

Универзитет "Св. Кирил и Методиј"
Природно - математички факултет

1000 Скопје, Република Македонија
Архимедова бр.3 П.Ф.162
www.pmf.ukim.edu.mk



"Ss.Cyril and Methodius" University
Faculty of Natural Sciences and Mathematics

1000 Skopje, Republic of Macedonia
Arhimedova no.3 P.O. Box 162
www.pmf.ukim.edu.mk

Бр. 03-985/3
Дата 18-05-2017

ДО
Друштво за производство и трговија на големо и мало РОЗА
КАНИНА ДООЕЛ
Петковски Томе увоз извоз РЕСЕН
ул. Никола Карев бр. 55
РЕСЕН

ПРЕДМЕТ: Доставување на резултати

Врз основа на Ваше барање од 02.05.2017 год, во прилог Ви доставуваме резултати од извршена микробиолошка анализа на Преспанска горчица 250 мл.

Со почит,

ДЕКАН,

Проф. д-р Ицко Ѓорѓоски





Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје
Природно-математички факултет
Институт за Биологија
- Катедра по микробиологија и микробна биотехнологија -

ИЗВЕШТАЈ

ОД СПРОВЕДЕНА МИКРОБИОЛОШКА
АНАЛИЗА ЗА УТВРДУВАЊЕ НА
МИКРОБИОЛОШКА ИСПРАВНОСТ И
АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА
ТИНКТУРА “ПРЕСПАНСКА ГОРЧИЦА“

Скопје, мај 2017 година

ЕКСПЕРТСКИ ТИМ

вклучен во изработка на извештајот

Универзитет Св. Кирил и Методиј

Природно-математички факултет

Институт за биологија

Катедра по микробиологија и микробна биотехнологија

Координатори:

д-р Џоко Кунгуловски, ред. проф.

д-р Наталија Атанасова-Панчевска, вонр. професор

ИЗВЕШТАЈ

1. ЗА ДОБИЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ ОД МИКРОБИОЛОШКАТА АНАЛИЗА НА ТИНКТУРА “ПРЕСПАНСКА ГОРЧИЦА”

По Ваше барање, а врз основа на писмото од 02.05.2017 година, на Катедрата по микробиологија и микробна биотехнологија при Природно-математичкиот Факултет во Скопје, извршена е микробиолошка анализа со цел утврдување на МИК (антимикробна активност) на 1 мостра од тинктура “Преспанска горчица”.

Пуштањето во промет на еден фармацевтски хербален препарат бара задолжителна контрола на неговата микробиолошка и хемиска исправност. Квалитетот на производот мора да ги задоволува строгите барања на Pharmacopeia.

ВОВЕД

Тинктура “Преспанска горчица”, хербален производ припремен од 33 лековити растенија од органско потекло.

Фармацевтските производи можат да бидат контаминирани од различни извори: воздух, вода, суровински материјал, опрема, персонал, корисник.

Дејонизираната вода која се употребува во фармацевтскиот процес може да се јави како извор на микроорганизми. Поради несоодвеното одржување на системот за дејонизирање на водата, низ јоноизменувачките колони од смолата, може да се формираат лежишта од бактериии. Ваквите лежишта потоа претставуваат извор на контаминација. Често пати дејонизираната вода може да биде и поконтаминирана од влезната водоводна вода како резултат на погрешно ладење, чување на водата, одржување на дистрибуциониот систем и друго. Поради ниските потреби од хранливи материи вообичаен контаминат на водата е *Pseudomonas sp.*

Суровините се чест извор на микробиолошка контаминација. Тие можат да бидат од растително, животинско или синтетичко потекло. Суровините добиени од растително потекло, како што се некои природни гуми, вообичаено содржат од 1000 до 100 000 микроорганизми на грам. Синтетичките суровини вообичаено имаат помал број на микроорганизми од природните материјали. Суровините од животинско потекло обично содржат само бактерии, ретко квасци или мувли, но оваа флора може да содржи патогени видови. Поради ова многу суровини се третирали со топлина, зрачење или алкохол, со што значително се намалува бројот на микроорганизми пред употреба.

1. ИНТЕРПРЕТАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД МИКРОБИОЛОШКИТЕ ТЕСТОВИ

Резултатите од аналитичките микробиолошки тестови можат да бидат доста тешки за интерпретација поради следниве значајни причини:

1. Микроорганизмите се среќаваат насекаде во окружувањето на човекот и претставуваат чести контаминанти при изведување на микробиолошките анализи.
2. Постои голема опасност аналитичарот да го контаминира примерокот во тек на земањето примерок или аналитичката постапка.
3. Микроорганизмите најчесто не се хомогено дистрибуирани низ примерокот или околината.
4. Микробиолошките резултати се предмет на значителен број различни случувања.

Табела 1. Прифатливи критериуми за микробиолошки квалитет на нестерилни фармацевтски дозажни форми според Ph. Eur. 2008

Начин на администрација	ВБАМ* (ФЕК/g или ФЕК/ml)	ВБКМ* (ФЕК/g или ФЕК/ml)	Специфични микроорганизми
Неводени препарати за орална употреба	10^3	10^2	Отсуство на <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)
Водени препарати за орална употреба	10^2	10^1	Отсуство на <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)
Препарати за ректална употреба	10^3	10^2	
Препарати за: Оромукозна употреба Гингивална употреба Кутанеална употреба Назална употреба Аурикуларна употреба	10^2	10^1	Отсуство на <i>Staphylococcus aureus</i> (1g или 1ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g или 1ml)
Вагинална употреба	10^2	10^1	Отсуство на <i>Staphylococcus aureus</i> (1g или 1ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g или 1ml) <i>Candida albicans</i> (1g или 1ml)
Трансдермални фластери (вклучувајќи ја и исамолепливата трака и причврстувачи)	10^2	10^1	Отсуство на <i>Staphylococcus aureus</i> (1g или 1ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g или 1ml)
За инхалација (со исклучок на препаратите за небулизација)	10^2	10^1	Отсуство на <i>Staphylococcus aureus</i> (1g или 1ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g или 1ml) bili-толерантни грам-негативни бактерии (1g или 1ml)
Специјално одобрение од Ph.Eur. за орални форми кои содржат материјал од природно потекло (животинско, растително или минерално) за кои не се користи антиминобен пред треман и за кои е дозволено	10^4	10^2	Не повеќе од 10^2 ФЕК bili-толерантни грам-негативни бактерии (1g или 1ml) Отсуство на <i>Staphylococcus aureus</i> (1g или 1ml) <i>Salmonella</i> (10g или 10ml) <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)

ВБАМ да надминува 10^3 ФЕК/g или ml			
Специјално одобрение од Ph.Eur. за препарати кои содржат една или повеќе растителни форми (цели, редуцирани или во прав)			Не повеќе од 10^2 ФЕК <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)
- растителни медицински препарати на кои им се додава зоврисна вода пред употреба	10^7	10^5	Не повеќе од 10^3 ФЕК <i>bili</i> -толерантни грам-негативни бактерии (1g или 1ml)
- растителни медицински препарати на кои не им се додава зоврисна вода пред употреба	10^5	10^4	Отсуство на <i>Salmonella</i> (10g или 10ml) <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)

ВБАМ*- вкупен број на аеробни мезофили

ВБКМ*- вкупен број на квасци и мувли

ФЕК*- формирани единечни колонии

Врз основа на горекажаното, целта на оваа студија беше микробиолошка контрола на одредени групи бактерии, мувли и квасци во тинктура “Преспанска горчица” (Ph. Eur. 2008).

Стандардите, за ваков вид мостра, при спроведувањето на микробиолошките испитувања препорачуваат следење на квалитативниот и квантитативниот состав на следните групи микроорганизми- контаминанти: вкупен број на колиформни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на фекални колиформни бактерии (1g или 1ml), *Staphylococcus aureus* (1g или 1ml), *Salmonella* (10g или 10 ml), *Escherichia coli* (1g или 1ml), *Pseudomonas aeruginosa* (1g или 1ml), вкупен број на аеробни хетеротрофно мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни олиготрофни мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни хетеротрофно психрофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на филаментозни мувли и квасци.

Покрај горенаведените анализи, а со цел да се добие комплетна слика за квалитативниот состав на микроорганизмите присутни во испитуваната мостра, беа изработени 30 нативни препарати и 30 трајни, претходно обоени по Грам, препарати.

ВБАМ да надминува 10^3 ФЕК/g или ml			
Специјално одобрение од Ph.Eur. за препарати кои содржат една или повеќе растителни форми (цели, редуцирани или во прав)			Не повеќе од 10^2 ФЕК <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)
- растителни медицински препарати на кои им се додава зовриена вода пред употреба	10^7	10^5	Не повеќе од 10^3 ФЕК <i>bili</i> -толерантни грам-негативни бактерии (1g или 1ml)
- растителни медицински препарати на кои не им се додава зовриена вода пред употреба	10^5	10^4	Отсуство на <i>Salmonella</i> (10g или 10ml) <i>Escherichia coli</i> (1g или 1ml)

ВБАМ*- вкупен број на аеробни мезофили

ВБКМ*- вкупен број на квасци и мувли

ФЕК*- формирани единечни колонии

Врз основа на горекажаното, целта на оваа студија беше микробиолошка контрола на одредени групи бактерии, мувли и квасци во тинктура “Преспанска горчица” (Ph. Eur. 2008).

Стандардите, за ваков вид мостра, при спроведувањето на микробиолошките испитувања препорачуваат следење на квалитативниот и квантитативниот состав на следните групи микроорганизми- контаминанти: вкупен број на колиформни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на фекални колиформни бактерии (1g или 1ml), *Staphylococcus aureus* (1g или 1ml), *Salmonella* (10g или 10 ml), *Escherichia coli* (1g или 1ml), *Pseudomonas aeruginosa* (1g или 1ml), вкупен број на аеробни хетеротрофно мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни олиготрофни мезофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на аеробни хетеротрофно психрофилни бактерии (1g или 1ml), вкупен број на филаментозни мувли и квасци.

Покрај горенаведените анализи, а со цел да се добие комплетна слика за квалитативниот состав на микроорганизмите присутни во испитуваната мостра, беа изработени 30 нативни препарати и 30 трајни, претходно обоени по Грам, препарати.

МЕТОДИ НА РАБОТА

I. МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА НА ТИНКТУРА ПРЕСПАНСКА ГОРЧИЦА (*Ph. Eur. 2008*)

1. ХРАНЛИВИ ПОДЛОГИ И РАСТВОРИ ЗА УТВРДУВАЊЕ НА МИКРОБИОЛОШКА ИСПРАВНОСТ

За утврдување на микробиолошката исправност на препаратите користени се готови микробиолошки подлоги од фирмата **bioMerieux-Франција** кои се во потполна согласност со барањата на *Ph. Eur.* и *USP* и се испорачуваат со сертификат за контрола на квалитетот на подлогата за секоја произведена серија. Во сертификатот се опфатени податоците како изглед на подлогата, волумен, рН, и бактериоошка активност на подлогата како тестови за забрзување на раст на соодветни микроорганизми, тестови за инхибирање на раст на несакани микроорганизми, перформанси на растење, селективност и тн.

1. Пуфериран раствор на NaCl и пептон рН 7,0

Состав	
KH_2PO_4	3,56g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,23g
Na Cl	4,30g
Пептон (од месо или казеин)	1,0g
Прочистена вода	1000 ml

Во колку истиот раствор се користи како неутрализирачки разредувач, во истиот се додава 30 g/l Полисорбат 80 и 3,0 g/l Соја лецитин. Се стерилизира со автоклавирање на 121°C, 15 мин.

2. Tripcase soy broth – TSB рН 7,3

Состав	
Пептон од казеин	17,0 g
Пептон од соја	3,0 g
Na Cl	5,0 g
KH_2PO_4	2,5g
Декстроza	2,5g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: Медиумот се користи за раст на најголемиот број неизбирливи микроорганизми (бактерии и фунги).

Прицип на делување: Бујонот содржи микстура од пептони со што овозможува раст на најголемиот број на неизбирливи микроорганизми.

3. Mac Conkey broth (MCB) pH 7,3

Состав	
Желатин хидролизиран со панкреатин	20,0 g
Лактоза монохидрат	10,0 g
Дехидрирана жолчка	5,0 g
Бромкрезол црвено	10,0 g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: Mac Conkey Broth се користи како селективна подлога за обогатување на *Escherichia coli* во нестерилни продукти пред култивирање на Mac Conkey Agar.

Прицип: Составот на подлогата одговара за раст на *Escherichia coli*. Селективноста на медиумот се постигнува со жолчката која го инхибира растот на најголемиот број на Грам-позитивни микроорганизми. Ферментацијата на лактоза од страна на колиформните бактерии ја закиселува подлогата што се забележува со промена на бојата на подлогата во жолта како резултат на присуството на бром крезол црвено како pH индикатор.

4. Trypcase Soy Agar (TSA) pH 7,3

Состав	
Пептон од казеин (говедски)	15,0 g
Пептон од соја	5,0 g
Na Cl	5,0 g
Агар	15,0g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: TSA подлогата се користи за селективна изолација на микроорганизми кои немаат посебни побараувања за нивен развој. Во фармацевтската индустрија се користи за броење на вкупно присутни аеробни микроорганизми при контрола на нестерилни производи.

Принцип: Подлогата содржи микстура од пептони кои овозможуваат раст на најголемиот број неизбирливи микроорганизми.

5. Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar (SDC) pH 5,6

Состав	
Пептон од казеин (говедски)	5,0 g
Пептон од месо	5,0 g
Декстроза	40,0 g
Chloramphenicol	0,05 g
Агар	15,0 g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: Оваа подлога во принцип се користи за броење на квасци и мувли во нестерилни производи, како и во надворешни услови. Овј медиум може да се користи и за контрола на воздух при што како узоркувач се користи семплер на воздух или со статичко узоркување, за тестирање на брисеви од ракавици на персоналот во производство и тн.

Принцип: Високата концентрација на декстрозата во медиумот го оптимизира растењето на мувлите. Киселото рН и присуството на 50mg/l хлоранфеникол ја зголемува селективноста на медиумот за одредени видови на бактерии.

6. Mac Conkey Agar (MCK) pH 7,1

Состав	
Говедски желатин пептон	17,0 g
Пептон од месо (говедско)	3,0 g
Лактоза (говедска)	10,0 g
Жолчни соли (овчи или говедски)	1,5 g
NaCl	5,0 g
Агар	13,5 g
Неутрално црвено	0,03 g
Кристал виолет	0,001 g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: МСК со кристал виолет се користи за селективна изолација и диференцијална подлога за детекција на ентеробактерии во примероци од различно потекло. Во фармацевтската индустрија се користи за детектирање на *E.coli* при микробиолошка контрола на нестерилни производи.

Принцип: МСК агарот со кристал виолет ја детектира ферментацијата на лактозата преку промена на бојата на неутралното црвено. Лактозо ферментиращките микроорганизми продуцираат розеви до црвени колонии, често пати опкружени со венец од жолчни соли. Микроорганизмите кои не ја ферментираат лактозата продуцираат безбојни или слабо кремасти колонии. Селективното запирање на раст на Грам позитивните бактерии е овозможено со присуството на жолчни бои и кристал виолет.

7. Baird Parker agar (BP)

Состав	
Говедски казеин пептон	10,0 g
Екстракт од месо (говедско)	5,0 g
Екстракт од квасец	1,0 g
Глицин	12,0
Литиум хлорид	5,0 g
Натриум пируват	10,0
Калиум телурит	0,1g
Жолчка од јајце	10 ml

Агар	17 g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: Подлогата ВР се препорачува за броење и потврдување на коагулаза позитивен *Staphylococcus* во храна и фармацевтски препарати.

Принцип на дејствување: Подлогата содржи богата хранлива база од ти пептони, глицини и натриум пируват кои се користат за стимулирање на раст на соеви кои можат да ги контаминираат производите во технолошкиот процес. Литиум хлоридот и калиум телуритот го прават медиумот селективен со тоа што го инхибираат растот на сите видови со исклучок на коагулаза позитивниот *Staphylococcus*. Редукцијата на калиум телурит предизвикува поцрнување на колониите на *Staphylococcus*. Жолчката од јајцата ни овозможува да ја детектираме продукцијата на липаза кај одредени коагулаза позитивни *Staphylococcus*. Колононите стануваат опкружени со прозирна зона и понекогаш блага преципитација.

8. Cetrimide Agar (CET)

Состав	
Говедски желатин пептон	20,0 g
Магнезиум хлорид	1,4 g
Натриум сулфат	10,0 g
Цетримид	0,3
Глицерол	10 ml
Агар	13,6 g
Прочистена вода	1000 ml

Примена на подлогата: CET агарот е селективен медиум за изолација и детекција на *Pseudomonas aeruginosa* од примероци со различно потекло.

Принцип: CET агарот ја стимулира продукцијата на пиоцијанин и флуоресценцијата на *P. aeruginosa*. Флуоресценцијата може да се детектира под ултра виолетово светло.

РЕЗУЛТАТИ

1. ВИЗУЕЛЕН ПРЕГЛЕД

Контаминираниот производ често е потемен и покажува промени на површинската структура. Понекогаш, на мувлосан материјал, се забележуваат и сивкасто-бели фунгални хифи. На светлина, фунгите спорутираат. Генерално, *Rhizopus* и *Mucor* продуцираат сиво-црни спори, *Penicillium* конидиите се светло сино-зелени, додека конидиите на *Aspergillus* се темни зелено-црни.

Кај испитуваните примерци не е забележана промена на површинската структура.

2. ПРЕГЛЕД СО МИРИС

Оригиналниот примерок Преспанска горчица има карактеристичен пријатен мирис.

Кај испитуваните примерци не е забележана промена на мисрисните особини.

3. ФЛУОРЕСЦЕНТЕН ПРЕГЛЕД

Bush Doctor (1993) испитувал различни видови хербални производи за присуство на афлатоксин-продуцирачки *A. flavus* со UV-A лампа. Контаминираниот материјал флуоресцирал со светло-зелена боја.

Кај испитуваните примерци не е забележана промена со примена на UV-A лампа.

4. МИКРОБИОЛОШКА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Добиените резултати од спроведените микробиолошки анализи прикжани се во табела 1.



Универзитет "Св.Кирил и Методиј"
Природно-математички факултет
Институт по биологија
Катедра за микробиологија и микробна биотехнологија
П.фах 162
1001 Скопје, Република Македонија



Табела 1. Микробиолошка анализа на Преспанска горчица.

РЕЗУЛТАТИ И ЗАКЛУЧОК:

Вид на примерок, датум и време на приемот на примерокот во лабораторија	Преспанска горчица; 05.05.2017 година	
Забележани пропусти и недостатоци при земањето и испраќањето на примерокот		
МИКРОБИОЛОШКИ ПРЕГЛЕД	Број:	1

Најверојатен број на бактерии (МПН) и изолати во 1 mL					
Вкупни колиформни	Фекални колиформни	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i> (10 mL)
0	0	0	0	0	0
Вкупен бр. на аеробни хетеротрофни мезофили во 1 mL	Вкупен бр. на анаеробни мезофили во 1 mL	Вкупен бр. на аеробни олиготрофни мезофили во 1 mL	Вкупен бр. на аеробни хетеротрофни психрофили во 1 mL	Вкупен бр. на квасци во 1 mL	Вкупен бр. на мувли во 1 mL
0	0	0	0	0	0

Примерокот е МИКРОБИОЛОШКИ	ИСПРАВЕН	X	НЕИСПРАВЕН	
Анализата ја извршил	д-р Наталија Атанасова Панчевска, вон. професор			

Заклучок: Анализираниот примерок микробиолошки е исправен.

Забелешка:

Анализата ја извршил,

д-р Наталија Атанасова Панчевска, вон. професор

Н. Атанасова-Панчевска

Одговорно лице

Проф. д-р Цоко Кунгуловски

Цоко Кунгуловски

ЗАКЛУЧОК И ПРЕДЛОГ

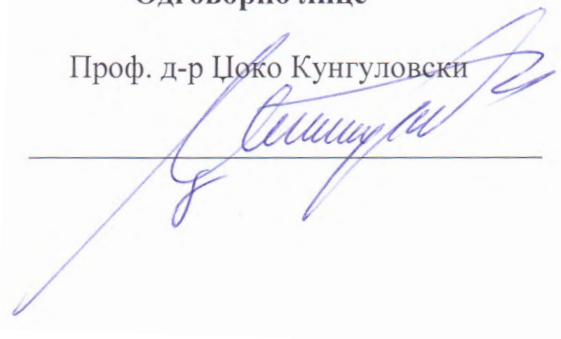
Од извршените микробиолошки анализи на испитуваната мостра од Преспанска горчица, може да се заклучи дека испитуваниот примерок микробиолошки е исправен. Во испитуваните мостри не е докажано присуство на клинички патогени микроорганизми, односно сапрофитни мезофилни и психрофилни хетеротрофни и олиготрофни микроорганизми.

Не се забележани органолептички промени на испитуваниот производ.

Врз основа на добиените резултати од спроведените микробиолошки анализи, се препорачува на надлежните институции производот Преспанска горчица да се процесуира во процесот на регистрација.

Одговорно лице

Проф. д-р Цоко Кунгуловски



2. ОДРЕДУВАЊЕ НА МИНИМАЛНА ИНХИБИТОРНА КОНЦЕНТРАЦИЈА НА ТИНКТУРА “ПРЕСПАНСКА ГОРЧИЦА“

Целта на испитувањата е дефинирање на минималната инхибиторна концентрација (МИК) и минималната бактерицидна активност (МБЦ) во *in vitro* услови на тинктура Преспанска горчица аплицирано врз 13 (тринаесет) бактерии и 7 тест мувли (фунги):

I. Бактерии

1. FNS-BCC 28 *B. subtilis* ATCC 6633
2. FNS-BCC 40 *B. pumilus* NCTC 8241
3. FNS-BCC 37 *Bacillus* sp.
4. FNS-BCC 61 *S. citreus*
5. FNS-BCC 65 *S. albus*
6. FNS-BCC *S. aureus* ATCC
7. FNS-BCC 69 *M. luteus*
8. FNS-BCC 91 *Listeria monocytogenes*
9. *Sarcina lutea*
10. FNS-BCC 3 *E. coli* ATCC 8739
11. FNS-BCC 70 *P. aeruginosa* ATCC
12. FNS-BCC 96 *S. typhimurium*
13. FNS-BCC 98 *S. enteridis*

II. Мувли (Fungi)

1. *Aspergillus ochraceus* FNS- FCC 46
2. *Alternaria alternata*
3. *Fusarium* sp.
4. *Penicillium* sp.
5. *Plasmopara viticola*
6. *Aspergillus niger* ATCC 1052
7. *Penicillium comine* IN 864

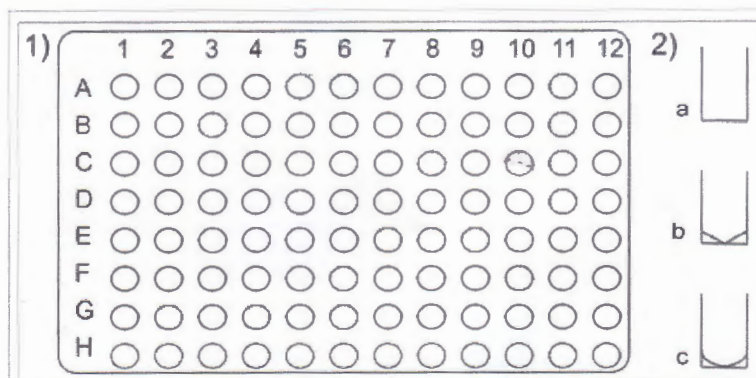
Колониите на тестираните бактерии се добиени од сток култури кои се дел од колекцијата на микроорганизми во сопственост на Катедрата по микробиологија и микробна биотехнологија при Институтот по Биологија при Природно-математички факултет, Скопје. Медиумите кои се користеа во овој труд за раст и одржување на микроорганизмите се Mueller Hinton Broth (MHB) за G – позитивни бактерии и G – негативни бактерии и Sabouraud Dextrose Broth (SDB) за мувли. Бактериите се инкубираат во инкубатор на 37 °C за време од 24 часа, додека мувлите се инкубираат 5-7 дена на 25 °C.

2.1. Добивање на суспензија од бактерии

Подготвувањето се состои од суспендирање на дел од културата во стерилен физиолошки раствор (0.90% NaCl) по што се врши хомогенизирање на вортекс. Густината на бактериската суспензија се споредува со 0,5 McFarland-ов стандард и доколку суспензијата не кореспондира со густината на стандардот треба да се додаде од физиолошкиот раствор додека истото не се постигне. Суспензијата е со густина додека $1,5 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ онаа која се користи треба да биде со разредување од $1,5 \times 10^6$ CFU ml⁻¹.

2.2. Микродилуциона метода

Антимикробната активност се испитуваше преку микродилуционата метода опишана од Sarker и *сop.*, 2007. Целта на методата е да се испита минималната инхибиторна концентрација и за таа намена се користи стерилна микродилуциона плочка на која има 96 бунарчиња.



Слика 1. Изглед на микродилуциона плочка

2.3. Резултати и дискусија

Во Табела 2 и 3 се прикажани добиените резултати за минималната инхибиторна концентрација и антимикробно дејство од тинктура Преспанска горчица врз 8 (осум) испитувани тест мувли (фунги) и 13 (тринаесет) бактерии. Осетливоста на микроорганизмите кон тинктурата се различни во зависност од групата на микроорганизмот.

Мувлата *Aspergillus ochraceus* FNS-FCC 46 е осетлива спрема тинктурата при концентрација од 0,39%, мувлата *Alternaria alternata* е осетлива на тинктурата при концентрација од 25%, *Fusarium sp.* не е осетлива на тинктурата, мувлата *Botritis cinerea* е осетлива при концентрација од 0,39%, *Penicillium sp.* е осетлива при концентрација од 50%, *Plasmopara viticola* е осетлива при концентрација од 12,5%, *Aspergillus niger* ATCC 1052 не е осетлива на тинктурата и мувлата *Penicillium comine* IN 864 е осетлива при концентрација од 0,39%.

Табела 2. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и антимикробно дејство од тинктура Преспанска горчица врз 8 (осум) испитувани тест мувли (фунги).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Преспанска горчица (разредување, %)	<i>Asp. ochraceus</i> FNS- FCC 46	<i>A.alternata</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i> <i>tutun</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	<i>A.niger</i> ATC C 1052	<i>P. commune</i> IN 864
50	-	-	+	-	-	-	+	-
25	-	-	+	-	+	-	+	-
12,5	-	+	+	-	+	-	+	-
6,25	-	+	+	-	+	+	+	-
3,125	-	+	+	-	+	+	+	-
1,56	-	+	+	-	+	+	+	-
0,78	-	+	+	-	+	+	+	-
0,39	-	+	+	-	+	+	+	-

+ има раст, не делува; - нема раст, делува

Во Табела 3 се прикажани добиените резултати за минималната инхибиторна концентрација и минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) од тинктура Преспанска горчица врз 13 (тринаесет) испитувани бактерии.

Тинктурата Преспанска горчица спрема бактериите FNS-BCC 28 *B. subtilis* ATCC 6633; FNS-BCC 70 *P. aeruginosa* ATCC и FNS-BCC 98 *S. enteridis*, покажува минимална инхибиторна концентрација (МИК) при разредување од 50%, додека минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) при разредување од 25%.

Тинктурата Преспанска горчица спрема бактериите FNS-BCC 40 *B. pumilus* NCTC 8241; FNS-BCC 37 *Bacillus* sp.; FNS-BCC 91 *Listeria monocytogenes*; FNS-BCC 96 *S. typhimurium* покажува минимална инхибиторна концентрација (МИК) при разредување од 25% , додека минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) е 12,5%.

Тинктурата Преспанска горчица спрема бактеријата FNS-BCC 69 *M. luteus* покажува минимална инхибиторна концентрација (МИК) при разредување од 6,250%, а минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) е 3,125%, додека пак бактериите FNS-BCC 61 *S. citris* и *Sarcina lutea* не покажува минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) и пониска од 0,39%.

Табела 3. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) од тинктура Преспанска горчица врз 13 (тринаесет) испитувани тест бактериски култури.

Преспанска горчица (разредување,%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-
25	MIC	MBC	MBC	-	MBC	-	-	MBC	-
12,5	+	MIC	MIC	-	-	MBC	-	MIC	-
6,25	+	+	+	-	MIC	MIC	MBC	+	MBC
3,125	+	+	+	-	+	+	MIC	+	-
1,56	+	+	+	-	+	+	+	+	-
0,78	+	+	+	MBC	+	+	+	+	-
0,39	+	+	+	MIC	+	+	+	+	MIC

+ ima rast, ne deluva; - nema rast, deluva

Преспанска горчица (разредување,10%)	10	11	12	13	K+	K-
50	-	MBC	-	MIC		
25	-	MIC	MBC	MBC		
12,5	MBC	+	MIC	+		
6,25	MIC	+	+	+		
3,125	+	+	+	+		
1,56	+	+	+	+		
0,78	+	+	+	+		
0,39	+	+	+	+		



Слика 2. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минималната бактерицидна концентрација (МБЦ) од тинктура Преспанска горчица врз 13 (тринаесет) испитувани тест бактериски култури.

Заклучок

Од добиените резултати може да се заклучи дека испитуваната тинктура Преспанска горчица има силно антифунгално и антибактериско дејство.

Испитуваната тинктура Преспанска горчица има многу посилено антибактериско дејство отколку антифунгално дејство.

Испитуваната тинктура Преспанска горчица има многу посилено антибактериско дејство спрема Гр позитивните бактерии во однос на Гр негативните бактерии.

6. Референци

Anke T., Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Prog. Ind. Microbiol.* 27 (1989) pp. 51–66

Bandow, J.E., Brotz, H., Leichert, L.I.O., Labischinski, H., Hecker, M., Proteomic approach to understanding antibiotic action, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 2, No. 1, (2003), pp. 948-955

Barros L., R.C. Calhelha, J. A. Vaz, I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista L. M. Estevinho, Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) pp. 151–156

Coulibaly A. Y., Konate K., Youl E. N. H., Sombie P.A.E.D., Kiendrebeogo, Meda M., N. T. R., Lamien A., Zeba B., Nacoulma O. G., Anti-proliferative effect of *Scoparia dulcis* L. against bacterial and fungal strains, *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 6(6) (2012) pp. 3055-3063

Chang S. T., P. G. Miles, *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, CRC Press. USA, 2nd Edn. (2004)

Momtaz H., E. Rahimi, S. Moshkelani, Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against *E. coli* isolated from Thai broilers, *Thai Journal of Veterinary Medicine* 40 (2010) pp. 311–315

Saga T., Yamaguchi K., *History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria*, Vol. 52, No.2, (2009) pp. 103–108

Siddiqi, R., Naz, S., Ahmad, S., Sayeed, S.A., Antimicrobial activity of the polyphenolic fractions derived from *Grewia asiatica*, *Eugenia jambolana* and *Carissa carandas*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46 (2011) pp. 250–256

Westh H., , C. S. Zinn, V. T. Rosahi, An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. Microb. Drug. Resist. 10 (2004) pp. 169 – 179

WHO, Global report on surveillance, Antimicrobial resistance (2014)

Одговорно лице
Проф. д-р Цоко Кунгуловски

