raziskovalna naloga

PROTIMIKROBNI UČINKI KEFIRJA NA RAST BAKTERIJE *Staphylococcus epidermidis*

druga področja (biotehnologija, živilstvo)

Avtor/-ji: Živa JUVAN, Ana MARKIČ, Maj ZUPAN

Mentor/-ica: Tadeja POLAJNAR, univ. dipl. inž. živ. teh.

Strahinj, marec 2022

ZAHVALA

Za pomoč pri raziskovalni nalogi bi se radi zahvalili naši mentorici Tadeji Polajnar, laborantki Katji Dobnikar in naši profesorici slovenščine, ki je lektorirala raziskovalno nalogo, Mariji Jerše.

I KAZALO (VSEBINE)

ZAHVALA ... II
I KAZALO (VSEBINE) ... III
II KAZALO SLIK ... V
III KAZALO TABEL ... VI
Povzetek ... VII
Abstract ... VII
1 UVOD ... 1
2 TEORETIČNI DEL ... 2
2.1 KEFIR ... 2
2.1.1 Zgodovina ... 2
2.1.2 Proizvodnja ... 2
2.1.3 Mikrobiološka sestava kefirja ... 3
2.2 KOŽA IN AKNE ... 4
2.2.1 Zgradba kože ... 4
2.2.2 Mikrobna združba kože ... 5
2.2.3 Akne in mozolji ... 6
2.2.4 Povzročitelji aken ... 6
2.2.4.1 *Propionibacterium acnes* ... 7
2.2.4.2 *Staphylococcus epidermidis* ... 8
2.3 PROTIMIKROBNA SREDSTVA ... 8
2.4 METODE IDENTIFIKACIJE ... 9
2.4.1 Barvanje po Gramu ... 9
2.4.2 Katalazni test ... 10
2.4.3 Hemolizni test ... 10
2.4.4 Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim ... 10
2.4.5 Difuzijski antibiogram ... 10
3.1 CILJI IN HIPOTEZE ... 11
3.2 METODOLOGIJA ... 11
3.2.1 Opis vzorca raziskave ... 11
3.2.2 Priprava gojišč ... 11
3.2.2.1 PCA gojišče ... 11
3.2.2.2 Krvni agar ... 11
3.2.2.3 Selektivno in diferencialno gojišče z manitolom in fenol rdečim ... 12

3.2.3 Opis postopka zbiranja podatkov 12
3.2.3.1 Opis izolacije *Propionibacterium acnes* 13
..... 14
3.2.3.2 Barvanje po Gramu 14
3.2.3.3 Katalazni test 14
3.2.3.4 Hemolizni test 15
3.2.3.5 Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim 15
3.2.3.6 Difuzijski antibiogram 16
3.3.1 Morfološke značilnosti kolonij 17
3.3.2 Barvanje po Gramu 17
3.3.3 Katalazni test 18
3.3.4 Hemolizni test 19
3.3.5. Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim 19
3.3.6 Difuzijski antibiogram 20
3.3.7 Obrazna maska 21
4 SKLEP 22
5 VIRI IN LITERATURA 24

II KAZALO SLIK

Slika 1: Kefir 2
Slika 2: Kefirna zrna, vir: lasten 3
Slika 3: Zgradba kože, spletni vir 1 4
Slika 4: Propionibacterium acnes, spletni vir 2 7
Slika 5: Staphylococcus epidermidis, spletni vir 3 8
Slika 6: Krvni agar 12
Slika 7: Izolacija St. epidermidis 12
Slika 8: Anaerobna komora 14
Slika 9: Globoki agar 15
Slika 10: Filtrni papir za diske za antibiogram 16
Slika 11: Katalazni test 18
Slika 12: Gojišče s fermentiranim manitolom 20
Slika 13: Difuzijski antibiogram 21
Slika 14: Obrazna maska 21
Slika 15: Kefirjeva maska z belo glino 23

III KAZALO TABEL

Tabela 1: Morfološke značilnosti kolonij 17
Tabela 2: Rezultati barvanja po Gramu 17
Tabela 3: Rezultati prisotnosti katalaze v izoliranih kolonijah.....18
Tabela 4: Rezultai hemoliznega testa.....19
Tabela 5: Rezultati fermentacije manitola.....19
Tabela 6: Difuzijski antibiogram.....20

Povzetek

Kefir je starodavni mlečni napitek, pridobljen z mlečnokislinsko in alkoholno fermentacijo, saj je kultura kefirja v obliki kefirnih zrn, sestavljenih tako iz mlečnokislinskih in drugih bakterij kot iz kvasovk.
Raziskovali smo optimalno količino kefirnih zrn, potrebnih za pripravo kefirja, ki bi imela zaviralni učinek na bakterijo *Staphylococcus epidermidis*, ki smo jo, kot glavno povzročiteljico aknavosti in mozoljavosti, izolirali s kože mladostnika.
Najboljše rezultate smo dosegli pri koncentraciji šestih oziroma osmih gramov kefirnih zrn v 100 ml mleka, pri 24 urni fermentaciji, na sobni temperaturi.

Ključne besede: kefir, kefirna zrna, Staphylococcus epidermidis, fermentacija

Abstract

Kefir is an ancient lactic drink, that is obtained by lactic acid and alcoholic fermentation. Kefir grains are composed of lactic acid and other kind of bacteria.
We researched the optimal quantity of kefir grains needed for the preparation of kefir that would have an antibiotic effect on the bacteria Staphylococcus epidermidis, which is the main cause of acne. We isolated the bacteria from the skin of an adolescent.
The best results were achieved by the concentration of six and eight gram per 100 ml of milk, that was fermented for 24 on room temperature.

Key words: Kefir, kefir grains, Staphylococcus epidermidis, fermentation

1 UVOD

Kefir oz. mlečni šampanjec izvira s Kavkaza in je ena najstarejših vrst fermentiranega mleka. Danes je razširjen in poznan po vsem svetu, največ pa ga proizvedejo v Rusiji. Pridobivamo ga iz kravjega, kozjega, ovčjega ali mešanega mleka. V njem najdemo naravno prisotne mlečnokislinske bakterije in kvasovke.

Kefirju pripisujejo številne za zdravje pomembne učinke in lastnosti. Ima ugoden vpliv na črevesno mikrofloro, s tem pa tudi na krepitev imunskega sistema in je dober za kožo.

Akne so zdravstveno stanje kože, povzročeno zaradi lasnih mešičkov zamašenih z odmrlimi kožnimi celicami in z odvečnim lojem. Najpogosteje se pojavijo pri najstnikih zaradi hormonskih sprememb, vendar se lahko pojavijo tudi v drugih življenjskih obdobjih. Povzročajo jih hormonsko neravnovesje, prehrana, stres in določena zdravila. Nastanejo zaradi zamašitve lojnic, prisotnosti bakterij in različnih kožnih vnetij.

Danes ima veliko najstnikov in tudi ljudje drugih starostnih skupin težave z aknami, obstaja pa tudi mnogo načinov, kako odpraviti ″težavo″. Pomagajo nam redna nega kože, kreme, serumi, maske, posežemo pa lahko tudi po zdravilih. Večina teh sredstev vsebuje različne kemijske dodatke, zato smo se odločili, da poiščemo naravno nadomestilo. Ko smo zasledili, da je za kožo dober tudi kefir, ki je naraven in enostaven za pripravo, smo se lotili dela.

Zanimalo nas je, katera koncentracija pripravljenega kefirja je optimalna za protimikrobni učinek na rast bakterije *Staphylococcus epidermidis*, ki smo jo izolirali s kože. Omenjena bakterija je namreč pogosto povročiteljica aknavosti.

Pri poskusu smo uporabili različne tehnike izolacije in identifikacije bakterije ter metodo difuzijskega antibiograma za določanje protibakterijskega učinka, kjer pa smo se orientirali po raziskovalni nalogi z naslovom Antibiotični učinki eteričnih olj na rast patogenih kožnih bakterij vrste *Staphylococcus epidermidis*, ki so jo leta 2015 napisali Petra Kern, Aljaž Mulej in Ana Šivic pod mentorstvom Marjetke Kastelic Švab.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 KEFIR

2.1.1 Zgodovina

Med ljudstvi, ki živijo v kavkaških gorah, kroži legenda, da je kefirna zrna prvič prinesel prerok Mohamed, zato jih pogosto imenujemo tudi prerokova zrna. Mohamed naj bi jih tudi naučil, kako iz kefirnih zrn delati tradicionalen kefir (Mlekarna Krepko, 2018).

Kefir je bil dolgo strogo varovana skrivnost. Kako je sploh postal bolj znan?

Ruski imunolog dr. Ilya Ilyich Metchnikoff - leta 1908 je prejel Nobelovo nagrado za svoje delo o imunosti - se je začel zanimati za spoznavanje vzrokov izjemne dolgoživosti ljudi na Kavkazu in v drugih regijah. Prišel je do zaključka, da je kislo mleko, vključno z mlečnim kefirjem, eden od ključev do dolgoživosti in dobrega počutja. Po objavi Metchnikoffove knjige *Podaljšanje življenja* leta 1907 se je Vserusko zdravniško društvo odločilo, da bo kefir uporabljalo kot zdravilo za svoje paciente (Smith, 2020).

Slika 1: Kefir

Vir: lasten

2.1.2 Proizvodnja

Kefir so prvotno izdelovali iz ovčjega mleka, zdaj pa se za pripravo uporablja predvsem kravje mleko, najdemo pa lahko tudi kultivate iz drugih vrst mleka, nadomestkov mleka ali pa drugih tekočin, ki vsebujejo sladkor (npr. sadni sokovi in kokosova voda).

Od ostalih fermentiranih mlečnih izdelkov se kefir razlikuje po obliki starter kulture. Medtem ko v proizvodnji jogurta ali sira uporabimo starter kulturo v obliki suspenzije rastočih celic, enakomerno razporejenih po mleku, so mlečnokislinske bakterije in kvasovke za proizvodnjo kefirja v obliki zrn (NIJZ, 2019).

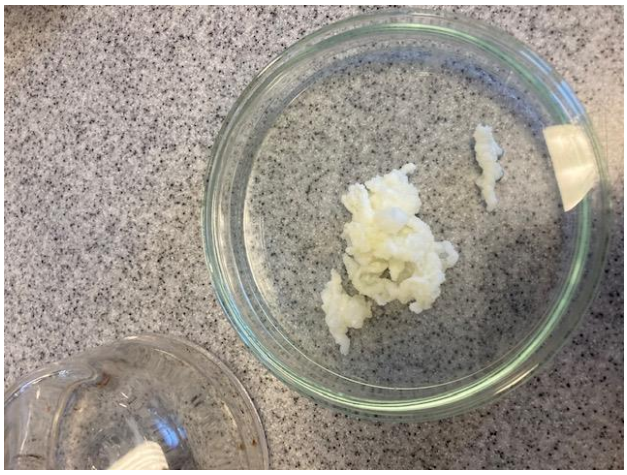
Tradicionalno so kefir pripravljali tako, da so v mleko dodali 2–10 % kefirnih zrn in mešanico shranili v zatesnjeno usnjeno torbo iz kozje kože, v kateri so jo mešali enkrat ali večkrat na dan. Danes se namesto usnjene torbe uporablja nerjaveča posoda, ki ni napolnjena do vrha. To pušča prostor za dvig gladine, ki je posledica nastajanja ogljikovega dioksida. Priporočljivo je, da je posoda odporna tudi na svetlobo, če ni, jo hranimo v temi, da preprečimo razgradnjo na svetlobo občutljivih vitaminov (NIJZ, 2019).

Fermentacija poteka na temperaturi 20–25 °C, približno 24 ur. Traja lahko tudi dlje, da produkt doseže določeno pH vrednost, željeni okus ali pa teksturo. Kefirna zrna nato odcedijo iz nastalega kefirja s plastičnim cedilom ali pa s cedilom iz drugega nerjavečega materiala in jih shranijo, za naslednjo fermentacijo (NIJZ, 2019).

Danes se za proizvodnjo kefirja po večini uporablja čiste kulture mikroorganizmov, izoliranih iz kefirnih zrn. Postopek je tako bolj enostaven, saj je kontrola prisotnih mikroorganizmov lažja. Težava pri tem načinu je najti najboljše razmerje med mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami, saj se zaradi različnih vplivov njihovo razmerje v kefirnih zrnih spreminja. Poleg tega pa je tak izdelek težko označiti kot kefir, saj nima vseh lastnosti tradicionalno izdelanega kefirja, in bi tako označen izdelek bil zavajujoč za kupce.

S tradicionalno pripravo (v mleko se doda kefirna zrna in ne mešanice mlečnokislinskih bakterij ter kvasovk) kefirja se v Evropski uniji ponaša le slovenska mlekarna Krepko (NIJZ, 2019).

2.1.3 Mikrobiološka sestava kefirja



Slika 2: Kefirna zrna, vir: lasten

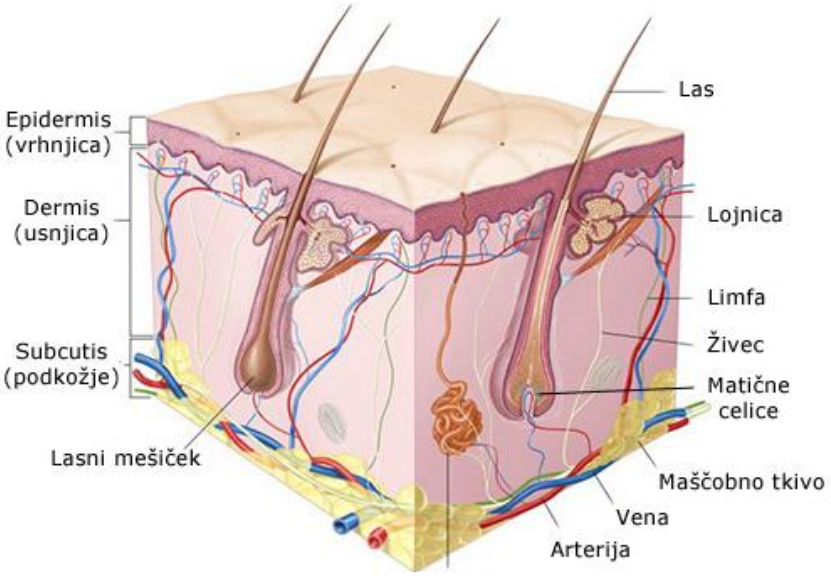
Kefirna zrna so živa kultura. So zelo kompleksna in spremenljiva simbiotska mikrobna združba kvasovk, mlečnokislinskih in ostalih bakterij v mešanici polisaharidov in beljakovin. Posamezna zrna so različnih velikosti, mehka, nepravilnih oblik in belo rumenkaste barve. Ločimo zrna za mlečni in vodni kefir, ki se razlikujejo po strukturi, barvi in obliki ter načinu uporabe (Mlekarna Krepko, 2018)

Legendo o kefirju ovija tančica skrivnosti, saj do danes ni raziskano kako so nastala kefirjeva zrna. Prizadevanja številnih znanstvenikov, da bi umetno izdelali kefirna zrna z enakimi zdravilnimi lastnostmi, kot jih imajo naravna, so bila vse do danes neuspešna.
Iz kefirjevih zrn so do zdaj izolirali veliko različnih vrst in rodov, kot so: *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Acetobacter* in mnogo vrst kvasovk. Bakterije in kvasovke se preživljajo in razmnožujejo s pomočjo medsebojnega vzpodbujanja rasti preko metabolitov, ki jim služijo kot vir energije ali rastni faktorji. Bakterije rodu *Lactococcus* in ocetnokislinske bakterije ponekod štejejo kot del normalne flore kefirnih zrn, medtem ko nekateri raziskovalci trdijo, da so onesnaževala (NIJZ, 2019).

2.2 KOŽA IN AKNE

2.2.1 Zgradba kože

Koža je največji organ na našem telesu, njena površina lahko doseže do dva kvadratna metra. Njena debelina je od 0,5 mm do 4 mm. Je kritični mejnik med človeškim telesom in zunanjim okoljem, njena glavna naloga pa je zagotavljanje pogojev za normalno izvajanje fizioloških procesov. Je večinoma suha, ima hladnejšo temperaturo od telesne in rahlo nižji pH. Je okolje,



Slika 3: Zgradba kože, spletni vir 1

v katerem se nahajajo mnoge mikrobne združbe bakterij, virusov in gliv. Mikroorganizme najdemo na površini kože, v znojnicah, lojnicah ali lasnih mešičkih (Dragaš, 2008).
Sestavljena je iz več plasti. Samo površino kože prekriva vrhnjica ali epidermis. Pod njo leži usnjica ali dermis. Nove celice vrhnjice nastajajo blizu dermisa, tam pa se delijo in pomikajo proti površini. V zgornjem delu vrhnjice odpadajo odmrle celice epidermisa, ki predstavljajo pregrado proti poškodbam in okužbam. Sama vrhnjica se obnavlja vsakih 15 do 30 dni. Nepoškodovana koža preprečuje vstop tujim snovem in bolezenskih mikrobom (Dragaš, 2008).

2.2.2 Mikrobna združba kože

Samo površino kože poseljuje normalna populacija mikroorganizmov, ki preprečuje naseljevanje patogenih mikrobov. Mikrobi živijo v združbah na površini in v notranjosti kože. Kožna mikrobna populacija je sestavljena iz koagulazno negativnih stafilokokov, difteroidov (korinebakterije), *Propionibacterium acnes, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Bacillus sp., Malassezia furfur* in saprofitnih, hitro rastočih mikrobakterij, ki pa se pojavijo le občasno. Večina teh je po Gramu pozitivnih, ki so bolj prilagojene suhim razmeram. Najdemo jih na površinskih celicah, v tesni povezavi z žlezami lojnic in znojnic, ki ležijo v usnjici. Sama koža proizvaja tudi protimikrobne snovi, ki pa naredijo neprijazno okolje za večino mikroorganizmov.
Lojnice tvorijo sebum (oljnat izvleček), ki je sestavljen iz organskih kislin in drugih maščob. Ti izvlečki so hrana za mikrobe normalne flore, predvsem za Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus* in aerobne korinebaterije. Gram negativne bakterije najdemo v vlažnih predelih telesa, kot so pazduha, dlan, ušesa, lasišče, presredek, genitalno-urinarni in analni predel, medtem ko so Gram pozitivne bakterije ljubiteljice suhih predelov kože.
Ko mikrobi opravljajo svoje delo, presnavljajo maščobe, nastaja kislo okolje, kar predstavlja nespecifično obrambo telesa proti okužbi, saj se večina mikrobov, nepatogenih in patogenih, ne more uspešno razvijati.
Žleze znojnice izločajo znoj ali pot skozi pore v koži, le ta pa znižuje pH kože in vsebuje visoko koncentracijo soli, kar predstavlja nespecifično obrambo telesa(Dragaš, 2008).

2.2.3 Akne in mozolji

Akne so bolezen pilosebacealne enote, ki je sestavljena iz dlake in lojnice. Pilosebacealne enote so razporejene po celem telesu, razen na dlaneh in podplatih, medtem ko so na obrazu, prsnem košu in vratu po devetkrat gostejše kot na drugih delih telesa .

Akne nastajajo zaradi hiperkeratinizacije oz. prekomernega poroževanja in mešanja žlez lojnic, zaradi luščenja epitelija lojnice, androgenega stimuliranja proizvodnje sebuma oz. loja, genetske podvrženosti, individualnega imunskega in vnetnega odgovora.

Akne se razvijajo v več fazah. V prvi fazi se zaradi motnje poroževanja lasni mešiček zapre, zaradi nabiranja loja pod njim pa se začnejo razmnoževati bakterije. Nastane cista (lat. acne comedonica), krajši komedon, ki se deli na odprt (ogrc) in zaprt komedon (izbočena cista, brez vidnega čepka). Drugo fazo imenujemo papula (lat. acne papulosa), komedon se vname in nastane zatrdela rdeča barva. Ko vnetje postaja močnejše, se začne nabirat gnoj in postane rumene barve. To imenujemo pustula (lat. acne papulopustulosa). Nodus, laično podkožni mozolj, je vnetje v globljih plasteh, ki je na površini viden kot vozliček rdeče barve. Če se vse skupaj začne gnojiti, govorimo o najhujši in o najbolj boleči obliki aken o nodulocistični akni (lat. acne nodulocystic). V tretji fazi se proces umiri, vendar na koži lahko pusti dolgotrajne posledice, kot so močne in globoke brazgotine (Dragaš, 2008).

Pri terapevtskem zdravljenju akne delimo v tri skupine. Blažje akne zahtevajo le lokalno terapijo, srednje akne so lahko povezane z brazgotinami in potrebujejo sistematsko terapijo, močne akne pa se zdravijo z uporabo oralnega izotretinonina (Dragaš, 2008)

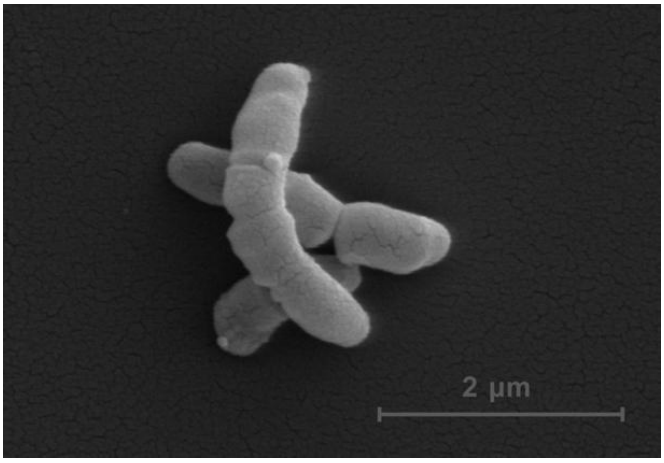
2.2.4 Povzročitelji aken

Bakteriji, ki so ju najpogosteje izolirali iz pilosebacealne enote, in jih omenjajo kot povzročitelje, sta bakteriji *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermnidis*. Prav tako ne smemo izključiti ostalih mikroorganizmov, ki sodelujejo in izkoristijo vnetno stanje. Tako npr. pri procesu sodeluje tudi *Staphylococcus aureus*, ki je oportunistični patogen, saj izkoristi vnetno stanje, ki ga je pred tem povzročila *P. acnes*. Sorodnica *P. acnes*, *P. granulosum,* pa naj bi se pojavila pri osebah z močno izraženimi aknami (Orožen Adamič, 2015).

Ker sta *P. acnes* in *S. epidermidis* največkrat omenjeni oz. prisotni pri izolaciji, smo se odločili, da ju v nadaljevanju tudi natančneje opišemo.

2.2.4.1 *Propionibacterium acnes*

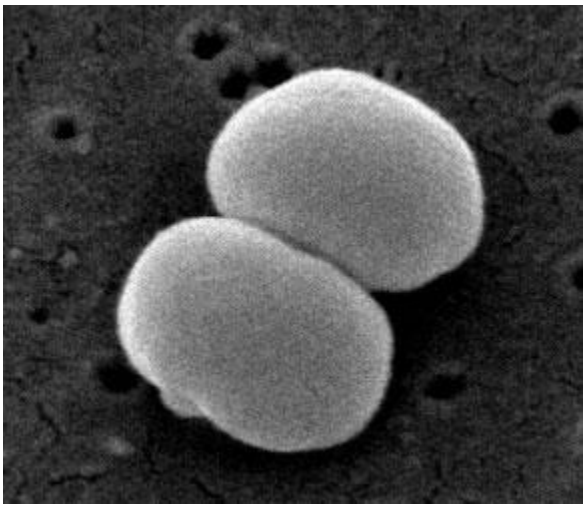
Propionske bakterije (lat. *Propionibacterium*) so rod paličastih Gram pozitivnih bakterij, ki so dobile ime po njihovem unikatnem metabolizmu, saj lahko sintetizirajo propionsko kislino. Predstavniki rodu so primarno fakultativni paraziti na človeku in živalih, ki živijo v in okoli pilosebacealnih enot, žlezah znojnicah in ostalih delih kože. *P. acnes* je anaerobna bakterija. Celice so lahko kokoidne, razvejane ali filamentne z dolžino do 20 µm. Pojavijo se posamično, v parih ali v kratkih verigah, v V ali Y konfiguraciji ali v skupkih. *P. acnes* lahko nekaj ur tolerira kisik, vendar je za rast in izolacijo potrebno anaerobno okolje. V anaerobnih razmerah preživi do osem mesecev in vitro, dolgo periodo časa pa preživi tudi v človeškem tkivu z nizkim oksidativnim potencialom. Optimalna temperatura za rast kolonij, ki so lahko bele, roza, sive, rdeče, rumene ali oranžne barve, je 37 °C. Oblika kolonij je okrogla, konkavna in svetlikajoča ali manjša, ploščata in suha.
Prisotnost bakterije na koži se razlikuje od osebe do osebe in lahko doseže število večje od 106 bakterij/cm^2 (Orožen Adamič, 2015)



Slika 4: Propionibacterium acnes, spletni vir 2

Vloga *Propionibacterium acnes* na koži telesa še ni dovolj raziskana. Na eni strani jo obravnavajo kot povzročiteljico aken, saj ji anaerobne razmere ustrezajo, hkrati pa naj bi proizvajala imunostimulantne snovi. Po drugi strani pa nekateri znanstveniki menijo, da je dominanca *P. acnes* v pilosebacealnih enotah le stranski učinek vnetja, ne pa vzrok zanj. Preiskuje se tudi možnost, da le nekateri sevi *P. acnes* povzročijo akne, medtem ko drugi sevi prebivajo le na zdravi koži. *P. acnes* so pripisovali nizko patogenost, vendar je bila v zadnjem času, poleg aken, opisana in vključena v številne klinične primere: vnetje prostate, sarkoidozo, infekcije prsnih vsadkov, očesnih vsadkov, sklepne protetike in SAPHO (Sinovitis, Akne, Pustuloza, Hiperostoza in Osteitis), kompleksno vnetje, ki zajame kožo, kosti in sklepe (Orožen Adamič, 2015).

2.2.4.2 *Staphylococcus epidermidis*



Slika 5: Staphylococcus epidermidis, spletni vir 3

Stafilokoki (lat. *Staphylococcus*) so rod Gram pozitivnih, aerobnih ali fakultativno anaerobnih kokov. Nekatere izmed njih lahko povzročajo gnojna vnetja, sepse, okužbe s hrano ipd. Večina vrst je nenevarnih za človeka in so del normalne bakterijske flore na koži in sluznici. *S. epidermidis* je koagulaza negativen stafilokok, nesporogen. Celice so v obliki kokov velikih do 1 µm, ki se pojavljajo v parih ali pa posamično. Kolonije so sive, sivo bele, gladke, dvignjene, svetlikajoče. Je fakultativni anaerob, najbolje pa raste v aerobnih razmerah. Rast je dobra pri koncentracijah NaCl do 7,5 % in pri temperaturi 37 °C. Habitat je koža in sluzne membrane človeka in ostalih sesalcev, predvsem hišnih ljubljenčkov. Kolonizira predvsem pazduho, glavo in nosnice. Je najpogosteje izoliran stafilokok in bakterijska vrsta iz človeškega epitelija. Kolonizira lahko različne medicinske pripomočke (predvsem katetre), povzroča pooperacijske infekcije, infekcije urinalnega trakta, infekcijo ran, pa tudi infekcije oči, ušes, nosa in grla (Orožen Adamič, 2015).

2.3 PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Antibiotiki so protimikrobna sredtva, ki delujejo na bakterije tako, da jih ubijejo ali pa zaustavijo njihovo rast.

Glede na to, kako učinkujejo na bakterije, jih delimo na baktericidne in bakteriostatične. Baktericidni antibiotiki mikroorganizem poškodujejo tako, da se ni več zmožen razmnoževati, medtem ko bakteriostatični razmnoževanje samo zaustavijo.

Poznanih je veliko število vrst antibiotikov, ki imajo različno kemijsko zgradbo in spekter delovanja. Razdeljeni so po načinu delovanja na mikrobno celico. Ločimo zaviralce sinteze

celične stene, zaviralce sestavljanja beljakovin v celici, zaviralce sinteze citoplazemske membrane in zaviralce sinteze nukleinskih kislin.

Po načinu delovanja antibiotike ločimo:

- zaviralce sinteze celične stene (betalaktami, glikopeptidi, bacitracin),
- zaviralce sinteze celične membrane, ki porušijo strukturo ali pa zavirajo delovanje celične membrane. Delovanje teh antibiotikov uničuje membrane bakterijskih (prokariontskih) in evkariontskih celic, zato moramo take antibiotike uporabljati le lokalno.
- Zaviralce sinteze beljakovin (linkozamidi, makrolidi, kloramfenikoli, tetraciklini).
- Zaviralce sinteze nukleinskih kislin, ki vplivajo na sintezo DNA in RNA, ali pa se antibiotiki vežejo na nukleinske kisline ter s tem preprečijo branje »sporočila«, to pa ustavi rast celic. Glavnina teh učinkovin je neselektivna (inhibirajo prokariontske in evkariontske celice), obstajajo pa tudi taki, ki delujejo specifično. Le-te je mogoče uporabiti v terapevtske namene. Mednje sodijo kinoloni in rifamicini.

  Posebna vrsta antibiotikov so betalaktamski antibiotiki. V to skupno prištevamo vse antibiotike, ki imajo v molekuli betalaktamski obroč. Najbolj znan predstavnik te skupine je penicilin. Betalaktamski antibiotiki delujejo baktericidno. Njihov antibakterijski spekter je različen, prav tako pa imajo razmeroma malo stranskih učinkov (Marolt – Gomišček, 1992).

2.4 METODE IDENTIFIKACIJE

2.4.1 Barvanje po Gramu

Za identifikacijo bakterij se pogosto uporablja metodo barvanja po Gramu, kar nam omogoča lažjo identifikacijo mikroorganizmov pod mikroskopom. S to metodo lahko ugotavljamo zgradbo celične stene, saj se glede na sestavo različno obarva. Ločimo po Gramu negativne bakterije, ki se po fiksaciji na objektnem steklu in izpeljanem postopku barvanja obarvajo rdeče-rožnato in po Gramu pozitivne bakterije, ki se obarvajo vijolično. Gram pozitivne bakterije imajo debelo celično steno z veliko peptidoglikana, zato na svojo celično steno vežejo veliko metil-vijoličnega barvila skupaj z Lugolovo raztopino (raztopina joda in kalijevega jodida) in se obarvajo vijolično. Celično steno Gram negativnih bakterij pa sestavljajo tanjše plasti peptidoglikana in se zato le-te obarvajo svetleje, torej rdeče-rožnato (Orožen Adamič, 2015).

2.4.2 Katalazni test

S katalaznim testom dokazujemo prisotnost encima katalaze, ki razgrajuje vodikov peroksid na celici neškodljive molekule vode in kisika. Katalazni test se tako lahko uporablja kot identifikacijska metoda, pri določanju vrst bakterij po vrsti njihovega metabolizma.
Celoten postopek poteka tako, da na objektno stekelce nanesemo kapljico 3-% vodikovega peroksida. S cepilno zanko nato v kapljico vnesemo nekaj bakterijske kulture. Reakcija poteče takoj. Če bakterija tvori encim katalazo, le-ta razgradi vodikov peroksid do vode in kisika. Reakcija je vidna kot nastajanje mehurčkov na površini kapljice vodikovega peroksida (Bajt, 2013).

2.4.3 Hemolizni test

Nekatere bakterije producirajo ekstracelularne hemolizine, ki lizirajo živalske eritrocite. Ločimo tri tipe hemolize: **alfa, beta, gama**. Pri Alfa hemolizi, nepopolnem uničenjem eritrocitov, opazimo zelenkasto rjavo območje okrog kolonij, pri Beta hemolizi, popolni lizi eritrocitov, pa to opazimo kot območje zbistritve okrog kolonij. Če se eritrociti sploh ne razgradijo, to označimo kot Gama hemolizo (Bajt, 2013).

2.4.4 Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim

Gojišče z manitolom, soljo in fenol rdečim se v mikrobiologiji pogosto uporablja kot diferencialno in selektivno gojišče. Spodbuja rast nekaterih skupin bakterij in zavira rast drugih. Vsebuje veliko koncentracijo (7.5 – 10%) soli (NaCl), kar povzroči zastoj rasti večine mikroorganizmov, spodbuja pa rast nekaterih bakterij iz rodu *Staphylococcus*.
Je tudi selektivno gojišče za stafilokoke, ki fermentirajo manitol v kislino in s tem povzročijo spremembo barve gojišča v rumeno, kar velja za *Staphylococcus aureus*, ne pa za *Staphylococcus epidermidis*. (https://en.wikipedia.org/wiki/Mannitol_salt_agar, 2022)

2.4.5 Difuzijski antibiogram

Difuzijski antibiogram je metoda, s katero ugotavljamo odpornost bakterij na antibiotike in kemoterapevtike, ali ugotavljamo učinkovitost antibiotikov in kemoterapevtikov pri zaviranju rasti bakterij. Pri tej metodi na gojišče najprej nanesemo čisto izolirano kulturo po celotni površini gojišča, da dosežemo konfluentno rast bakterij, nato pa nanj položimo še diske, prepojene z antibiotičnimi učinkovinami. Po inkubaciji plošč opazujemo in merimo inhibicijske cone (območja okoli diskov, ki niso porasla z bakterijami), in s tem ugotavljamo učinkovitost antibiotičnih učinkovin na diskih na izbrano vrsto bakterije (Bajt, 2013).

3 RAZISKOVALNI DEL

3.1 CILJI IN HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo si postavili naslednji hipotezi in cilj.

Hipotezi:

- S kože lahko uspešno izoliramo bakterijo *Staphylococcus epidermidis*
- Na izolirano bakterijo ima kefir protimikrobni učinek

Cilj:

- Izdelati obrazno masko iz kefirja, ki bo imela protimikrobni učinek na povzročitelja mozoljavosti.

3.2 METODOLOGIJA

3.2.1 Opis vzorca raziskave

Za analizo smo uporabili kefirna zrna, ki smo jih dobili na BC Naklo. Pripravili smo tri različne koncentracije kefirja in sicer 4, 6 in 8 g/ 100 ml mleka. Kefir smo pri sobni temperaturi fermentirali 24 ur.

3.2.2 Priprava gojišč

3.2.2.1 PCA gojišče

Natehtali smo 5.8 g PCA gojišča (Tryptic Glucose Yeast Agar ali Plate Count Agar- PCA), ki sestoji iz triptona, kvasnega ekstrakta, glukoze in agarja ter se uporablja za ugotavljanje skupnega števila MO pri 22–37 °C in ga zamešali v 250 ml hladne destilirane vode. V vodni kopeli smo nato gojišče segrevali do popolne raztopitve delcev in ga dali za 15 minut v avtoklav na 121°C, da se je gojišče steriliziralo. Pred vsako uporabo smo gojišče segreli do tekočega.

3.2.2.2 Krvni agar

Že v naprej pripravljenemu in steriliziranemu osnovnemu PCA gojišču smo sterilno dodali 5% ovčje krvi. Gojišče smo mešali toliko časa, da se je popolnoma raztopilo in pri tem pazili, da nismo presegli temperature koagulacije.

Slika 6: Krvni agar

Vir: lasten

3.2.2.3 Selektivno in diferencialno gojišče z manitolom in fenol rdečim

V erlenmajerico smo natehtali 2.5 g manitola, 6.1 g PCA gojišča in 18.75 g soli (NaCl), nato smo vse skupaj zalili z 250 ml destilirane vode. Potem smo na magnetnem mešalu gojišče pustili vreti 15 minut, da se je zbistrilo ter dali v avtoklav, da smo ga sterilizirali. Gojišče smo potem aseptično vlili v sterilne epruvete, v katere smo vcepili bakterije vzorcev.

3.2.3 Opis postopka zbiranja podatkov

S sterilno vatirano palčko smo odvzeli vzorec iz sveže stisnjenega mozolja. Ta vzorec smo nato aseptično nanesli na sterilno PCA gojišče, ki smo ga razlili po petrijevkah in ga inkubirali pri 37°C 24 – 48 ur. Dobili smo mešano kulturo bakterij.

Slika 7: Izolacija St. epidermidis

Vir: lasten

Naslednji postopek na poti do izolacije in identifikacije bakterij je bila izolacija čistih kultur. Z izolacijsko tehniko enojnega in dvojnega cik-caka smo izolirali 4 morfološko različne vzorce kolonij, ki smo jih za nadaljnje lažje označevanje oštevilčili s številkami od 1 do 4.

Tudi za izolacijo čistih kultur smo uporabili PCA gojišče razlito na sterilne petrijevke.

Vsak vzorec smo za identifikacijo razdelili na dve paralelki in jih inkubirali pri temperature 37 °C v časovnem okvirju 48 ur.

Dobljene kolonije smo nadaljno identificirali z različnimi metodami in tehnikami.

3.2.3.1 Opis izolacije *Propionibacterium acnes*

Odvzete vzorce brisa smo tako nacepili na PCA gojišče in krvni agar in jih inkubirali v **anaerobni komori**, saj smo v literaturi zasledili, da iskana bakterija raste v anaerobnem okolju. Nadaljnja analiza kolonij z gojišča je pokazala, da nam omenjene bakterije ni uspelo izolirati, saj nobena bakterija ni imela paličaste oblike, značilne za Propionibacterium acnes. Postopek izolacije smo nekajkrat ponovili, tudi z nacepitvijo vzorca na gojišče na Petrifilmu, ki prav tako ni prinesel pričakovanih rezultatov.

Slika 8: Anaerobna komora

Vir: lasten

3.2.3.2 Barvanje po Gramu

Najprej smo z ezo zajeli kolonijo bakterij in jo razmazali po površini objektnega stekelca, na katerega smo še prej kanili kapljico destilirane vode. Preparat smo fiksirali nad plamenom gorilnika. Sledilo je barvanje. Najprej smo preparat prelili z raztopino metil-vijoličnega in počakali 2 minuti in ga sprali z destilirano vodo. Nato smo nanesli Lugolovo raztopino, minuto počakali in ponovno sprali z destilirano vodo. Sledilo je razbarvanje vzorca z etanolom (30 sekund) in prelivanje z raztopino rdečega fuksina za 30 sekund. Po končanem barvanju smo preparate sprali z vodo, posušili na zraku in mikroskopirali.

3.2.3.3 Katalazni test

S tem testom smo iskali pozitivno reakcijo razgradnje peroksida na vodo in kisik, saj je iskana vrsta Staphylococcus epidermidis katalazno aktivna.
Na objektno steklo smo najprej nanesli kapljico 3-% vodikovega peroksida in mu dodali nekaj bakterijske kulture. Opazovali smo nastajanje mehurčkov na površini kapljice.
Postopek smo ponovili za vsako od štirih izoliranih kolonij.

3.2.3.4 Hemolizni test

Ker s preprostimi identifikacijskimi tehnikami ni bilo mogoče identificirati vrste bakterij v vzorcih, smo se lotili identifikacije s pomočjo diferencialnih gojišč. Prvo tako gojišče je bil krvni agar, ki je diferencialno obogateno gojišče, na katerem določamo stopnjo hemolize pri kulturah bakterij.

Najprej smo za izvedbo hemoliznega testa potrebovali gojišče krvni agar. Za pripravo smo uporabili defibrinogenizirano ovčjo kri, ki smo jo dodali PCA gojišču za določanje skupnega števila mikroorganizmov.

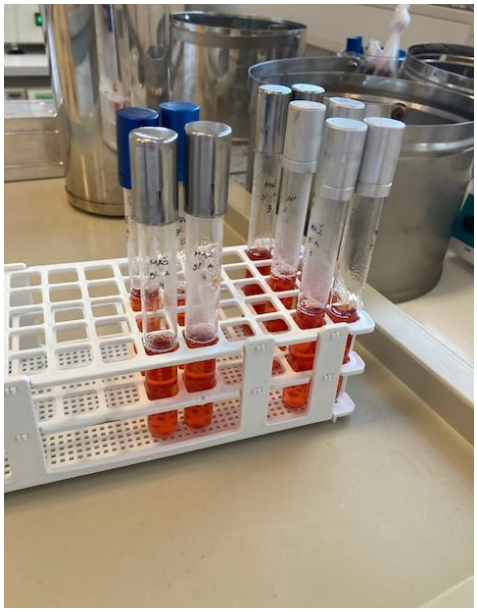
Na sterilne petrijevke s krvnim agarjem smo torej z ezo nacepili vse štiri vzorce izoliranih čistih kultur bakterij v treh paralelkah, dovolj redko, da smo lažje razbrali rezultate hemolize. Plošče smo nato inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo opazovali cone lize okrog kolonij.

3.2.3.5 Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim

Za nadaljnjo identifikacijo vrste *Staphylococcus epidermidis* smo izbrali in sestavili gojišče, ki nam bo pomagalo določiti vrsto bakterij v vzorcih. Za vrsto *Staphylococcus epidermidis* je značilno, da na selektivnem diferencialnem gojišču z manitolom in fenol rdečim ne fermentira manitol do kisline, kar ne povzroči razbarvanja fenol rdečega v rumeno.

Najprej smo pripravili gojišče z manitolom, soljo in indikatorjem fenol – rdečim.

Ko je bilo gojišče ohlajeno in pripravljeno na vcepitev bakterij, smo v sterilnih pogojih nadaljevali svoje delo.



Slika 9: Globoki agar

Vir: lasten

Z ezo smo iz vzorcev čistih izoliranih kultur zajeli kolonije in jih aseptično vcepili v agarne epruvete. Za objektivnejše rezultate smo za vsak vzorec vcepili vsaj dve paralelki epruvet. Plošče smo predhodno označili in jih po nacepitvi bakterij inkubirali 24–48 ur pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo opazovali spremembo barve indikatorja v gojišču in tako ugotavljali, ali bakterije fermentirajo manitol do kisline ali ne.

3.2.3.6 Difuzijski antibiogram

Preden smo se lotili difuzijskih antibiogramov smo naredili predpoizkus antibiograma, in sicer smo namesto diskov uporabili sama kefirna zrna. Na agarne plošče smo nanesli raztopino našega vzorca in fiziološke raztopine in jo s hokejko enakomerno razmazali. Nato smo v sredino vsake petrijevke postavili po eno zrno in petrijevke potsavili v inkubator na 37°C za 48 ur. Po inkubaciji so se pojavile opazne inkubacijske cone, zato smo nadaljevali še z difuzijskim amtibiogramom z diski.

Ker za izvedbo difuzijskega antibiograma nismo uporabili standardnih antibiotičnih diskov z znanimi koncentracijami antibiotikov, smo sami izdelali diske in jih prepojili s kefirjem različnih koncentracij (4 g, 6 g in 8 g / 100 ml), katerih antibiotični učinek smo želeli raziskovati.

V epruvete s po 9ml fiziološke raztopine smo z ezo aseptično dodali čisto kulturo izolirane bakterije *Staphylococcus epidermidis* in epruvete pretresli na stresalniku. Nato smo iz epruvet na agarne plošče odpipetirali 0.5 ml raztopine, tako smo zagotovili enakomerno razporeditev bakterij po celotni površini gojišča t. j. konfluentno rast. Nato smo na agarne plošče nanesli po en disk prepojen s kefirjem. Plošče smo nato inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C, nato pa opazovali rast bakterij ter antibiotične učinke kefirja glede na velikost inhibicijskih con. Za vsako koncentracijo kefirja smo izvedli dve paralelki.

Slika 10: Filtrni papir za diske za antibiogram

Vir: lasten

3.3 REZULTATI IN INTERPRETACIJA

3.3.1 Morfološke značilnosti kolonij

Izolirali smo štiri morfološko različne kolonije bakterij.

Tabela 1: Morfološke značilnosti kolonij

Morfološka značilnost	Kolonija št. 1	Kolonija št. 2	Kolonija št. 3	Kolonija št. 4
Velikost	večje	majhne	večje	večje
Oblika	okrogla	okrogla	okrogla	okrogla
Barva	snežno bela	bež	snežno bela	bež
Robovi	raven	raven	raven	raven
Konsistenca	kompaktna	kompaktna	kompaktna	kompaktna
Profil	privzdignjen	privzdignjen	privzdignjen	privzdignjen
Prosojnost	neprosojne	neprosojne	neprosojne	neprosojne

Kolonije so različne le po velikosti in barvi. Kolonije smo označevali po principu kolonija št. 1, vzorec 1 (V1) …

3.3.2 Barvanje po Gramu

Za lažjo identifikacijo z mikroskopiranjem smo uporabili metodo barvanja po Gramu.

Tabela 2: Rezultati barvanja po Gramu

Vzorec bakterij	V1	V2	V3	V4
Rezultat barvanja po Gramu	Gram pozitivni stafilokoki	Gram pozitivni stafilokoki	Gram pozitivni stafilokoki	Gram pozitivni stafilokoki

Ko smo si preparate ogledali pod mikroskopom smo ugotovili, da prav vsi preparati vsebujejo koke. Koki so bili povezani v grozde, zato smo lahko sklepali, da gre za stafilokoke.

3.3.3 Katalazni test

Po mikroskopiranju smo naredili tudi test prisotnosti encima katalaze.

Tabela 3: Rezultati prisotnosti katalaze v izoliranih kolonijah

Vzorec bakterij	V1	V2	V3	V4
Rezultati katalaznega testa	pozitiven	pozitiven	pozitiven	pozitiven

Tudi po katalaznem testu nismo mogli dokončno identificirati prave vrste bakterije, saj je bil rezultat testa pri vseh pozitiven.

Slika 11: Katalazni test

Vir: lasten

3.3.4 Hemolizni test

Popolna identifikacija bakterije še ni bila mogoča, zato smo opravili hemolizni test.

Tabela 4: Rezultai hemoliznega testa

Vzorec	V1	V2	V3	V4
Rezultati hemolize	γ hemoliza	γ hemoliza	γ hemoliza	γ hemoliza

Rezultati hemoliznega testa so pokazali, da se barva gojišča okoli kultur ni spremenila. Sklepamo, da gre za Gama hemolizo. Tako s hemoliznim testom nismo mogli izločiti še nobenega vzorca.

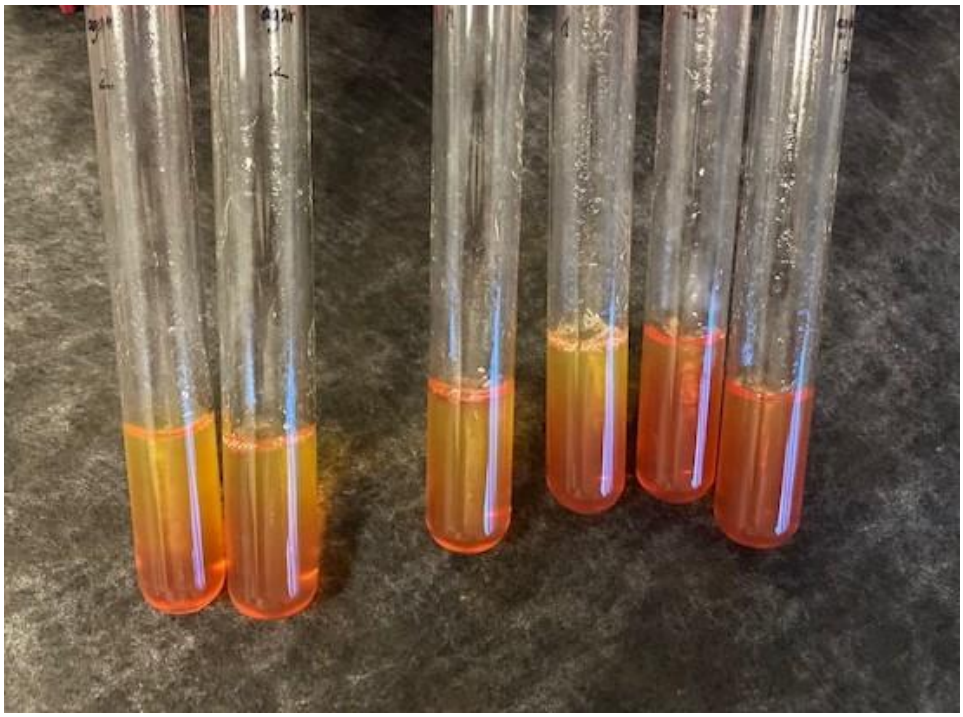
3.3.5. Selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim

Vsi dobljeni rezltati so kazali na prisotnost rodu Staphylococcus, ker pa nas je posebej zanimala prisotnost *Staphylococcus epidermidisa*, smo vzorce kolonij še vcepili v selektivno gojišče z manitolom in fenol rdečim.

Tabela 5: Rezultati fermentacije manitola

Vzorec	V1	V2	V3	V4
Sprememba barve gojišča	sprememba na rumeno	brez sprememb	sprememba na rumeno	brez sprememb

Ker iskana kultura *Staphylococcus epidermidis* ne fermentira manitola in tako ne povzroča nastanka kisline, se barva indikatorja v gojišču ne spremeni in gojišče ostane rdeče. Torej smo s testom ugotovili, da je iskana vrsta bakterije *Staphylococcus epidermidis* v kolonijah označenih z 2 in 4.



Slika 12: Gojišče s fermentiranim manitolom

Vir: lasten

3.3.6 Difuzijski antibiogram

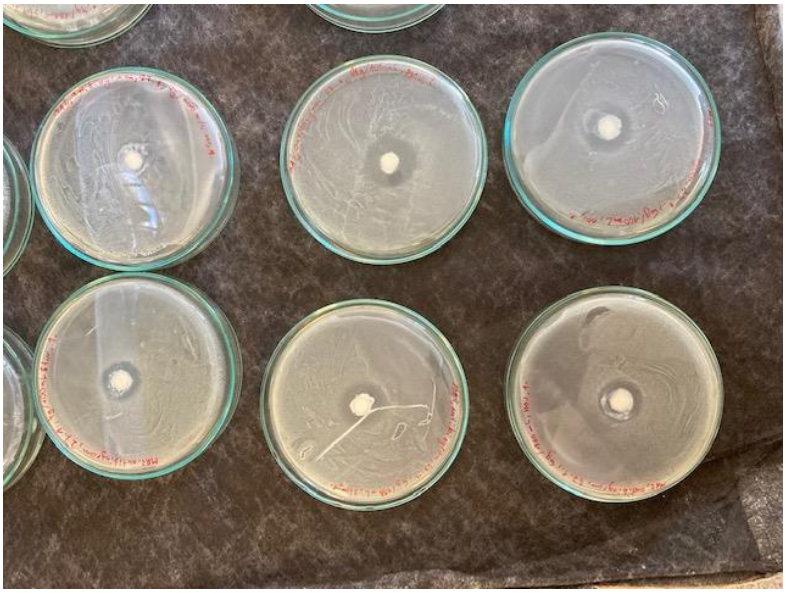
Po identifikaciji smo za preverjanje protimikrobnih učinkov kefirja naredili še difuzijske antibiograme.

Tabela 6: Difuzijski antibiogram

Koncentracija kefirja	Velikost inhibicijske cone (mm)		Povprečje (mm)
4 g/100 ml	19	17	18
6 g/100 ml	25	23	24
8 g/100 ml	24	24	24

Odstopanja v velikosti inhibicijskih con so bila za posamezne koncentracije minimalna. Najbolj antibiotično učinkoviti koncentraciji sta bili 6 in 8 g/100 ml. Opazimo lahko tudi, da se velikosti

inhibicijskih con za 6 g/100 ml in 8 g/100 ml mleka ne razlikujejo, torej višja koncentrcija ne pomeni večjega protimikrobnega učinka.



Slika 13: Difuzijski antibiogram

Vir: lasten

3.3.7 Obrazna maska

Zaradi dobrih rezultatov pri difuzijskem antibiogramu smo se lotili izdelave obrazne maske. To smo naredili tako, da smo v 11 g kefirja koncentracije 6 g zrn/100 ml mleka dodali 1 g bele gline, ki smo jo kupili v spletni trgovini Tovarne Organika. Vsebino smo enakomerno zmešali, da smo dobili homogeno zmes.

Slika 14: Obrazna maska

Vir: lasten

4 SKLEP

S pomočjo tehnike izolacije in identifikacije smo določili kulturo za katero so značilne morfološke lastnosti, ki bi jih lahko pripisali *Staphylococcus epidermidis*.

Nadaljne raziskave so potrdile naše domneve, saj smo določili, da je izolirana bakterija Gram pozitiven kok, ki se združuje v obliko grozda, je katalazno pozitiven, vrši hemolizo in fermentira manitol.

Na ta način smo potrdili prvo hipotezo, saj smo s kože uspešno izolirali *Staphylococcus epidermidis*. Drugo hipotezo, ki trdi, da ima kefir na izolirano bakterijo protimikrobni učinek, smo potrdili z nadaljnimi testi difuzijskega antibiograma. Najbolj optimalni zaviralni učinek se je pokazal pri koncentracijah 6 in 8 g kefirnih zrn na 100 ml mleka.

Za zaključek smo izdelali tudi obrazno masko in tako dosegli cilj raziskovalne naloge.

Ob koncu naj povzamemo, da smo zadovoljni z opravljenim raziskovalnim delom, saj smo razvili izdelek, ki je naraven, brez dodanih kemikalji, pa vendar dovolj učinkovit, da bo lahko pomagal mladostnikom, kot smo tudi sami, v prizadevanju za čistejšo kožo s preprečevanjem nastajanja aken in mozoljev.

Ko smo začeli razmišljati v katero smer bi raziskovali in se na koncu odločili za kefir, se še zdaleč nismo zavedali, da je to tako obsežna tema. Pojavila so se nam številna vprašanja na katera bi želeli v prihodnosti odgovoriti. Zanima nas v kakšnih koncentracijah priprave je obrazna maska najbolj učinkovita. Nadalje bi želeli izdelati deklaracijo za pripravljeno masko in določiti rok uporabe. Tudi izolacija bakterije Propionibacterium acnes nam še vedno predstavlja izziv. Glede na kompleksnost kefirnih zrn bi bilo vsekakor potrebno raziskati njihovo mikrobiološko strukturo. Te in še druge teme bomo mogoče raziskovali sami ali pa prihodnje

generacije srednješolcev. Zase lahko zaključimo, da smo pri raziskovalnem delu pridobili mnoge tako teoretične kot praktične izkušnje, ki nam bodo koristile tudi pri nadaljnem študiju.

Slika 15: Kefirjeva maska z belo glino

Vir: lasten

5 VIRI IN LITERATURA

Akne. 12. september 2020. Dostopno na: https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/acne/symptoms-causes/syc-20368047 (februar, 2022)

Antibiotiki. Lek. 2020. Dostopno na: https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/okuzbe/antibiotiki/ (februar, 2022)

N. Bajt. Mikrobiološke preiskave. Učbenik za modul Živilska mikrobiologija z biotehnologijo (vsebinski sklop Živilska mikrobiologija) za izobraževalna programa Živilsko-prehranski tehnik SSI in PTI. Ljubljana. DZS. 2013. (marec, 2022)

A. Z. Dragaš. Mikrobiologija z epidemiologijo. Ljubljana. DZS. 2008. (marec, 2022)

Kefir. Mlekarna Krepko. Dostopno na: https://www.mlekarna-krepko.si/sl/blog/kefir/ (marec, 2022)

Kefir. NIJZ. 22. Januar 2019. Dostopno na: https://www.nijz.si/sl/kefir (februar, 2022)

M. Marlot. Gomišek. Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi. 1. Izdaja. Ljubljana. Medicinski zgledi. 2002. (marec, 2022)

A. Orožen. Adamič, K. Sernec. Mikrobiologija. Učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike. Ljubljana. DZS. 2015. (februar, 2022)

S. S. The fascinating history of milk kefir. 16. September 2020. Dostopno na: https://www.rawmilkinstitute.org/updates/the-fascinating-history-of-milk-kefir (marec, 2022)

P. Starpek. Mikrobiologija in epidemiologija. Priročnik za vaje. Ljubljana. Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo. 2010. (marec, 2022)

V. Vilčnik. Akne in mozolji-neljubi spremljevalci. ABC zdravja. 13. December 2017. Dostopno na: https://www.abczdravja.si/dermatologija-koža-lasje-nohti/akne-in-mozolji-neljubi-spremljevalci/ (marec, 2022)

A. Mulej, P. Kern, A. Šivic. Antibiotični učinki eteričnih olj na rast patogenih kožnih bakterij *Staphylococcus epidermidis*. Krka d.d. Novo mesto. 2015. (marec, 2022)

Spletni vir 1: https://www.naravni-koticek.si/blog/zgradba-in-funkcija-koze/ (13. 3. 2022)

Spletni vir 2: http://outbreaknewstoday.com/propionibacterium-acnes-disease-protective-properties-swedish-researchers-14127/ 13. 3. 2022)

Spleti vir 3: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Staphylococcus_epidermidis (13. 3. 2022)

Spletni vir 4: https://en.wikipedia.org/wiki/Mannitol_salt_agar (13.3.2022)