luknjico) odšteli povprečno absorbanco negativne kontrole in nato izračunali povprečje med štirimi paralelkami (Harvey in sod., 2007).

3.3.4.2 Določanje biofilma s kvantifikacijo aktivnih celic na nerjavečem jeklu

Za kvantifikacijo aktivnih celic v biofilmu smo uporabili gojitveno metodo določanja koncentracije bakterij na trdnem gojišču. 0,5 mL 24-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* namnožene v gojišču MHB smo inkubirali v plastičnem lončku, ki je vseboval 10 mL gojišča MHB in 12 kupončkov iz nerjavečega jekla. Inkubacija je trajala 72 ur pri 20 °C, vzorčenje smo izvedli po prvi uri in po 24, 48 in 72 urah.

Pri vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic v gojišču MHB in koncentracijo celic, ki so se pritrdele na nerjaveče jeklo. Vzorčili smo v paralelkah in sicer dvakrat po 0,75 mL suspenzije, v kateri smo z metodo štetja kolonij na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003) AHB določili koncentracijo v biofilm ne vezanih celic. Vzoredno smo iz plastičnega lončka smo vzeli tudi dva kupončka iz nerjavečega jekla. Vsakega smo sprali s 5 mL sterilne destilirane vode ter ga nato dali v epruveto z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Nato smo obe epruveti 1 minuto mešali na vrtilnem mešalniku pri 2300 obratih/s, da smo odstranili celice, ki so bile vezane na nerjavečem jeklu in jih sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdem gojišču AHB (SIST EN ISO 4833, 2003) določili koncentracijo aktivnih celic vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011).

3.3.4.3 Določanje vpliva različnih okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili tudi vpliv različnih okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma: različna temperatura, različne koncentracije razkužil ter izpostavitve ekstraktu rastline *Evodia rutaecarpa*.

V 10 mL gojišča MHB smo dodali 0,5 mL 24-urne kulture (3.3.2) in 12 kupončkov iz nerjavečega jekla in MIC razkužila. Po enakem postopku smo pripravili suspenzijo z $\frac{1}{2}$ MIC razkužila in suspenzijo s $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*. Pri vsakem poskusu smo pripravili tudi suspenzijo gojišča MHB, kulture in kupončkov brez dodatka protimikrobne snovi in rezultate smo uporabili kot pozitivno kontrolo. V primeru ko smo

določali vpliv koncentracije razkužila na tvorbo biofilma, je inkubacija trajala 48 ur pri 20 °C in vzorčenje smo izvedli po prvi uri in po 24 ter 48 urah. Za določanje vpliva ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* na tvorbo biofilma pa je inkubacija trajala 72 ur pri 8 °C in 37 °C. Vzorčili smo po prvi uri in po 24, 48 ter 72 urah. Potek poskusa je razviden na sliki 6.

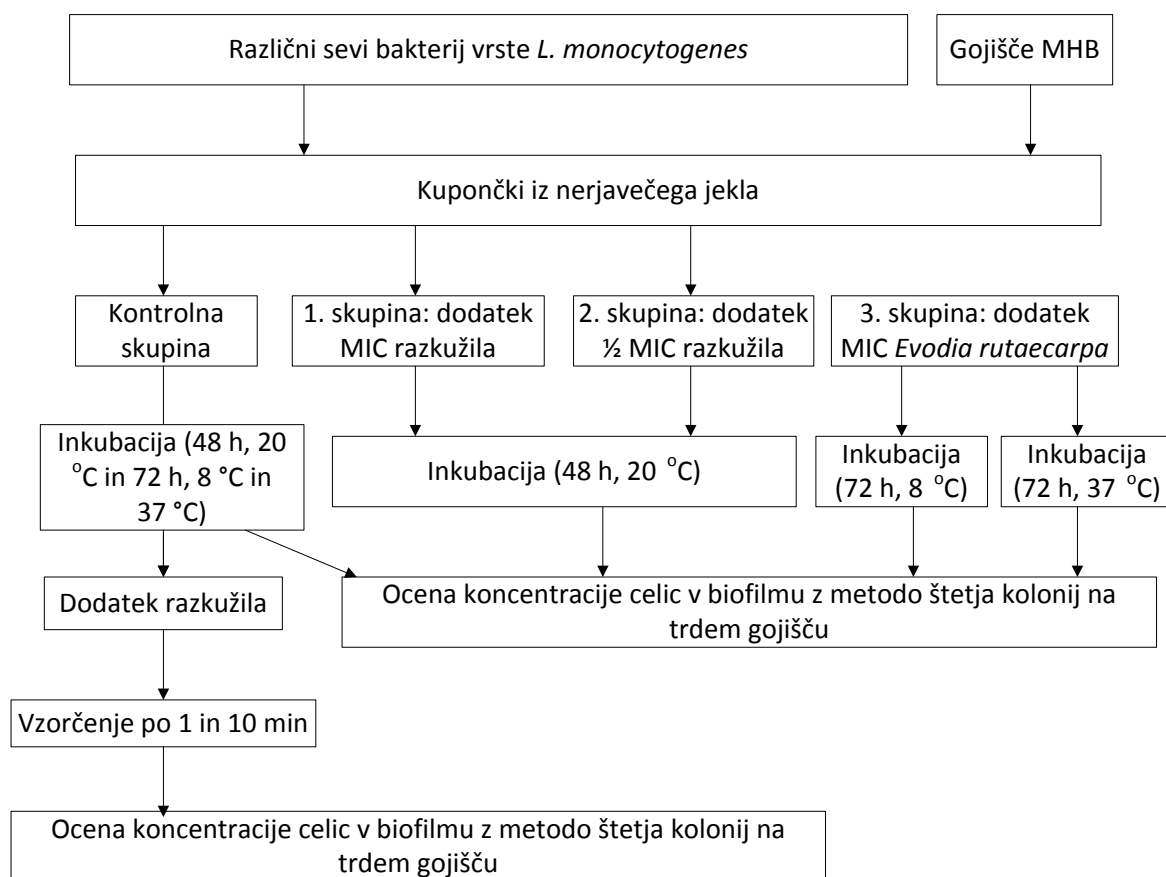
Po določenem času smo določili koncentracijo celic v gojišču MHB in koncentracijo celic, ki so se pritrdile na nerjaveče jeklo. Iz vsake suspenzije smo vzorčili v paralelkah in sicer dvakrat po 0,75 mL suspenzije, v kateri smo z metodo štetja na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003) AHB določili koncentracijo v biofilm ne vezanih celic. Vzporedno smo iz vsake suspenzije vzeli tudi 2 kupončka iz nerjavečega jekla. Vsakega smo sprali s 5 mL sterilne destilirane vode ter ga nato dali v epruveto z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Nato smo vse epruvete 1 minuto mešali na vrtnem mešalniku pri 2300 obratih/s, da smo odstranili celice, ki so bile vezane na nerjavečem jeklu in jih sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003) AHB določili koncentracijo aktivnih celic vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011).

3.3.4.4 Določanje vpliva različnih okoljskih dejavnikov na biofilm

Za določanje vpliva različnih okoljskih dejavnikov na že tvorjen biofilm smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Že tvorjen biofilm smo izpostavili MIC razkužila za 1 minuto in za 10 minut.

V 10 mL gojišču MHB smo dodali 0,5 mL 24-urne kulture (3.3.2) in 12 kupončkov iz nerjavečega jekla. Suspenzija nam je istočasno predstavljala vzorec, katerega bomo kasneje izpostavili razkužilu ter kontrolo, katero ne bomo izpostavili razkužilu. Inkubacija je trajala 48 ur pri 20 °C in vzorčenje smo izvedli po prvi uri in po 24 ter 48 urah. Potek poskusa je razviden na sliki 6.

Po določenem času smo določili koncentracijo celic v gojišču MHB in koncentracijo celic, ki so se pritrdile na nerjaveče jeklo. Iz suspenzije smo vzeli 2 kupončka iz nerjavečega jekla ter vsakega dali v 2 mL MIC razkužila. Pustili smo, da je razkužilo učinkovalo 1 min na prvi kuponček ter 10 min na drugi kuponček. Po pretečenem času smo vsak kuponček sprali s 5 mL sterilne destilirane vode ter ga nato dali v epruveto z 2 mL fiziološke raztopine in 15 steklenimi kroglicami. Nato smo vse epruvete 1 minuto mešali na vrtnem mešalniku pri 2300 obratih/s, da smo odstranili celice, ki so bile vezane na nerjavečem jeklu in jih sprostili v suspenzijo. V suspenziji smo z metodo štetja na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003) AHB določili koncentracijo aktivnih celic, vezanih v biofilmu na nerjavečem jeklu (Belessi in sod., 2011).



Slika 6: Shematski prikaz določanja vpliva razkužil in ekstrakta *Evodia rutaecarpa* na tvorbo biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* ter vpliva razkužil na celice v biofilmu.

3.3.5 Statistično vrednotenje rezultatov

Rezultate smo statistično ovrednotili s testom ANOVA. Test ANOVA je statistična analiza variance in jo uporabimo takrat, kadar analiziramo značilnost razlik med povprečnimi vrednostmi za več kot dva vzorca, pri čemer so vzorci med seboj neodvisni. Glede na število dejavnikov in število vzorcev smo uporabili dve vrsti testa ANOVA, test ANOVA za posamezni dejavnik ter test ANOVA za dva dejavnika s ponovitvami. Test ANOVA za posamezni dejavnik izvede analizo variance na podlagi podatkov za dva ali več vzorcev. Test ANOVA za dva dejavnika s ponovitvijo je uporaben, kadar lahko podatke razvrstimo v dve različni skupini (Bastič, 2006).

Pri analizi vsake skupine rezultatov smo si postavili statistično domnevo, kar je še nedokazana trditev o lastnosti slučajne spremenljivke. Opredelili in zapisali smo si dve statistični domnevi: ničelno domnevo H_0 in alternativno domnevo H_1 . Nato je sledil postopek preizkušanja statističnih domnev s testom ANOVA. Izbrali smo si vrednost za stopnjo značilnosti $\alpha = 0,05$. Postavili in zapisali smo H_0 in H_1 . Predpostavili smo, da H_0 velja. Izbrali smo testno statistiko ANOVA in določili območje, kjer H_0 obdržimo in območje, kjer H_0 zavrnemo v korist H_1 . Izračunali smo P-vrednost, ki je verjetnost, da ob predpostavki, da je ničelna domneva pravilna, dobimo za testno statistiko vrednosti, ki so bolj v korist alternativne domneve od izračunane vrednosti testne statistike. P-vrednost je

vezana na vzorec in izraža, v kolikšni meri so vzorčni podatki v skladu z ničelno domnevo. Na podlagi p-vrednosti postavimo statistični sklep. Če je bila P-vrednost večja od α ($p > 0,05$), ničelno domnevo obdržimo, kar pomeni, da rezultati niso statistično značilni in vzorčni podatki ne nasprotujejo ničelni domnevi. Če pa je bila P-vrednost manjša od α ($p < 0,05$), ničelno domnevo zavrnemo v korist alternativne domneve, kar pomeni da rezultati so statistično značilni in pri stopnji značilnosti α trdimo, da je alternativna domneva pravilna ter verjetnost, da smo se zmotili, je največ α (Košmelj, 2007).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Predpostavili smo, da bakterije vrste *L. monocytogenes* tvorijo biofilm. Da bi ugotovili, kateri sevi so močni tvorci in kateri šibki tvorci biofilma, smo izvedli poskus določanja količine biofilma na polistirenski površini z metodo barvanja s kristal violetom. Na ta način smo izbrali tri seve bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki so glede na naše dobljene rezultate močni oz. srednje močni tvorci biofilma in z njimi dalje izvedli še poskus določanja koncentracije celic v biofilmu na nerjavečem jeklu s kvantifikacijo celic na nerjavečem jeklu in kvantifikacijo v biofilm nevezanih celic. V zaključku smo proučili tudi vpliv okoljskih dejavnikov (različna temperatura, različne koncentracije razkužil, različen čas izpostavitve razkužilu ter izpostavitvi ekstraktu rastline *Evodia rutaecarpa*) na tvorbo biofilma in na že tvorjen biofilm, zato smo morali izbranim sevom bakterij vrste *L. monocytogenes* določiti minimalno inhibitorno koncentracijo razkužil (triklosan, benzalkonijev klorid in kloroheksidin diacetat monohidrat) in ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*.

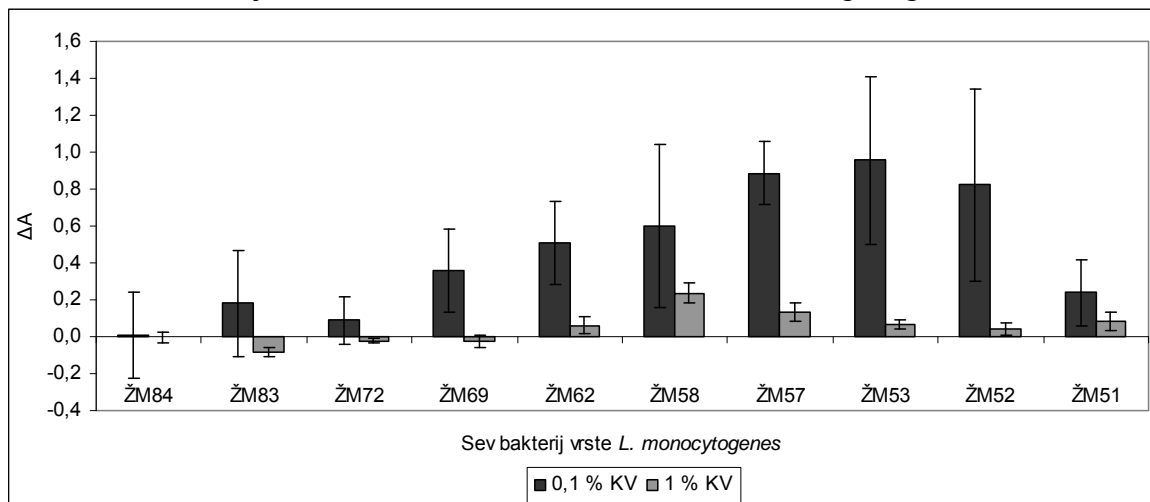
4.1 OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM

Optimizacija metode barvanja s kristal violetom je zajemala določitev vpliva koncentracije barvila kristal violet in določitev vpliva meritev absorbcije barvila kristal violet v mikrotitrski ploščici na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* na polistirenski površini.

4.1.1 Vpliv koncentracije kristal violeta

Z metodo barvanja s kristal violetom smo določili vpliv koncentracije kristal violeta na količino tvorjenega biofilma na polistirenski površini. Poskuse smo izvajali v 4 paralelkah ter uporabili dve različni koncentraciji kristal violeta (1 % in 0,1 % koncentracijo). Poskus smo opravili z desetimi sevi (*L. monocytogenes* ŽM84, *L. monocytogenes* ŽM83, *L. monocytogenes* ŽM72, *L. monocytogenes* ŽM69, *L. monocytogenes* ŽM62, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM57, *L. monocytogenes* ŽM53, *L. monocytogenes* ŽM52, *L. monocytogenes* ŽM51).

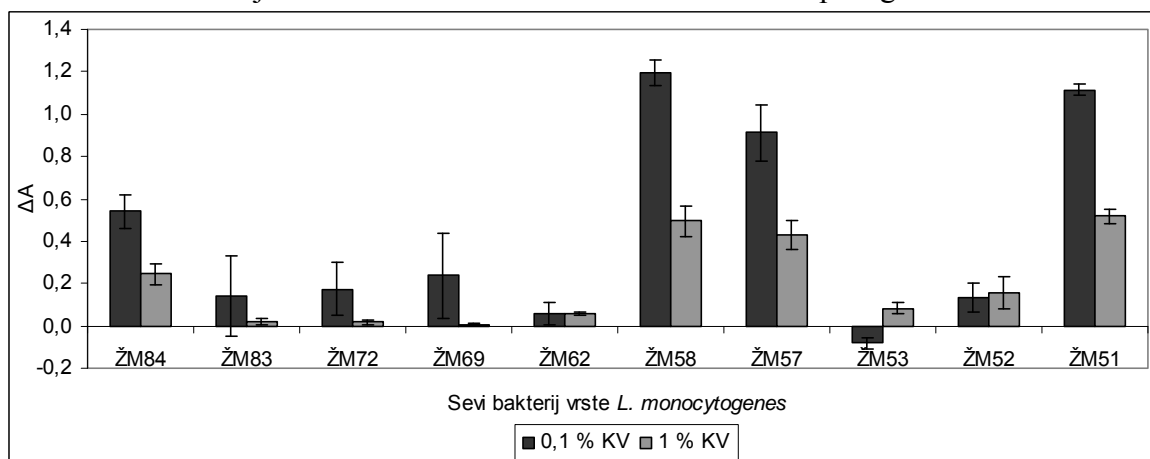
Po 24-urni inkubaciji smo dobili rezultate razvidne na sliki 7 in v prilogi A.



Slika 7: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

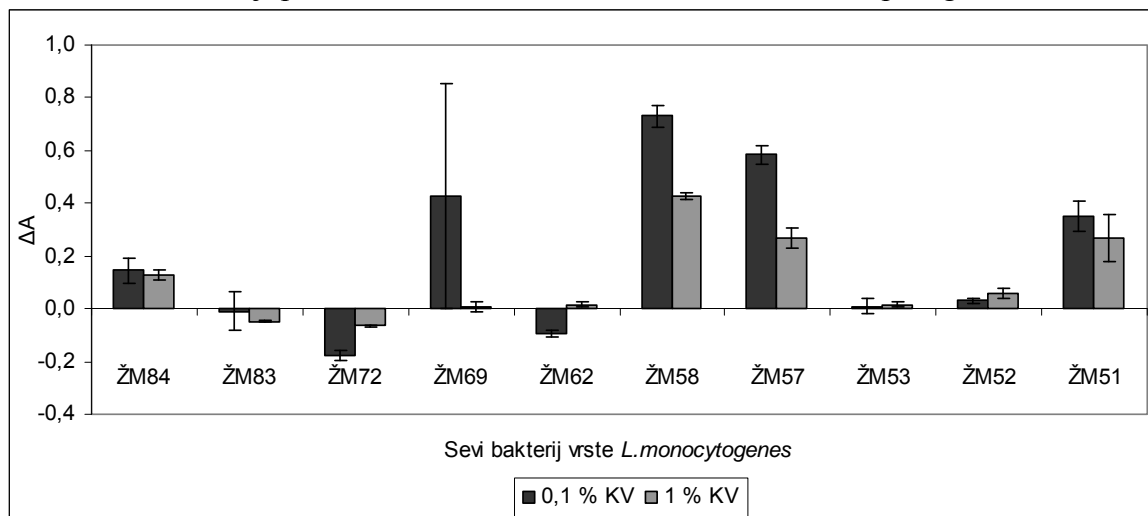
Po 48-urni inkubaciji smo dobili rezultate razvidne na sliki 8 in prilogi B.



Slika 8: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

Po 72-urni inkubaciji pa smo dobili rezultate razvidne na sliki 9 in v prilogi C.



Slika 9: Vpliv koncentracije kristal violeta na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanca, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

Količine tvorjenega biofilma na polistirenski površini dobljene po končanem poskusu z metodo barvanja s kristal violetom so prikazani v prilogi D in E, za vsako koncentracijo kristal violeta posebej.

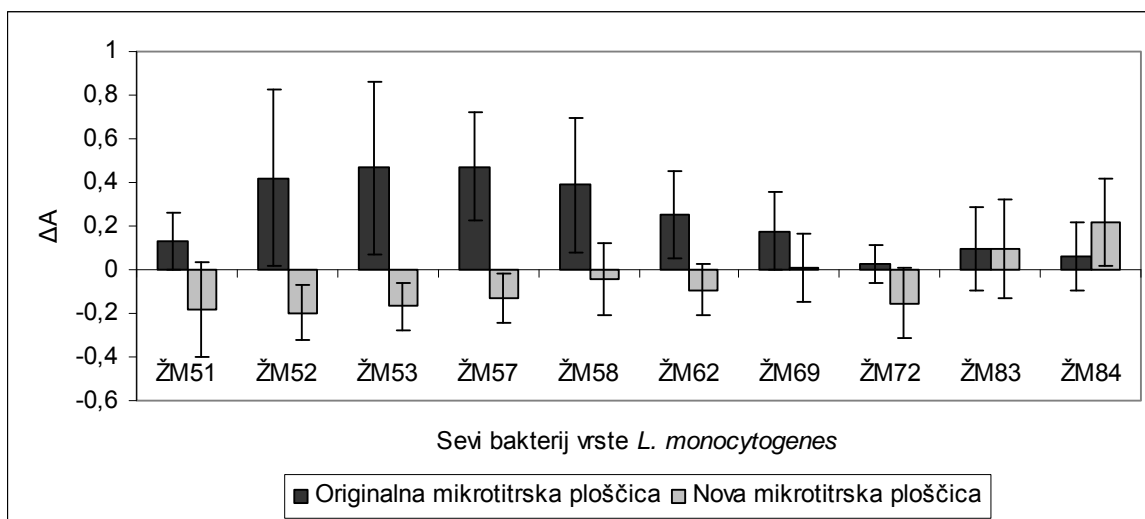
Iz slik 7, 8 in 9 ter prilog A, B in C je razvidno, da se po 24-urni inkubaciji količina biofilma med posameznimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* ne razlikuje (priloga A), razlika je pa vidna po 48 in 72 urah (priloga B in C). V vseh treh primerih, tako pri 24-urni inkubaciji kakor pri 48- in 72-urni inkubaciji, pa je količina biofilma izbranih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* odvisna od koncentracije uporabljenega kristal violeta (priloga A, B, C).

Na slikah 7, 8 in 9 ter prilogah A, B in C smo preizkusili dve različni koncentraciji kristal violeta in opazovali njun vpliv na tvorbo biofilma. Harvey in sodelavci (2007) in Djordevic in sodelavci (2002) so se odločili za 1 % koncentracijo kristal violeta za določitev biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Burton in sodelavci (2006) pa so za določitev količine biofilma na polistirenski površini bakterij vrste *Escherichia coli* in *Staphylococcus epidermidis* uporabili 0,4 % koncentracijo kristal violeta. Glede na omenjene članke smo se tudi sami odločili, da bomo preizkusili dve 0,1 % in 1 % koncentracijo kristal violeta. Ker so bili rezultati ob dodatku 0,1 % barvila kristal violet izraženi kot razlika absorbanca (ΔA) višji pri 24-, 48- in 72-urni inkubaciji smo se odločili, da bomo za nadaljne poskuse uporabljali to koncentracijo barvila.

Tako kakor Wirtanen in Mattila-Sandhohn (1992) smo tudi mi opazili, da po 24 urah biofilm še ni bil formiran in zato niso bile vidne razlike med sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* v tvorbi biofilma na polistirenski površini.

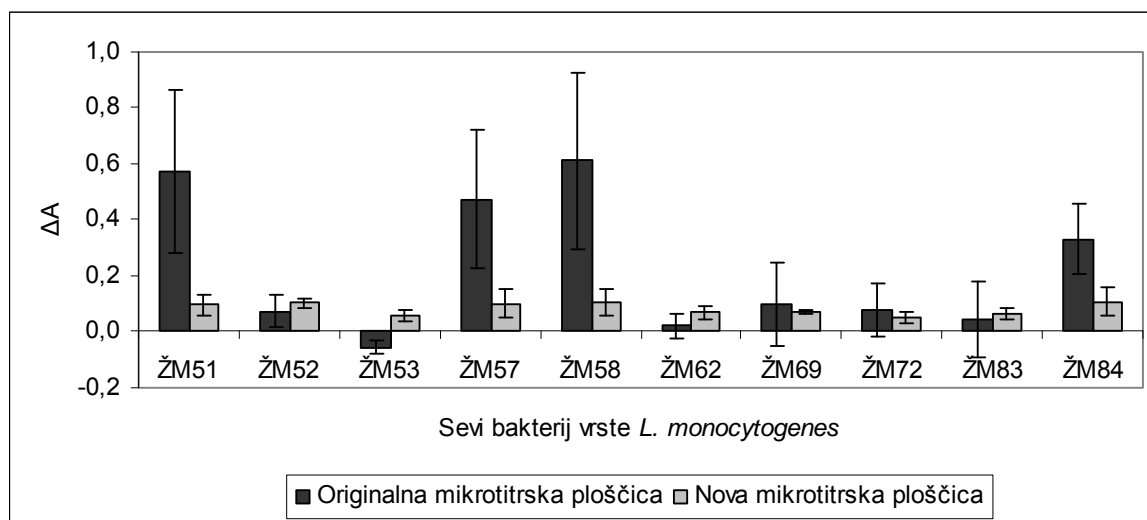
4.1.2 Vpliv meritev absorbcije kristal violeta v mikrotitrski ploščici

Polovici izbranih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 2) (*L. monocytogenes* ŽM84, *L. monocytogenes* ŽM83, *L. monocytogenes* ŽM72, *L. monocytogenes* ŽM69, *L. monocytogenes* ŽM62, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM57, *L. monocytogenes* ŽM53, *L. monocytogenes* ŽM52, *L. monocytogenes* ŽM51) smo z metodo barvanja s kristal violetom določili količino tvorjenega biofilma na polistirenski površini. Kakor opisano v poglavju 3.3.4.1 smo po opravljenem barvanju s 0,1 % kristal violetom iz vsake luknjice na mikrotitrski ploščici, ki je vsebovala 200 μ L raztopine kristal violeta, 100 μ L vsebine prenesli v novo mikrotitrsko ploščico. Absorbanco smo nato izmerili pri vseh vzorcih v originalni in v novi mikrotitrski ploščici pri 582 nm. Za vsak sev smo imeli 4 paralelke. Meritve absorbanc dobljene na originalni mikrotitrski ploščici smo primerjali z meritvami absorbanc na novi mikrotitrski ploščici. Celoten poskus smo ponovili dvakrat, rezultate pa združili na slikah 10, 11 in 12 in prilogah F, G, H.



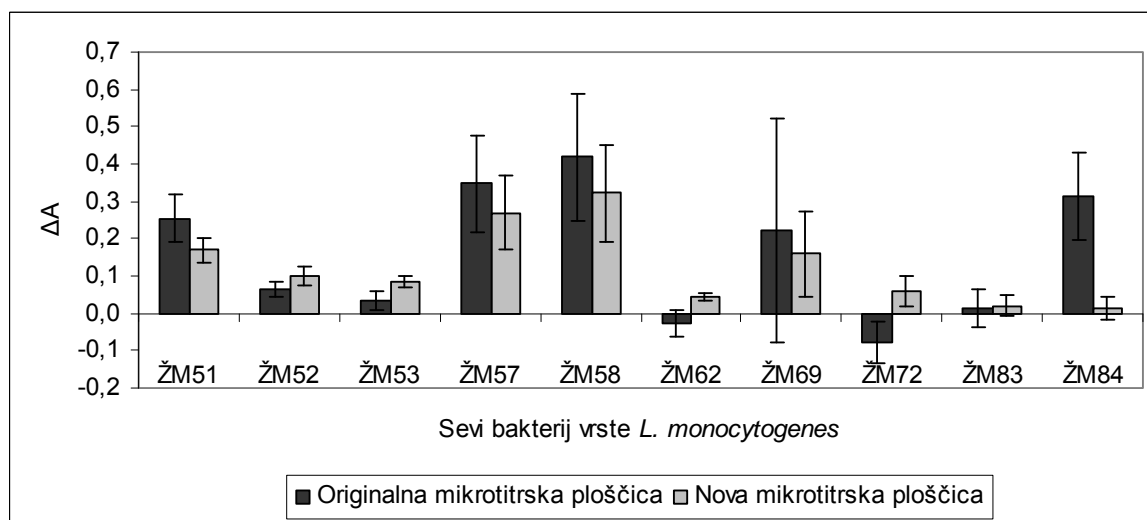
Slika 10: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.



Slika 11: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.



Slika 12: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

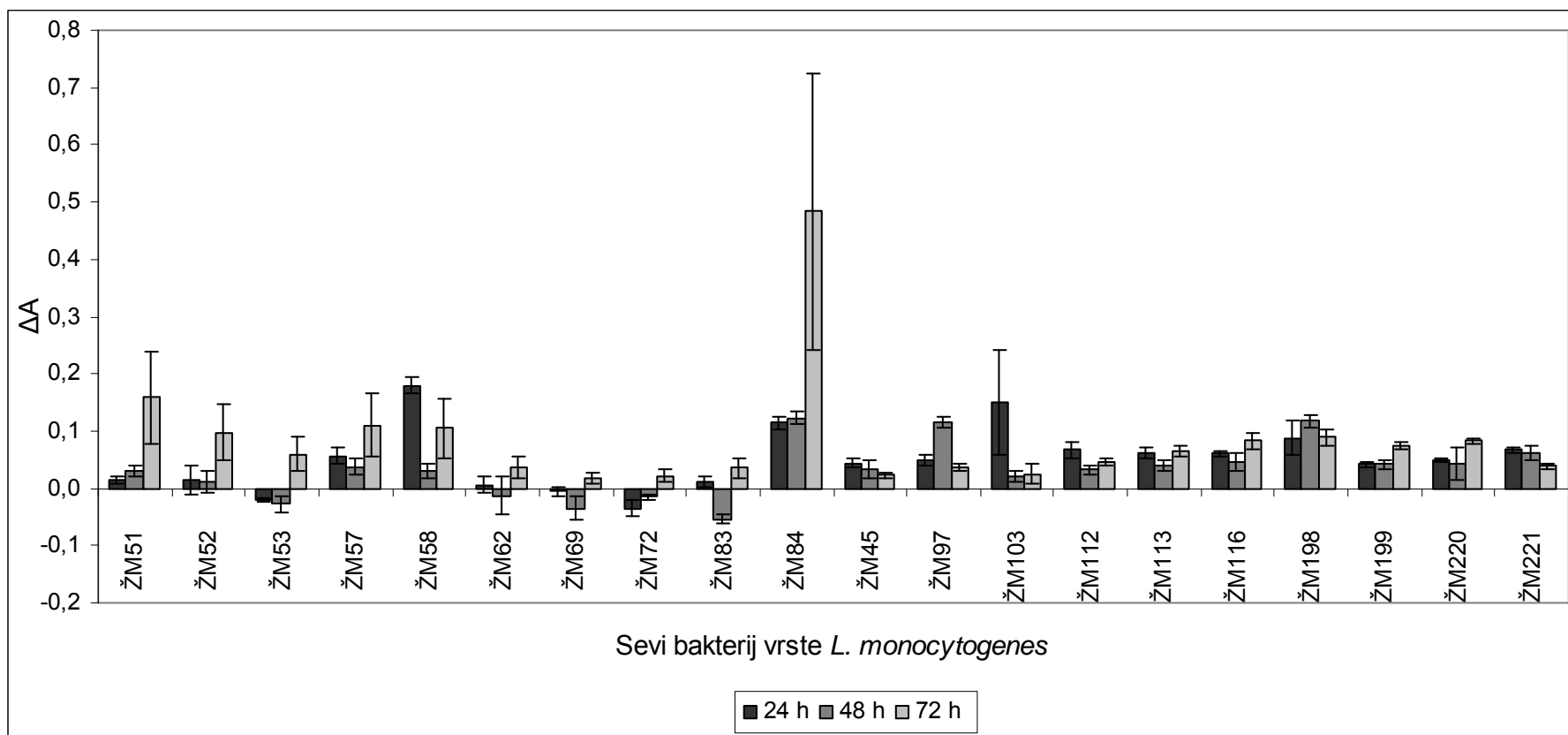
Iz slike 10 in priloge F je razvidno, da je tvorba biofilma po 24 urah odvisna od meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici, ni pa nobenih razlik v tvorbi biofilma v odvisnosti od različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes*. Iz slik 11, 12 in priloge G ter H je vidno, da se količina biofilma na polistirenski površini spreminja v odvisnosti od seva bakterij vrste *L. monocytogenes*. Po 48 urah je količina biofilma še vedno odvisna od tega ali je meritev absorbance bila opravljena v originalni ali v novi mikrotitrski ploščici, po 72 urah pa te razlike ne vidimo več (priloge G, H).

Na slikah 10, 11 in 12 ter prilogah F, G in H smo primerjali meritve absorbanc dobljene na originalni mikrotitrski ploščici z meritvami absorbanc na novi mikrotitrski ploščici. Ta končni postopek analize določanja biofilma z metodo barvanja s kristal violetom se je glede na avtorje razlikoval. Tako so Harvey in sodelavci (2007) merili absorbenco v originalni mikrotitrski ploščici. Djordevic in sodelavci (2002) pa so absorbenco merili v novi mikrotitrski ploščici, kamor so, tako kot smo storili tudi mi, odpipetirali 100 μ L vsebine. Ker je prvi del našega poskusa zajemal optimizacijo metode barvanja s kristal violetom smo se odločili preveriti oba načina merjenja absorbance. Na podlagi dobljenih rezultatov (slike 10, 11 in 12 ter priloge F, G, in H) smo se odločili, da bomo za nadaljno analizo podatkov uporabljali rezultate izmerjene v originalni mikrotitrski ploščici, saj je bil razpon absorbanc večji, manj je bilo negativnih vrednosti in zato je bila interpretacija rezultatov nekoliko lažja.

Iz slik 10, 11 in 12 in priloge F, G ter H je razvidno, da po 24-urni inkubaciji ni vidnih razlik v tvorbi biofilma med različnimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar bi pomenilo (Wirtanen in Mattila-Sandhohn., 1992), da je inkubacijska doba 24 ur prekratka za nastanek biofilma.

4.2 VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* IN ČASA NA TVORBO BIOFILMA NA POLISITIRENSKI POVRŠINI

Sevom bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 2) smo z metodo barvanja s kristal violetom določili količino tvorjenega biofilma na polistirenski površini v odvisnosti od seva bakterij vrste *L. monocytogenes* in od časa. Uporabili samo 0,1 % barvilo kristal violet, ter tako ugotavljali vpliv seva bakterij vrste *L. monocytogenes* in časa na tvorbo biofilma na polistirenski površini. Rezultati so vidni na sliki 13 in prilogi I.



Slika 13: Relativna količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določena z metodo barvanja s 0,1 % kristal violetom.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

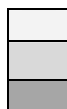
Tvorba biofilma na polistirenski površini je odvisna od seva bakterij vrste *L. monocytogenes* in od časa inkubacije (priloga I). Na podlagi dobljenih rezultatov (slika 13) smo seve bakterij vrste *L. monocytogenes* razdelili na močne, srednje močne in šibke tvorce biofilma po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji. Za posamezen čas inkubacije smo največji razpon med relativnimi absorbancami razdelili na tri dele (po 33,33 %) ter glede na relativno absorbanco vsakega seva le-tega uvrstili v pripadajočo se skupino. Rezultati so vidni v preglednici 4.

Preglednica 4: Razdelitev sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* na šibke, srednje in močne tvorce biofilma na polistirenski površini.

Sev	ΔA		
	24 h	48 h	72 h
ŽM51	0,0154	0,0311	0,1583
ŽM52	0,0151	0,0112	0,0970
ŽM53	-0,0188	-0,0270	0,0592
ŽM57	0,0567	0,0378	0,1096
ŽM58	0,1796	0,0304	0,1048
ŽM62	0,0058	-0,0138	0,0377
ŽM69	-0,0057	-0,0354	0,0175
ŽM72	-0,0347	-0,0148	0,0214
ŽM83	0,0124	-0,0534	0,0358
ŽM84	0,1143	0,1219	0,4832
ŽM45	0,0442	0,0325	0,0231
ŽM97	0,0490	0,1154	0,0377
ŽM103	0,1503	0,0208	0,0254
ŽM112	0,0676	0,0321	0,0446
ŽM113	0,0621	0,0397	0,0659
ŽM116	0,0606	0,0449	0,0833
ŽM198	0,0874	0,1174	0,0889
ŽM199	0,0419	0,0418	0,0740
ŽM220	0,0487	0,0438	0,0834
ŽM221	0,0674	0,0610	0,0384

Legenda:

- Šibki tvorce biofilma:
- Srednje močni tvorce biofilma:
- Močni tvorce biofilma:



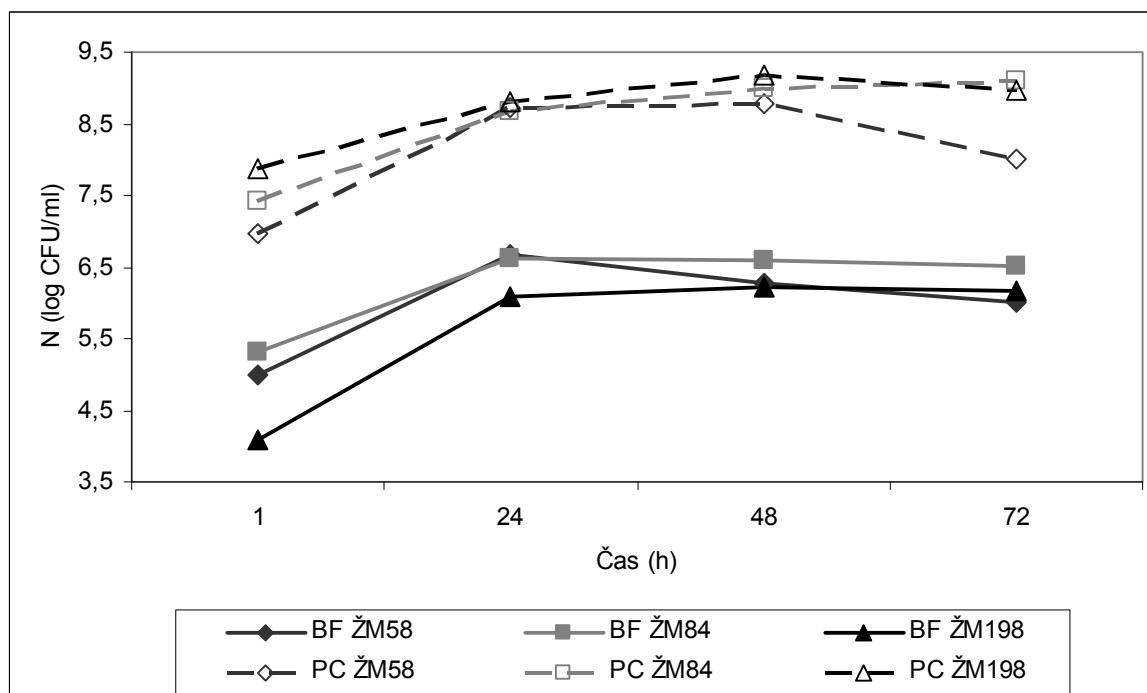
Izmed vseh preizkušenih sevov se je pokazalo, da je samo sev *L. monocytogenes* ŽM84 močen tvorec biofilma. Preostali sevi pa srednje močni oz. šibki tvorce biofilma. Podobne rezultate so dobili tudi Harvey in sodelavci (2007), kjer so izmed 138 sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* določili samo dva seva za močna tvorca biofilma (1,5 %), devet testiranih sevov je bilo srednje močnih (6,5 %) in 127 sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* je bilo šibkih tvorcev biofilma (92,0 %).

Djordjević in sodelavci (2002) ter Harvey in sodelavci (2007) so v svojih raziskavah pokazali, da se količina tvorjenega biofilma na polistirenski površini razlikuje med izbranimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes*. Do enakih zaključkov smo prišli tudi v naši raziskavi. Glede na dobljene rezultate (preglednica 4) smo izbrali tri seve bakterij vrste *L. monocytogenes*, za katere smo določili, da so močni tvorci biofilma: *L. monocytogenes* ŽM84 (humani izolat), *L. monocytogenes* ŽM58 (referenčni sev) in *L. monocytogenes* ŽM198 (živilski izolat) in jih uporabili pri nadaljnjem delu.

4.3 VPLIV SEVA BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* NA TVORBO BIOFILMA NA NERJAVEČEM JEKLU

Glede na rezultate dobljene z metodo barvanja s kristal violetom smo izmed vseh preizkušenih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* izbrali tri močne oz. srednje močne tvorce biofilma, in sicer sev *L. monocytogenes* ŽM84, *L. monocytogenes* ŽM198 in *L. monocytogenes* ŽM58 (4.1.3) ter sev *L. monocytogenes* L4 s katerimi smo želeli določiti tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu.

Na sliki 14 in prilogah J in K so prikazane koncentracije celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in količina planktonskih celic pri treh različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes*, humani izolat ŽM84, referenčni sev ŽM58 in živilski izolat ŽM198 pri 20 °C. Poskus smo izvedeli v dveh paralelkah.



Slika 14: Koncentracija celic vezanih v biofilm in koncentracija planktonskih celic sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM84 in *L. monocytogenes* ŽM198.

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

Iz slike 14 in prilog J in K je razvidno, da koncentracija celic v biofilmu in količina planktonskih celic pri izbranih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* v odvisnosti od časa raste. Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* v biofilmu tvorjenemu na nerjavečem jeklu je odvisno od seva ŽM58, ŽM84 in ŽM198 ter od časa inkubacije (priloga J). Prav tako je tudi koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* odvisno od seva ŽM58, ŽM84 in ŽM198 ter od časa inkubacije (priloga K).

Kalmokoff in sodelavci (2001) so raziskovali vpliv različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* na tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu. Tako kot mi, so tudi oni prišli do zaključka, da je tvorba biofilma na nerjavečem jeklu odvisna od seva bakterij vrste *L. monocytogenes*.

4.4 DOLOČITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE RAZKUŽIL IN EKSTRAKTA *Evodia rutaecarpa*

Da bi lahko spremljali vpliv protimikrobnih snovi na tvorbo biofilma pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* smo z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici določili MIC (minimalno inhibitorno koncentracijo) razkužil (triklosan, benzalkonijev klorid in kloroheksidin diacetat monohidrat) ter ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa*. Rezultati (preglednica 5) so pokazali, da je MIC razkužila triklosan za seve ŽM58 in ŽM198 bakterij vrste *L. monocytogenes* 8 µg/mL, za naravni ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa* za seva ŽM58 in L4 bakterij vrste *L. monocytogenes* pa je bil 4,096 mg/mL. Za razkužili benzalkonijev klorid in kloroheksidin diacetat monohidrat zaradi ne določljivih rezultatov nismo uspeli določiti MIC.

Preglednica 5: MIC razkužil in ekstrakta *Evodia rutaecarpa* za izbrane seve bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Protimikrobna snov	MIC za sev		
	<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	<i>L. monocytogenes</i> ŽM198	<i>L. monocytogenes</i> L4
Razkužilo triklosan	8 µg/mL	8 µg/mL	/
Benzalkonijev klorid	/	/	/
Kloroheksidin diacetat monohidrat	/	/	/
Ekstrakt <i>Evodia rutaecarpa</i>	4,096 mg/mL	/	4,096 mg/mL

Legenda: /: ni določeno, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, ŽM: oznaka seva.

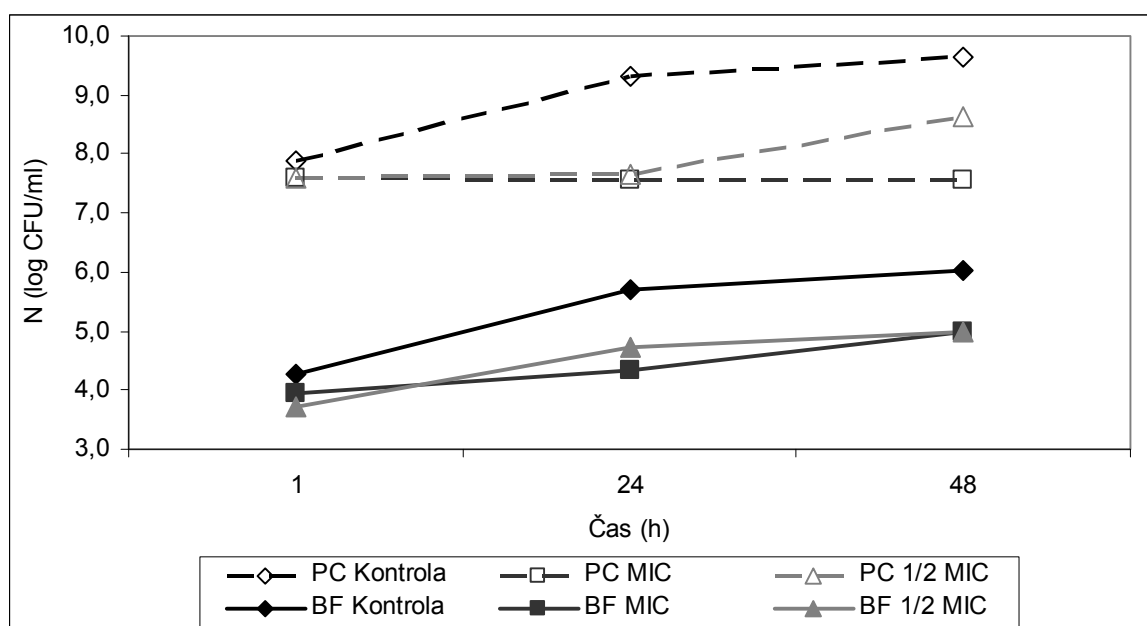
4.5 VPLIV RAZKUŽILA IN EKSTRAKTA *Evodia ruteacarpa* NA TVORBO BIOFILMA BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* NA NERJAVEČEM JEKLU

4.5.1 Vpliv različnih koncentracij razkužila triklosan na tvorbo biofilma

Poskus je bil izveden na dveh izbranih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes*, ŽM198 in ŽM58. Poskus za sev *L. monocytogenes* ŽM198 smo ponovili dvakrat, za sev ŽM58 bakterij vrste *L. monocytogenes* pa enkrat. Oba poskusa sta bila izvedena v dveh paralelkah. Kot protimikrobno snov smo uporabili razkužilo triklosan z dvema različnima koncentracijama, 8 µg/mL (MIC) in 4 µg/mL (MIC/2). Razkužilo smo dodali v 10 mL MHB, nato smo dodali 12 kupončkov iz nerjavečega jekla in 0,5 mL pripravljene kulture izbranega seva bakterij vrste *L. monocytogenes*. Vsebino smo 48 ur inkubirali pri 20 °C. Kontrolni vzorec je bil pripravljen popolnoma enako, vendar brez razkužila. Po končani inkubaciji smo določili celice, vezane v biofilm in tudi celice, ki niso tvorile biofilma.

4.5.1.1 Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 ob dodatku razkužila triklosan

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo celic bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM198 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracijo planktonskih celic. Poskus smo ponovili dvakrat in ga vedno izvajali z dvema paralelkama. Vsi rezultati so prikazani na sliki 15 in prilogah L in M.



Slika 15: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

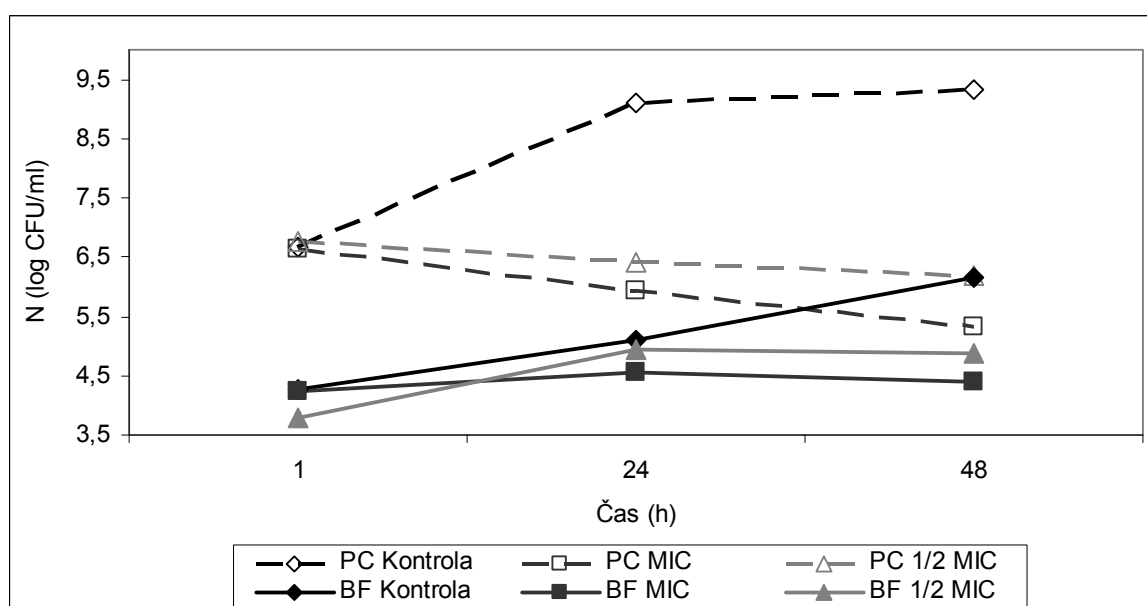
Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, 1/2 MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija.

Iz slike 15 in prilog L ter M je razvidno, da koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic seva ŽM198 bakterij vrste *L. monocytogenes* v odvisnosti od časa raste. Tako pri koncentraciji celic v biofilmu, kakor pri koncentraciji planktonskih celic je vidna razlika med kontrolno skupino ter skupino, kjer smo uporabili razkužilo triklosan. Na sam

biofilm koncentracija razkužila ni vplivala, razlike med uporabo MIC in $\frac{1}{2}$ MIC niso vidne (priloga L), je pa vplivala koncentracija razkužila na planktonske celice (priloga M).

4.5.1.2 Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku razkužila triklosan

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracijo planktonskih celic ob dodatku MIC in $\frac{1}{2}$ MIC razkužila triklosan. Poskus smo za določanje živih celic vezanih v biofilm izvedli v dveh paralelkah, za določanje planktonskih celic pa ni bilo paralelk. Rezultati so prikazani na sliki 16 in v prilogah N in O.



Slika 16: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, $\frac{1}{2}$ MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija.

Kakor je prikazano na sliki 16 in v prilogah N in O, je koncentracija celic vezanih v biofilm in koncentracija planktonskih celic odvisno od časa inkubacije. Dodatek razkužila je vplival na zmanjšano tvorbo biofilma in na planktonske celice, katerih rast je bila tudi inhibirana v primerjavi s kontrolno skupino kjer nismo dodali razkužila. Na samo tvorbo biofilma koncentracija razkužila ni vplivala, razlik med uporabo MIC in $\frac{1}{2}$ MIC razkužila ni (priloga N).

Številni avtorji so pokazali, da so celice v biofilmu veliko bolj odporne na okoljski stres kakor planktonske celice (Davies, 2003). Chavant in sodelavci (2004) so pokazali, da se z pravilno uporabo razkužil lahko vpliva na zmanjšanje koncentracije celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* formiranem na nerjavečem jeklu. Ugotovili so tudi, da starejši biofilmi razvijejo močnejšo odpornost proti razkužilom. Do podobnih rezultatov

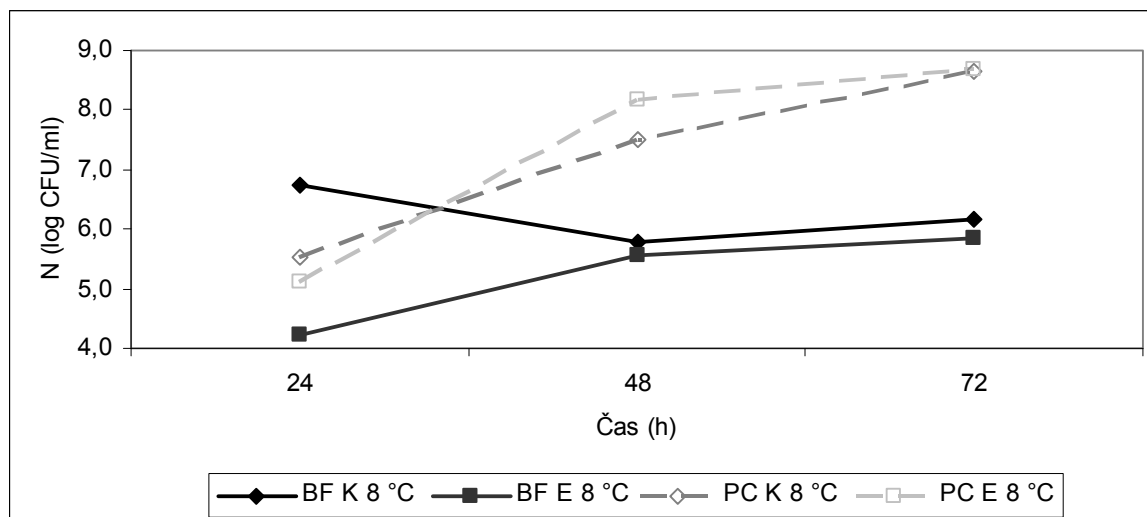
smo prišli tudi mi. Na slikah 15 in 16 ter prilogah L, M, N in O je viden vpliv razkužila triklosan na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Koncentracija celic v biofilmu v kontrolni skupini je večje od koncentracije celic v biofilmu v skupini, kjer je bil uporabljen triklosan (MIC in $\frac{1}{2}$ MIC). Iz tega lahko sklepamo, da bi bilo razkužilo triklosan primerno za razkuževanje površin v živilski industriji, ki bi lahko prišle v stik z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

4.5.2 Vpliv ekstrakta *Evodia rutaecarpa* in temperature na tvorbo biofilma

Za določitev vpliva naravnega ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* smo izbrali dva seva bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* L4. Kot protimikrobno snov smo uporabili alkoholno raztopino ekstrakta *Evodia rutaecarpa* s koncentracijo 1,024 mg/mL ($\frac{1}{4}$ MIC). Alkoholno raztopino ekstrakta smo dodali v 10 mL MHB, nato smo dodali 12 kupončkov iz nerjavečega jekla in 0,5 mL pripravljene kulture izbranega seva bakterij vrste *L. monocytogenes*. Vsebino smo 72 ur inkubirali pri 8 °C in pri 37 °C. Kontrolni vzorec je bil pripravljen popolnoma enako vendar brez ekstrakta in tudi inkubiran pri dveh različnih temperaturah. Po končani inkubaciji smo določili celice, vezane v biofilm in celice, ki niso tvorile biofilma.

4.5.2.1 Koncentracija celic v biofilmu in planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ekstrakta *Evodia rutaecarpa*

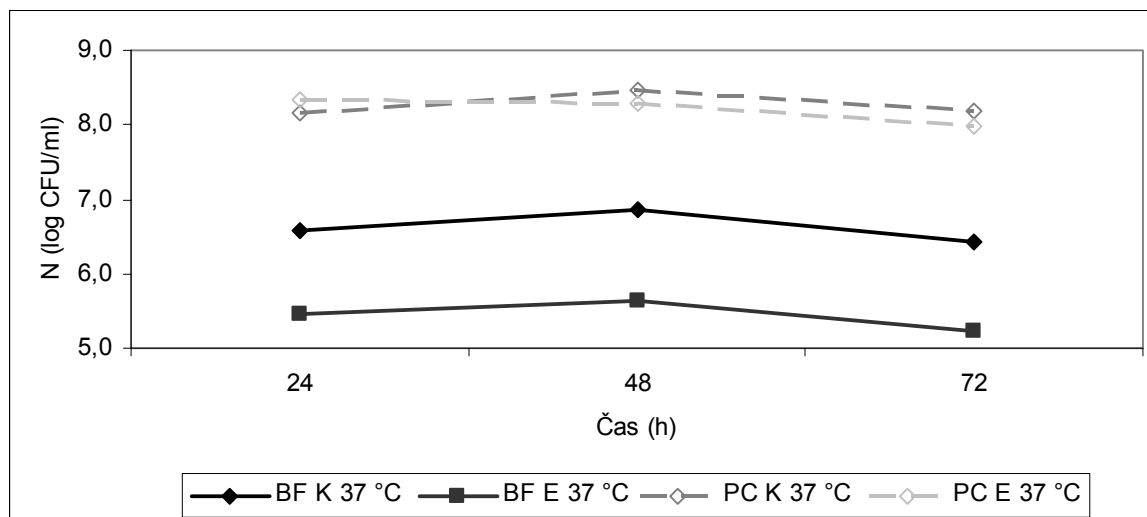
Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo živih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracijo planktonskih celic ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C. Rezultati so prikazani na slikah 17 in 18 ter prilogah P, Q, R in S.



Slika 17: Koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, E: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Iz slike 17 in prilog P in Q je vidno, da je koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ekstrakta *Evodia rutaecarpa* in pri inkubaciji na 8 °C odvisna od časa inkubacije in od uporabe ekstrakta.

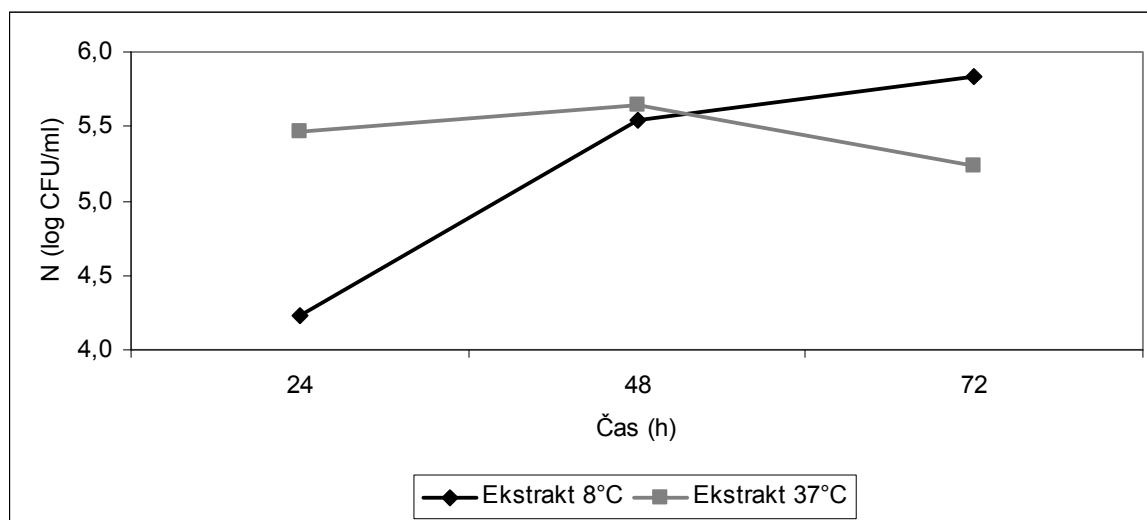


Slika 18: Koncentracija celic v biofilmu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, E: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu je bilo ob dodatku ekstrakta manjše kot koncentracija celic v gojišču brez dodatka ekstrakta in se s časom povečuje (slika 18, priloga R). Koncentracija planktonskih celic pa ni odvisna od uporabe ekstrakta (priloga S).

Za ugotovitev vpliva temperature in ekstrakta na tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 smo med seboj primerjali rezultate dobljene pri inkubaciji nerjavečega jekla z ekstraktom pri 8 °C in 37 °C.



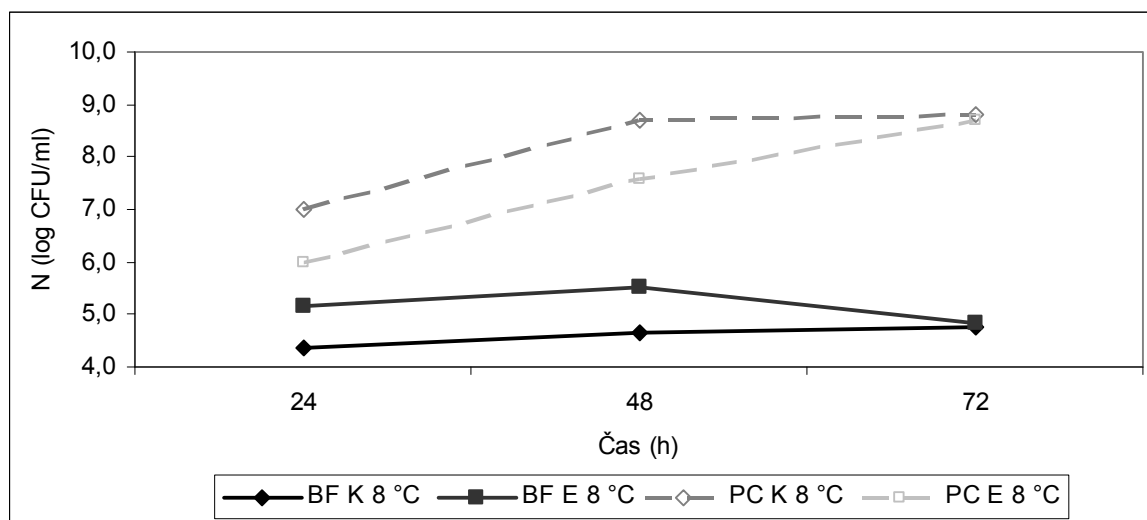
Slika 19: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Iz slike 19 in priloge T je razvidno, da se koncentracija biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 na nerjavečem jeklu pri uporabi ekstrakta povečuje pri 8 °C vseh 72 ur, medtem ko se pri 37 °C koncentracija biofilma po 48 urah zmanjšuje. Razlike v koncentraciji celic so majhne in test ANOVA je za omenjene podatke pokazal, da tvorba biofilma ni odvisna od temperature.

4.5.2.2 Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ekstrakta *Evodia rutaecarpa*

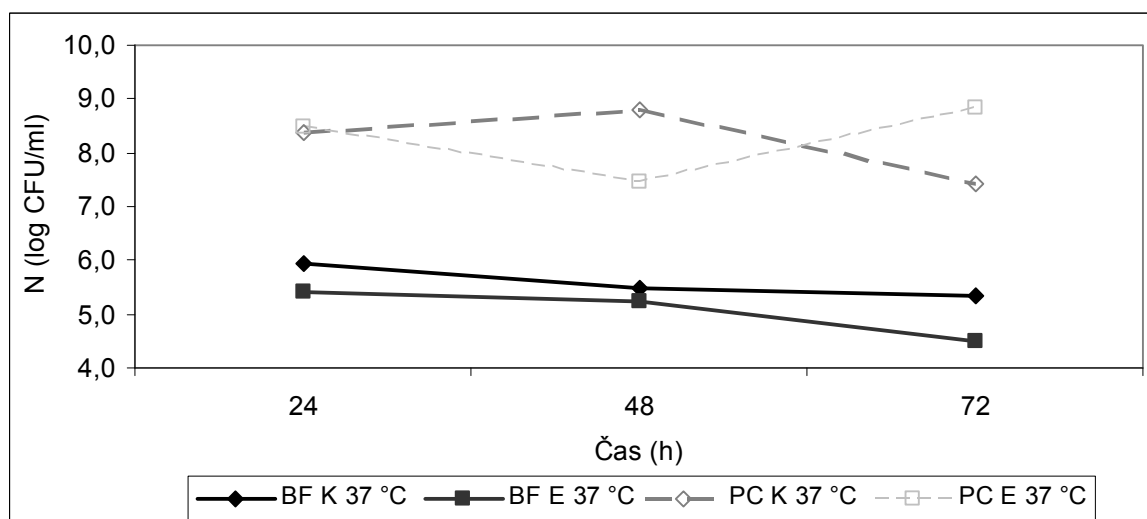
Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določili koncentracijo živih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu in koncentracijo planktonskih celic ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C. Rezultati so prikazani na slikah 20 in 21 in prilogah U ter V.



Slika 20: Koncentracija celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, E: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Koncentracija biofilma in planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 na nerjavečem jeklu je bila ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C prvih 48 ur manjša kot pri kontrolnih vzorcih, ki niso vsebovali dodatka ekstrakta, medtem ko vpliva ekstrakta ni po 72-urni inkubaciji (slika 20, prilogi U in V).



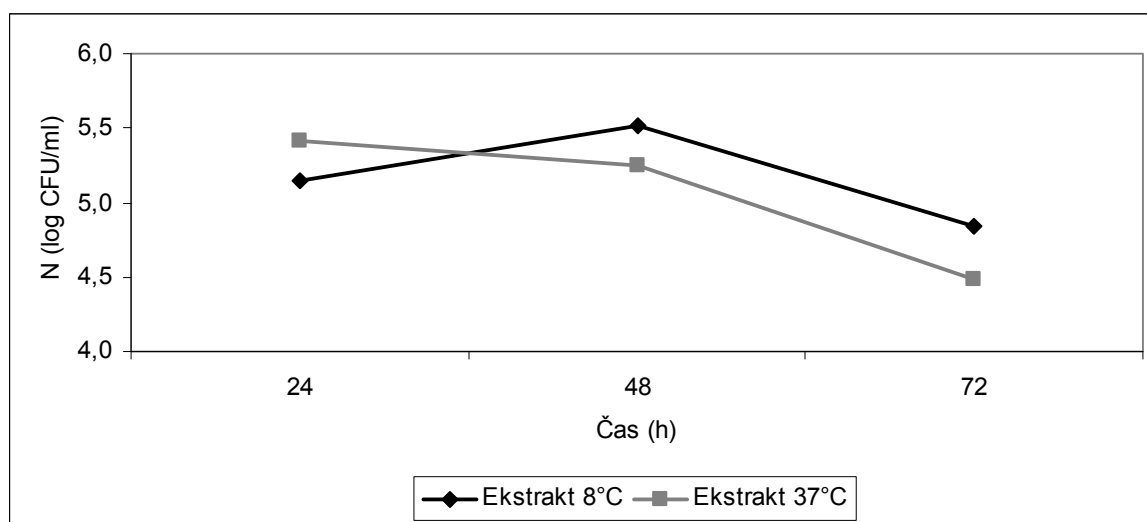
Slika 21: Koncentracija celic v biofilmu na nerjavečem jeklu in koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, E: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Koncentracija biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 je ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C odvisna od časa in od uporabe ekstrakta (slika 21, priloga W).

Na koncentracijo planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 pa $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* ni imel vpliva (priloga X).

Vpliv temperature na tvorbo biofilma na nerjavečem jeklu pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* L4 smo ugotovili tako, da smo med seboj primerjali rezultate dobljene pri inkubaciji z ekstraktom pri 8 °C in 37 °C.



Slika 22: Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, K: kontrola, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Kakor za sev bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 je tudi za sev bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 značilno, da na koncentracijo celic v biofilmu pri uporabi ekstrakta temperatura nima vpliva (slika 22 in priloga Y).

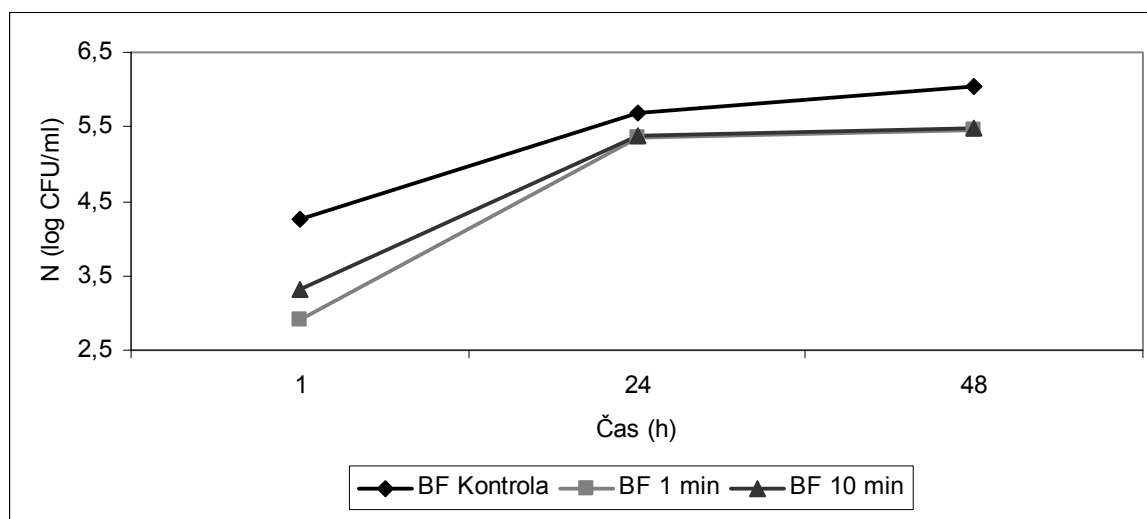
Različni avtorji (Sandasi in sod., 2007; Sandasi in sod. 2010) so preizkušali inhibitorno sposobnost različnih rastlinskih ekstraktov na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Večina raziskav je bila narejenih na biofilmu, tvorjenem na polistirenski površini in njegovem določanju z metodo barvanja s kristal violetom. Mi smo za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskega ekstrakta *Evodia rutaecarpa* uporabili biofilm, tvorjen na nerjavečem jeklu in gojitveno metodo določanja koncentracije bakterij na trdnem gojišču. Mattos de Oliveira in sodelavci (2012) so kakor mi uporabili biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*, tvorjen na nerjavečem jeklu ter kot protimikrobno snov uporabili različne ekstrakte cimeta. Kljub razlikam v metodi določanja količine biofilma in uporabi različnih ekstraktov, so se naši rezultati skladali z rezultati v omenjenih virih. $\frac{1}{4}$ MIC ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* ni imel večjega protimikrobnega učinka na biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Različne študije so pokazale, da visoka temperatura vpliva na hitrejšo tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* (Bae in sod., 2011), v našem primeru pa ni bilo vidnega vpliva temperature inkubacije (8 °C, 37 °C) na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* (slika 19, slika 22).

4.6 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ RAZKUŽILA TRIKLOSAN NA BIOFILM, TVORJEN NA NERJAVEČEM JEKLU

Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo preverili učinkovitost razkužila triklosan na celice bakterij vrste *L. monocytogenes* v biofilmu tako, da smo biofilm na nerjavečem jeklu izpostavili MIC razkužila triklosan za 1 minuto in za 10 minut. Na ta način smo preverili učinkovitost razkužila triklosan na biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes* glede na čas izpostavitve biofilma razkužilu. Poskus je bil opravljen na dveh različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes*, ŽM198 in ŽM58. V obeh primerih smo imeli po dve paralelke. Poskus s sevom bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 smo ponovili dvakrat.

Na sliki 23 in prilogi Z so prikazani rezultati za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM198.

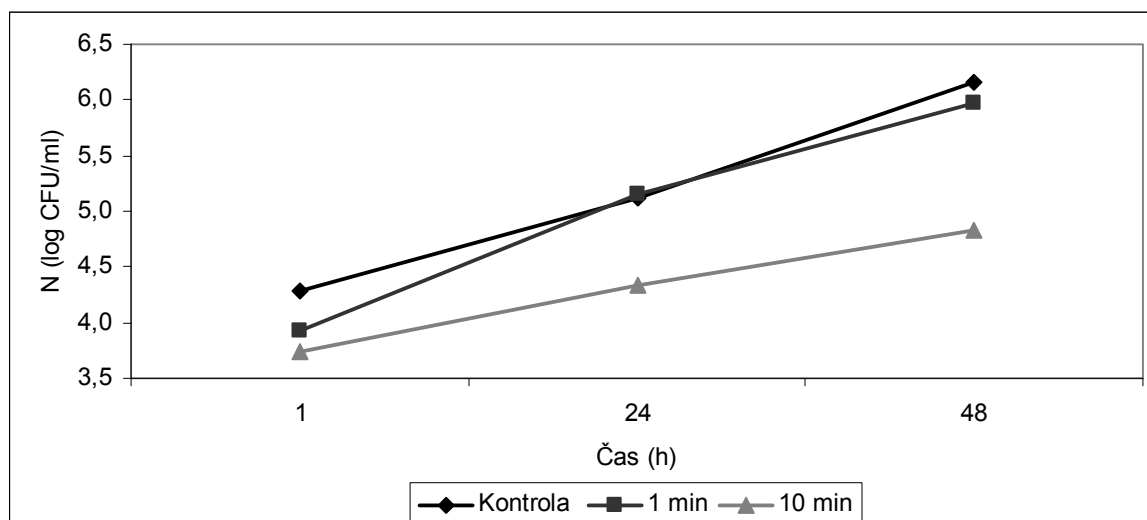


Slika 23: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 10 minut, BF Kontrola: kontrola biofilma.

Kakor je razvidno na sliki 23 in v prilogi Z, je koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 po izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan, odvisna od časa inkubacije in od uporabe razkužila triklosan. Razlike med koncentracijama celic biofilma izpostavljenega MIC razkužila triklosan za 1 minuto in biofilma izpostavljenega MIC razkužila triklosan za 10 minut pa ni.

Na sliki 24 in v prilogi AA prikazani rezultati za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM58.



Slika 24: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 10 minut, BF Kontrola: kontrola biofilma.

Iz slike 24 in priloge AA je razvidno, da je koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 v biofilmu na nerjavečem jeklu po izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan zmanjšano. Daljši čas učinkovanja razkužila (10 minut) je imel večji vpliv na odmiranje celic v biofilmu v primerjavi z 1-minutno izpostavitvijo.

Bae in sodelavci (2011) so pokazali, da je 1- in 5-minutna izpostavitve biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*, tvorjenega na nerjavečem jeklu, različnim razkužilom učinkovita. Uspelo jim je zmanjšati koncentracijo celic v biofilmu iz 5 log CFU/mL na 3 log CFU/mL. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi sami, le da nam je uspelo zmanjšati koncentracijo celic v biofilmu za manjši delež.

5 SKLEPI

Tvorba biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*:

- na polistirenski površini je odvisna od seva.
- ni odvisna od vira izolacije (referenčni, humani, živilski izolati).
- na nerjavečem jeklu je manjša ob dodatku razkužila triklosan medtem ko različni koncentraciji razkužila (MIC in $\frac{1}{2}$ MIC razkužila) nimata statistično značilnega vpliva.
- na nerjavečem jeklu je manjša ob dodatku ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* pri koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIC.
- na nerjavečem jeklu ob dodatku ekstrakta rastline *Evodia rutaecarpa* pri koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIC ni odvisna od temperature (8 °C, 37 °C).

Koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* v samem biofilmu na nerjavečem jeklu

- se zmanjša ob dodatku razkužila triklosan pri koncentraciji MIC.
- ni odvisno od časa (1 in 10 minut) izpostavitve razkužilu triklosan koncentracije MIC.

6 POVZETEK

Kakovostna in mikrobiološko neoporečna hrana je bistvenega pomena za kvalitetno življenje človeka. Ključen korak do mikrobiološko neoporečne hrane pa se opravi v obratih živilske industrije. V le-teh mora biti dobro poskrbljeno za higieno prostorov in opreme.

Tvorba biofilmov v živilski industriji predstavlja velik problem. Biofilmi različnih patogenih mikroorganizmov se lahko tvorijo na najrazličnejših površinah, na steklu, plastičnih površinah, nerjavečem jeklu, gumah. Zaradi večje odpornosti na razkužila oziroma biocide, biofilmi predstavljajo potencialno nevarnost kontaminacije hrane in posledično okužbe ljudi.

Tak problem predstavlja tudi patogene bakterije vrste *L. monocytogenes*. Prilagodljive so na vrsto okoljskih dejavnikov, kot so nizka temperatura hladilnika, nizke koncentracije kisika, preživijo lahko ob prisotnosti do 10 % NaCl in aktivnosti vode do 0,92. Poleg omenjenih lastnosti pa so še zmožne tvoriti biofilm, ki celice še dodatno ščiti pred okoljskim stresom.

V naši raziskavi smo analizirali tvorbo biofilma živilskih, humanih in referenčnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* na dveh različnih površinah, ki se velikokrat uporabljajo v živilski industriji; polistiren in nerjaveče jeklo. Glede na dobljene rezultate z metodo barvanja s kristal violetom smo 20 izbranih sevov razdelili v tri skupine: močne tvorce biofilma, srednje močne in šibke tvorce biofilma. Izbrali smo tri močne oz. srednje močne tvorce biofilma, en živilski, en humani in en referenčni izolat ter preverili njihovo sposobnost tvorbe biofilma tudi na nerjavečem jeklu. Na podlagi priporočil iz Univerze v Budimpešti smo preizkusili tudi sev L4.

Preizkusili smo tudi vpliv okoljskih dejavnikov na tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* na nerjavečem jeklu. Za inhibicijo rasti biofilma smo uporabili razkužilo triklosan v dveh različnih koncentracijah (MIC in $\frac{1}{2}$ MIC) in ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa* ($\frac{1}{4}$ MIC) pri dveh različnih temperaturah (8 °C in 37 °C). Ker nas je tudi zanimalo kako inhibirati že tvorjen biofilm, smo v našem poskusu analizirali tudi vpliv MIC triklosana na že tvorjen biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*. Razkužilo smo pustili učinkovati 1 minuto in 10 minut.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da za inhibicijo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* lahko uporabimo razkužilo triklosan ali ekstrakt rastline *Evodia rutaecarpa*. Inhibitorni vpliv razkužila triklosan se je pokazal tudi na že tvorjen biofilm bakterij vrste *L. monocytogenes*.

7 VIRI

- Aarnisalo K., Lunden J., Korkeala H., Wirtanen G. 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT Food Science and Technology*, 40: 1041–1048
- 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
- Bae Y. M., Baek S. Y., Lee S. Y. 2011. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 465-473
- Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H.L. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4543–4548
- Bastič M. 2006. Metode raziskovanja. Maribor, Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor: 51 str.
- 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: 46-52
- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R., 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7336-7342
- Bremer P.J., Monk I., Osborne C.M. 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64, 9: 1369–1376
- Burton E., Yakandawala N., LoVetri K., Madhyastha M. S. 2006. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 1–4
- Cerca N., Martins S., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. 2005. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *Research in Microbiology*, 156: 650–655
- 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
- Danevčič T., Mandić-Mulec I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63-64
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 114–122
- Davey M.E., O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867
- Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2950-2958
- Dongyou L. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. New York, Taylor & Francis Group: 540 str.
- Essawi T., Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 343–349
- Frank J.F., Koffi R.A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53: 550-554
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 34-40
- Guarrera P.M. 2005 Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, 76: 1–25
- Harvey J., Keenan K. P., Gilmour A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24: 380-392
- Hefford M.A., D'Aoust S., Cyr T.D., Austin J.W., Sanders G., Kheradpir E., Kalmokoff M.L. 2005. Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 3: 197–208
- Hood S. K., Zottola E.A. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, 6: 9-18
- Jeršek B. 2007. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-20

- Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.D., Sanders G., Banerjee S., Farber J.M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 725-734
- 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 izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (junij 2012)
- Kreft J.U. 2004. Biofilms promote altruism. *Microbiology*, 150: 2751-2760
- Krysinski E.P., Brown L.J., Marchisello T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 55: 246-251
- Lee S., Frank J.F. 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54: 4-6
- Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P., Dunlap P. V. 2009. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Pearson Education: 1168 str.
- Mafu A.A., Roy D., Gmdet J. attd Magny P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53: 742-746
- Mattos de Oliveira M.M., Brugnera D.F., Arantes do Nascimento J., Batista N.N., Hilsdorf Piccoli R. 2012. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology*, 234: 821-832
- Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-139
- Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 255-61
- Morton L.H.G., Greenway D.L.A., Gaylarde C.C., Surman S.B. 1998. Consideration of some implications of to biocides the resistance of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41: 247-259

- Oh S.W., Gray P.M., Dougherty R.H., Kang D.H. 2005. Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce foodborne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 56–60
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420
- Portenier I., Waltimo T., Orstavik D., Haapasalo M. 2005. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *Journal of Endodontics*, 31: 380-86
- Rodrigues L.B., Ruschel dos Santos L., Zancanaro Tagliari V., Rizzo N.N., Trenhago G., Picollo de Oliveira A., Goetzl F., Pinheiro do Nascimento V. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1082-1085
- 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
- Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 30-35
- Settanni L., Palazzolo E., Guarrassi V., Aleo A., Mammina C., Moschetti G., Germana M. A. 2012. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, 26: 326-330
- SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krme - Horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov - Tehnika štetja kolonij pri 30 °C. 2003: 9 str.
- Sorum H., L'Abée-Lund T.M. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 1/2: 43–56
- Stopar D. 2007. Priročnik iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 430 str.
- Sun D.W. 2011. Handbook of food safety engineering. Oxford, Wiley-Blackwell: 840 str.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19: 1130-1138

- Wagner M., Nielsen P.H., Loy A., Nielsen J.L., Daims H. 2006. Linking microbial community structure with function: fluorescence *in situ* hybridization microautoradiography and isotope arrays. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 83-91
- Wirtanen G., Mattila-Sandhohn T. 1992. Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests. Part I. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 25: 43-49

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Barbari Jeršek za nasvete in vodenje med eksperimentalnim delom v laboratoriju in med pisanjem diplomske naloge.

Posebna zahvala je namenjena še staršem in prijateljem za spodbudo, podporo in razumevanje časa študija.

PRILOGE

Priloga A: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)		P _{sev}
	0,1 % KV	1 % KV	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,0080 ± 0,23	-0,0036 ± 0,03	0,134
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,1801 ± 0,29	-0,0840 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	0,0884 ± 0,13	-0,0235 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,3575 ± 0,23	-0,0240 ± 0,04	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	0,5070 ± 0,23	0,0614 ± 0,04	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,5999 ± 0,44	0,2373 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,8855 ± 0,17	0,1339 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	0,9554 ± 0,46	0,0641 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,8246 ± 0,52	0,0430 ± 0,03	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,2389 ± 0,18	0,0821 ± 0,05	
P % KV	0,0001		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanč, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga B: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja z barvilom kristal violet.

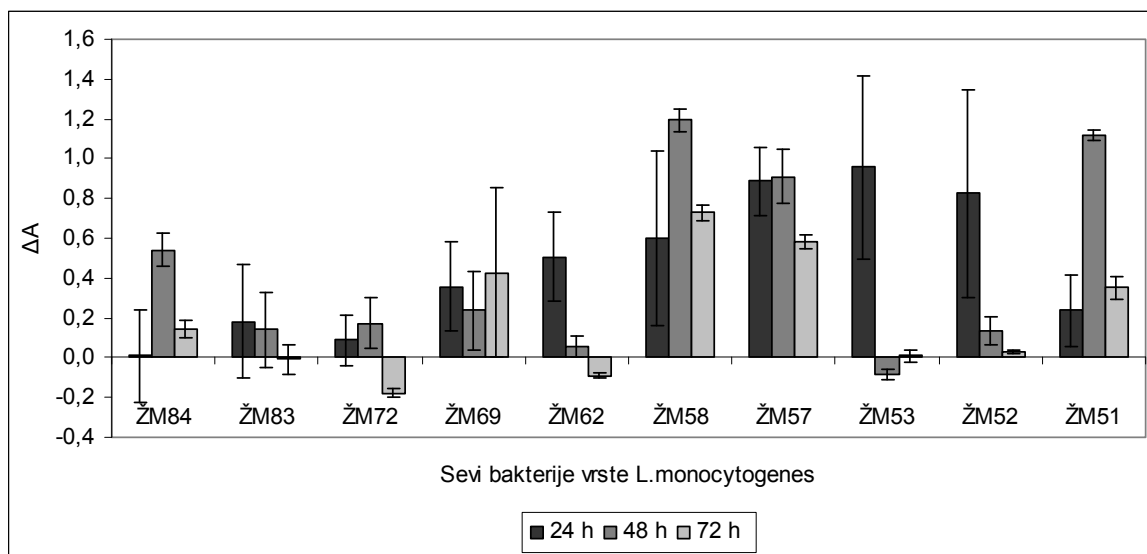
Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)		P _{sev}
	0,1 % KV	1 % KV	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,5398 ± 0,08	0,2447 ± 0,05	5,7 x 10 ⁻¹⁹
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,1425 ± 0,19	0,0178 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	0,1722 ± 0,13	0,0166 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,2367 ± 0,20	0,0064 ± 0,00	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	0,0551 ± 0,05	0,0569 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	1,1926 ± 0,06	0,4947 ± 0,07	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,9111 ± 0,13	0,4312 ± 0,07	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	-0,0822 ± 0,03	0,0840 ± 0,03	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,1353 ± 0,07	0,1551 ± 0,08	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	1,1139 ± 0,03	0,5197 ± 0,03	
P % KV	5,7 x 10 ⁻⁸		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanč, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga C: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določen z metodo barvanja s kristal violetom .

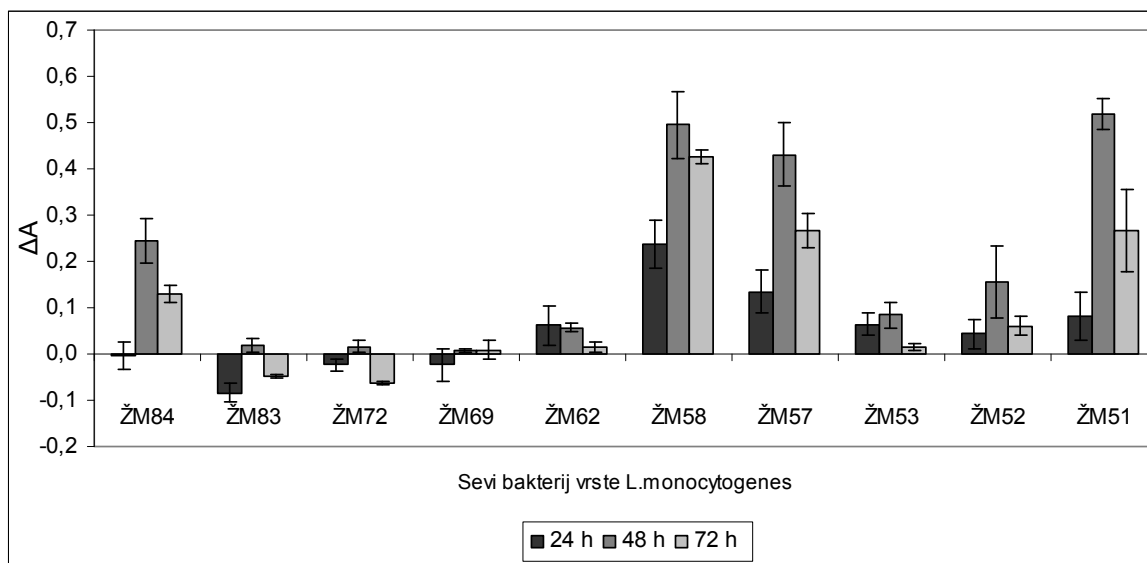
Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)		P _{sev}
	0,1 % KV	1 % KV	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,1443 ± 0,05	0,1284 ± 0,02	4,9 x 10 ⁻⁹
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	-0,0087 ± 0,07	-0,0489 ± 0,00	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	-0,1769 ± 0,02	-0,0631 ± 0,00	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,4269 ± 0,43	0,0081 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	-0,0922 ± 0,01	0,0151 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,7309 ± 0,04	0,4265 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,5841 ± 0,03	0,2672 ± 0,04	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	0,0104 ± 0,03	0,0155 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,0309 ± 0,01	0,0609 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,3502 ± 0,06	0,2672 ± 0,09	
P % KV	0,047		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanca, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.



Priloga D: Relativna količina biofilma pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določena z metodo barvanja s kristal violetom (0,1 %).

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanca, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.



Priloga E: Relativna količina biofilma pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določena z metodo barvanja s kristal violetom (1 %).

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet.

Priloga F: Vpliv meritve absorbance v originalni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Sev	ΔA ± SD (n=8)		P _{sev}
	Originalna mikrotitrerska ploščica	Nova mikrotitrerska ploščica	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,1271 ± 0,13	-0,1811 ± 0,22	0,82
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,4199 ± 0,40	-0,1962 ± 0,13	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	0,4683 ± 0,40	-0,1668 ± 0,11	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,4711 ± 0,25	-0,1292 ± 0,11	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,3898 ± 0,31	-0,0416 ± 0,16	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	0,2564 ± 0,20	-0,0934 ± 0,12	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,1759 ± 0,18	0,0114 ± 0,16	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	0,0268 ± 0,09	-0,1539 ± 0,16	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,0962 ± 0,19	0,0958 ± 0,23	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,0611 ± 0,15	0,2167 ± 0,20	
P _{mikrotitrerska ploščica}	7,5 x 10 ⁻⁶		

Legenda: ΔA: povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga G: Vpliv meritve absorbance v osnovni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)		P _{sev}
	Originalna mikrotitrerska ploščica	Nova mikrotitrerska ploščica	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,5725 ± 0,29	0,0975 ± 0,04	0,0006
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,0733 ± 0,06	0,1025 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	-0,0546 ± 0,03	0,0593 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,4744 ± 0,25	0,1015 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,6115 ± 0,31	0,1058 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	0,0207 ± 0,04	0,0709 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,1007 ± 0,15	0,0715 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	0,0787 ± 0,10	0,0527 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,0445 ± 0,13	0,0629 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,3309 ± 0,12	0,1083 ± 0,05	
P _{mikrotitrerska ploščica}	5,7 x 10 ⁻⁵		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga H: Vpliv meritve absorbance v osnovni in novi mikrotitrski ploščici na relativno količino biofilma različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* po 72-urni inkubaciji na polistirenski površini določeni z metodo barvanja z 0,1 % kristal violetom.

Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)		P _{sev}
	Originalna mikrotitrerska ploščica	Nova mikrotitrerska ploščica	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,2543 ± 0,06	0,1699 ± 0,03	7,8 x 10 ⁻⁸
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,0640 ± 0,02	0,0990 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	0,0348 ± 0,02	0,0844 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,3468 ± 0,13	0,2690 ± 0,10	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,4178 ± 0,17	0,3213 ± 0,13	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	-0,0272 ± 0,04	0,0459 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,2222 ± 0,30	0,1590 ± 0,11	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	-0,0778 ± 0,05	0,0596 ± 0,04	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,0136 ± 0,05	0,0211 ± 0,03	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,3138 ± 0,12	0,0146 ± 0,03	
P _{mikrotitrerska ploščica}	0,32		

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga I: Relativna količina biofilma na polistirenski površini pri različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* določena z barvanjem s kristal violetom.

Sev	$\Delta A \pm SD$ (n=4)			P _{sev}
	24 h	48 h	72 h	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	0,0154 ± 0,01	0,0311 ± 0,01	0,1583 ± 0,08	0,004
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	0,0151 ± 0,03	0,0112 ± 0,02	0,0970 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	-0,0188 ± 0,00	-0,0270 ± 0,01	0,0592 ± 0,03	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	0,0567 ± 0,01	0,0378 ± 0,01	0,1096 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,1796 ± 0,02	0,0304 ± 0,01	0,1048 ± 0,05	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	0,0058 ± 0,01	-0,0138 ± 0,03	0,0377 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	-0,0057 ± 0,01	-0,0354 ± 0,02	0,0175 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	-0,0347 ± 0,02	-0,0148 ± 0,00	0,0214 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM83	0,0124 ± 0,01	-0,0534 ± 0,01	0,0358 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM84	0,1143 ± 0,01	0,1219 ± 0,01	0,4832 ± 0,24	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM45	0,0442 ± 0,01	0,0325 ± 0,02	0,0231 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM97	0,0490 ± 0,01	0,1154 ± 0,01	0,0377 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM103	0,1503 ± 0,09	0,0208 ± 0,01	0,0254 ± 0,02	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM112	0,0676 ± 0,01	0,0321 ± 0,01	0,0446 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM113	0,0621 ± 0,01	0,0397 ± 0,01	0,0659 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM116	0,0606 ± 0,01	0,0449 ± 0,02	0,0833 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM198	0,0874 ± 0,03	0,1174 ± 0,01	0,0889 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM199	0,0419 ± 0,01	0,0418 ± 0,01	0,0740 ± 0,01	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM220	0,0487 ± 0,00	0,0438 ± 0,03	0,0834 ± 0,00	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM221	0,0674 ± 0,01	0,0610 ± 0,01	0,0384 ± 0,00	
P čas inkubacije	0,02			

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbcanc, ŽM: oznaka seva, KV: kristal violet, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga J: Koncentracija celic sevov bakterij vrste *L.monocytogeens* ŽM58, *L.monocytogenes* ŽM84 in *L.monocytogenes* ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu.

Sev	N ± SD	Čas (h)				P _{sev}
		1	24	48	72	
(logCFU/mL) (n=2)	BF ŽM58	5,00 ± 0,63	6,68 ± 0,04	6,28 ± 0,20	6,00 ± 0,00	0,03
	BF ŽM84	5,31 ± 0,05	6,62 ± 0,12	6,59 ± 0,11	6,51 ± 0,02	
	BF ŽM198	4,09 ± 0,07	6,09 ± 0,09	6,21 ± 0,15	6,18 ± 0,03	
P čas inkubacije		10 ⁻⁵				

Legenda: N: koncentracija celic, SD: standardni odklon, BF: biofilm, ŽM: oznaka seva, P: verjetnost.

Priloga K: Koncentracija v biofilm nevezanih celic sevov bakterij vrste *L.monocytogenes* ŽM58, *L.monocytogenes* ŽM84 in *L.monocytogenes* ŽM198.

Sev	N ± SD	Čas (h)				P _{sev}
		1	24	48	72	
(logCFU/mL) (n=2)	PC ŽM58	6,95 ± 0,02	8,72 ± 0,10	8,78 ± 0,00	8,00 ± 0,00	9 x 10 ⁻⁹
	PC ŽM84	7,42 ± 0,04	8,68 ± 0,02	8,99 ± 0,06	9,10 ± 0,01	
	PC ŽM198	7,88 ± 0,01	8,80 ± 0,01	9,19 ± 0,04	8,97 ± 0,02	
P čas inkubacije		8 x 10 ⁻¹⁴				

Legenda: N: koncentracija celic, SD: standardni odklon, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, P: verjetnost.

Priloga L: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu, ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

Koncentracija razkužila triklosan		Čas (h)			P koncentracija razkužila	P razkužilo
		1	24	48		
N ± SD (logCFU/mL) (n=4)	BF Kontrola	4,26 ± 0,42	5,69 ± 0,21	6,04 ± 0,10	0,84	0,001
	BF MIC	3,94 ± 0,14	4,32 ± 0,07	5,00 ± 0,03		
	BF 1/2 MIC	3,72 ± 0,27	4,71 ± 0,13	5,00 ± 0,07		
P čas inkubacije		2,8 x 10 ⁻⁵				

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, ½ MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga M: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

Koncentracija razkužila triklosan		Čas (h)			P koncentracija razkužila	P razkužilo
		1	24	48		
N ± SD (logCFU/mL) (n=4)	PC Kontrola	7,87 ± 0,07	9,30 ± 0,00	9,65 ± 0,24	5,6 x 10 ⁻⁶	5,6 x 10 ⁻¹⁵
	PC MIC	7,59 ± 0,03	7,57 ± 0,04	7,55 ± 0,04		
	PC 1/2 MIC	7,58 ± 0,02	7,67 ± 0,00	8,63 ± 0,00		
P čas inkubacije		10 ⁻¹⁰				

Legenda: N: koncentracija celic, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, ½ MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga N: Koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58, vezanih v biofilm na nerjavečem jeklu, ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

Koncentracija razkužila triklosan		Čas (h)			P koncentracija razkužila	P razkužilo
		1	24	48		
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	BF Kontrola	4,28 ± 0,07	5,11 ± 0,02	6,15 ± 0,03	0,19	8,6 x 10 ⁻⁶
	BF MIC	4,24 ± 0,04	4,56 ± 0,00	4,40 ± 0,00		
	BF 1/2 MIC	3,78 ± 0,02	4,93 ± 0,11	4,89 ± 0,15		
P čas inkubacije		9,7 x 10 ⁻⁷				

Legenda: N: koncentracija celic, BF: biofilm, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, ½ MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga O: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku različnih koncentracij razkužila triklosan.

Koncentracija razkužila triklosan		Čas (h)		
		1	24	48
N (logCFU/mL) (n=1)	PC Kontrola	6,67	9,10	9,32
	PC MIC	6,64	5,92	5,34
	PC 1/2 MIC	6,78	6,43	6,18

Legenda: N: koncentracija celic, PC: planktonske celice, ŽM: oznaka seva, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, ½ MIC: polovična minimalna inhibitorna koncentracija.

Priloga P: Koncentracija živih celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P _{ekstrakt}
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	6,73 ± 0,01	5,78 ± 0,01	6,17 ± 0,04	2,7 x 10 ⁻⁸
	Ekstrakt	4,23 ± 0,01	5,55 ± 0,03	5,84 ± 0,02	
P čas inkubacije		1,4 x 10 ⁻⁵			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga Q: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P _{ekstrakt}
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	5,52 ± 0,01	7,50 ± 0,00	8,66 ± 0,01	0,012
	Ekstrakt	5,12 ± 0,00	8,18 ± 0,05	8,67 ± 0,00	
P čas inkubacije		1,4 x 10 ⁻¹⁰			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga R: Koncentracija živih celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P _{ekstrakt}
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	6,57 ± 0,03	6,87 ± 0,33	6,43 ± 0,00	0,003
	Ekstrakt	5,46 ± 0,03	5,65 ± 0,24	5,24 ± 0,01	
P čas inkubacije		0,4			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga S: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P _{ekstrakt}
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	8,16 ± 0,01	8,47 ± 0,00	8,18 ± 0,04	0,07
	Ekstrakt	8,34 ± 0,04	8,29 ± 0,02	7,99 ± 0,02	
P čas inkubacije		0,0006			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga T: Koncentracija celic v biofilmu seva bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.

Temperatura inkubacije		Čas (h)			P temperatura
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Ekstrakt 8 °C	4,23 ± 0,01	5,55 ± 0,03	5,84 ± 0,02	0,22
	Ekstrakt 37 °C	5,46 ± 0,24	5,65 ± 0,39	5,24 ± 0,01	
P čas inkubacije		0,02			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga U: Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P ekstrakt
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	4,37 ± 0,10	4,66 ± 0,05	4,77 ± 0,01	0,0014
	Ekstrakt	5,15 ± 0,00	5,52 ± 0,19	4,84 ± 0,01	
P čas inkubacije		0,07			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga V: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ekstrakta ¼ MIC *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P ekstrakt
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	7,00 ± 0,00	8,70 ± 0,02	8,80 ± 0,02	7,7 x 10 ⁻⁹
	Ekstrakt	6,00 ± 0,00	7,57 ± 0,02	8,71 ± 0,01	
P čas inkubacije		8,4 x 10 ⁻¹¹			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga W: Koncentracija celic v biofilmu bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P ekstrakt
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	5,95 ± 0,10	5,48 ± 0,12	5,33 ± 0,08	0,02
	Ekstrakt	5,41 ± 0,06	5,24 ± 0,33	4,48 ± 0,00	
P čas inkubacije		0,03			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga X: Koncentracija planktonskih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 37 °C.

Koncentracija ekstrakta		Čas (h)			P ekstrakt
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Kontrola	8,39 ± 0,12	8,79 ± 0,01	7,41 ± 0,01	0,37
	Ekstrakt	8,48 ± 0,00	7,46 ± 0,03	8,82 ± 0,02	
P čas inkubacije		0,007			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga Y: Koncentracija živih celic v biofilmu seva bakterij vrste *L. monocytogenes* L4 ob dodatku ¼ MIC ekstrakta *Evodia rutaecarpa* pri 8 °C in 37 °C.

Temperatura inkubacije		Čas (h)			P temperatura
		24	48	72	
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	Ekstrakt 8 °C	5,15 ± 0,00	5,52 ± 0,19	4,84 ± 0,01	0,15
	Ekstrakt 37 °C	5,41 ± 0,06	5,24 ± 0,33	4,48 ± 0,00	
P čas inkubacije		0,0001			

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, Ekstrakt: ekstrakt *Evodia rutaecarpa*.

Priloga Z: Koncentracija živih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM198 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.

Čas izpostavitve razkužilu triklosan		Čas (h)			P čas izpostavitve razkužilu	P razkužilo
		1	24	48		
N ± SD (logCFU/mL) (n=4)	BF Kontrola	4,26 ± 0,42	5,69 ± 0,21	6,04 ± 0,10	0,21	0,0001
	BF 1 min	2,91 ± 0,25	5,35 ± 0,13	5,46 ± 0,06		
	BF 10 min	3,31 ± 0,14	5,39 ± 0,07	5,49 ± 0,03		
P čas inkubacije		6,4 x 10 ⁻¹⁵				

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 10 minut, BF Kontrola: kontrola biofilma.

Priloga AA: Koncentracija živih celic bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM 58 v biofilmu na nerjavečem jeklu po 1-minutni in 10-minutni izpostavitvi biofilma MIC razkužila triklosan.

Čas izpostavitve razkužilu triklosan		Čas (h)			P čas izpostavitve razkužilu	P razkužilo
		1	24	48		
N ± SD (logCFU/mL) (n=2)	BF Kontrola	4,28 ± 0,07	5,11 ± 0,02	6,15 ± 0,03	0,03	0,005
	BF 1 min	3,93 ± 0,43	5,16 ± 0,01	5,97 ± 0,18		
	BF 10 min	3,75 ± 0,25	4,34 ± 0,01	4,83 ± 0,01		
P čas inkubacije		7 x 10 ⁻⁵				

Legenda: N: koncentracija celic, ŽM: oznaka seva, SD: standardni odklon, P: verjetnost, BF 1 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 1 minuto, BF 10 min: biofilm po izpostavitvi MIC razkužila triklosan za 10 minut, BF Kontrola: kontrola biofilma.