

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja ARZENŠEK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA  
NA BAKTERIJE VRSTE *Alicyclobacillus acidoterrestris***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS  
AGAINST *Alicyclobacillus acidoterrestris***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

**POPRAVKI:**

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Arzenšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.24:582.929.4(043)=163.6  
KG mikroorganizmi/kvarljivci/*Alicyclobacillus*/*Alicyclobacillus acidoterrestris*/rožmarin/*Rosmarinus officinalis* L./ekstrakt rožmarina/protimikrobeno delovanje/karnozolna kislina/minimalna inhibitorna koncentracija/minimalna baktericidna koncentracija  
AV ARZENŠEK, Anja  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2009  
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE *Alicyclobacillus acidoterrestris*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 66 str., 13 pregl., 38 sl., 13 pril., 77 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil ugotoviti protimikrobeno delovanje ekstraktov rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Primerjalno smo protimikrobeni učinek ekstraktov določili tudi na bakterijah vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*. Komercialno pripravljena ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh sta vsebovala 22,04 % in 40,49 % karnozolne kisline. Za določitev protimikrobnega učinka smo uporabili metodo difuzije v trdem gojišču AM (*Alicyclobacillus medium*) in metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM. Celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* smo pripravili v tekočem gojišču AM ali BAM (*Bacillus acidocaldarius medium*), odvisno od zaželenega začetnega števila celic v inokulumu. Pripravili smo različne koncentracije ekstraktov od 8 do 0,00391 %, tako da smo ekstrakt razredčili v absolutnem etanolu. Pri metodi difuzije v trdem gojišču AM smo po 24-urni inkubaciji odčitali inhibicijske cone pri določeni koncentraciji ekstrakta. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) smo definirali kot najnižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina, pri kateri je bila po 24-urni inkubaciji inhibicijska cona večja za 1 do 3 mm od inhibicijske cone absolutnega etanola. Vrednosti MIC, določene z metodo difuzije v gojišču AM pri bakterijah vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*, so bile v območju med 20000 µg ekstrakta/ml EtOH do 625 µg ekstrakta/ml EtOH za Ros.con in od 10000 µg ekstrakta/ml EtOH do 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH za Ros.conh. Odpornost bakterij rodu *Alicyclobacillus* proti ekstraktoma je bila odvisna od izbranega ekstrakta in koncentracije ekstrakta ter od vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču AM smo ugotavljali protimikrobeni učinek ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *A. acidoterrestris* tako, da smo določili minimalno baktericidno koncentracijo (MBC) in MIC. MBC je bila tista koncentracija, pri kateri je preživel po delovanju ekstrakta rožmarina 0,1 % testnih bakterij. MIC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina, ki je preprečila razmnoževanje inokuluma. MBC za ekstrakt Ros.con je bila 34,59 µg/ml AM in za ekstrakt Ros.conh 6,083 µg/ml AM. MIC za ekstrakt Ros.con je bila 7,813 µg/ml AM in za ekstrakt Ros.conh 3,906 µg/ml. Tako določene MIC smo uporabili tudi za ugotavljanje protimikrobnega učinka teh koncentracij na različno začetno število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v inokulumu. MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh so imele protimikrobeni učinek na vse preizkušene koncentracije bakterij v inokulumu. MIC določene pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču AM za bakterije vrste *A. acidoterrestris* so delovale baktericidno na bakterije vrste *A. acidiphilus*, medtem ko so imele na bakterije vrst *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus* bakteriostatičen vpliv.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24:582.929.4(043)=163.6  
CX spoiling bacteria/*Alicyclobacillus*/*Alicyclobacillus acidoterrestris*/rosemary/*Rosmarinus officinalis* L./  
rosemary extracts/antimicrobial activity/carnosic acid/minimal inhibitory concentration/minimal  
bactericidal concentration  
AU ARZENŠEK, Anja  
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2009  
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS AGAINST *Alicyclobacillus*  
*acidoterrestris*  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XI, 66 p., 13 tab., 38 fig., 13 ann., 77 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of our research was to investigate the antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. For comparison we have investigated the antimicrobial activity of rosemary extracts against *A.acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. herbarius* and *A. cycloheptanicus*. We have used two extracts of rosemary Ros.con and Ros.conh, which were containing carnosic acid, 22.04 %wt. and 40.49 %wt., respectively. We wanted to determine an antimicrobial activity of selected rosemary extracts with two methods: disc diffusion method (AM–*Alicyclobacillus* medium) and broth dilution method (AM). All tested bacteria were inoculated into AM or BAM (Bacillus acidocaldarius medium), dependent of wanted inoculum concentration. We prepared different solutions of extracts from 8 to 0,00391 % in absolute ethanol, the concentrations of extracts were prepared in accordance with the studied method. With the disc diffusion method we have measured the zone of the inhibition diameter after 24 hour of incubation. The minimal inhibitory concentration (MIC) was the lowest concentration of rosemary extract, at which the inhibition zone was 1-3 mm bigger than inhibition zone of absolute ethanol. We have determinated MIC values for *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum* and *A. cycloheptanicus* in the ranges from 20000 µg/ml EtOH to 625 µg/ml EtOH for extract Ros.con and from 10000 µg/ml EtOH to 312,5 µg/ml EtOH for extract Ros.conh for tested *Alicyclobacillus* strains. We have established, that the resistance of *Alicyclobacillus* species against rosemary extracts depended on: selected extract, selected concentration and various species of the genus *Alicyclobacillus*. With the broth dilution method we have determinated minimal bactericidal concentration (MBC) and MIC for *A. acidoterrestris*. MBC was the concentration of rosemary extract, which was giving 0.1 % survival of the tested bacteria. MIC was the lowest concentration of extract which has stopped the multiplication of bacteria. MBC for Ros.con was at 34.59 µg/ml AM and for Ros.conh at 6.083 µg/ml AM. MIC for Ros.con was at 7.813 µg/ml AM and for Ros.conh at 3.906 µg/ml AM. We used the determined MIC values of extracts Ros.con and Ros.conh for the investigation of influence about the influence of these MIC values on different inoculum concentrations of *A. acidoterrestris*. MIC had antimicrobial activity on all tested inoculum concentration of *A. acidoterrestris*. MIC values determined with the broth dilution method for *A. acidoterrestris* had the bactericidal effect on *A. acidiphilus* and bacteriostatic effect on *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum* and *A. cycloheptanicus*.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i> .....	3
2.1.1 Klasifikacija .....	3
2.1.2 Morfologija .....	4
2.1.3 Ekologija, fiziologija in biokemijske lastnosti.....	5
2.1.4 Bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i> kot kvarljivci.....	6
2.1.4.1 Gvajakol .....	8
2.1.4.2 Halofenoli .....	9
2.2 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA... .....	10
2.3 MEHANIZMI PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA EKSTRAKTOV .....	11
2.4 ROŽMARIN .....	13
2.5 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI .....	17
2.5.1 Metoda difuzije v trdem gojišču .....	17
2.5.2 Metoda razredčevanja v tekočem ali trdnem gojišču.....	19
<b>3 MATERIJAL IN METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1 POTEK DELA .....	21
3.2 MATERIAL .....	22
3.2.1 Bakterije.....	22
3.2.2 Mikrobiološka gojišča.....	22
3.2.2.1 Selektivna gojišča.....	22
3.2.2.2 Fiziološka raztopina .....	24
3.2.3 Ekstrakti rožmarina.....	25
3.2.4 Druge kemikalije in dodatki.....	25
3.2.5 Laboratorijska oprema.....	25
3.3 METODE DELA .....	26
3.3.1 Revitalizacija bakterij.....	26
3.3.2 Priprava inokuluma .....	26
3.3.3 Metoda difuzije v trdem gojišču AM.....	27
3.3.4 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču AM.....	29

3.3.5 Rast bakterij vrst <i>A. acidocaldarius</i> , <i>A. acidiphilus</i> , <i>A. hesperidum</i> in <i>A. cycloheptanicus</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov rožmarina .....	32
3.3.6 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču .....	33
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA, DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU AM.....	34
4.1.1 Velikosti inhibicijskih con pri različnih vrstah bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	34
4.1.1.1 MIC ekstraktov rožmarina, določene za različne vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	36
4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA, DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V GOJIŠČU AM .....	37
4.2.1 Rast bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z dodatkom ekstraktov Ros.con in Ros.conh37	37
4.2.1.1 Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	39
4.2.1.2 Določitev MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	42
4.2.2 Protimikrobni učinek MIC ekstraktov rožmarina na različne koncentracije bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	43
4.2.2.1 Protimikrobni učinek MIC ekstrakta Ros.con .....	44
4.2.2.2 Protimikrobni učinek MIC ekstrakta Ros.conh .....	45
4.2.3 Protimikrobni učinek MIC ekstraktov rožmarina, določen za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na druge vrste bakterij <i>Alicyclobacillus</i> .....	46
4.2.3.1 Rast bakterij vrste <i>A. acidocaldarius</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh .....	46
4.2.3.2 Rast bakterij vrste <i>A. acidiphilus</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh ....	47
4.2.3.3 Rast bakterij vrste <i>A. hesperidum</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh ...	48
4.2.3.4 Rast bakterij vrste <i>A. cycloheptanicus</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh .....	50
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>52</b>
5.1 RAZPRAVA .....	52
5.1.1 Metoda difuzije v gojišču AM .....	53
5.1.2 Metoda razredčevanja v gojišču AM.....	54
5.1.3 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na različne koncentracije bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	55
5.1.4 Protimikrobni učinek MIC ekstraktov rožmarina, določen za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na druge vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	56
5.2 SKLEPI.....	58
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>59</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>61</b>
<b>8 PRILOGE .....</b>	<b>68</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Temperaturna in pH območja za rast bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> (Karavaiko in sod., 2005; Goto in sod., 2003).....	5
Preglednica 2-2: Fizikalno-kemijske karakteristike ekstrakta Ros.con (Berglez, 2002).....	17
Preglednica 3-1: Sestava dela A gojišča <i>Alicyclobacillus medium</i> .....	22
Preglednica 3-2: Sestava dela B gojišča <i>Alicyclobacillus medium</i> .....	23
Preglednica 3-3: Sestava dela C gojišča <i>Alicyclobacillus medium</i> .....	23
Preglednica 3-4: Sestava tekočega gojišča BAM .....	24
Preglednica 3-5: Laboratorijska oprema.....	25
Preglednica 4-1: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh, določene z metodo difuzije v trdem gojišču AM za različne vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	36
Preglednica 4-2: Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste <i>A.acidoterrestris</i> v gojišču AM.....	39
Preglednica 4-3: Rast bakterij vrste <i>A. acidocaldarius</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh .....	46
Preglednica 4-4: Rast bakterij vrste <i>A. acidiphilus</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh.....	47
Preglednica 4-5: Rast bakterij vrste <i>A. hesperidum</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh.....	49
Preglednica 4-6: Rast bakterij vrste <i>A. cycloheptanicus</i> v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh.....	50

## KAZALO SLIK

Slika 2-1: $\omega$ - aliciklične maščobne kisline razdeljene na: $\omega$ - cikloheksilne in $\omega$ - cikloheptilne maščobne kisline (Yokota in sod., 2007).....	3
Slika 2-2: Spore bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> , kot so vidne pod SEM (Mallidis in Drizou, 1991); A – normalne spore, B – spore, uničene z visokim tlakom in temperaturo (207 MPa, 5 min, 45 °C). .....	5
Slika 2-3: Poenostavljena shema nastanka gvajakola iz ferulne kisline z bakterijami vrste <i>A. acidoterrestris</i> (Chang in Kang, 2004).....	8
Slika 2-4: Strukturne formule spojin, ki povzročajo neprijetne aromе: (a) gvajakol, (b) 2,6-dibromofenol, (c) 2,6-diklorofenol (Yokota in sod., 2007) .....	9
Slika 2-5: Tarčna mesta in mehanizmi protimikrobnega delovanja aktivnih komponent rastlinskih ekstraktov v bakterijski celici (Burt, 2004).....	12
Slika 2-6: Rožmarin (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).....	13
Slika 2-7: Struktura formula karnozolne kisline (Rižner Hraš, 2000) .....	14
Slika 2-8: Struktura formula karnozola (Rižner Hraš, 2000) .....	14
Slika 2-9: Struktura formula rožmarinske kisline (Rižner Hraš, 2000) .....	15
Slika 2-10: Struktura formula ursolne kisline (Rižner Hraš, 2000) .....	15
Slika 2-11: Struktura formula oleanolne kisline (Rižner Hraš, 2000).....	16
Slika 2-12: Določanje inhibicijskih koncentracij z difuzijo v trdem gojišču (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005).....	18
Slika 2-13: Inhibicijske cone pri metodi difuzije v trdem gojišču .....	19
Slika 2-14: Prikaz postopka metode razredčevanja v tekočem gojišču (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 b).....	20
Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela .....	21
Slika 3-2: Bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ 184 pod mikroskopom .....	26
Slika 3-3: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i> z metodo difuzije v trdem gojišču AM.....	28
Slika 3-4: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM.....	30
Slika 3-5: Shema določanja učinkovitosti MIC Ros.con in Ros.conh na različne začetne koncentracije bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	31
Slika 3-6: Shema določanja učinkovitosti MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na druge vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	32
Slika 3-7: Kolonije bakterij vrste <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> na gojišču AM .....	33
Slika 4-1: Povprečne inhibicijske cone za različne vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con.....	35

---

Slika 4-2: Povprečne inhibicijske cone za različne vrste bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh.....	35
Slika 4-3: Rast bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con ..	38
Slika 4-4: Rast bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh ..	38
Slika 4-5: Preživelost bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> pri času 24 ur v gojišču AM pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh ..	40
Slika 4-6: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM .....	40
Slika 4-7: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM .....	41
Slika 4-8: Protimikroben učinek različnih koncentracij ekstrakta Ros.con na bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> ....	42
Slika 4-9: Protimikroben učinek različnih koncentracij ekstrakta Ros.conh na bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> ...	43
Slika 4-10: Protimikroben učinek MIC ekstrakta Ros.con (7,813 µg/ml) na rast različnih koncentracij bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	44
Slika 4-11: Protimikroben učinek MIC ekstrakta Ros.conh (3,90625 µg/ml) na rast različnih koncentracij bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	45
Slika 4-12: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast bakterij vrste <i>A. acidocaldarius</i> .....	47
Slika 4-13: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast bakterij vrste <i>A. acidiphilus</i> .....	48
Slika 4-14: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast bakterij vrste <i>A. hesperidum</i> .....	49
Slika 4-15: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast bakterij vrste <i>A. cycloheptanicus</i> .....	51
Slika 5-1: Protimikroben učinek MIC ekstrakta Ros.con (7,813 µg/ml), ki smo jo določili za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast drugih vrst bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	56
Slika 5-2: Protimikroben učinek MIC ekstrakta Ros.conh (3,906 µg/ml), ki smo jo določili za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , na rast drugih vrst bakterij <i>Alicyclobacillus</i> .....	57

## KAZALO PRILOG

Priloga A 9-1: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> , določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM.....	68
Priloga A 9-2: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste <i>A. acidocaldarius</i> , določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM.....	69
Priloga A 9-3: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste <i>A. acidiphilus</i> , določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM .....	70
Priloga A 9-4: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste <i>A. hesperidum</i> , določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM .....	71
Priloga A 9-5: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste <i>A. cycloheptanicus</i> , določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM .....	72
Priloga A 9-6: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con ob začetku inkubacije.....	73
Priloga A 9-7: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con po osemurni inkubaciji .....	74
Priloga A 9-8: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji.....	75
Priloga A 9-9: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh ob začetku inkubacije .....	76
Priloga A 9-10: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh po osemurni inkubaciji .....	77
Priloga A 9-11: Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh po 24-urni inkubaciji.....	78
Priloga A 9-12: Protimikrobn učinek dodatka MIC ekstrakta Ros.con (7,8125 µg/ml) na različne koncentracije bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	79
Priloga A 9-13: Protimikrobn učinek dodatka ekstrakta Ros.conh (3,90625 µg/ml) na različne koncentracije bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> .....	80

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
<i>A. acidiphilus</i>	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>
<i>A. acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>A. acidoterrestris</i>	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>
<i>A. disulfidooxidans</i>	<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>
<i>A. herbarius</i>	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>
<i>A. hesperidum</i>	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>
<i>A. pomorum</i>	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>
<i>A. sandaiensis</i>	<i>Alicyclobacillus sandaiensis</i>
<i>A. tolerans</i>	<i>Alicyclobacillus tolerans</i>
<i>A. vulcanalis</i>	<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>
AM	gojišče Alicyclobacillus tekoči ali trdi medij
$a_w$	vodna aktivnost
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BAM	gojišče Bacillus acidocaldarius medij
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butiliran hidroksitoluen
cfu	kolonijska enota (ang. Colony forming unit)
DSMZ	Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen
EtOH	etanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
N	število mikroorganizmov (cfu/ml ali cfu/g)
NFPA	National Food Processors Association
OTC	oksitetraciklin
PG	polietilen glikol
Ros.con	ekstrakt rožmarina z 22,04 % karnozolne kislino
Ros.conh	ekstrakt rožmarina s 40,49 % karnozolne kislino
<i>S. aureus</i>	<i>Staphlococcus aureus</i>
SEM	elektronski mikroskop
UHT	angl. ultra high-temperature heat-treatment
ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete
16S rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina

## 1 UVOD

Umetni konzervansi se že desetletja uporabljajo za zaščito živil pred razvojem kvarljivcev in patogenih bakterij. Danes se je povečalo zanimanje za uporabo naravnih spojin, na primer ekstraktov rožmarina, ki se uporablja za antioksidativno in protimikroben zaščito živil. Tako bi se lahko izognili nezaželenim stranskim učinkom na zdravje ljudi, ki lahko nastanejo z uživanjem umetnih konzervansov (Romano in sod., 2009). Vse več raziskav dokazuje, da imajo fenolne spojine iz zelišč in začimb tudi ugodne učinke na zdravje, preprečevale naj bi tudi razvoj rakavih obolenj (Nychas, 1995).

V zadnjih desetletjih so proizvajalci po vsem svetu opazili kvarjenje sadnih sokov zaradi sporotvornih, acidofilnih bakterij vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Sveži sadni sokovi in koncentrati sokov so pogosto kontaminirani s sporami bakterij vrste *A. acidoterrestris*, ki preživijo pasterizacijo. Te bakterije so kvarljivci živil in povzročajo nastanek neprijetne arome v sadnih sokovih, na primer spojino gvajakol. Bakterije vrste *A. acidoterrestris* ne tvorijo toksinov in niso patogene (Oita, 2002).

Dolgo časa je bila termična obdelava surovin in izdelkov edini način za zmanjšanje števila spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* in zaščito sadnih sokov pred kvarjenjem. Potem so se pojavile nove metode za preprečevanje vzklitja bakterijskih spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* v modelnih suspenzijah in živilih. To so inovativni pristopi za inhibicijo in/ali kontrolo razvoja bakterij iz spor, kot je uporaba rastlinskih ekstraktov in eteričnih olj, ter naravnih spojin nizina, lizocima in monolavrina (Bevilacqua in sod., 2008).

Rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih sokovih so že uspešno inhibirali z nizinom, to je peptid, ki ga izločajo bakterije vrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Lizocim je encim iz jajčnega beljaka, ki zmanjša odpornost spor *A. acidoterrestris* proti povišani temperaturi. UHT (angl. ultra high-temperature heat-treatment) je najbolj učinkovita metoda za preprečevanje kvarjenja sadnih sokov z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, ker do zdaj te bakterije še niso našli v komercialnih pasteriziranih sadnih sokovih, vendar UHT uniči tudi aroma sadnih sokov (Oita, 2002).

Potrošniki želijo izdelke, ki so izdelani čim bolj naravno in vsebujejo naravne sestavine, zato je vse več pozornosti usmerjene v raziskave uporabnosti rastlinskih ekstraktov in eteričnih olj za kontrolo proizvodov pred kvarljivci in tudi patogenimi bakterijami (Bevilacqua in sod., 2008). Rastlinske ekstrakte evkaliptusa za zaviranje vzklitja spor bakterij vrste *A. acidoterrestris* je prvi uporabil Takahashi (2004) in z njim uspešno inhibiral rast teh bakterij. Nekaj živilskih naravnih konzervansov, ki vsebujejo eterična olja, je že komercialno dostopnih, na primer pri DOMCA S. A. (Alhendin, Granada, Spain), ki vsebuje 50 % eteričnega olja rožmarina, žajblja in citrusov ter 50 % glicerola (Mendoza-Yepes in sod., 1997).

Protimikroben učinek eteričnih olj oziroma ekstraktov je odvisen od kemijske sestave prisotnih aktivnih komponent, njihovega razmerja in interakcije med njimi. Med aktivnimi komponentami prihaja do medsebojnega sinergističnega ali antagonističnega vpliva. Protimikroben delovanje rastlinskih ekstraktov zato ni enako protimikrobnemu delovanju čistih izoliranih snovi (Burt, 2004).

Uporaba eteričnih olj in ekstraktov ter njihovih aktivnih komponent tako pomeni nov pristop k stabilizaciji sokov z naravnimi spojinami, ki so ekstrahirane iz rastlin. Tako potrošnik ne bo sprejemal teh protimikrobnih snovi kot kemikalije, ampak kot naravne komponente sokov, ki pa prispevajo tudi k boljši aromi sokov.

## 1.1 CILJ NALOGE

Cilj naloge je bil določiti protimikrobni učinek ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Uporabili smo dve metodi določanja protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina, s katerima smo žeeli ugotoviti razliko v delovanju med ekstraktoma Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris* ter določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) in minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstraktov rožmarina. Hkrati smo žeeli preveriti ali imajo MIC, določene za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, enak protimikrobni učinek tudi na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh imata protimikrobni učinek na bakterije vrste *A. acidoterrestris*.
- Predvidevali smo večji inhibitorni učinek ekstrakta Ros.conh, ker je vseboval več karnozolne kisline v primerjavi z ekstraktom Ros.con.
- Pričakovali smo večji inhibitorni učinek ekstraktov na manjše začetno število bakterij v inokulumu.
- Predvidevali smo, da je odpornost različnih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus* proti ekstraktom rožmarina odvisna od vrste ekstrakta, bakterij in začetnega števila bakterij v inokulumu.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus*

#### 2.1.1 Klasifikacija

Leta 1967 sta Uchino in Doi izolirala aerobne sporogene bakterije iz termalnega izvira na Japonskem in jih objavila kot novo vrsto, ki naj bi bila sorodna bakterijem vrste *Bacillus coagulans*. Danes taksonomska uvrstitev teh izolatov ni mogoča, ker ti izolati niso bili shranjeni, vendar je opis njihovih morfoloških, fizioloških in biokemijskih lastnosti podoben bakterijam, ki jih danes imenujemo *Alicyclobacillus* (Wisotzkey in sod., 1992). Zdaj to odkritje velja za prvo izolacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

Nekaj let pozneje sta Darland in Brock (1971) izolirala bakterije iz vzorcev zemlje in vode, ki so bile po lastnostih zelo podobne tistim, ki sta jih izolirala Uchino in Doi. Na podlagi taksonomskega uvrščanja so jih klasificirali v novo vrsto *Bacillus acidocaldarius*. Poleg njihovih termofilno-acidofilnih lastnosti so te bakterije v celični membrani vsebovale hopanoid in enkratne aliciklične končne skupine v strukturi maščobnih kislin. Te značilne  $\omega$ -cikloheksilne maščobne kisline (slika 2-1) so glavna komponenta esencialnih maščobnih kislin teh organizmov. Ker so bile bakterije vrste *Bacillus acidocaldarius* izolirane izključno iz vročih in večinoma kislih okolij, so verjeli, da bodo te bakterije z nenavadnimi  $\omega$ -cikloheksilnimi maščobnimi kislinami striktno omejene na ta okolja (Darland in Brock, 1971).

Cerny in sodelavci (1984) so izolirali prve bakterije z  $\omega$ -cikloheksilnimi maščobnimi kislinami iz netermalnega okolja. Bakterije so bile izolirane iz pokvarjenega jabolčnega soka in bile tudi vzrok za kvarjenje. Prisotnost nenavadnih  $\omega$ -cikloheksilnih maščobnih kislin in hopanoida v membrani izoliranih bakterij je pomenila sorodnost med bakterijami vrste *B. acidocaldarius* in izolati iz jabolčnega soka. Vendar so bile te bakterije v nekaterih lastnostih drugačne kot bakterije vrste *B. acidocaldarius*, zato so jih imenovali *Bacillus acidoterrestris* (Deinhard in sod., 1987), ker so bile bakterije te vrste večinoma izolirane iz zemlje. »Acidoterrestris« pomeni, da je rad v kislem okolju in je izoliran iz zemlje. Bakterije vrst *B. acidocaldarius* in *B. acidoterrestris* se razlikujejo po uporabi spojin, ki vsebujejo ogljik.



Slika 2-1:  $\omega$  - aliciklične maščobne kisline razdeljene na:  $\omega$  - cikloheksilne in  $\omega$  - cikloheptilne maščobne kisline (Yokota in sod., 2007)

Pozneje so iz vzorcev zemlje izolirali še eno vrsto bakterij, ki so vsebovale  $\omega$ -aliciklične maščobne kisline, imenovali so jih bakterije vrste *Bacillus cycloheptanicus* (Deinhard in sod., 1987), ker so v svoji membrani vsebovale  $\omega$ -cikloheptilne maščobne kisline (slika 2-1). Bakterije vrste *B. cycloheptanicus* se od bakterij z  $\omega$ -alicikličnimi maščobnimi kislinami razlikujejo tudi po obligatni potrebi po hranilih metioninu, izolevcinu in pantotenski kislini.

Razlike med bakterijami vrst *B. acidocaldarius* in *B. acidoterrestris* in bakterijami vrste *B. cycloheptanicus* je pokazala tudi DNA-hibridizacija. Wisotzkey in sodelavci (1992) so s sekvenčno analizo 16S rRNA primerjali bakterije vrst *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* in *B. cycloheptanicus*. Primarne primerjave sekvenc 16S rRNA so pokazale, da sta vrsti *B. acidocaldarius* in *B. acidoterrestris* skoraj identični (98,8 %) in spadata v isti rod, medtem ko jima je vrsta *B. cycloheptanicus* manj podobna, od 93,2 % do 92,7 %. Proučili so tudi sekundarno strukturo 16S rRNA, ki pa se skoraj ni razlikovala med temi tremi vrstami bakterij *Bacillus* oziroma je bila skoraj identična, vendar pa se je razlikovala od sekundarne strukture 16S rRNA drugih vrst bakterij *Bacillus*.

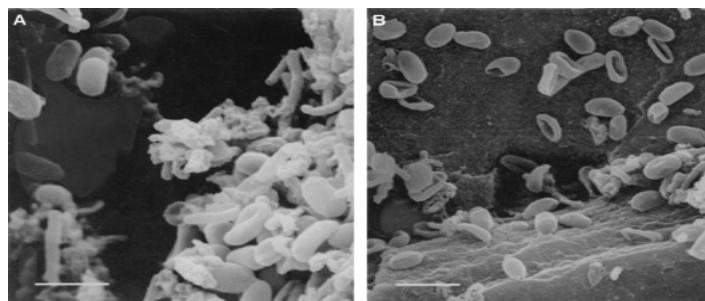
Na podlagi teh rezultatov so se Wisotzkey in sodelavci leta 1992 odločili, da se bakterije vrste *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* in *B. cycloheptanicus* preimenujejo v nov rod *Alicyclobacillus*. Kar nekaj časa so rod *Alicyclobacillus* predstavljale tri vrste, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* in *Alicyclobacillus cycloheptanicus*. Bile so vzrok za neprijeten vonj in kvarjenje pijač ne samo na Japonskem, ampak tudi drugod po svetu (Wissem in Parish, 1998; Eiroa in sod., 1999; Duong in Jensen, 2000; Walls in Chuyate, 2000).

Rezultat vse pogostejšega kvarjenja pijač je bilo vse več raziskav in s tem tudi identifikacij novih vrst in sevov bakterij rodu *Alicyclobacillus*: *A. acidoterrestris* (Deinhard in sod., 1987), *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* (Nicolaus in sod., 1998), *A. hesperidum* (Albuquerque in sod., 2000), *Alicyclobacillus* genomska vrsta I (Albuquerque in sod., 2000), *A. acidiphilus* (Matsubara in sod., 2002), *A. herbarius* (Goto in sod., 2002), *Alicyclobacillus* genomska vrsta II (Goto in sod., 2002), *A. sandaiensis* (Tsuruoka in sod., 2003), *A. pomorum* (Goto in sod., 2003), *A. vulcanalis* (Simbahan in sod., 2004), *A. tolerans* in *A. disulfidooxidans* (Karavaiko in sod., 2005).

Taksonomske raziskave na bakterijah rodu *Alicyclobacillus* so veliko pripomogle k boljši uvrstitvi teh bakterij v primerjavi s preteklostjo (Yokota in sod., 2007).

## 2.1.2 Morfologija

Vegetativne celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* so paličaste oblike s terminalnimi ali subterminalnimi endosporami (slika 2-2) in so približno 0,7–1 µm široke in 3–5 µm dolge. Združevanje celic v verige je redko in gibljivost teh bakterij je slaba. Celice se na začetku kultivacije obarvajo grampozitivno, pozneje na koncu kultivacije pa postanejo gramnegativne ali mešane. Velikost kolonij je odvisna od rastnega medija, dosežejo pa 2–5 mm, včasih tudi več. Oblika kolonij na trdem gojišču BAM (gojišče *Bacillus acidocaldarius* medium) je sevno variabilna, praviloma se oblikujejo okrogle kolonije, ki so bele do bež barve in s starostjo postajajo temnejše. Rast v trdo gojišče je omejena na približno 0,5–1 mm pod površino zaradi nizke koncentracije kisika (Yokota in sod., 2007).



Slika 2-2: Spore bakterij vrste *A. acidoterrestris*, kot so vidne pod SEM (Mallidis in Drizou, 1991); A – normalne spore, B – spore, uničene z visokim tlakom in temperaturo (207 MPa, 5 min, 45 °C).

### 2.1.3 Ekologija, fiziologija in biokemijske lastnosti

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* rastejo pri temperaturi 20–70 °C, njihov rastni optimum pa je pri temperaturah med 40 in 60 °C in pH med 2,0 in 6,0, optimalni pH pa je med 3,5 in 4,5. Rast je zmanjšana pri vrednostih temperature in pH zunaj optimuma. So striktni aerobi, čeprav lahko preživijo tudi v mikroaerofilnih razmerah, rast pa je inhibirana v okolju brez kisika. Zelo dobro izkoriščajo različne sladkorje, odvisno od vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* in proizvajajo kisline, vendar nikoli ne pride do tvorbe plinov (Goto in sod., 2003). Bakterije vrste *A. acidoterrestris* proizvajajo kisline iz glicerola, arabinoze, riboze, D-ksiloze, D-galaktoze, D-fruktoze, ramnoze, manitola, sorbitola,... (Goto, 2006). Prisotnost soli, organskih kislin, polifenolov in alkohola določenih koncentracij lahko odvisno od rastne faze celic inhibirajo njihovo rast (Yokota in sod., 2007). Bakterije rodu *Alicyclobacillus* niso patogene (Walls in Chuyate, 2000).

Bakterije vrste *A. acidocaldarius* lahko v primerjavi z drugimi vrstami bakterij rodu *Alicyclobacillus* živijo v najbolj ekstremnih razmerah (preglednica 2-1).

Preglednica 2-1: Temperaturna in pH območja za rast bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Karavaiko in sod., 2005; Goto in sod., 2003)

VRSTA	Temperaturno območje (°C)	Optimalna temperatura (°C)	pH območje	Optimalen pH
<i>A. acidocaldarius</i>	35–70	55–60	2,5–6,0	4,5–5,0
<i>A. acidoterrestris</i>	20–55	40–50	3,0–6,0	3,5–4,0
<i>A. acidiphilus</i>	20–55	50	2,5–5,5	3,0
<i>A. hesperidum</i>	35–60	50–53	2,5–5,5	3,5–4,0
<i>A. cycloheptanicus</i>	30–55	50	3,0–5,5	4,0

Najbolj značilna lastnost bakterij rodu *Alicyclobacillus* je prisotnost  $\omega$ -alicikličnih maščobnih kislin (slika 2-1) kot glavnih komponent celičnih membran (Poralla in Knig, 1983). Membrane bakterij vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. hesperidum* in *A. acidiphilus* so v glavnem sestavljeni iz  $\omega$ -cikloheksilnih maščobnih kislin (Matsubara in sod., 2002), medtem ko so  $\omega$ -cikloheptilne maščobne kisline glavna komponenta membran bakterij vrst *A. cycloheptanicus* in *A. herbarius* (Deinhard in sod., 1987).

Ta posebna komponenta membran naj bi varovala te bakterije v ekstremnih okoljih z visoko temperaturo in nizkim pH (Wisotzkey in sod., 1992). Zelo skupaj krožno razporejene ω-aliciklične maščobne kislina naj bi formirale zaščitni plasti celične membrane in tako prispevale k večji odpornosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

#### 2.1.4 Bakterije rodu *Alicyclobacillus* kot kvarljivci

Kvarjenje v kislih pijačah in kislih jedeh ni pogosto povezano z bakterijskimi sporami, prav tako je razvoj termofilnih sporogenih bakterij inhibiran z nizkim pH (Chang in Kang, 2004). Spore bakterij vrste *Clostridium botulinum*, ki lahko tvorijo nevarni toksin botulinum, se niso sposobne razviti in rasti ali tvoriti toksine v okolju s pH, nižjim od 4,6 (Blotcher, 1983). Prav tako bakterije vrste *Bacillus stearothermophilus*, pogoste termofilne bakterije, ki s kisanjem kvarijo živila, ne morejo rasti pod pH 5,3. Zato so vse vrste pasterizacijskih postopkov prirejene tako, da je stabilizacija sokov in nektarjev, ki imajo pH pod 4,5, usmerjena predvsem na uničenje plesni, kvasovk in nekaterih nesporogenih bakterij (Eiroa in sod., 1999). Naravno nizek pH sokov inhibira rast veliko vrst bakterij in je selektiven dejavnik za plesni in kvasovke. Pasterizacija in kontrolirani proces proizvodnje pa uničita temperaturno občutljive kvarljivce, kot so mlečokislinske bakterije, kvasovke in nekatere plesni (Chang in Kang, 2004). V tem procesu produkt segrevajo 15–20 s na temperaturo 82–84 °C. Pakiran izdelek pa dve minuti zadržujejo v hladilnem tunelu, dokler se ne ohladi (Solberg in sod., 1990). Čeprav lahko majhno število temperaturno odpornih plesni ta proces preživi in povzroči kvarjenje, naj bi sadni sokovi, ki so tako proizvedeni, ostali stabilni do konca roka uporabe (Chang in Kang, 2004).

Zadnji dve desetletji so bile s kvarjenjem v komercialno pasteriziranih sadnih sokovih povezane še termoacidofilne sporogene bakterije. Bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* je prvi dokumentiral Cerny s sodelavci v Nemčiji (1984) kot povzročitelje kvarjenja v jabolčnem soku. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so kasneje kot povzročitelje kvara našli tudi v Veliki Britaniji, Avstraliji, na Japonskem in v ZDA (Yamazaki in sod., 1996).

Najprej so bila kvarjenja, ki so jih povzročale bakterije rodu *Alicyclobacillus*, označena kot naključna, vendar je poročilo NFPA (National Food Processors Association) leta 1998 pokazalo, da je kvarjenje sadnih sokov, ki so ga povzročile te bakterije, zelo razširjeno (Walls in Chuyate, 1998). Rezultati tega poročila so pokazali, da je kar 35 % proizvajalcev sadnih sokov že imelo opravka s kvarjenjem, ki so ga povzročile bakterije rodu *Alicyclobacillus*. Kvarjenje se je največkrat pojavilo v zgodnjem pomladi ali poleti in najpogosteje v jabolčnem soku, drugih vrstah sokov in tudi v narezanih konzerviranih paradižnikih. Te bakterije preživijo v kislem mediju pri pH od 3,5 do 5,3 in temperature pasterizacije. Kvarjenje se kaže kot neprijeten vonj in aroma, z motnostjo ali brez nje, proizvajalci pa ga največkrat ne opazijo, dokler ne dobijo reklamacije s strani kupcev.

Splitstoesser in sodelavci (1996) so proučili vrsto različnih komercialnih pijač in njihovo dovzetnost za kvarjenje z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*. Jabolčni in paradižnikov sok sta zelo občutljiva za kvarjenje, povzročeno z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*. Mešanica jabolčnega, pomarančnega in ananasovega soka (pH 2,9, 14,8 °Brix), sok grenivk (pH 3,2, 10,4 °Brix), pomarančni (pH 3,6, 12,0 °Brix) in ananasov sok (pH 3,3, 13,4 °Brix) so bili občutljivi

za kvarjenje, povzročeno z vsaj eno vrsto bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Brusnični sok (pH 2,4, 14 °Brix), mešanica jabolčnega in grozdnega soka (pH 2,8–3,7, 12,2–14,8 °Brix), mešanica jabolčnega, grozdnega in češnjevega soka (pH 3,7, 12,4 °Brix) in slivov sok (pH 3,7, 18,8 °Brix) pa niso bili ugodni za rast bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Vodna aktivnost je pomemben rastni dejavnik za bakterije rodu *Alicyclobacillus*, rast je bila inhibirana šele, ko je bila presežena koncentracija sladkorja 18 °Brix. Koncentracija etanola je zavirala rast, ko je bila presežena šestodstotna vsebnost etanola, kar vključuje tudi namizna vina (Splittstoesser in sod., 1996).

Velika razširjenost bakterij rodu *Alicyclobacillus* v jabolčnih sokovih je vredna pozornosti že zaradi velike potrošnje te vrste sokov, ki je kar 24 % med sadnimi sokovi (Doores, 1983). Kvarjenje, povzročeno s temi bakterijami, pa je lahko zelo velik strošek za proizvajalce. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* zato pomenijo nov izziv za živilsko industrijo.

Kvarjenje se kaže predvsem kot neprijetna aroma in vonj. Sokovi se pokvarijo veliko pred rokom uporabe in ne kažejo nobenih očitnih znakov kvarjenja kot na primer napihovanje embalaže, ker se plini se ne sproščajo (Brown, 1995). Odpornost proti pasterizaciji, nizkemu pH in sposobnosti tvorjenja neprijetnih arom je mnoge raziskovalce spodbudila, da so začeli iskati druge rešitve v kontroli kakovosti pijač (Chang in Kang, 2004).

Med vzroki za kvarjenje sokov z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* sta navedeni primarna in sekundarna mikroflora in voda (Chang in Kang, 2004). Sadje kot surovina za sokove bi lahko bilo kontaminirano s primarno mikrofloro, ki je večinoma na površini sadja. Sekundarna mikroflora so predvsem mikroorganizmi v zemlji, prahu, dežju, na insektih, ptičih in glodavcih. Bakterije vrste *A. acidoterrestris* so zlasti v zemlji, zato lahko pridejo med proizvodnjo s površine neopranega ali slabo opranega svežega sadja. Tudi voda je lahko vzrok kontaminacije sokov, McIntyre in sodelavci (1995) so namreč iz vode izolirali bakterije vrste *A. acidoterrestris*.

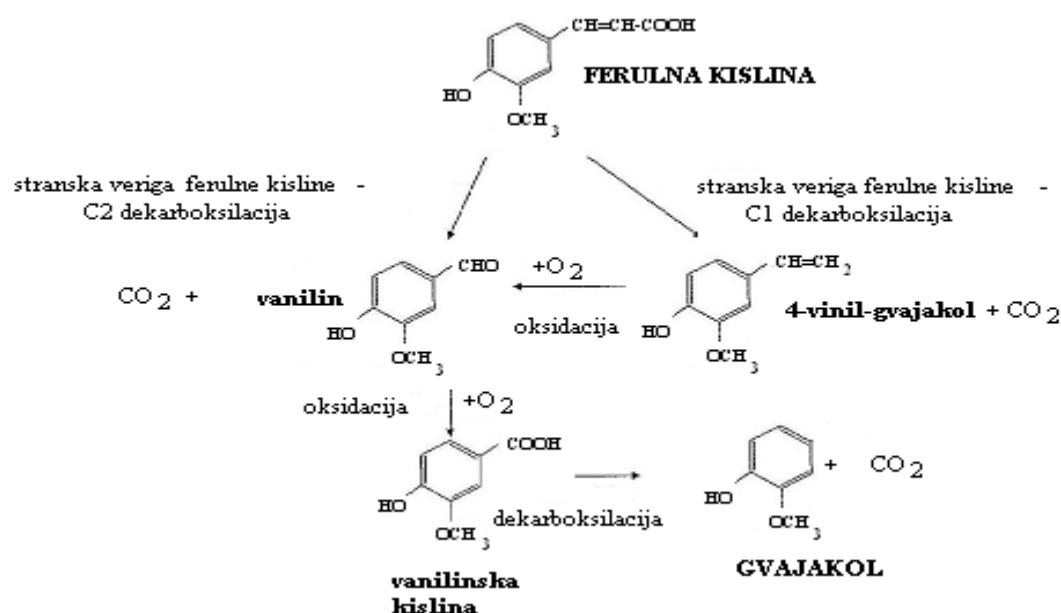
Bakterije rodu *Alicyclobacillus* kot termofilne bakterije ne rastejo pod temperaturo 20 °C. Študije so pokazale, da skladiščenje komercialnih pasteriziranih sadnih sokov na temperaturah pod 20 °C prepreči germinacijo spor in s tem kvarjenje. Vendar so pasterizirani sadni sokovi večinoma transportirani in skladiščeni pri sobni temperaturi, zato bi hlajenje teh izdelkov pomenilo še dodaten velik strošek. Druga možnost, da bi temperaturo pasterizacije povišali na sterilizacijsko, nad 100 °C, ni mogoča. Ta ekstremna temperatura, ki bi sicer inaktivirala tudi spore bakterij *Alicyclobacillus*, bi hkrati povzročila tvorbo nesprejemljivih organoleptičnih lastnosti produkta (Jensen in Whitfield, 2003).

Neprijetne arome, ki so posledica aktivnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*, lahko razdelimo v dve skupini (Chang in Kang, 2004): gvajakol (Pettipher in sod., 1997) in halofenole, med katere spadata 2,6-dibromofenol (2,6-DBP) in 2,6-diklorofenol (2,6-DCP) (Baumgart in sod., 1997).

#### 2.1.4.1 Gvajakol

Gvajakol (2-metoksifenol) je aromatska spojina, ki je lahko v živilih zaželena ali nezaželena. Zaradi svoje arome po dimu in zažganem je zelo razširjen in uporabljen kot komponenta sintetičnih arom v proizvodnji živil, kot so pražena živila: kava in ječmenov slad (Chang in Kang, 2004). Bolj je gvajakol poznan kot neprijetna aroma vin, sadnih sokov, čokoladnega sladoleda in vanilijevega jogurta. V vseh primerih, kjer je bil gvajakol povzročitelj neprijetne arome, je nastal kot posledica kvarjenja in bil identificiran kot metabolit mikrobnega delovanja (Chang in Kang, 2004).

Springett (1996) je ugotovil, da je vzrok neprijetne arome zaradi gvajakola v vzorcih sadnega soka metabolična aktivnost bakterij vrste *A. acidoterrestris*, ki najprej s svojimi encimi razgradijo lignin do ferulne kisline in nato naprej do gvajakola. Nastanek gvajakola iz lignina je prikazan na sliki 2-3.



Slika 2-3: Poenostavljena shema nastanka gvajakola iz ferulne kisline z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* (Chang in Kang, 2004)

Dejavniki, ki vplivajo na bakterije rodu *Alicyclobacillus*, da tvorijo gvajakol, so:

**Koncentracija bakterij rodu *Alicyclobacillus*:** Pettipher in sodelavci (1997) so ugotovili, da je bil v pomarančnem in jabolčnem soku zaznan gvajakol pri koncentraciji bakterij vrste *A. acidoterrestris*  $10^5$  cfu/ml. Komitopoulou in sodelavci (1999) so dobili podobne rezultate.

Bakterije vrste *A. acidoterrestris*, ki so jih dodali v jabolčni, pomarančni in grozdni sok ter ga shranili na  $30^\circ\text{C}$ , so se namnožile za več kot štiri log enote, da so dosegle stacionarno fazo pri  $10^6$ - $10^7$  cfu/ml po osmih dneh. V vseh primerih so zaznali gvajakol že po štirih dneh, ko je populacija dosegla  $10^5$  cfu/ml.

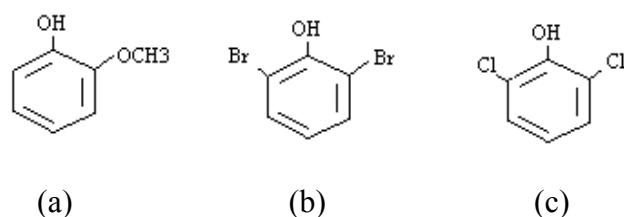
**Temperatura skladiščenja:** Pettipher in sodelavci (1997) so ugotavljali razlike med inkuliranimi in neinkuliranimi jabolčnimi sokovi, skladiščenimi pri 21 in 37 °C. Največje razlike med naravno kontaminiranimi in inkuliranimi vzorci so bile pri vzorcih, skladiščenih pri 37 °C. Hitrost reakcije nastanka gvajakola je naraščala z naraščanjem temperature inkubacije.

**Temperaturni šok:** Za nastanek gvajakola je potrebna prisotnost vegetativnih celic bakterij rodu *Alicyclobacillus*. S procesom aktivacije so spodbudili germinacijo spor (Keynan in Evenchik, 1969). Najbolj uporabljeni metoda aktivacije je izpostavitev temperaturam, ki so malo pod temperaturo uničenja. Splitstoesser in sodelavci (1998) so ugotovili 100-odstotno rast nastanka gvajakola, ko so bile spore izpostavljene temperaturnemu šoku 60 °C za 30 minut. To metodo bi lahko uporabili za pospeševanje tvorbe gvajakola in tako ugotovili okužbo z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*.

Gvajakol tvorijo poleg *A. acidoterrestris* tudi druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*: *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, *Alicyclobacillus* sp.2 in *A. hesperidum* subsp. *aigle*. Vendar bakterije vrste *A. acidoterrestris* tvorijo največ gvajakola (Chang in Kang, 2004).

#### 2.1.4.2 Halofenoli

Bakterije vrste *A. acidoterrestris* tvorijo tudi halofenole (slika 2-4), ki so tako kot gvajakol nezaželene aromatske spojine v nekaterih živilih (Jensen in Whitfield, 2003). 2,6-dibromofenol organoleptično zaznamo že pri koncentraciji 0,5 ng/l, 2,6-diklorofenol pa pri koncentraciji 6,2 ng/l. V pokvarjenih sadnih sokovih so halofenoli prisotni tudi v 1000x manjših koncentracijah kot gvajakol, vendar še vedno v več kot 10x večjih koncentracijah od meje zaznave. Bakterije vrste *A. acidoterrestris* so začele tvoriti 2,6-dibromofenol v sadnem soku že po 24-urah inkubacije pri 45 °C. Poleg 2,6-dibromofenola in 2,6-diklorofenola tvorijo tudi halofenole 2,4-dibromofenol, 2,4-diklorofenol in 2,4,6-triklorofenol, vendar so bile njihove koncentracije, ki so jih določili v pokvarjenih sadnih sokovih pod mejo zaznave. Do zdaj še ni bilo dokazano, da bi poleg bakterij vrste *A. acidoterrestris* še katera druga vrsta bakterij rodu *Alicyclobacillus* tvorila halofenole (Jensen in Whitfield, 2003).



Slika 2-4: Strukturne formule spojin, ki povzročajo neprijetne arome: (a) gvajakol, (b) 2,6-dibromofenol, (c) 2,6-diklorofenol (Yokota in sod., 2007)

## 2.2 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Rastline, zelišča in začimbe ter njihova eterična olja oziroma ekstrakti vsebujejo veliko število spojin, ki zavirajo metabolične aktivnosti bakterij, kvasovk in plesni. Številne spojine med njimi še niso povsem raziskane (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a).

Wilkins in Board (1989) sta objavila, da je poznanih več kot 1340 rastlin, ki so potencialen vir protimikrobnih spojin. Te protimikrobne spojine so v eteričnih oljih ali ekstraktih iz listov (rožmarin, žajbelj), cvetov ali cvetnih popkov (cimet), čebulic (čeba, česen), sadežev (poper, kardamom) in drugih delov rastlin (Nychas, 1995, Shelef, 1983).

V rastlinah, začimbah in zeliščih, so spojine s protimikrobnim delovanjem: fenolne spojine, terpeni, alifatski alkoholi, aldehydi, ketoni, kisline in izoflavoni. Njihova protimikrobra aktivnost je odvisna od kemijske strukture in koncentracije (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a). Enostavni in kompleksni derivati fenolov so glavne protimikrobne spojine v eteričnih oljih začimb, to so borneol, cineol, camfor,  $\alpha$ -pinen in borniol acetat (Shelef, 1983). Glavne protimikrobne snovi v ekstraktih rožmarina pa so fenolne spojine karnozolna kislina, karnozol in rožmarinska kislina (Romano in sod., 2009).

Raziskave protimikrobne aktivnosti začimb je zelo težko primerjati, ker so postopki analiz različni. Večina teh raziskav testira različne ekstrakte začimb ali kar naravne začimbe na različnih bakterijah. Njihove inhibitorne koncentracije so težko primerljive, ker so začimbe naravni produkt z različnimi vsebnostmi aktivnih komponent. V teh raziskavah večinoma ugotavlja, ali imajo določene začimbe protimikrobo aktivnost ali ne. Zaradi številnih metod za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti je tudi njihove rezultate kvantitativno težko primerjati (Zaika, 1988, Davidson in Parish, 1989).

Furag in sodelavci (1989) so odkrili povezavo med spojinami z aromatskim obročem in polarno stransko skupino, ki jih začimbe vsebujejo, in protimikrobo aktivnostjo. Večje protimikrobo delovanje so imele začimbe, ki so vsebovale fenolne spojine z -OH skupinami.

Sofos in sodelavci (1998) so ugotovili, da ekstrakt rožmarina občutno inhibira rast bakterij vrste *Staphylococcus aureus* že pri 0,1 % ekstrakta v raztopini. Tudi Pandit in Shelef (1994) sta ugotovila, da rožmarin in nageljne žbice protimikrobo učinkujejo in sicer na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* že pri koncentracijah manj kot 1 %. Komponenta eteričnega olja rožmarina, ki je protimikrobo delovala na te bakterije, je bila  $\alpha$ -pinen. Del Campo in sodelavci (2000) pa so dokazali, da je med vsemi fenolnimi spojinami v ekstraktu rožmarina, karnozolna kislina imela največji protimikrobo učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Karnozol in ursolno kislino, ki so ju izolirali iz rožmarina in imata antioksidativno aktivnost, so testirali na šestih sevih bakterij, ki so kvarljivci živil, in kvasovkah (Tainter in Grenis, 2001). Njuno protimikrobo aktivnost so primerjali z umetnima antioksidantoma BHA (butiliran hidroksianizol) in BHT (butiliran hidroksitoluen). Čisti karnozol in ursolna kislina sta bila pri nižjih koncentracijah učinkovitejša od ekstrakta rožmarina, prav tako je bil karnozol učinkovitejši kot BHA in BHT ter ursolna kislina učinkovitejša kot BHT.

Tudi pri tej raziskavi so prišli do zaključka, da je protimikroben učinek odvisen od –OH skupin, ki so vezane na C-atome teh dveh fenolnih spojin.

Romano in sodelavci (2009) so primerjali protimikroben delovanje ekstrakta rožmarina, BHA, BHT in benzojske kislino na bakterije vrst *E. coli* in *S. aureus*. Ekstrakt rožmarina je vseboval 30 % karnozolne kislino in 5 % rožmarinske kislino, kar so ugotovili s HPLC. Ekstrakt rožmarina je imel večji protimikroben učinek kot BHT in kot benzojska kislina, medtem ko je imel podoben učinek kot BHA na obe vrsti bakterij. MIC za bakterije vrste *S. aureus* so bile v padajočem zaporedju: BHA < ekstrakt rožmarina < benzojska kislina < BHT. Za bakterije vrste *E. coli* so bile vrednosti MIC: BHA < ekstrakt rožmarina < benzojska kislina = BHT. Najmanjši protimikroben učinek na inhibicijo obeh vrst bakterij je imel BHT. Ekstrakt rožmarina je imel večji učinek na grampozitivne bakterije vrste *S. aureus* kot na gramnegativne bakterije vrste *E. coli*.

## 2.3 MEHANIZMI PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA EKSTRAKTOV

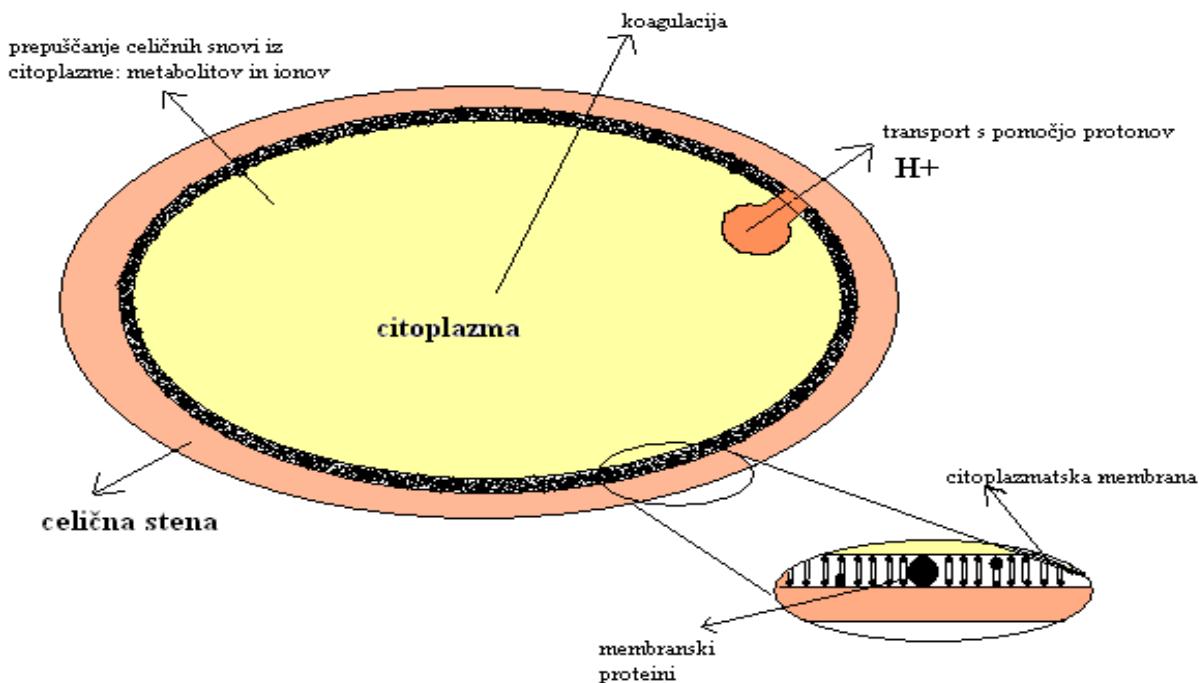
Raziskave so pokazale, da imajo nekateri ekstrakti začimb široko območje protimikrobnega delovanja, medtem ko drugi ekstrakti protimikroben delujejo samo na specifične skupine mikroorganizmov. Na primer samo na bakterije ali samo na grampozitivne ali gramnegativne bakterije (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a).

Rastlinski ekstrakti vplivajo na različne biokemične in/ali metabolične funkcije v celici, kar kaže na to, da ima vsaka aktivna komponenta, ki jih sestavlja, svoje specifično delovanje ozziroma tarčno mesto na celici (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a).

Protimikroben učinek ekstraktov je zato odvisen od kemijske sestave prisotnih aktivnih komponent, razmerja aktivnih komponent in interakcije med njimi. Med aktivnimi komponentami prihaja do medsebojnega vpliva, ki ima lahko za rezultat boljše (sinergistično) ali slabše (antagonistično) protimikroben delovanje ekstrakta, kot ga ima njegova glavna protimikrobra snov. Protimikroben delovanje rastlinskih ekstraktov zato ni enako protimikrobnemu delovanju čistih izoliranih snovi. Zaradi velikega števila različnih skupin aktivnih komponent v eteričnih oljih so tudi mehanizmi njihovega protimikrobnega delovanja različni (Burt, 2004).

Mehanizmi delovanja aktivnih komponent ekstraktov na bakterijsko celico (Burt, 2004):

- degradacija celične stene
- poškodbe citoplazemske membrane
- poškodbe membranskih proteinov
- prepuščanje celične vsebine
- koagulacija proteinov citoplazme
- oviranje transporta s pomočjo protonov



Slika 2-5: Tarčna mesta in mehanizmi protimikrobnega delovanja aktivnih komponent rastlinskih ekstraktov v bakterijski celici (Burt, 2004)

Aktivne komponente s protimikrobnim delovanjem v ekstraktih rožmarina so tudi fenolne spojine. Učinek fenolnih spojin je odvisen od koncentracije. Nizke koncentracije fenolnih spojin vplivajo na encimsko aktivnost, še zlasti na aktivnost tistih encimov, ki so pomembni pri nastanku energije v celici. Višje koncentracije fenolov pa povzročijo denaturacijo proteinov v celični membrani (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a). Fenolne spojine imajo vpliv na permeabilnost celične membrane, tako da ta začne v okolje prepuščati makromolekule, kar je za celico usodno (Burt, 2004). Lahko tudi vplivajo na membranske proteine, tako da spremenijo njihovo strukturo in s tem uničijo njihovo funkcionalnost. Ko fenolne spojine pridejo v celično membrano, se vežejo z membranskimi encimi in proteini in s tem ovirajo tok protonov, kar zmanjša celično aktivnost (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 a). Fenolne spojine lahko denaturirajo encime, ki so odgovorni za razvoj spor, ali pa reagirajo z aminokislinami, ki so pomembne za razvoj spor (Nychas, 1995).

Protimikrobeni učinek ekstraktov lahko še povečamo z nizko vrednostjo pH, nizko  $a_w$  vrednostjo, nižjo koncentracijo kisika, povečano temperaturo in povečanim tlakom (Burt, 2004).

## 2.4 ROŽMARIN

Rožmarin (slika 2-6) spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*), razširjeno v vseh podnebnih območjih, še zlasti v Sredozemlju in srednji Aziji. To so eno- ali večletna zelišča, polgrmi ali grmi, najbolj znane rastline te družine so: rožmarin, žajbelj, timijan, origano, sivka, poprova meta, melisa, majaron, bazilika, šatraj in navadna črnoglavka. Približno 500 vrst iz te družine zaradi svojih lastnosti uporablajo v tradicionalni medicini. Ustnatice vsebujejo veliko fenolnih spojin (Rižner Hraš, 2000).

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis L.*) je med 0,5 in dva metra visok, zimzelen, gostolisten grm. Suličasti listi so ozki, do tri centimetre dolgi in po vejicah razporejeni v vretencih, zgoraj temnozeleni, spodaj volnato dlakavi in belkasti. Ima grozdom podobne, bledo modre ali bledo vijoličaste, približno centimeter dolge, v šopih razporejene cvetove. Pri nas cveti od februarja do oktobra.

Raste predvsem na apnenčastih in peščenih tleh pri pH prsti med 4,5 in 8,7. Samoniklo pa uspeva predvsem na sončnih in kamnitih mestih južne Primorske in Istre. Uspeva pri temperaturah med 9 in 28 °C in ni odporen proti mrazu, odporen je proti suši, če ima vsaj 20 centimetrov prsti v globino. Škodljivcev in bolezni rožmarin nima (Berglez, 2002).

V Evropi ga že stoletja gojijo kot dišavo. V komercialne namene uporablajo kultiviran in divji rožmarin. Liste sušijo v senci, da ohranijo več barvnih in aromatskih komponent, sušijo ga lahko tudi z zmrzovanjem, vendar se pri tem postopku izgubi nekaj barvnih komponent. Glavni proizvajalci rožmarina so sredozemske države, ZDA in Velika Britanija (Berglez, 2002).



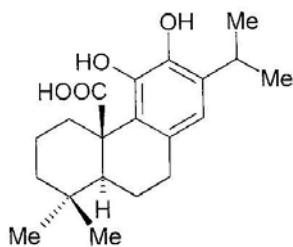
Slika 2-6: Rožmarin (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000)

Rožmarin vsebuje naslednje spojine (preglednica 2-2) (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000):

1. **eterično olje** (posušeni listi vsebujejo med 1,5 in 2,5 % eteričnega olja, katerega glavne sestavine so  $\alpha$ -pinen, kafra in cineol, ki so tudi glavne protimikrobne spojine eteričnega olja).

## 2. **diterpenske fenole**

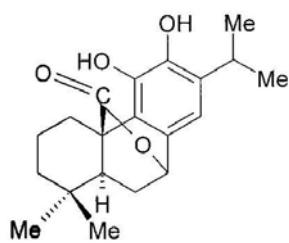
- **karnozolna kislina**



Slika 2-7: Strukturna formula karnozolne kisline (Rižner Hraš, 2000)

Karnozolna kislina (slika 2-7) je diterpenski fenol, v naravi jo najdemo v nekaterih rastlinah iz družine ustnatic, predvsem v rožmarinu in žajblju. Vsebnost karnozolne kisline v posušenih rožmarinovih listih je 2–7 %, odvisna pa je od številnih dejavnikov, kot so izpostavljenost termičnemu stresu in suši, koncentracija CO<sub>2</sub> v zraku, sezonske podnebne spremembe, način sušenja, časa obiranja in gnojenja. Nastaja v plastidih rožmarina. Karnozolna kislina je topna v metanolu, etanolu, acetonu in deloma v vodi. Je zelo učinkovit antioksidant, deluje kot donator vodikovega atoma iz hidroksilne skupine lipidnemu radikalu in tako prepreči verižno reakcijo. Antioksidativna učinkovitost je višja kot pri sintetičnih antioksidantih BHA, BHT in PG. Deluje protimutageno, protikarcenogeno in protimikroben ter ima zelo ugoden vpliv na človekovo zdravje. Za izolacijo karnozolne kisline iz rastlin se uporablja ekstrakcija s superkritičnim ogljikovim dioksidom (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).

- **karnozol**



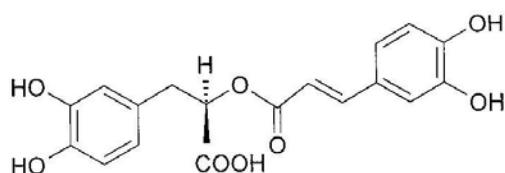
Slika 2-8: Strukturna formula karnozola (Rižner Hraš, 2000)

Karnozolna kislina je dokaj nestabilna, zato pri procesu oksidacije nastanejo njeni derivati z  $\gamma$ - (rožmanol, epirožmanol) in  $\delta$ - (karnozol) laktionsko strukturo. Karnozol (slika 2-8) je fenolni diterpenski  $\delta$ -lakton, ki ga najdemo v rožmarinu in žajblju. Čisti karnozol je v obliki

brezbarvnih igličastih kristalov brez vonja in okusa. Njegova koncentracija v rožmarinu je približno desetkrat nižja od koncentracije karnozolne kisline, iz njega pa je mogoče karnozol izolirati z ekstrakcijami z organskimi topili ali uporabo superkritične fluidne ekstrakcije (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).

### 3. fenolne kislina

- **rožmarinska kislina**



Slika 2-9: Strukturna formula rožmarinske kisline (Rižner Hraš, 2000)

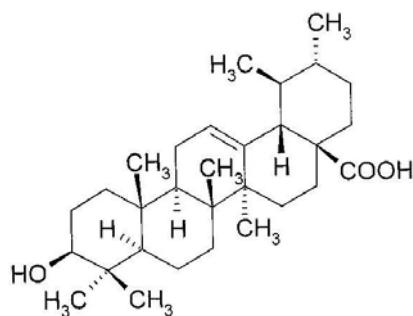
Rožmarinska kislina (slika 2-9) je dimer kavne kisline. Vsebnost rožmarinske kisline v rastlinah je med 0,07 in 0,84 %. Razen v rožmarinu jo najdemo tudi v melisi, žajblju, timijanu, origanu, majaronu, baziliki, šetraju in meti. Čista rožmarinska kislina je v obliki belega prahu, je dobro topna v vodi ter deluje antioksidativno predvsem v vodnih medijih in emulzijah. Uporablja se predvsem za stabilizacijo sadnih sokov, kjer upočasni porjavitev rdečega pigmenta. Poleg antioksidativnega delovanja deluje tudi protivnetno, protivirusno in protibakterijsko (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).

### 4. druge organske kislina (askorbinska in nikotinska kislina)

### 5. flavone

### 6. triterpenske kisline

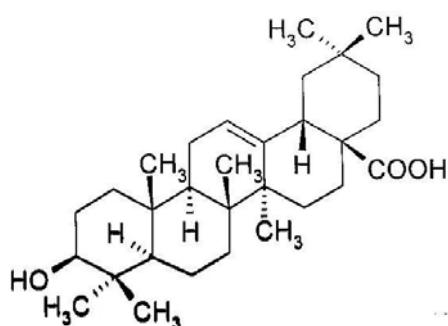
- **ursolna kislina**



Slika 2-10: Strukturna formula ursolne kisline (Rižner Hraš, 2000)

Ursolna kislina (slika 2-10) je triterpenska kislina, ki je kot prosta kislina ali aglikon za triterpenske saponine v številnih rastlinah, kot so rožmarin, sivka, origano, borovnice, ter v vrhnjem voščenem olupu jabolk in češenj. Rožmarin je vsebuje okrog 5 %. Je relativno slab antioksidant, deluje pa protimikrobeno. Uporablja se kot emulgator v farmacevtski, kozmetični in živilski industriji (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).

• **oleanolna kislina**



Slika 2-11: Strukturna formula oleanolne kisline (Rižner Hraš, 2000)

Oleanolna kislina (slika 2-11) je izomer ursolne kisline in je praviloma v rastlinah skupaj z njo. Ima podobno delovanje kot ursolna kislina. Vsebnost oleanolne kisline v rožmarinu je 10 %. V vodi ni topna (Berglez, 2002; Rižner Hraš, 2000).

7. **druge triterpene** (betulin,  $\alpha$ - in  $\beta$ -amirin)
8. **steroide** (fitosteroli,  $\beta$ -sitosterol)
9. **lipide** (v vosku je 97 % alkanov in 2,3 % alifatskih in cikličnih alkenov)
10. **ogljikove hidrate** (kislinsko labilni polisaharidi, prosti monosaharidi, alkalno stabilni polisaharidi)

Rožmarin oziroma njegovi ekstrakti, eterična olja in nekatere komponente, predvsem karnozolna kislina, karnozol, ter ursolna, oleanolna in betulinska kislina se zaradi svojega protimikrobnega, protivnetnega, protivirusnega in protimutagenega delovanja veliko uporablja tudi v medicini (Berglez, 2000).

**Preglednica 2-2: Fizikalno-kemijske karakteristike ekstrakta Ros.con (Berglez, 2002)**

Karakteristika	Enota	Rezultat
Karnozolna kislina	%	24,1
Karnozol	%	3,86
Ursolna kislina	%	10,2
Oleanolna kislina	%	6,1
Betulinska kislina	%	4,7
Rožmarinska kislina	%	< 0,1
Eterično olje (R )-(+)-limonen	ml/kg	1,76
Cineol	ppm	72
(+)-kafra	ppm	990
(+)-kafra	ppm	186
Kalorična vrednost ekstrakta	J/g	34,027
Vodna aktivnost (20 °C)		0,39
Vлага (105 °C, do konst. mase)	%	0,61
Motnost (0,1% v rastl. olju)	/	10,1
Baker	ppm	1,38
Svinec	ppm	0,32
Kadmij	ppm	< 0,01
Cink	ppm	1,72
Žarilni ostanek (550 °C)	%	0,36

## 2.5 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

Metode za *in vitro* določanje protimikrobnega delovanja delimo na difuzijske in razredčevalne ter metode spremljanja kinetike mikrobne rasti (Burt, 2004).

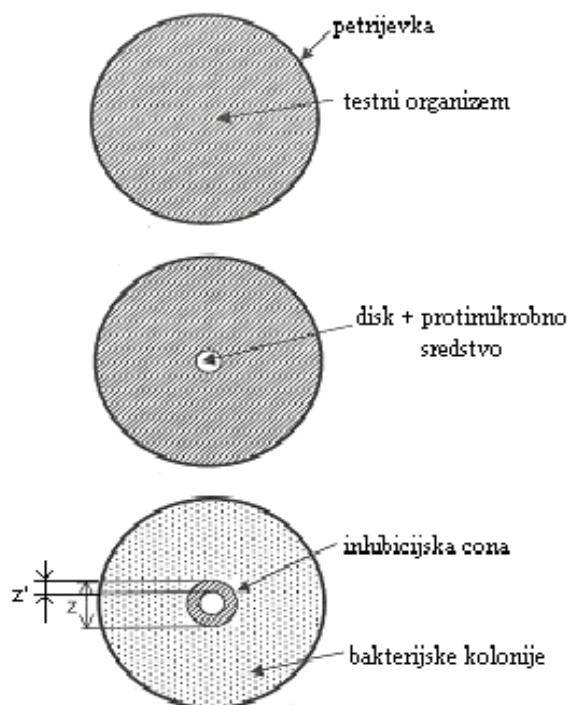
Na končne rezultate metod vplivajo mnogi dejavniki: metoda ekstrakcije protimikrobnih snovi iz rastlin, volumen inokuluma, faza rasti, uporabljeno gojišče, pH gojišča, čas inkubacije in temperatura. Najpogosteje uporabljeno merilo za določanje protimikrobnega učinka snovi v raziskavah je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), katere definicija se v raziskavah med avtorji razlikuje. Rezultate različnih raziskav za ugotavljanje protimikrobnega delovanja snovi je zato težko primerjati med seboj. Za določanje protimikrobnega delovanja snovi se uporablja tudi minimalna baktericidna koncentracija (MBC) (Burt, 2004).

### 2.5.1 Metoda difuzije v trdem gojišču

Metoda difuzije v trdem gojišču je najpogosteje uporabljeni metoda za ugotavljanje protimikrobnih aktivnosti snovi, od kar obstaja direktna povezava med izmerjeno inhibicijsko cono in MIC (Woods in Washington, 1999). Je lahko izvedljiva in se uporablja za ugotavljanje občutljivosti bakterijskih sevov za protimikrobna sredstva in določanje protimikrobnega delovanja novih protimikrobnih sredstev (Dorman in Deans, 2000).

Pri tej metodi se protimikroben snov doda na papirnat disk, ki je nameščen na trdem gojišču, v katerem je preiskovana mikrobna kultura. Snov difundira v gojišče in obseg inhibicije se pokaže kot cona brez mikrobne rasti okrog diska (Barry, 1986).

Raztopina s protimikroben snovjo naj ne bi bila preveč hidrofobna, saj tako ne bi difundirala in bi bil rezultat lažno negativen. Testni organizem mora rasti hitro in po celiem gojišču. Ta metoda naj se ne bi uporabljala pri anaerobnih mikroorganizmih. Petrijevke morajo biti prekrite s trdim gojiščem, z debelino vsaj 4 mm, površina trdega gojišča pa naj bo enakomerno premazana s kulturo testnega mikroorganizma ( $10^6$  cfu/ml) (Piddock, 1990). Petrijevke nato inkubiramo v optimalnih razmerah 16–24 ur. Inhibicijsko cono okrog diskov izmerimo tako, da izmerimo polmer  $Z'$  od konca diska do konca cone (slika 2-12).



Slika 2-12: Določanje inhibicijskih con z difuzijo v trdem gojišču (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005)

Rezultati metode difuzije v trdem gojišču z diskami so kvalitativni, občutljivost testnega mikroorganizma pa se kaže z velikostjo inhibicijske cone (mm) okrog diska (Parish in Davidson, 1993), in sicer z večanjem inhibicijske cone, narašča protimikroben učinkovitost dodane snovi. Metoda je tehnično lahko izvedljiva in dobro ponovljiva, vendar so za določanje MIC druge metode primernejše (Woods in Washington, 1999, Lopez-Malo Vigil in sod., 2005 b).

Nekatere definicije MIC, določene z metodo difuzije v trdem gojišču (slika 2-13):

- MIC je najnižja koncentracija protomikrobne snovi, ki inhibira rast bakterij na gojišču z dodano protomikrobno snovjo (Cannilac in Mourey, 2003).
- MIC je koncentracija, pri kateri ni vidne rasti bakterij na gojišču (Delaquis in sod., 2002).
- MIC je najnižja koncentracija protomikrobne snovi, pri kateri se po inkubaciji naredi dobro vidna inhibicijska cona (Nedorostova in sod., 2009).
- MIC je koncentracija, pri kateri je inhibicijska cona vzorca za 1–3 mm večja kot inhibicijska cona topila (Proestos in sod., 2006).



Slika 2-13: Inhibicijske cone pri metodi difuzije v trdem gojišču

### 2.5.2 Metoda razredčevanja v tekočem ali trdnem gojišču

Metoda razredčevanja v tekočem ali trdem gojišču je zelo uporabna in zanesljiva referenčna metoda za določanje učinkovitosti protomikrobne snovi in se navadno uporablja, kadar so potrebni kvantitativni podatki. Na primer za ugotavljanje mikrobicidnega učinka protomikrobne snovi ter za anaerobne in mikroaerofilne mikroorganizme (Barry, 1986). Ta metoda je fleksibilna in uporabna tudi za določanje vpliva različnih razmer okolja na aktivnost protomikrobne snovi. Podobno kot metoda difuzije v trdem gojišču je lahko izvedljiva, fleksibilna in dobro ponovljiva.

Tudi pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču se za določitev protomikrobnega delovanja snovi določa MIC in MBC.

Nekatere definicije MIC, določene z metodo difuzije v trdem gojišču, so:

- MIC je najnižja koncentracija protomikrobne snovi, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost inokuluma (Carson in sod., 1995).

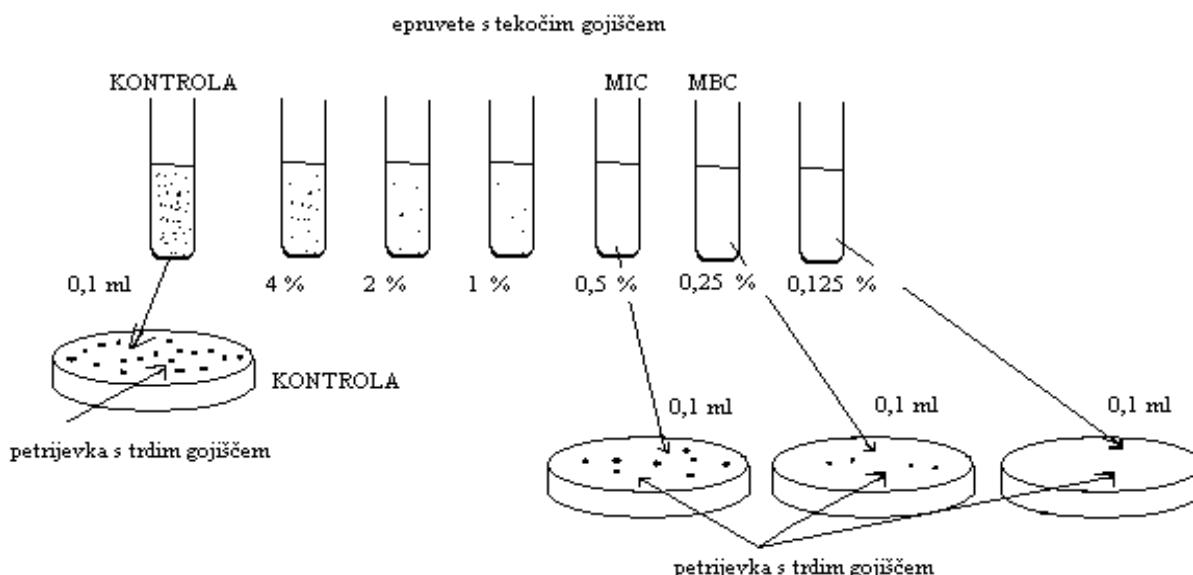
- MIC je najnižja koncentracija, ki povzroči značilno znižanje živosti izbranega mikroorganizma ( $> 90\%$ ) (Consetino in sod., 1999).
- MIC je najnižja koncentracija protimikrobne snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur (Cannilac in Mourey, 2001).

Nekatere definicije MBC, določene z metodo difuzije v trdem gojišču, so:

- MBC je najnižja koncentracija protimikrobne snovi, pri kateri po 24-urni inkubaciji preživi 0,1 % bakterij (Cannilac in Mourey, 2001).
- MBC je najnižja koncentracija, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti (Onawunmi, 1989).

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču (slika 2-14) protimikrobeno snov serijsko razredčimo s topilom. Protimikrobna sredstva navadno testiramo pri dvakratnih serijskih razredčitvah. Posamezno koncentracijo protimikrobne snovi dodamo v epruveto s tekočim gojiščem, v katerega smo pred tem že dodali kulturo bakterij, približno  $10^5$  cfu/ml (Piddock, 1990). Naredimo tudi kontrolo, tako da v tekoče gojišče s kulturo bakterij ne dodamo protimikrobne snovi, ampak sterilno destilirano vodo. Epruvete s suspezijami inkubiramo 16 do 24 ur pri optimalni temperaturi testnega mikroorganizma. Število preživelih mikroorganizmov določimo z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču lahko izvedemo tudi na mikrotitrskih ploščicah (Davidson in Parish, 1993).

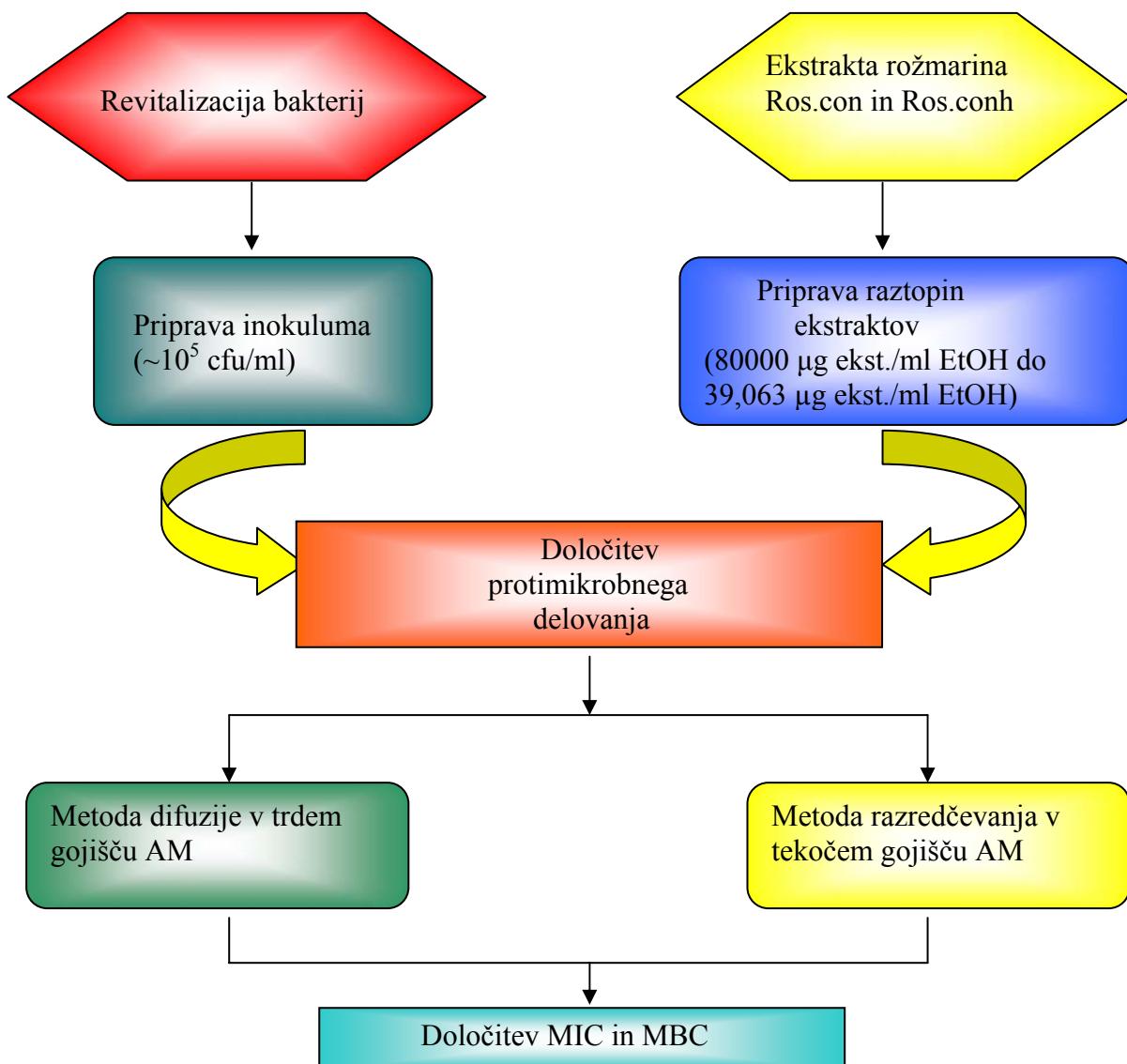


Slika 2-14: Prikaz postopka metode razredčevanja v tekočem gojišču (Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 b)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil proučiti protimikroben učinkovitost ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Primerjalno smo protimikroben učinek ekstraktov določili tudi na bakterijah vrst *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidifilus*, *Alicyclobacillus hesperidum* in *Alicyclobacillus cycloheptanicus*. Potek raziskovalnega dela je shematsko prikazan na sliki 3-1.



Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela

Legenda: **ekst:** ekstrakt; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **MBC:** minimalna baktericidna koncentracija, **AM:** gojišče *Alicyclobacillus* medium

Preizkusili smo dve različni metodi ugotavljanja protimikrobe aktivnosti ekstraktov rožmarina in glede na dobljene rezultate določili minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) in minimalne baktericidne koncentracije (MBC).

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterije

- bakterije vrst *Alicyclobacillus acidocaldarius* ŽMJ183 (446, DSMZ, Nemčija), *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ184 (3922, DSMZ, Nemčija) in *Alicyclobacillus acidiphilus* ŽMJ185 (14558, DSMZ, Nemčija) kot referenčni sevi in
- seva, izolirana iz živil *Alicyclobacillus hesperidum* ŽMJ193 in *Alicyclobacillus cycloheptanicus* ŽMJ197

### 3.2.2 Mikrobiološka gojišča

#### 3.2.2.1 Selektivna gojišča

**Gojišče *Alicyclobacillus medium*** (Darland in Brock, 1971, Wisse in Parish, 1998)

Preglednica 3-1: Sestava dela A gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O (Merck, 1.02382.0500, Nemčija)	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,50 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Zorka Šabac, Jugoslavija/Srbija)	0,20 g
kvasni ekstrakt (Biolife, 412220, Italija)	2,00 g
glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška)	5,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kemika, 1112408, Hrvaška)	3,00 g
destilirana H <sub>2</sub> O (za tekoče gojišče)	1000 ml
destilirana H <sub>2</sub> O (za trdo gojišče)	500 ml

### Priprava dela A:

Sestavine, navedene v preglednici 3-1, smo zatehtali v steklenico in dodali 1000 ml destilirane vode, če smo pripravljali tekoče gojišče, ali 500 ml destilirane vode, če smo pripravljali trdo gojišče. Ko smo vsebino premešali, smo pH znižali z 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 4,0. Predhodno smo pH-meter umerili s pufom pH 7,0 in pufom 4,0. S kapalko smo dodajali H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dokler pH ni padel na 4,0. Vsebino smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

### Preglednica 3-2: Sestava dela B gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.08883.0500, Nemčija)	0,10 g
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O (Kemika, 13225, Zagreb)	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Merck, 1.00165.0500, Nemčija)	0,30 g
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich Chemie, 20,218-50, Nemčija)	0,20 g
CuCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich Chemie, 22,178-3, Nemčija)	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O (Sigma, N-5756, ZDA)	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O (Kemika, 14189, Zagreb)	0,03 g
destilirana H <sub>2</sub> O	1000 ml

### Priprava dela B:

Sestavine, navedene v preglednici 3-2, smo zatehtali v steklenico in dodali 1000 ml destilirane vode. Vsebino smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

### Preglednica 3-3: Sestava dela C gojišča *Alicyclobacillus medium*

Sestavina	Količina
agar (Biolife, 411030, Italija)	15,0 g
destilirana H <sub>2</sub> O	500 ml

### Priprava dela C:

Agar smo zatehtali v steklenico in dodali 500 ml destilirane vode ter premešali. Potem smo vsebino sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

### Priprava tekočega gojišča *Alicyclobacillus medium*:

Zmešali smo dela A in B tako, da smo v steklenico s 1000 ml dela A sterilno odpipetirali 1 ml dela B in premešali.

### Priprava trdega gojišča *Alicyclobacillus medium*:

Zmešali smo dele A, B in C tako, da smo v steklenico s 500 ml dela A sterilno odpipetirali 1 ml dela B, premešali in takoj dolili še 500 ml dela C in vsebino spet premešali.

Tako pripravljeno gojišče smo razlili v sterilne petrijevke in jih hranili v hladilniku.

### Tekoče gojišče BAM (*Bacillus acidocaldarius medium*) (Darland in Brock, 1971, Silva in sod., 1999)

#### Preglednica 3-4: Sestava tekočega gojišča BAM

Sestavina	Količina
kvasni ekstrakt (Biolife, 412220, Italija)	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Zorka Šabac, Jugoslavija/Srbija)	0,20 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.02382.0500, Nemčija)	0,25 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Kemika, 1112408, Hrvaška)	0,60 g
destilirana $\text{H}_2\text{O}$	500 ml

Sestavine, navedene v preglednici 3-4, smo zatehtali v steklenico in z merilnim valjem dodali 500 ml destilirane vode in premešali. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C.

#### 3.2.2.2 Fiziološka raztopina

Sestavine:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, 1112408, Hrvaška)

Priprava:

Zatehtali smo 3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ga raztopili v 100 ml destilirane vode ( $\text{pH} = 7,2$ ). 1,25 ml te raztopine smo razredčili v 1 l destilirane vode. Fiziološko raztopino smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C.

### 3.2.3 Ekstrakti rožmarina

- Ekstrakt rožmarina Ros.con je vseboval 22,04 % karnozolne kisline (Vitiva, Slovenija).
- Ekstrakt rožmarina Ros.conh je vseboval 40,49 % karnozolne kisline (Vitiva, Slovenija).
- Absolutni etanol (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)

Priprava:

Najprej smo pripravili osnovni raztopini z masno koncentracijo 16 mg ekstrakta Ros.con in Ros.conh /100 ml absolutnega etanola. V epruveto smo zatehtali 0,480 g ekstrakta in mu dodali 3 ml absolutnega etanola. Raztopino smo nato mešali na vrtinčnem mešalu, dokler se ekstrakt ni popolnoma raztopil v etanolu. Osnovni raztopini ekstrakta Ros.con in Ros.conh smo uporabili za nadaljnje razredčitve: 8 mg/100 ml ab. EtOH , 4 mg/100 ml ab. EtOH, 2 mg/100 ml ab. EtOH, 1 mg/100 ml ab. EtOH, 0,5 mg/100 ml ab. EtOH, 0,25 mg/100 ml ab. EtOH, 0,125 mg/100 ml ab. EtOH, 0,0625 mg/100 ml ab. EtOH, 0,03125 mg/100 ml ab. EtOH, 0,0156 mg/100 ml ab. EtOH, 0,00781 mg/100 ml ab. EtOH , 0,00391 mg/100 ml ab. EtOH . Osnovna raztopina Ros.con je vsebovala 3,526 % karnozolne kisline in osnovna raztopina Ros.conh 6,478 % karnozolne kisline.

### 3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- Absolutni etanol – EtOH (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)
- 70 % (v/v) – EtOH (Merck, Nemčija)
- 96 % (v/v) – EtOH (Merck, Nemčija)
- Glicerol (Kemika, 0711901, Hrvaška)
- Raztopina oksitetraciklina – OTC (Krka, 743054, Slovenija)
- Diski premera 6 mm (BD, Francija)

### 3.2.5 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali, so navedene v preglednici 3-5.

Preglednica 3-5: Laboratorijska oprema

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Avtomatske pipete in nastavki	P1000,P100,P10 (1000 µl,100 µl,10 µl)	Gilson, Francija
Digitalna tehnicka	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Inkubator	I-105CK	Kambič, Slovenija
Optični čitalnik	ScanPrisa 1240 UT	Acer, Tajvan
Mikroovalovna pećica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Plinski gorilnik	/	/
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehnicka, Slovenija
Tehnicka	Sartorius analytic	Sartorius, Nemčija
Vrtinčno mešalo	Vibriomix 104EV	Tehnicka, Slovenija
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Zmrzovalnik	/	LTH, Slovenija

Splošna laboratorijska oprema: cepilne zanke, epruvete, petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice – 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml (Duran, Nemčija), merilni valji (Plastbrand, Nemčija), pipetor (Eppendorf, Nemčija), parafilm (PM 992, American National Can), pincete, steklovina in programska oprema: Microsoft Office, Corel Draw (verzija 12).

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Revitalizacija bakterij

Bakterije vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus* so bile pred začetkom eksperimentalnega dela zamrznjene v krioeprvetah z dodatkom glicerola in shranjene pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vsebino iz krioeprvet, ki smo jih odtajali na sobni temperaturi, smo prelili v tekoče gojišče AM in inkubirali 24 ur pri  $45^{\circ}\text{C}$ . Nato smo 0,1 ml kulture prenesli na gojišče AM in gojišča inkubirali 24 ur pri  $45^{\circ}\text{C}$ . Na trdem gojišču AM so zrasle majhne (2 mm) okrogle kolonije bakterij rodu *Alicyclobacillus*, ki so imele značilno belo barvo.



Slika 3-2: Bakterije vrste *A. acidoterrestris* ŽMJ 184 pod mikroskopom

#### 3.3.2 Priprava inokuluma

S cepilno zanko smo nacepili štiri kolonije iz trdega gojišča AM v 4 ml tekočega gojišča AM. Vsebino smo premešali na vrtinčnem mešalniku in suspenzijo 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri  $45^{\circ}\text{C}$ . Predvidevali smo, da so se bakterije v tekočem gojišču AM namnožile do koncentracije  $10^5 \text{ cfu/ml}$ .

Za metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM smo v inokulumu potrebovali večje začetno število bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Za to smo uporabili tekoče gojišče BAM. S cepilno zanko smo sterilno nacepili štiri kolonije iz trdega gojišča AM v 4 ml tekočega gojišča BAM. Vsebino smo premešali in 24 ur inkubirali na stresalniku pri  $45^{\circ}\text{C}$ . Predvidevali smo, da so se bakterije v tekočem gojišču BAM namnožile do  $10^6 \text{ cfu/ml}$ .

Za določitev točnega števila celic v tekočem gojišču smo uporabili metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

Po opravljenem raziskovalnem delu smo v hladilniku vsak teden za nadaljnje delo shranili bakterijske kulture na trdem gojišču AM.

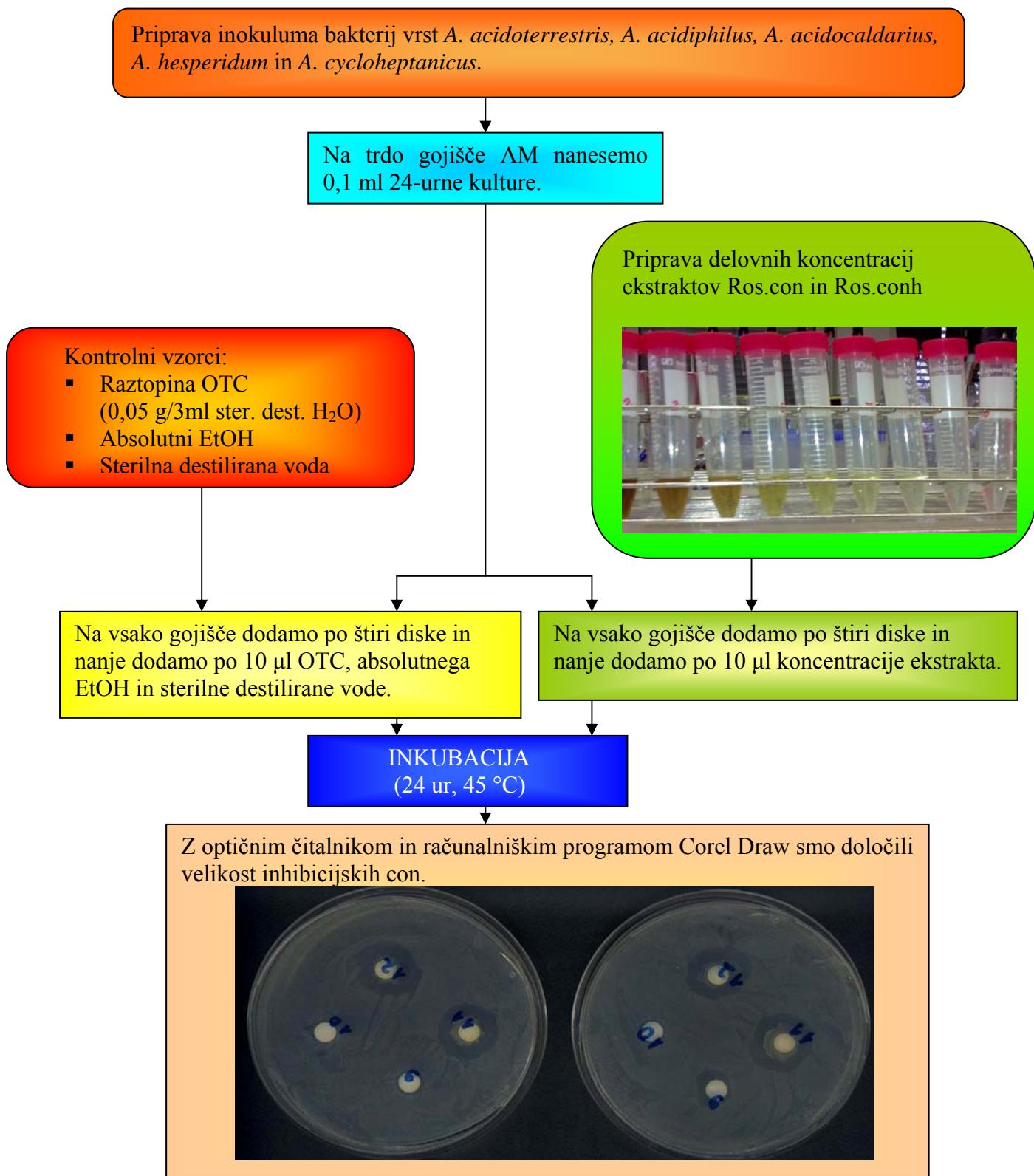
### 3.3.3 Metoda difuzije v trdem gojišču AM

Uporabljen material:

- Trdo gojišče *Alicyclobacillus* medij
- Absolutni etanol – EtOH
- Oksitetraciklin (OTC)
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh
- Čista kultura bakterij vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius* in *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*
- Fiziološka raztopina

Izvedba:

Z metodo difuzije v trdem gojišču AM smo želeli ugotoviti protimikroben učinek ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh na bakterije vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius* in *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-3.



Slika 3-3: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije rodu *Alicyclobacillus* z metodo difuzije v trdem gojišču AM

Legenda: **EtOH**: etanol; **OTC**: oksitetraciklin; **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda

Protimikroben učinek smo določili za vsako vrsto bakterij (*A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*) posebej tako, da smo na trdo gojišče AM odpipetirali 0,1 ml čiste kulture in jo razmazali s stekleno palčko. V kvadratu in primernih presledkih smo na eno gojišče nato namestili po štiri diske. Na vsak disk smo s pipeto dodali 10 µl določene koncentracije ekstraktov rožmarina. Predhodno smo iz ekstraktov Ros.con in Ros.conh pripravili seriji razredčitev v absolutnem etanolu od začetne osnovne 16 do 0,00391 mg/100 ml ab. EtOH. Za vsako razredčitev ekstrakta rožmarina smo naredili še ponovitev.

Pozitivna kontrola pri vsakem eksperimentu je bil disk, na katerega smo dodali raztopino antibiotika OTC, negativna kontrola je bil disk s sterilno destilirano vodo, preverili pa smo tudi učinek absolutnega etanola. Za vsak kontrolni vzorec smo naredili še ponovitev. Tako pripravljena gojišča z diskami smo 24 ur inkubirali pri 45 °C.

Po inkubaciji smo velikost inhibicijskih koncentracij odčitali z optičnim čitalnikom tako, da smo sliko gojišča z diskimi prenesli v digitalno obliko. Z računalniškim programom CorelDraw smo izmerili polmere inhibicijskih koncentracij od konca diska do konca cone. Za vsako inhibicijsko koncentracijo smo izmerili polmer na različnih straneh cone, ker te niso bile enakomerne, in izračunali povprečje, nato smo rezultate podali kot povprečje dveh paralelk. Rezultate meritev smo uporabili kot merilo za določitev protimikrobnega delovanja posamezne koncentracije ekstrakta in določitev minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov.

Kot MIC smo določili tisto koncentracijo, pri kateri je bila inhibicijska koncentracija ekstrakta za 1–3 mm večja kot inhibicijska koncentracija absolutnega etanola (Proestos in sod., 2006).

### 3.3.4 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču AM

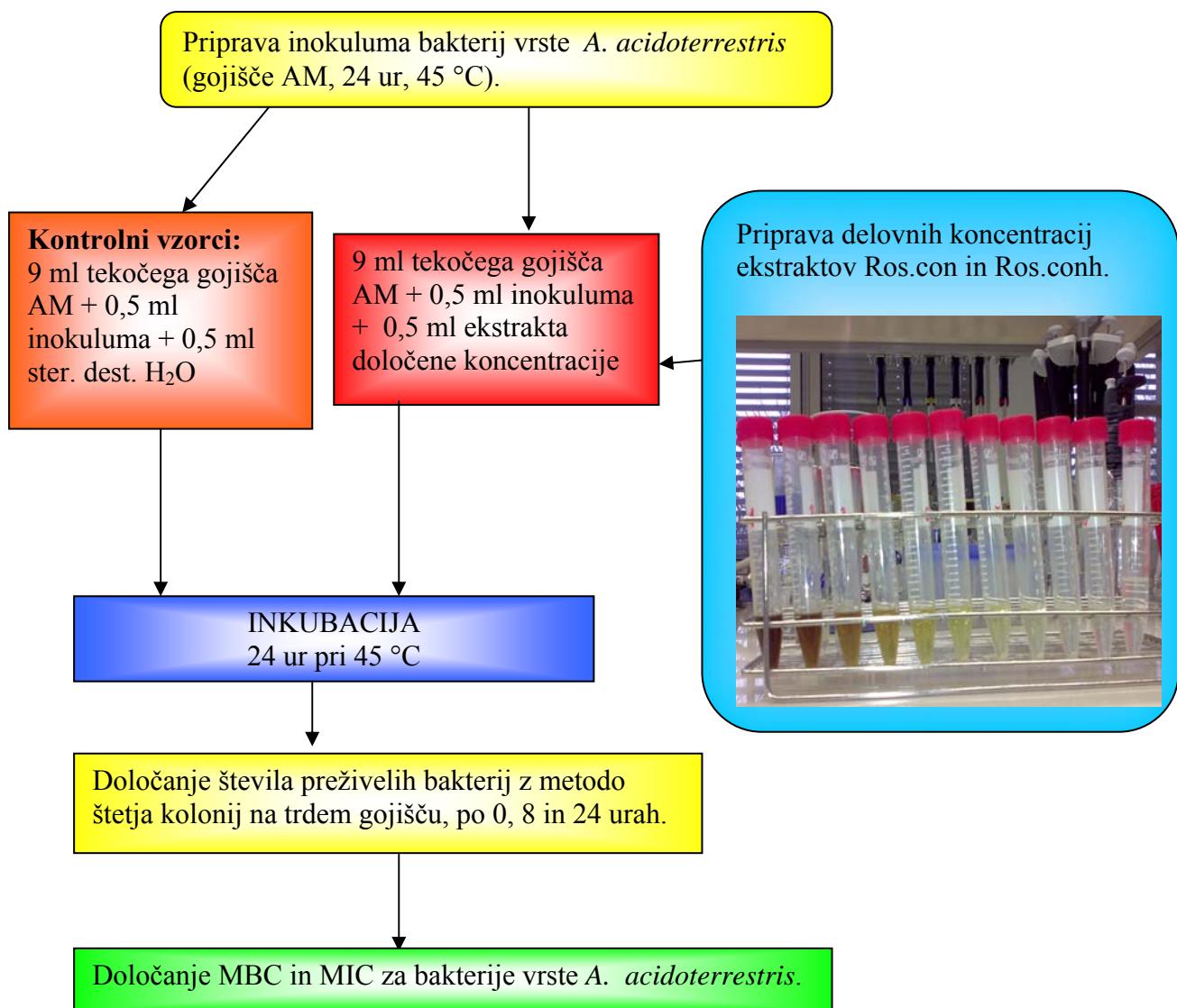
Uporabljen material:

- Tekoče gojišče AM
- Trdo gojišče AM
- Čista kultura bakterij vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*
- Fiziološka raztopina
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije ekstraktov rožmarina
- Absolutni etanol

Izvedba:

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM smo določili MIC in MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris*. MBC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, pri kateri je po 24-urni inkubaciji preživelno 0,1 % bakterij (Cannilac in Mourey, 2001). MIC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstrakta Ros.con in Ros.conh, ki je preprečila razmnoževanje ali znižala živost inokulum (Carson in sod., 1995).

Metodo smo izvedli, kot je prikazano na sliki 3-4, v 9 ml tekočega gojišča AM smo dodali 0,5 ml 24-urne kulture bakterij vrste *A. acidoterrestris* in 0,5 ml ekstrakta rožmarina Ros.con ali Ros.conh določene masne koncentracije. Različne koncentracije ekstraktov rožmarina smo naredili tako, da smo pripravili seriji razredčitev ekstraktov Ros.con in Ros.conh v absolutnem etanolu od začetne osnovne 16 do 0,000391 mg/100 ml ab. EtOH. Epruvete s suspenzijami smo inkubirali 24 ur pri 45 °C. Pred začetkom inkubacije, po osmih in 24 urah smo določili vpliv ekstraktov na preživelost bakterij z metodo štetja kolonij na ploščah. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-4.



Slika 3-4: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM

Legenda: **EtOH:** etanol; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda; **AM:** gojišče *Alicyclobacillus* medium; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija, **MBC:** minimalna baktericidna koncentracija

Ko smo ugotovili MIC za ekstrakta Ros.con in Ros.conh, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris* pri različnih začetnih koncentracijah inokuluma. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-5.

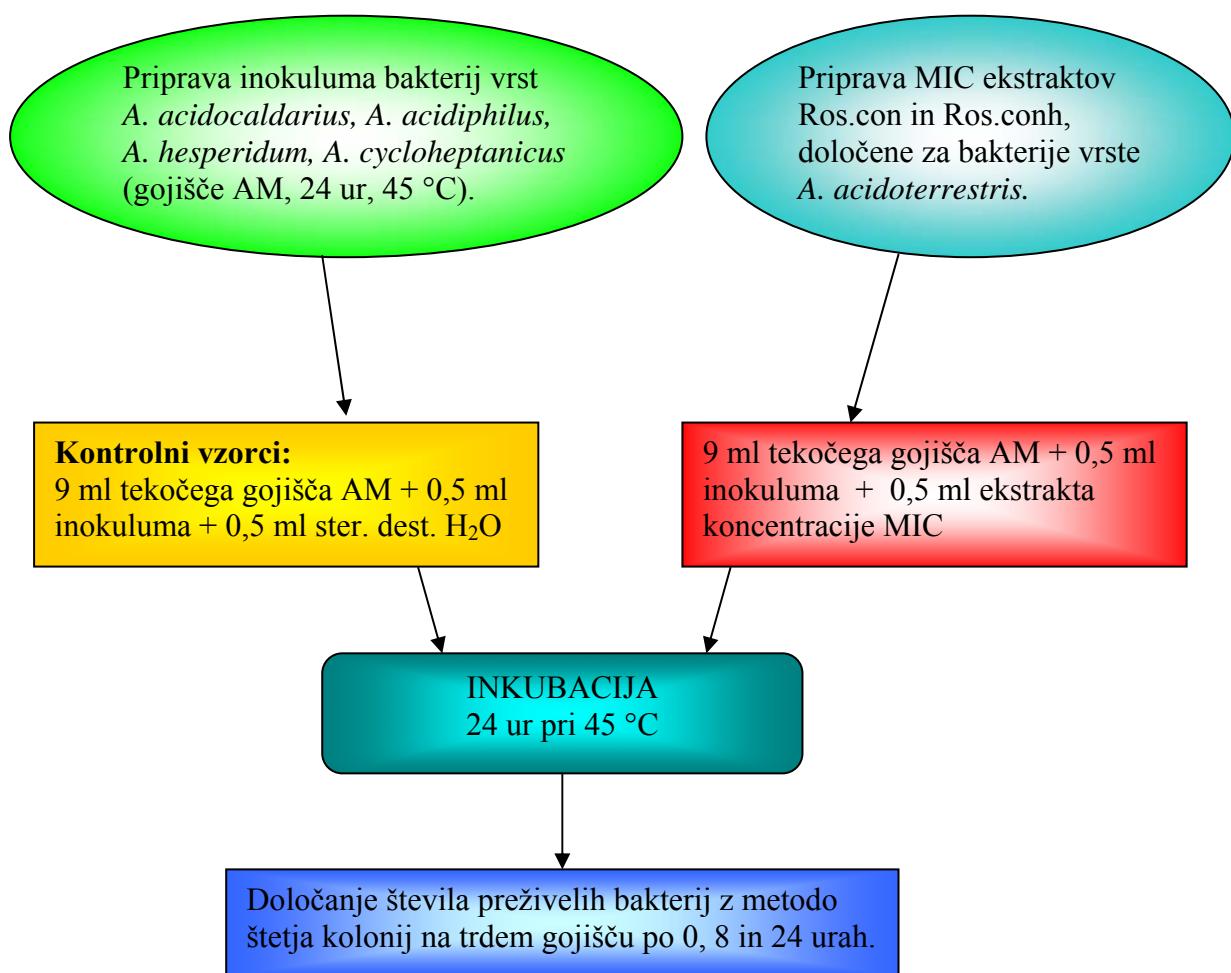


Slika 3-5: Shema določanja učinkovitosti MIC Ros.con in Ros.conh na različne začetne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Legenda: **EtOH:** etanol; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija; **AM:** gojišče *Alicyclobacillus* medium

### 3.3.5 Rast bakterij vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus* v gojišču AM z MIC ekstraktov rožmarina

Z MIC ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh, ki smo ju določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, smo določali učinek teh koncentracij ekstraktov tudi na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Določili smo rastne krivulje na dveh referenčnih sevih bakterij vrst *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus* in na živilskih izolatih *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*. Shema določanja učinkovitosti MIC je prikazana na sliki 3-6:



Slika 3-6: Shema določanja učinkovitosti MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*

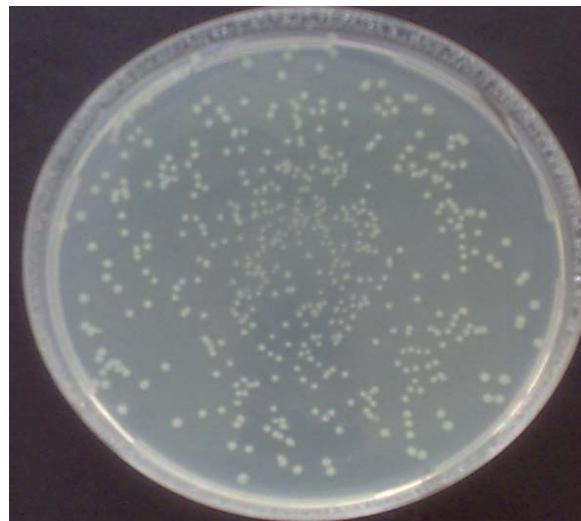
Legenda: **EtOH**: etanol; **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **MIC**: minimalna inhibitorna koncentracija; **AM**: gojišče *Alicyclobacillus* medium

### 3.3.6 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču

Število bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču (slika 3-7) smo določali po začetku inkubacije, ter po 8 in 24-urni inkubaciji bakterij v tekočem gojišču AM (ISO 4833, 2003). V tekoče gojišče AM smo pred inkubacijo dodali bakterije rodu *Alicyclobacillus* in določeno koncentracijo ekstrakta rožmarina. Enako smo število bakterij določili v kontrolnih vzorcih. Za vsak vzorec smo imeli dve ponovitvi. V 9 ml fiziološke raztopine smo dodali 1 ml vsakega vzorca in vsebino razredčevali do ustrezne razredčitve. Po dve paralelni razredčenega vzorca smo prenesli na trdi gojišči AM in vzorec razmazali s sterilno palčko. Gojišča smo nato inkubirali 24 ur pri 45 °C. Po inkubaciji smo na gojišču prešteli zrasle kolonije in izračunali število preživelih bakterij (N) z enačbo 3.1:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2)} \cdot d \quad \dots(3.1)$$

Legenda: N: je število bakterij v cfu/ml;  $\Sigma C$ : seštevek vseh kolonij na števnih gojiščih;  $n_1$ : število gojišč pri prvi razredčitvi;  $n_2$ : število gojišč pri drugi razredčitvi; d: faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi



Slika 3-7: Kolonije bakterij vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* na gojišču AM

## 4 REZULTATI

Za ekstrakte rožmarina so dokazali, da imajo protimikrobni učinek na grampozitivne bakterije (Rožman, 2007), zato smo predpostavili, da ga imajo tudi na bakterije rodu *Alicyclobacillus*.

Da bi ugotovili koncentracije ekstraktov, ki inhibirajo rast in razmnoževanje teh bakterij, smo uporabili metodo difuzije v trdem gojišču AM in metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM smo ugotavljali minimalno baktericidno koncentracijo in minimalno inhibitorno koncentracijo ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh in primerjali njuno delovanje.

Ko smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču ugotovili MIC za ekstrakta Ros.con in Ros.conh, smo ti koncentraciji uporabili za spremjanje rasti oziroma odmiranja bakterij vrste *A. acidoterrestris* pri različnih začetnih koncentracijah inokuluma.

Z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris* smo nato določili še rastne krivulje dveh referenčnih sevov *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus* in dveh živilskih izolatov bakterij vrst *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

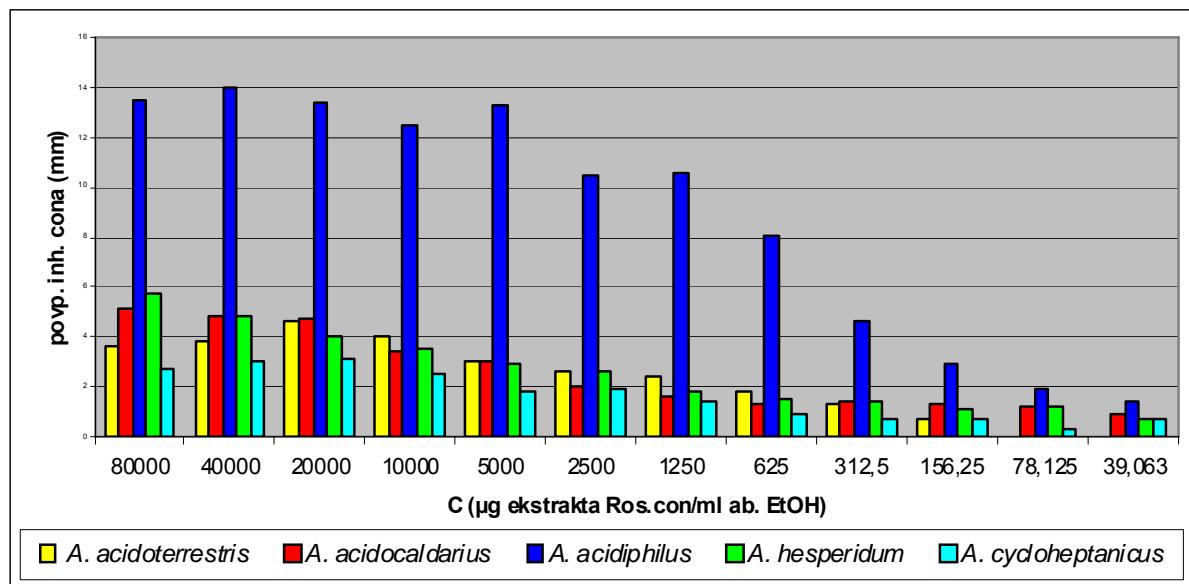
### 4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA, DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU AM

#### 4.1.1 Velikosti inhibicijskih con pri različnih vrstah bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Z metodo difuzije v trdem gojišču AM smo ugotavljali protimikrobn delovanje ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh pri treh referenčnih sevih bakterij vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus* in dveh živilskih izolatih bakterij vrst *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

Določali smo MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, tako da smo uporabili 12 koncentracij vsakega ekstrakta. Različne koncentracije ekstraktov smo pripravili tako, da smo ekstrakt razredčili v absolutnem etanolu od koncentracije 80000 do 39,063 µg ekstrakta/ml absolutnega etanola. Za pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino antibiotika oksitetraciklina (OTC), za negativno kontrolo sterilno destilirano vodo, preverili pa smo tudi učinek absolutnega etanola.

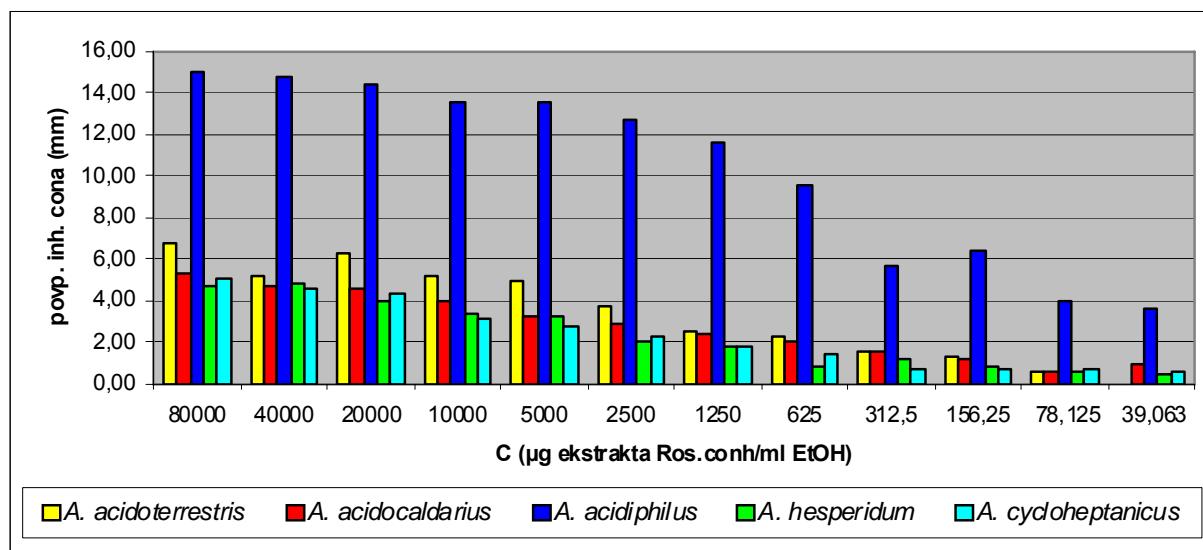
Iz rezultatov v prilogah 9-1, 9-2, 9-3, 9-4, 9-5 je razvidno, da imata ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh protimikrobni učinek na vse preizkušene bakterije rodu *Alicyclobacillus*.



Slika 4-1: Povprečne inhibicijske cone za različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con

Legenda: povp. inh. cona: povprečna inhibicijska cona; C: koncentracija ekstrakta µg/ml absolutnega etanola

Slike 4-1 je razvidno, da ima ekstrakt Ros.con večji protimikroben učinek na bakterije vrste *A. acidiphilus* kot na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Najnižji uporabljeni koncentraciji ekstrakta Ros.con 78,125 µg/ml ab. EtOH in 39,063 µg/ml ab. EtOH nimata protimikrobnega učinka na bakterije vrste *A. acidoterrestris*.



Slika 4-2: Povprečne inhibicijske cone za različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con

Legenda: povp. inh. cona: povprečna inhibicijska cona; C: koncentracija ekstrakta (µg/ml) v absolutnem etanolu

S slike 4-2 je razvidno, da ima ekstrakt Ros.conh večji protimikrobnob učinek na bakterije vrste *A. acidiphilus* kot na druge vrste bakterij *Alicyclobacillus*. Najnižja uporabljen koncentracija ekstrakta Ros.conh 39,063 µg/ml ab. EtOH nima protimikrobnega učinka na bakterije vrste *A. acidoterrestris*.

#### 4.1.1.1 MIC ekstraktov rožmarina, določene za različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*

MIC smo določili kot koncentracijo, pri kateri je bila inhibicijska cona vzorca za 1–3 mm večja kot inhibicijska cona topila (Proestos in sod., 2006).

Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.con in Ros.conh za različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* so prikazane v preglednici 4-1.

**Preglednica 4-1: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh, določene z metodo difuzije v trdem gojišču AM za različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus***

Vrsta bakterij	MIC (µg ekstrakta/ml EtOH)	
	Ros.con	Ros.conh
<i>A. acidoterrestris</i>	5000	2500
<i>A. acidocaldarius</i>	20000	10000
<i>A. acidiphilus</i>	625	312,5
<i>A. hesperidum</i>	5000	5000
<i>A. cycloheptanicus</i>	20000	5000

Iz preglednice 4-1 je razvidno, da je bila za inhibicijo rasti različnih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus* potrebna manjša koncentracija ekstrakta Ros.conh, ki je vseboval 40,49 % karnozolne kisline, kot ekstrakta Ros.con, ki je vseboval 22,04 % karnozolne kisline. Za bakterije vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus* in *A. hesperidum* je bila vrednost MIC ekstrakta Ros.conh enkrat manjša od vrednosti MIC ekstrakta Ros.con.

Bakterije vrste *A. acidiphilus* so imele najnižjo vrednost MIC za ekstrakt Ros.con in Ros.conh, za inhibicijo rasti so zadostovale že zelo nizke koncentracije, to je 625 µg ekstrakta Ros.con/ml EtOH in 312,5 µg ekstrakta Ros.conh/ml EtOH. Najvišjo vrednost MIC za ekstrakt Ros.con so imele bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*, to je 20000 µg ekstrakta Ros.con/ml EtOH. Najvišjo vrednost MIC za ekstrakt Ros.conh so imele bakterije vrste *A. acidocaldarius*, to je 5000 µg ekstrakta/ml EtOH.

Glede na vrednosti MIC za ekstrakt Ros.con je največja razlika med bakterijami vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*, ter bakterijami vrste *A. acidiphilus*. Za ekstrakt Ros.conh je največja razlika glede na vrednosti MIC med bakterijami vrste *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus*.

## 4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA, DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V GOJIŠČU AM

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM smo med 24-urno inkubacijo določali protimikrobeno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Protimikrobeno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh smo ovrednotili po 24 urah inkubacije z izračunom MBC in določanjem MIC.

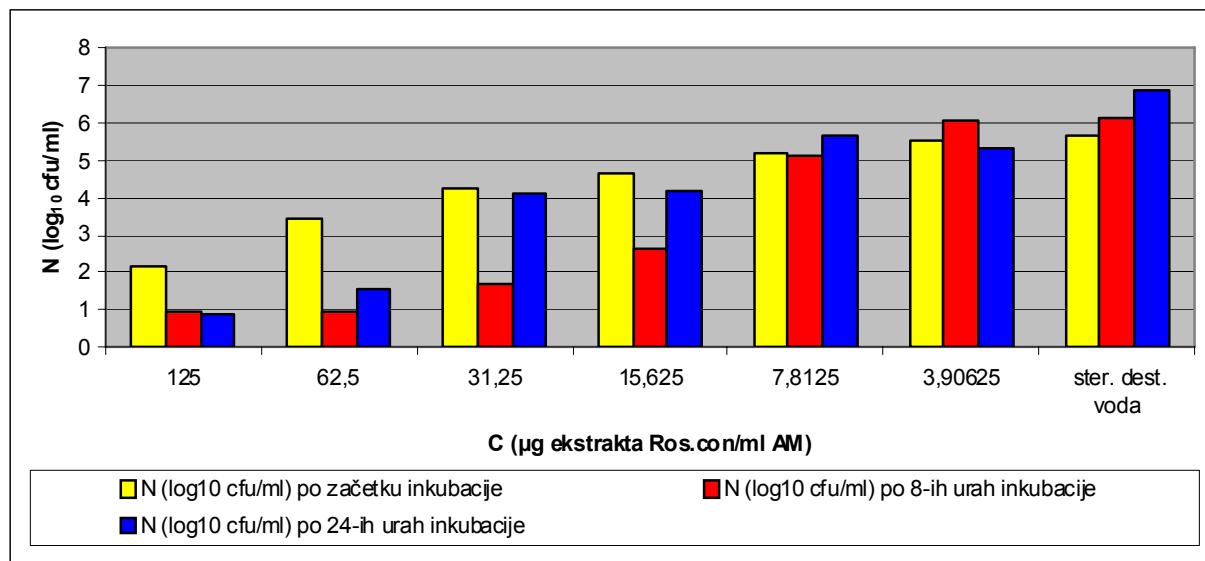
MBC smo določali kot najnižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, pri kateri po 24-urni inkubaciji preživi 0,1 % bakterij (Cannilac in Mourey, 2001).

MIC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstrakta Ros.con in Ros.conh, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost bakterij (Carson in sod., 1995).

### 4.2.1 Rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z dodatkom ekstraktov Ros.con in Ros.conh

Rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* v tekočem gojišču AM smo ugotavljali tako, da smo v 9 ml tekočega gojišča AM dodali 0,5 ml čiste 24-urne kulture bakterij *A. acidoterrestris* z začetnim številom približno  $10^5$  cfu/ml in 0,5 ml določene razredčitve ekstrakta rožmarina.

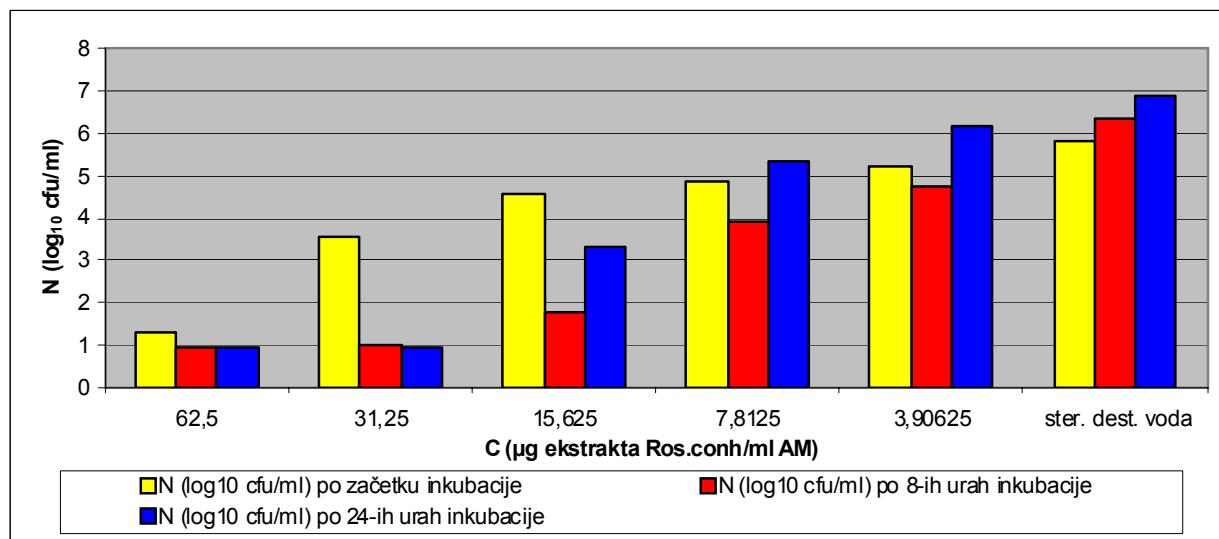
Razredčitve ekstraktov Ros.con in Ros.conh smo pripravili tako, da smo naredili seriji 12 razredčitev v absolutnem etanolu od 8 do 0,00391 mg ekstrakta/100 ml ab. EtOH. Protimikrobeni učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* smo spremljali tako, da smo ob začetku inkubacije, po osmih in 24 urah od dodatka kulture bakterij vrste *A. acidoterrestris* in ekstraktov v tekoče gojišče AM, število preživelih bakterij določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Vzopredno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali v preglednicah v prilogah A 9-6, A 9-7, A 9-8, A 9-9, A 9-10 in A 9-11.



Slika 4-3: Rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con

Legenda: N ( $\log_{10}$  cfu/ml): logaritem števila bakterij; C: koncentracija ekstrakta ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tekočega gojišča AM

Na sliki 4-3 je prikazan protimikrobeni vpliv različnih koncentracij ekstrakta rožmarina Ros.con na rast bakterij *A. acidoterrestris* med 24-urno inkubacijo. Nižja je koncentracija ekstrakta Ros.con, manjši je protimikrobeni učinek na rast bakterij vrste *A. acidoterrestris*.



Slika 4-4: Rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh

Legenda: N ( $\log_{10}$  cfu/ml) : logaritem števila bakterij; C: koncentracija ekstrakta ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tekočega gojišča AM

Na sliki 4-4 je prikazan protimikroben vpliv različnih koncentracij ekstrakta rožmarina Ros.conh na rast bakterij *A. acidoterrestris* med 24-urno inkubacijo. Tudi pri ekstraktu Ros.conh se z nižanjem koncentracije, manjša protimikroben učinek na bakterije vrste *A. acidoterrestris*.

#### 4.2.1.1 Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris*

Za izračun MBC smo podatke iz preglednic v prilogah A 9-10 in A 9-11 preračunali v odstotkih preživelih bakterij vrste *A. acidoterrestris* in izračunane vrednosti še logaritmirali. Logaritmirane vrednosti so navedene v preglednici 4-2.

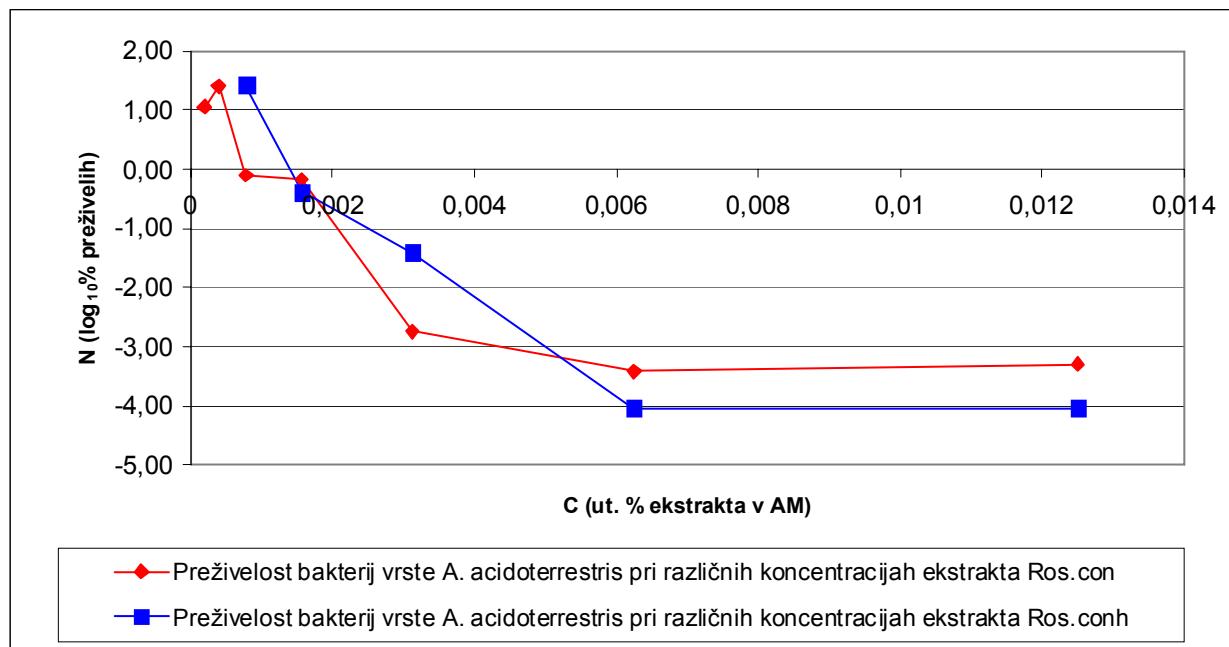
**Preglednica 4-2: Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM**

Koncentracija ekstrakta		N <sub>1</sub> ( $\log_{10}\%$ preživelih)	N <sub>2</sub> ( $\log_{10}\%$ preživelih)
C (µg/ml AM)	C (% ekstrakta v AM)		
125	0,0125	-3,29	/
62,5	0,00625	-3,41	/
31,25	0,003125	-2,74	-4,04
15,625	0,001563	-0,16	-4,04
7,813	0,0007813	-0,10	-1,40
3,906	0,0003906	1,41	-0,38
1,953	0,0001953	1,06	1,43

Legenda: %: utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM, C: koncentracija ekstrakta µg/ml AM,  $\log_{10}\%N_1$ : logaritem odstotka preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con,  $\log_{10}\%N_2$ : logaritem odstotka preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh

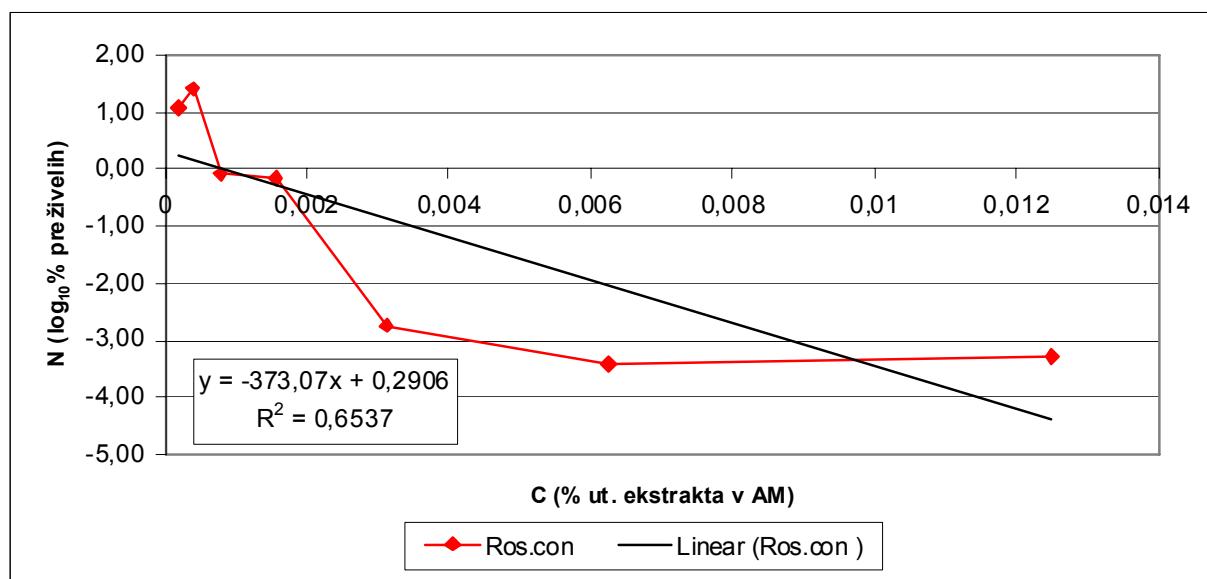
Vrednost MBC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh v tekočem gojišču AM, pri kateri je po 24-urni inkubaciji preživelo 0,1 % bakterij vrste *A. acidoterrestris* ( $\log_{10} 0,1 = -1$ ) (slika 4-5).

Iz preglednice 4-2 je razvidno, da je vrednost MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* po 24 urah inkubacije določena med 15,625 in 31,25 µg/ml AM. Vrednost MBC ekstrakta Ros.conh je določena približno pri 7,813 µg/ml AM. Za natančnejšo določitev vrednosti MBC smo izračunali enačbi premic (sliki 4-6 in 4-7) in računsko določili MBC.



Slika 4-5: Preživelost bakterij vrste *A. acidoterrestris* pri času 24 ur v gojišču AM pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh

Legenda: C (% ekstrakta v AM): utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM, N ( $\log_{10}\% \text{ preživelih}$ ): logaritem odstotka preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con in Ros.conh



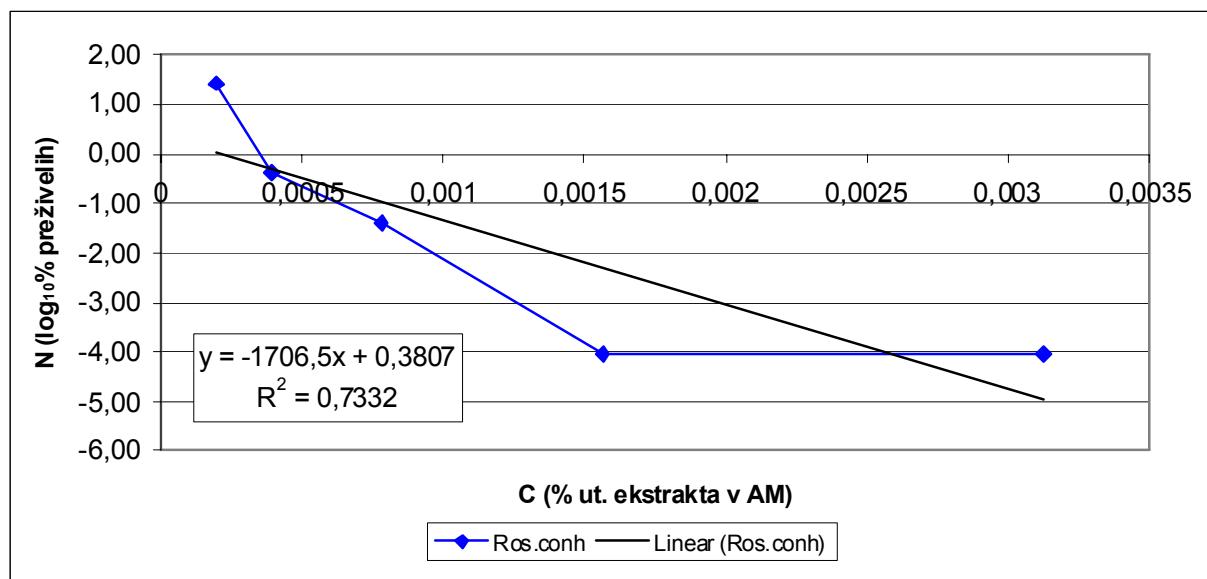
Slika 4-6: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM

Legenda: C (% ekstrakta v AM): utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM, N ( $\log_{10}\% \text{ preživelih}$ ): logaritem odstotka preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con

$$-1 = -373,07 * \text{MBC} + 0,2906$$

MBC = 0,00346 % ekstrakta Ros.con v AM

Vrednost MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* po 24 urah inkubacije je bila 0,00346 % ekstrakta v tekočem mediju AM ali 34,59 µg/ml AM.



Slika 4-7: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM

Legenda:  $C (\% \text{ ekstrakta v AM})$ : utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM,  $N (\log_{10}\% \text{ preživelih})$ : logaritem odstotka preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh

$$-1 = -1706,5 * \text{MBC} + 0,3807$$

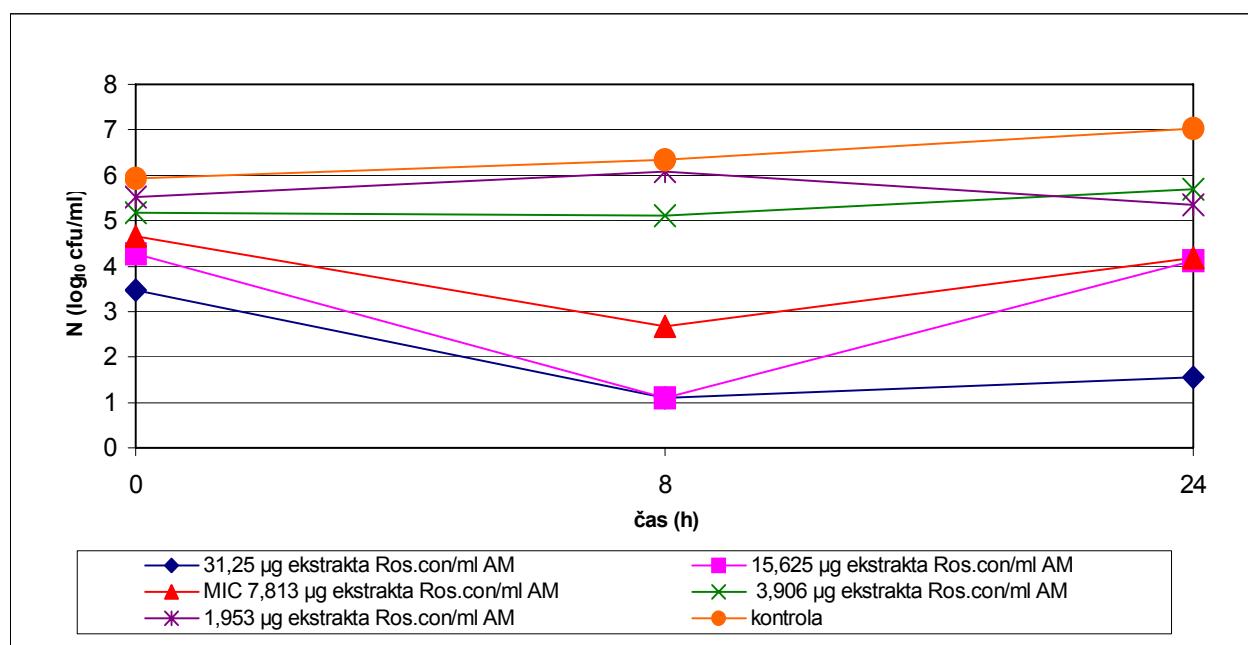
MBC = 0,0006083 % ekstrakta Ros.conh v AM

Vrednost MBC ekstrakta Ros.conh bakterije vrste *A. acidoterrestris* po 24 urah inkubacije je bila 0,0006083 % ekstrakta v tekočem mediju AM ali 6,083 µg/ml AM.

#### 4.2.1.2 Določitev MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris*

MIC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstraktov Ros.con in Ros.conh, ki preprečuje razmnoževanje bakterij (Carson in sod., 1995). To je tista koncentracija ekstrakta, pri kateri število bakterij vrste *A. acidoterrestris* po 24 urah inkubacije ni bilo večje kot ob začetku inkubacije.

- Za MIC ekstrakta Ros.con v tekočem gojišču AM smo določili vrednost 7,813 µg/ml AM.
- Za MIC ekstrakta Ros.conh v tekočem gojišču AM smo določili vrednost 3,906 µg/ml AM.

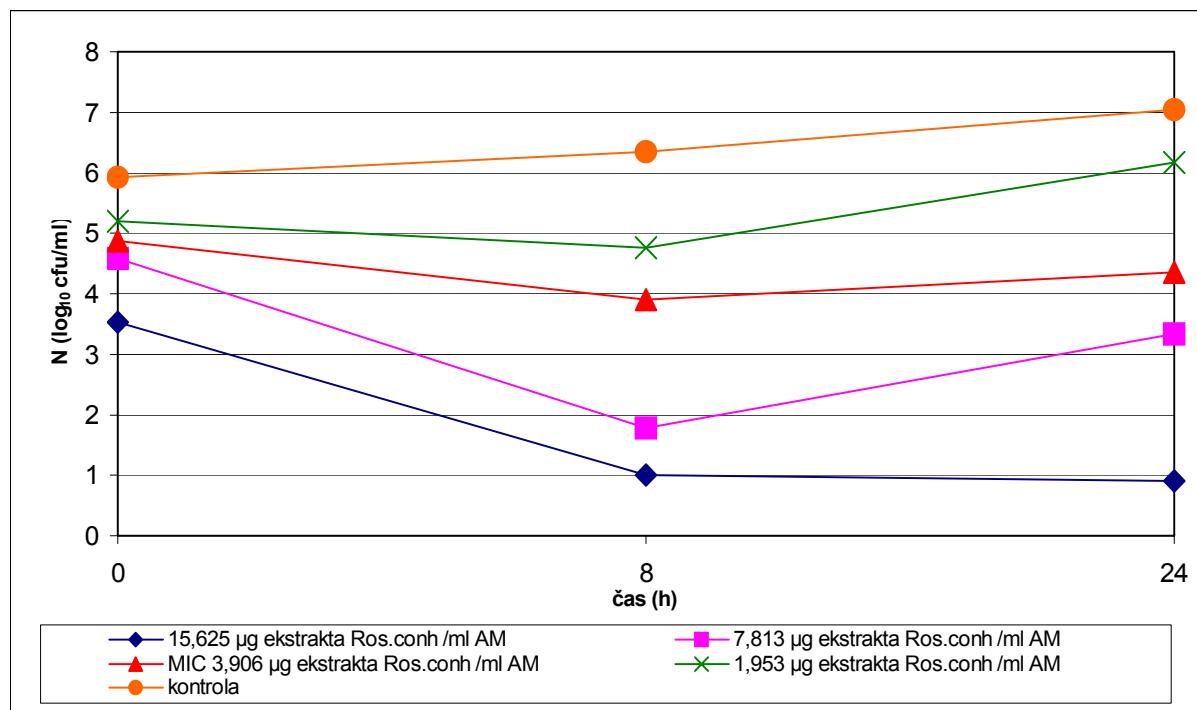


Slika 4-8: Protimikroben učinek različnih koncentracij ekstrakta Ros.con na bakterije vrste *A. acidoterrestris*

Legenda: **N ( $\log_{10}$  cfu/ml):** logaritem števila bakterij; **MIC:** minimalna inhibitorna koncentracija

S slike 4-8 je razvidno, da število bakterij vrste *A. acidoterrestris* 24 ur po dodatku 7,813 µg/ml AM ekstrakta Ros.con ni večje kot ob začetku inkubacije, ko smo dodali ekstrakt. To pomeni, da je 7,813 µg/ml AM minimalna inhibitorna koncentracija, ki po 24 urah preprečuje razmnoževanje oziroma inhibira rast teh bakterij.

Po dodatku višje koncentracije ekstrakta Ros.con (15,625 µg/ml AM) se je število bakterij vrste *A. acidoterrestris* po osmih urah inkubacije zmanjšalo za 3 log enote, nato pa se je število bakterij vrste *A. acidoterrestris* spet povečalo za 3 log enote. Po dodatku nižje koncentracije ekstrakta Ros.con 3,906 µg/ml AM je bilo število bakterij po 24 urah večje kot ob začetku inkubacije.



Slika 4-9: Protimikroben učinek različnih koncentracij ekstrakta Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris*

Legenda: N ( $\log_{10}$  cfu/ml): logaritem števila bakterij; MIC: minimalna inhibitorna koncentracija

S slike 4-9 je razvidno, da število bakterij vrste *A. acidoterrestris* 24 ur po dodatku 3,906  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM ekstrakta Ros.conh ni večje kot na začetku inkubacije, ko smo dodali ekstrakt. To pomeni, da je 3,906  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM minimalna inhibitorna koncentracija, ki po 24 urah preprečuje razmnoževanje oziroma inhibira rast bakterij vrste *A. acidoterrestris*.

Po dodatku višje koncentracije ekstrakta Ros.conh (7,813  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM) se je število bakterij vrste *A. acidoterrestris* po osmih urah inkubacije zmanjšalo za 3 log enote, nato pa se je število bakterij vrste *A. acidoterrestris* spet povečalo za 2 log enote. Po dodatku nižje koncentracije ekstrakta Ros.conh 1,953  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM je bilo število bakterij vrste *A. acidoterrestris* po 24 urah večje kot ob začetku inkubacije.

#### 4.2.2 Protimikrobeni učinek MIC ekstraktov rožmarina na različne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris*

V nadaljevanju smo primerjali učinek MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, ki smo jo določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na različne začetne koncentracije teh bakterij. S temi poskusi smo želeli ugotoviti protimikrobeni učinek predhodno določene MIC ekstraktov Ros.con (7,813  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM) in Ros.conh (3,906  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AM) na različne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris*.

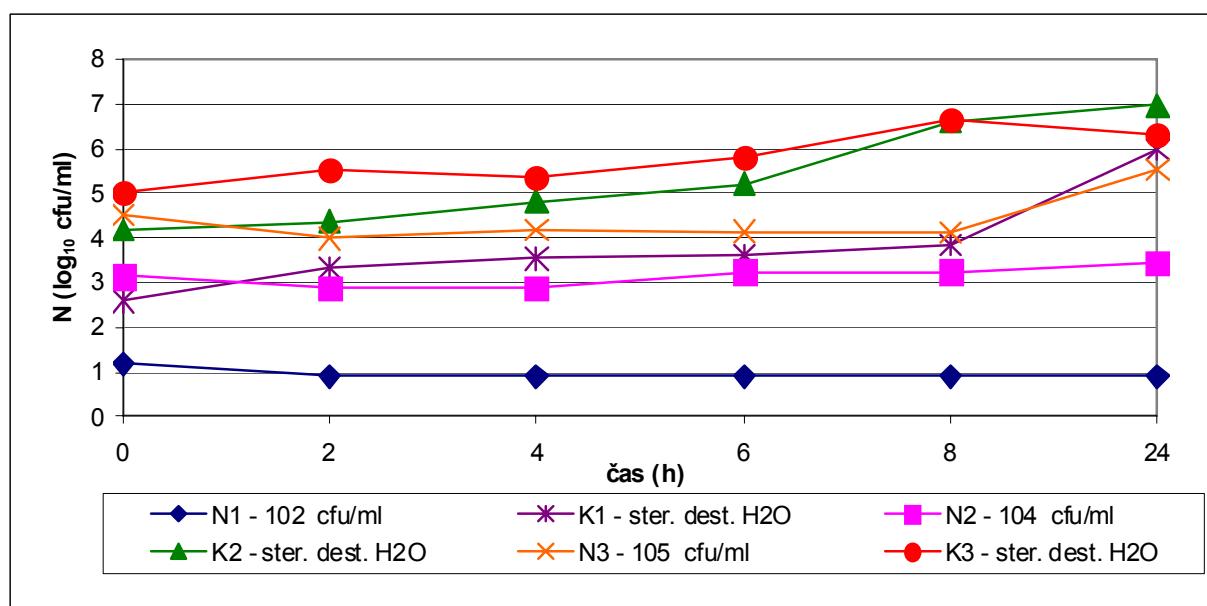
#### 4.2.2.1 Protimikrobi učinek MIC ekstrakta Ros.con

Poskuse smo izvedli tako, da smo v 30 ml tekočega gojišča AM dodali 1 ml čiste kulture *A. acidoterrestris* z različnimi koncentracijami celic v inokolumu in 1,67 ml ekstrakta Ros.con. Uporabili smo MIC ekstrakta Ros.con (7,813 µg/ml). Različne koncentracije celic bakterij smo dobili tako, da smo 24-urno kulturo razredčili v fiziološki raztopini do nižjih koncentracij. Protimikrobi učinek ekstrakta Ros.con ob začetku inkubacije po dveh, štirih, šestih, osmih in 24 urah smo spremljali z metodo štetja kolonij. Vzporedno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje paralelk v prilogi A 9-12.

S slike 4-10 je razvidno, da MIC ekstrakta rožmarina Ros.con v tekočem gojišču AM deluje baktericidno na bakterije vrste *A. acidoterrestris* pri začetni koncentraciji celic  $10^2$  cfu/ml, saj je bila koncentracija celic že po začetku inkubacije pod mejo občutljivosti metode.

Pri  $10^4$  cfu/ml je MIC ekstrakta Ros.con zavirala razmnoževanje bakterij vrste *A. acidoterrestris*, saj je bila rast v kontrolnih vzorcih z dodatkom sterilne vode večja za 3 log enote.

Koncentracija 7,813 µg/ml ekstrakta rožmarina Ros.con ima torej največji vpliv na najnižjo koncentracijo bakterij v inokolumu, to je  $10^2$  cfu/ml, medtem ko ima na višjo koncentracijo bakterij inhibitorni vpliv, kar potrjuje rezultate poskusa določanja MIC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* (4.2.1.2).



Slika 4-10: Protimikrobi učinek MIC ekstrakta Ros.con (7,813 µg/ml) na rast različnih koncentracij bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Legenda:  $N (\log \text{cfu/ml})$ : logaritem števila bakterij,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$ : koncentracija bakterij ob dodatku ekstrakta Ros.con,  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ : koncentracija bakterij v kontrolnem vzorcu, **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda

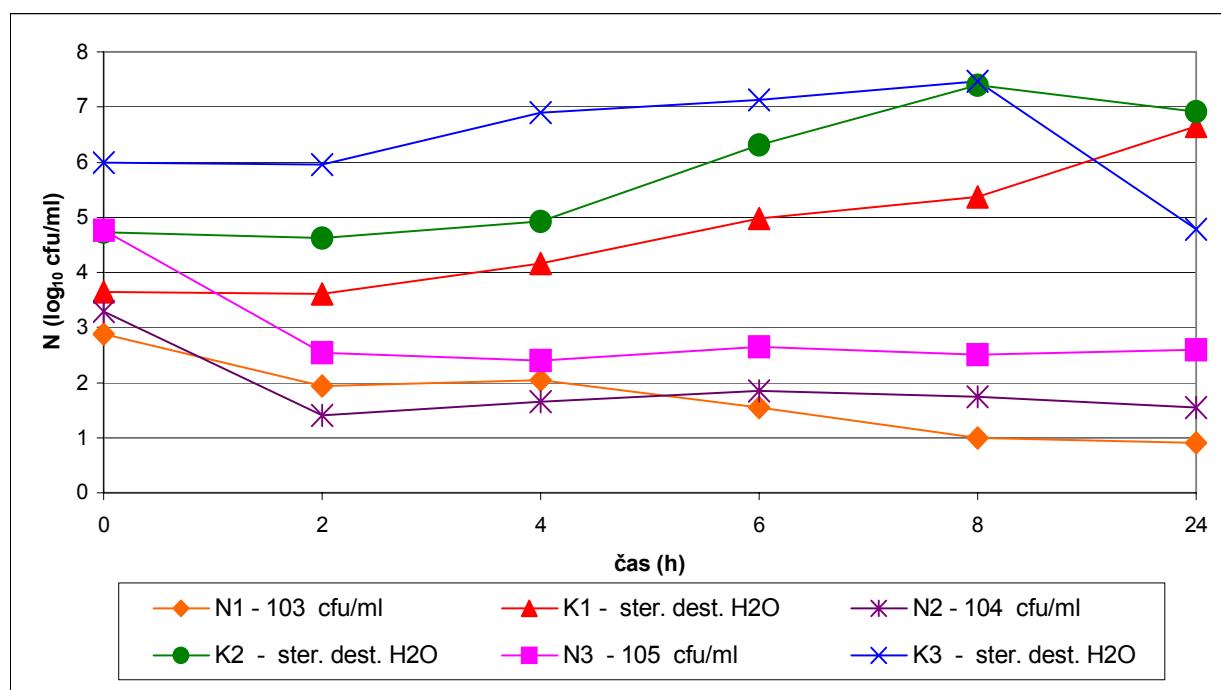
#### 4.2.2.2 Protimikrobn učinek MIC ekstrakta Ros.conh

Poskuse smo izvedli tako, kot v poglavju 4.2.2.1, le da smo dodali MIC ekstrakta Ros.conh 3,906 µg/ml. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje paralelk v prilogi A 9-13.

S slike 4-11 je razvidno, da MIC ekstrakta rožmarina Ros.conh v tekočem gojišču AM deluje baktericidno na bakterije vrste *A. acidoterrestris* pri začetni koncentraciji  $10^3$  cfu/ml, koncentracija celic je bila pod mejo občutljivosti metode po osmih urah inkubacije.

Pri  $10^4$  cfu/ml in  $10^5$  cfu/ml bakterij vrste *A. acidoterrestris* je MIC ekstrakta Ros.conh zavirala njihovo razmnoževanje.

Koncentracija 3,906 µg/ml ekstrakta rožmarina Ros.conh ima torej največji vpliv na najnižjo koncentracijo bakterij vrste *A. acidoterrestris* v inokolumu, to je  $10^3$  cfu/ml, medtem ko ima na višji koncentraciji inhibitorni vpliv, kar potrjuje rezultate določanja MIC ekstrakta Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris* (4.2.1.2).



Slika 4-11: Protimikrobn učinek MIC ekstrakta Ros.conh (3,90625 µg/ml) na rast različnih koncentracij bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Legenda: **N (log cfu/ml):** logaritem števila bakterij, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>:** koncentracija bakterij ob dodatku ekstrakta Ros.conh, **K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>:** koncentracija bakterij v kontrolnem vzorcu, **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda

#### 4.2.3 Protimikroben učinek MIC ekstraktov rožmarina, določen za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na druge vrste bakterij *Alicyclobacillus*

Z MIC ekstraktov rožmarina Ros.con (7,813 µg/ml) in Ros.conh (3,906 µg/ml), ki smo ju določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, smo določili učinek teh koncentracij ekstraktov tudi na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Določili smo rastne krivulje na dveh referenčnih sevih bakterij vrst *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus* in na živilskih izolatih bakterij vrst *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

##### 4.2.3.1 Rast bakterij vrste *A. acidocaldarius* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

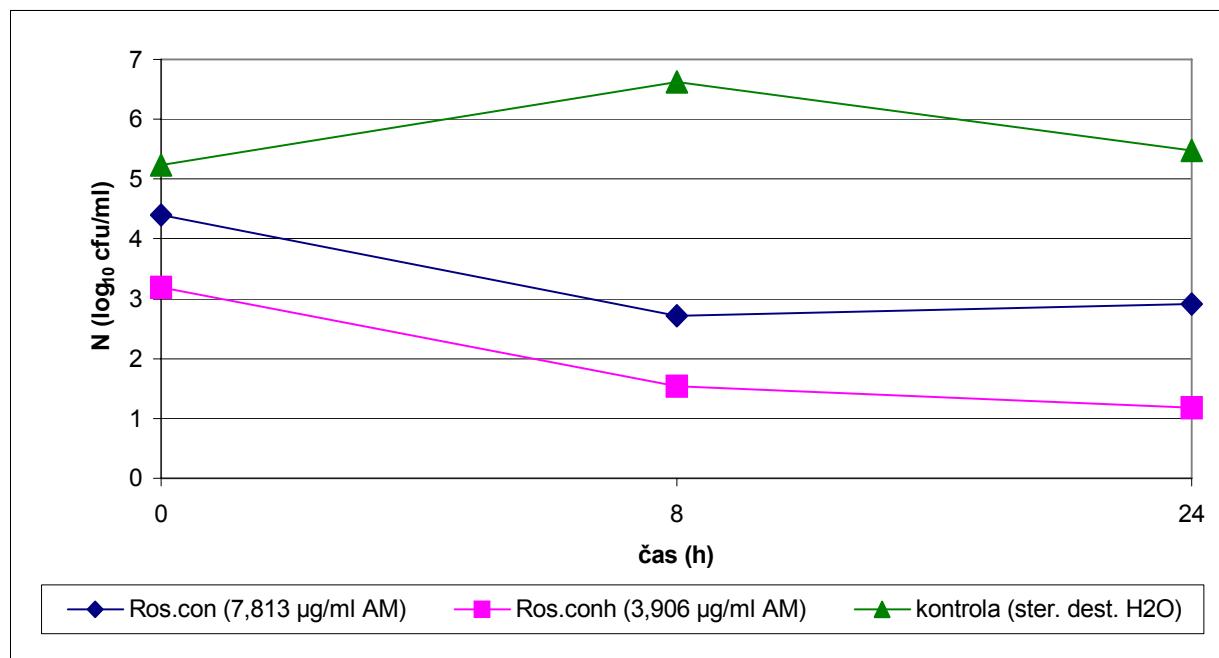
Protimikroben učinek MIC ekstraktov Ros.con (7,813 µg/ml) in Ros.conh (3,906 µg/ml) na bakterije vrste *A. acidocaldarius* smo ugotovili tako, da smo ob začetku inkubacije ter po osmih in 24 urah od dodatka bakterij vrste *A. acidocaldarius* in ekstraktov Ros.con oziroma Ros.conh v tekoče gojišče AM določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij. Vzporedno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje dveh paralelk v preglednici 4-3.

Preglednica 4-3: Rast bakterij vrste *A. acidocaldarius* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

Ros.con			Ros.conh			Kontrola	
ČAS (h)	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	
0	$2,50 \times 10^4$	$2,12 \times 10^2$	$1,56 \times 10^3$	$1,06 \times 10^2$	$1,70 \times 10^5$	$7,07 \times 10^4$	
8	$5,10 \times 10^2$	$2,83 \times 10^1$	$3,50 \times 10^1$	$2,12 \times 10^1$	$4,25 \times 10^6$	$2,12 \times 10^4$	
24	$8,10 \times 10^2$	$1,41 \times 10^1$	$1,50 \times 10^1$	$0,71 \times 10^1$	$3,00 \times 10^5$	$4,24 \times 10^4$	

Legenda: N: število bakterij; SD: standardna deviacija

S slike 4-12 je razvidno, da se število bakterij vrste *A. acidocaldarius* 24 ur po dodatku ekstrakta Ros.con ni povečalo oziroma je bilo razmnoževanje teh bakterij inhibirano. To pomeni, da je bila tudi za bakterije vrste *A. acidocaldarius* koncentracija 7,813 µg/ml ekstrakta Ros.con v tekočem gojišču AM inhibitorna. Število bakterij vrste *A. acidocaldarius* se prav tako po 24 urah od dodatka ekstrakta Ros.conh ni povečalo, torej je bila tudi koncentracija ekstrakta Ros.conh 3,906 µg/ml v tekočem gojišču AM inhibitorna.



Slika 4-12: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast bakterij vrste *A. acidocaldarius*.

Legenda:  $N (\log_{10} \text{cfu/ml})$ : logaritem števila bakterij; ster. dest.  $H_2O$  : sterilna destilirana voda

#### 4.2.3.2 Rast bakterij vrste *A. acidiphilus* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

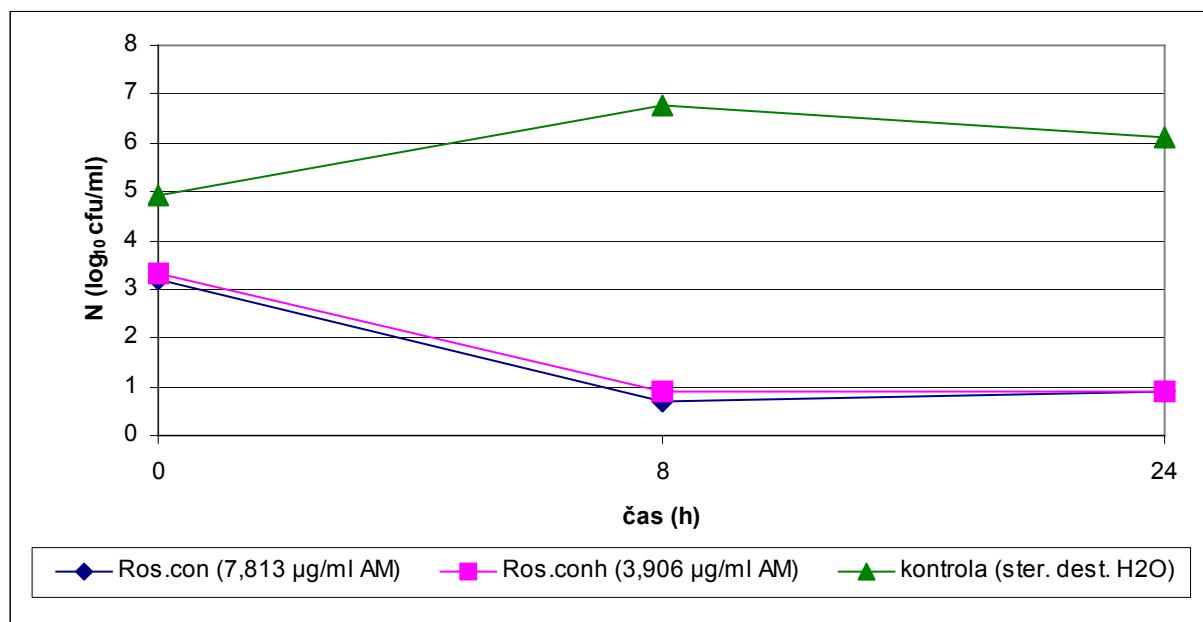
Protimikroben učinek MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidiphilus* smo ugotovili tako, da smo ob začetku inkubacije ter po osmih in 24 urah od dodatka bakterij vrste *A. acidiphilus* in ekstraktov Ros.con oziroma Ros.conh v tekoče gojišče AM določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij. Vzopredno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje dveh paralelk v preglednici 4-4.

Preglednica 4-4: Rast bakterij vrste *A. acidiphilus* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

Ros.con			Ros.conh			Kontrola	
ČAS (h)	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	
0	$1,57 \times 10^3$	$2,12 \times 10^1$	$2,15 \times 10^3$	$0,71 \times 10^1$	$8,60 \times 10^4$	$1,34 \times 10^4$	
8	$< 1,00 \times 10^1$	0	$< 1,00 \times 10^1$	0	$5,90 \times 10^6$	$4,24 \times 10^5$	
24	$< 1,00 \times 10^1$	0	$< 1,00 \times 10^1$	0	$1,26 \times 10^6$	$6,36 \times 10^5$	

Legenda: N: število bakterij; SD: standardna deviacija

Slike 4-13 je razvidno, da sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določeni za bakterije *A. acidoterrestris*, večji učinek na bakterije *A. acidiphilus*, na katere sta 24 ur po dodatku koncentracije 7,813 µg/ml ekstrakta Ros.con in koncentracije 3,906 µg/ml ekstrakta Ros.conh v tekoče gojišče AM, delovali baktericidno.



Slika 4-13: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast bakterij vrste *A. acidiphilus*.

Legenda: N ( $\log_{10}$  cfu/ml): logaritem števila bakterij; ster. dest. H<sub>2</sub>O: sterilna destilirana voda

#### 4.2.3.3 Rast bakterij vrste *A. hesperidum* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

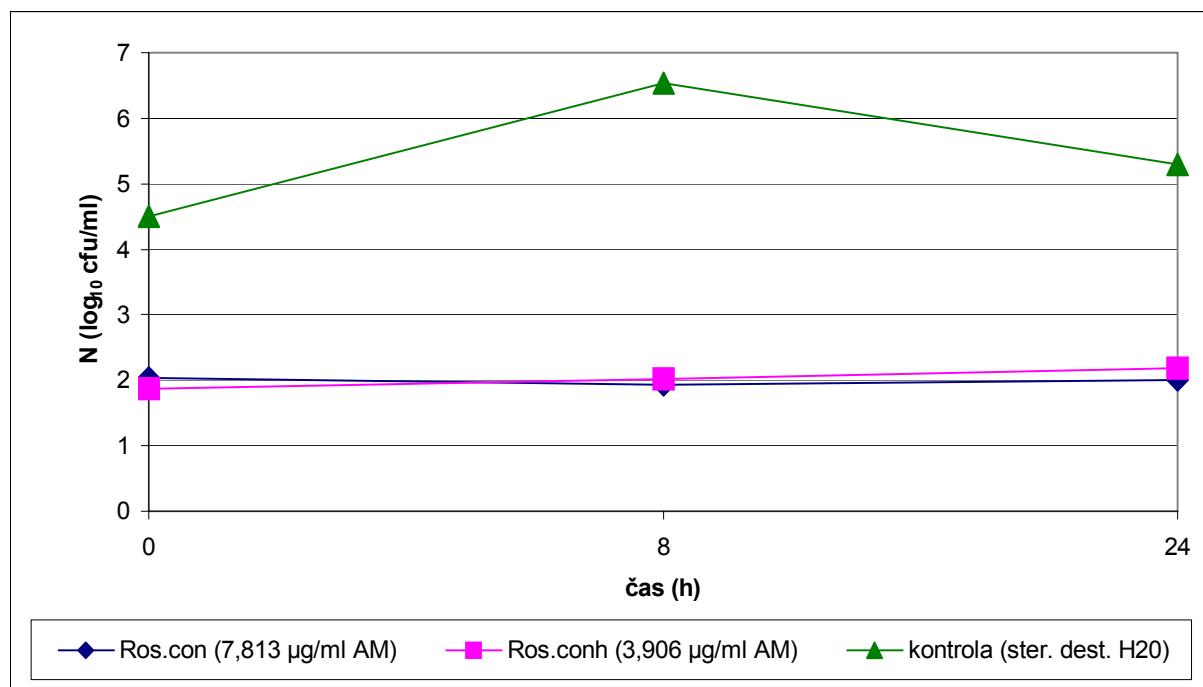
Ugotavljali smo tudi protimikroben učinek MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. hesperidum* tako, da smo ob začetku inkubacije ter po osmih in 24 urah od dodatka bakterij vrste *A. hesperidum* in ekstraktov Ros.con oziroma Ros.conh v tekoče gojišče AM določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij. Vzporedno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje dveh paralelk v preglednici 4-5.

**Preglednica 4-5: Rast bakterij vrste *A. hesperidum* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh**

Ros.con			Ros.conh		Kontrola	
ČAS (h)	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD
0	$1,10 \times 10^2$	0	$7,50 \times 10^1$	$0,71 \times 10^1$	$3,15 \times 10^4$	$1,62 \times 10^4$
8	$8,50 \times 10^1$	$6,36 \times 10^1$	$1,05 \times 10^2$	$2,12 \times 10^1$	$3,40 \times 10^6$	$2,97 \times 10^5$
24	$1,00 \times 10^2$	$1,41 \times 10^1$	$1,55 \times 10^2$	$0,71 \times 10^1$	$1,95 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$

Legenda: N: število bakterij; SD: standardna deviacija

S slike 4-14 je razvidno, da se število bakterij vrste *A. hesperidum* ves čas inkubacije po dodatku ekstrakta Ros.con ni povečalo oziroma je bilo razmnoževanje teh bakterij inhibirano. To pomeni, da je tudi za bakterije vrste *A. hesperidum* koncentracija 7,813 µg/ml ekstrakta Ros.con v tekočem gojišču AM inhibitorna. Število bakterij vrste *A. hesperidum* se je po 24 urah inkubacije po dodatku ekstrakta Ros.conh povečalo. Torej MIC ekstrakta Ros.conh 3,906 µg/ml v tekočem gojišču AM, določena za bakterije *A. acidoterrestris* ni bila inhibitorna za bakterije *A. hesperidum*.



**Slika 4-14: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast bakterij vrste *A. hesperidum*.**

Legenda: N (log<sub>10</sub> cfu/ml): logaritem števila bakterij; ster. dest. H<sub>2</sub>O: sterilna destilirana voda

#### 4.2.3.4 Rast bakterij vrste *A. cycloheptanicus* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh

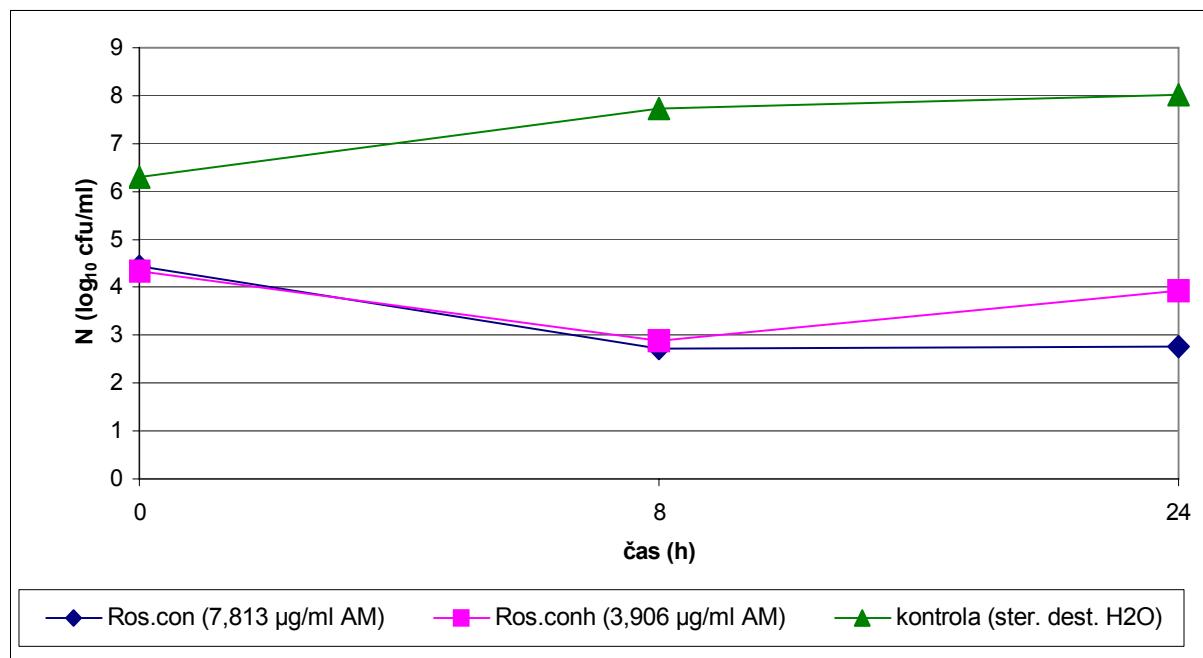
Ugotavljali smo protimikroben učinek MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. cycloheptanicus* tako, da smo spremljali rast ob začetku inkubacije ter po osmih in 24 urah od dodatka bakterij vrste *A. cycloheptanicus* in ekstraktov Ros.con oziroma Ros.conh v tekoče gojišče AM in določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij. Vzporedno smo rast spremljali v kontrolnih vzorcih, kjer smo namesto ekstrakta dodali sterilno destilirano vodo. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate podali kot povprečje dveh paralelk v preglednici 4-6.

**Preglednica 4-6: Rast bakterij vrste *A. cycloheptanicus* v gojišču AM z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh**

Ros.con			Ros.conh			Kontrola	
ČAS (h)	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	N (cfu/ml)	SD	
0	$2,68 \times 10^4$	$3,89 \times 10^3$	$2,14 \times 10^4$	$2,12 \times 10^3$	$2,01 \times 10^6$	$4,95 \times 10^4$	
8	$5,25 \times 10^2$	$0,71 \times 10^1$	$7,70 \times 10^2$	$4,24 \times 10^1$	$5,53 \times 10^7$	$3,29 \times 10^7$	
24	$5,95 \times 10^2$	$6,36 \times 10^1$	$8,30 \times 10^3$	$9,90 \times 10^1$	$1,04 \times 10^8$	$5,66 \times 10^4$	

Legenda: N: število bakterij; SD: standardna deviacija

S slike 4-15 je razvidno, da se število bakterij vrste *A. cycloheptanicus* 24 ur po dodatku ekstrakta Ros.con ni povečalo oziroma je bilo razmnoževanje teh bakterij inhibirano. To pomeni, da je bila tudi za bakterije vrste *A. cycloheptanicus* koncentracija 7,813 µg/ml ekstrakta Ros.con v tekočem gojišču AM inhibitorna. Število bakterij vrste *A. cycloheptanicus* po 24 urah od dodatka ekstrakta Ros.conh ni bilo večje kot ob začetku inkubacije, torej je bila inhibitorna tudi koncentracija 3,906 µg ekstrakta Ros.conh/ml v tekočem gojišču AM.



Slika 4-15: Vpliv MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določene za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast bakterij vrste *A. cycloheptanicus*.

Legenda: N ( $\log_{10}$  cfu/ml): logaritem števila bakterij; ster. dest. H<sub>2</sub>O: sterilna destilirana voda

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil preveriti, ali imata ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, ki sta vsebovala različno koncentracijo karnozolne kisline, protimikroben učinek na grampozitivne bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Rezultati predhodnih študij so pokazali, da sta ekstrakta delovala protibakterijsko na različne grampozitivne bakterije kot so bakterije vrste *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*, medtem ko na gram-negativne bakterije rodu *Salmonella* ekstrakta nista imela protibakterijskega učinka (Rožman, 2007; Piskernik, 2008).

Ekstrakt rožmarina Ros.con je vseboval 22,04 % karnozolne kisline, ekstrakt Ros.conh pa 40,49 %. Karnozolna kislina spada med fenolne spojine, ki so glavne protimikroben komponente v ekstraktih rožmarina (Del Campo in sod., 2000). Ekstrakt Ros.con je vseboval še 3,86 % karnozola, 10,2 % ursolne kisline, 6,1 % oleanolne kisline, 4,7 % betulinske kisline in manj kot 0,1 % rožmarinske kisline. Vseboval je tudi 1,76 ml/kg eteričnega olja z 72 ppm limonena in 990 ppm cineola (Berglez, 2002). Nismo pa imeli podatkov o ostali sestavi ekstrakta Ros.conh. Študije so pokazale, da imajo tudi druge spojine v ekstraktu Ros.con protimikroben učinek na različne bakterije (Burt, 2004). Čeprav so prisotne v ekstraktih v nizkih koncentracijah, imajo lahko ključno vlogo v protimikrobnem delovanju ekstrakta (Burt, 2004).

Primerjava rezultatov z drugimi študijami je težavna, ker se za določitev protimikrobnega delovanja uporablja več različnih metod in tudi avtorji uporabljajo različne definicije MIC. Rezultati se lahko razlikujejo tudi zaradi različne metode ekstrakcije, dela rastline, iz katerega je bil ekstrakt pripravljen, letnega časa pobiranja, podnebnih razmer in sestave tal (Ibanez in sod., 2003).

Poskuse smo izvedli s dvema različnima metodama za določanje protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *A. acidoterrestris*: metodo difuzije v trdem gojišču in metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Spremljali pa smo tudi kinetiko rasti različnih koncentracij bakterij vrste *A. acidoterrestris* med 24-urno inkubacijo v tekočem gojišču po dodatku ekstrakta Ros.con ali Ros.conh.

Z metodo difuzije v trdem gojišču smo ugotavljali protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh tudi na druge bakterije vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

Ugotavljali smo tudi učinek MIC, ki smo jo določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na različne koncentracije teh bakterij. Z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, ki smo jo določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, smo ugotavljali protimikroben učinek te koncentracije ekstraktov še na druge bakterije vrst *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

### 5.1.1 Metoda difuzije v gojišču AM

Metoda difuzije v trdem gojišču je najpogosteje uporabljena metoda za ugotavljanje protimikrobnega delovanja snovi, odkar obstaja direktna povezava med izmerjeno inhibicijsko cono in MIC (Woods in Washington, 1999). Je relativno preprosta, vendar včasih lahko ekstrakt teže difundira v gojišče (Dorman in Deans, 2000).

Z metodo difuzije v trdem gojišču AM smo ugotavljali protimikrobeni učinek ekstraktov rožmarina na bakterije vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus* in določili njihove minimalne inhibitorne koncentracije. Za MIC smo določili tisto koncentracijo, pri kateri je bila inhibicijska cona vzorca za 1–3 mm večja kot inhibicijska cona absolutnega etanola (Proestos in sod., 2006).

Za inhibicijo rasti različnih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus* (slike 4-1 in 4-2) je bila potrebna nižja koncentracija ekstrakta Ros.conh, ki je vseboval 40,49 % karnozolne kislina, kot ekstrakta Ros.con, ki je vseboval 22,04 % karnozolne kislina. Za bakterije vrst *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus* je bila vrednost MIC ekstrakta Ros.conh še enkrat manjša od MIC ekstrakta Ros.con, zato predvidevamo, da ima protimikrobeni učinek na te bakterije karnozolna kislina, katere koncentracija je v ekstraktu Ros.conh tudi še enkrat višja. Za bakterije vrste *A. hesperidum* je bila vrednost MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh enaka, zato sklepamo, da so imele na bakterije vrste *A. hesperidum* protimikrobeni učinek tudi druge protimikrobeno aktivne komponente v ekstraktu rožmarina (Burt, 2004).

Ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh sta imela najnižjo vrednost MIC (preglednica 4-1) za bakterije vrste *A. acidiphilus*, za inhibicijo rasti so zadostovale že zelo nizke koncentracije, to je 625 µg ekstrakta Ros.con/ml EtOH in 312,5 µg ekstrakta Ros.conh/ml EtOH. Najvišjo vrednost MIC za ekstrakt Ros.con so imele bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*, to je 20000 µg ekstrakta/ml EtOH. Za ekstrakt Ros.conh pa so imele najvišjo MIC bakterije vrste *A. acidocaldarius*, to je 10000 µg ekstrakta Ros.conh/ml EtOH.

Ekstrakta Ros.con in Ros.conh sta imela tudi glede na izmerjene inhibicijske cone največji protimikrobeni učinek na bakterije vrste *A. acidiphilus*, povprečna inhibicijska cona, izmerjena za ekstrakt Ros.con, je bila 13,54 mm in za ekstrakt Ros.conh 14,98 mm (priloga A 9-3).

Rožman (2007) je prav tako določala protimikrobeno delovanje ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh na grampozitivne bakterije z metodo difuzije v trdem gojišču, na različne seve bakterij vrste *L. monocytogenes* in na bakterije vrst *B. cereus* in *S. aureus*. Vrednosti MIC za različne seve bakterij *L. monocytogenes* so bile od 2500 µg ekstrakta/ml EtOH do 625 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.con in od 2500 µg ekstrakta/ml EtOH do 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.conh. MIC za bakterije vrste *S. aureus* je bila 5000 µg ekstrakta/ml EtOH za Ros.con in 2500 µg ekstrakta/ml EtOH za Ros.conh. Na bakterije vrste *B. cereus* sta imela ekstrakta enak protimikroben učinek, MIC je bila določena pri 625 µg ekstrakta/ml EtOH. V primerjavi z vrednostmi MIC ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh, ki smo jih določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*, sta imela ekstrakta približno enak protimikroben učinek, razen za bakterije *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*, na katere sta imela manjši protimikroben učinek.

Rezultati metode difuzije v trdem gojišču z diskami so kvalitativni (Parish in Davidson, 1993), metoda se najpogosteje uporablja za ugotavljanje ali ima preiskovana snov protimikrobeni učinek (Dorman in Deans, 2000). Je tehnično lahko izvedljiva in dobro ponovljiva, vendar so za določanje MIC druge metode primernejše (Woods in Washington, 1999, Lopez-Malo Vigil in sod, 2005 b).

### 5.1.2 Metoda razredčevanja v gojišču AM

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je zanesljiva referenčna metoda za določanje učinkovitosti protimikrobne snovi in se navadno uporablja, kadar so potrebni kvantitativni podatki (Barry, 1986). S to metodo smo določali MBC in MIC ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris* in tako primerjali njuno protimikrobeno delovanje.

Ugotovili smo, da je MBC ekstrakta Ros.conh, določena za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, nižja kot MBC ekstrakta Ros.con, kar pomeni, da je ekstrakt Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris* učinkoval bolj protimikrobeno (preglednica 4-2). To je razumljivo, saj je ekstrakt Ros.conh (40,49 % karnozolne kislina) vseboval več protimikrobne spojine karnozolne kislina, in sicer skoraj dvakratno količino v primerjavi z ekstraktom Ros.con (22,04 % karnozolne kislina). Vrednost MBC ekstrakta Ros.conh pa je bila 6,083 µg/ml AM, to je več kot petkrat nižja koncentracija kot pri ekstraktu Ros.con, za katerega je bila določena vrednost MBC 34,59 µg/ml AM. Če bi upoštevali, da v ekstraktu rožmarina protimikrobeno deluje le karnozolna kislina, bi glede na njeno vsebnost v ekstraktu Ros.conh pričakovali dvakrat nižjo MBC. Zato sklepamo, da so poleg karnozolne kislina na bakterije vrste *A. acidoterrestris* protimikrobeno delovale tudi ostale protimikrobeno aktivne komponente ekstrakta, kot so karnozol, ursolna, oleanolna, betulinska in rožmarinska kislina (Burt, 2004).

Rožman (2007) je prav tako določala MBC ekstrakta Ros.con na dva različna seva bakterij vrste *L. monocytogenes* z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB. MBC ekstrakta Ros.con je bila po 24-urah inkubacije 53,9 µg/ml TSB za sev bakterij *L. monocytogenes* ŽM58 in 401 µg/ml TSB za sev *L. monocytogenes* ŽM115.

Ekstrakt Ros.con je imel v primerjavi z MBC, ki so bile določene za bakterije vrste *L. monocytogenes*, na bakterije vrste *A. acidoterrestris* večji protimikroben učinek, saj je bila MBC ekstrakta Ros.con določena za bakterije vrste *A. acidoterrestris* 34,59 µg/ml AM (sliki 4-5 in 4-6).

Tudi MIC ekstrakta Ros.conh, določena za bakterije vrste *A. acidoterrestris* z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, je bila nižja kot MIC za ekstrakt Ros.con. MIC za ekstrakt Ros.con smo določili pri 7,813 µg/ml AM in za ekstrakt Ros.conh pri 3,906 µg/ml AM (sliki 4-7 in 4-8).

### 5.1.3 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na različne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris*

Ko smo ugotovili MIC za ekstrakta Ros.con in Ros.conh, smo te koncentracije uporabili za spremljanje rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris* pri različnih začetnih koncentracijah inokuluma.

MIC ekstrakta Ros.con ( $7,813 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ima največji vpliv na najnižjo koncentracijo bakterij v inokulumu, to je  $10^2 \text{ cfu}/\text{ml}$ , medtem ko ima na višji koncentraciji bakterij inhibitorni vpliv, kar potrjuje rezultate poskusa določanja MIC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* (4.2.2.1).

Koncentracija  $3,906 \mu\text{g}/\text{ml}$  ekstrakt Ros.conh ima prav tako največji vpliv na najmanjšo koncentracijo bakterij vrste *A. acidoterrestris* v inokulumu, to je  $10^3 \text{ cfu}/\text{ml}$ , medtem ko ima na višji koncentraciji inhibitorni vpliv, kar potrjuje rezultate določanja MIC ekstrakta Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris* (4.2.2.2).

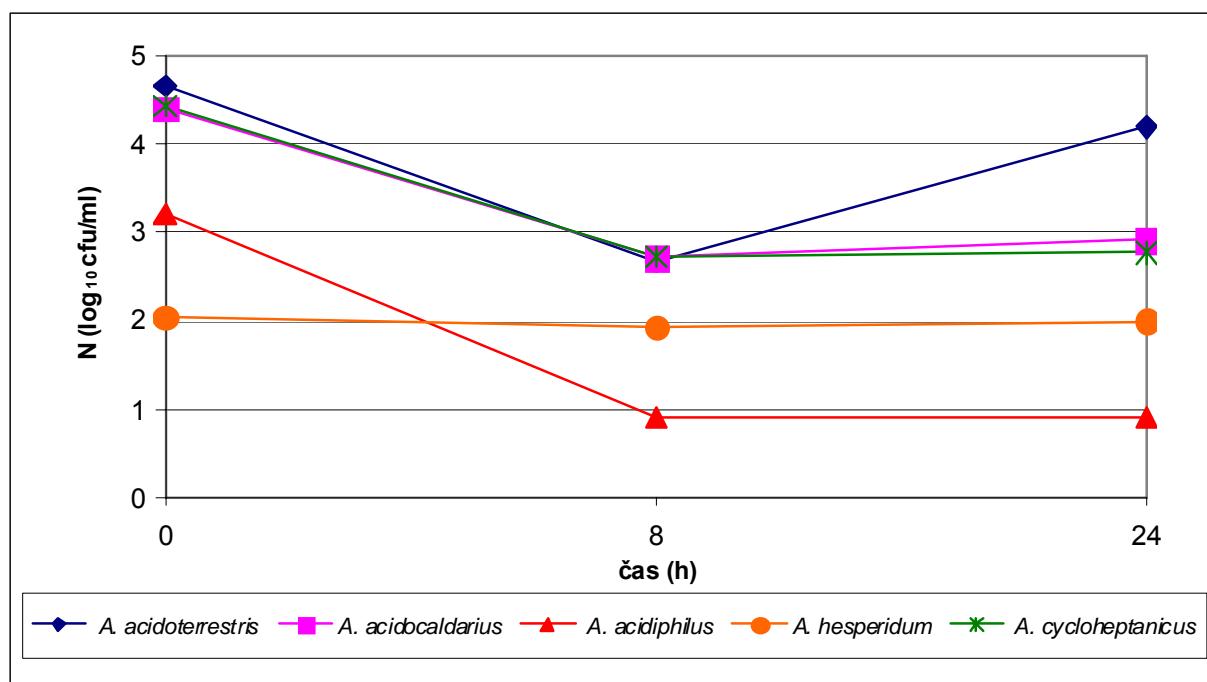
Za obe metodi določanja protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Alicyclobacillus*, smo uporabili koncentracijo inokuluma približno  $10^5 \text{ cfu}/\text{ml}$ .

Ugotovili smo tudi, da se bakterije vrste *A. acidoterrestris* z različnim začetnim številom v inokulumu, ki smo jim dodali sterilno destilirano vodo namesto ekstrakta, po 24 urah namnožijo do približno enake koncentracije. To pomeni, da razlike v koncentraciji inokuluma v kontrolnih vzorcih ne vplivajo na število bakterij po 24 urni inkubaciji. Opazili smo, da to velja do začetne koncentracije inokuluma  $10^6 \text{ cfu}/\text{ml}$ , ki po osmih urah doseže koncentracijo  $10^7 \text{ cfu}/\text{ml}$  in po 24 urah pade na  $10^5 \text{ cfu}/\text{ml}$ . Domnevali smo, da bakterije vrste *A. acidoterrestris* zaradi visoke koncentracije po osmih urah porabijo skoraj vse hranilne snovi v tekočem gojišču, prav tako se poveča tudi koncentracija metabolitov, zato preidejo v fazo odmiranja.

Zaradi večjega števila celic, pride tudi hitreje do tvorbe amonijaka, zato se tudi zviša pH. Sklepali smo, da bi lahko bil razlog za zmanjšanje števila bakterij vrste *A. acidoterrestris* po 24-urah inkubacije nevtralen pH gojišča, saj je območje pH za rast teh bakterij od 3,0 do 6,0, optimalen pH je 4,0 (Oita, 2002).

### 5.1.4 Protimikroben učinek MIC ekstraktov rožmarina, določen za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*

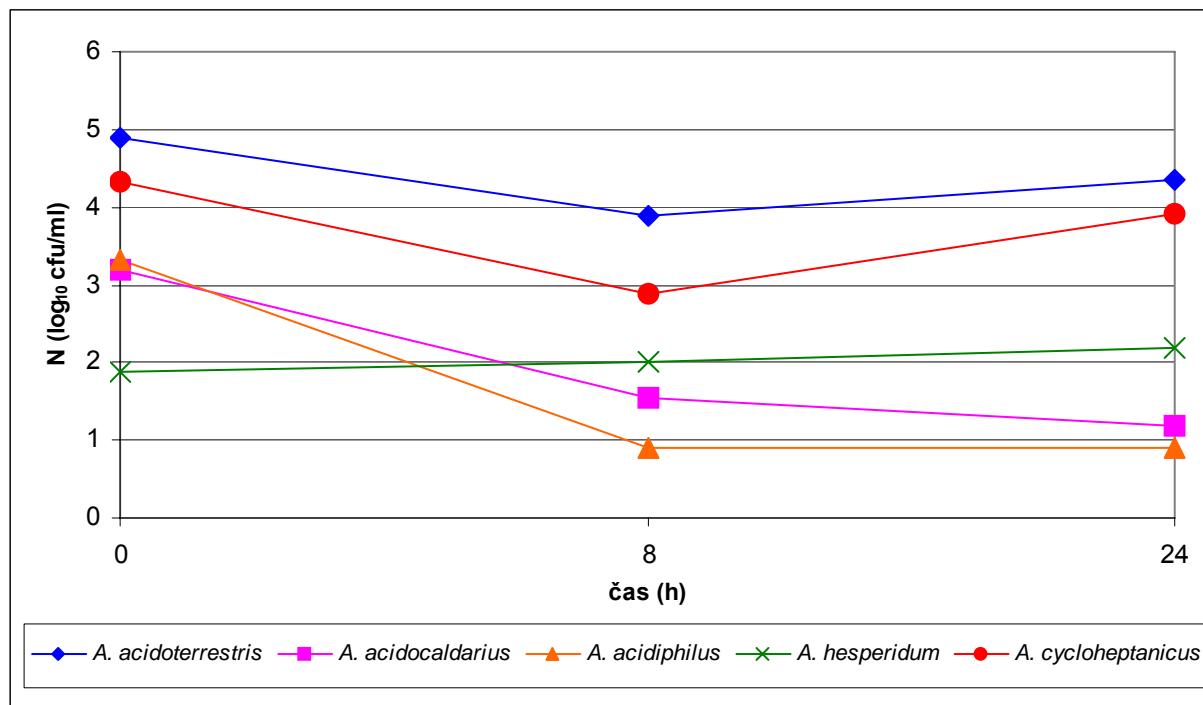
Z MIC ekstraktov Ros.con (7,813 µg/ml) oziroma Ros.conh (3,906 µg/ml), določeno za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, smo nato določili še rastne krivulje dveh referenčnih sevov *A. acidocaldarius* in *A. acidiphilus* in dveh živilskih izolatov bakterij vrst *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.



Slika 5-1: Protimikroben učinek MIC ekstrakta Ros.con (7,813 µg/ml), ki smo jo določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast drugih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*

S slike 5-1 je razvidno, da je imela koncentracija 7,813 µg/ml ekstrakta Ros.con v tekočem gojišču AM, ki je bila določena kot MIC za bakterije *A. acidoterrestris*, podoben protimikrobeni učinek tudi na bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*. Največji protimikrobeni učinek je imela ta koncentracija ekstrakta Ros.con na bakterije vrst *A. acidiphilus* in *A. hesperidum*.

S slike 5-2 je razvidno, da je imela koncentracija ekstrakta Ros.conh 3,906 µg/ml v tekočem gojišču AM, določena kot MIC za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, največji protimikrobeni učinek na bakterije vrste *A. acidiphilus* in *A. acidocaldarius*.



Slika 5-2: Protimikrobní učinek MIC ekstrakta Ros.conh ( $3,906 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), ki smo jo določili za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, na rast drugih vrst bakterij *Alicyclobacillus*

Največji protimikrobní učinek sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidiphilus*. Koncentracija MIC, določena za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, je bila za te bakterije baktericidna.

Na bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus* sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh inhibitorní učinek.

Na bakterije vrste *A. hesperidum* je imela MIC ekstrakta Ros.con inhibitorní učinek. MIC ekstrakta Ros.conh, določena za bakterije vrste *A. acidoterrestris* pa ni imela inhibitornega učinka na bakterije vrste *A. hesperidum*, ker je bilo število bakterij vrste *A. hesperidum* po 24-urah inkubacije večje kot na začetku inkubacije. Predpostavili smo, da je MIC ekstrakta Ros.conh za bakterije vrste *A. hesperidum* višja koncentracija, to je  $7,813 \mu\text{g}/\text{ml}$  ekstrakta Ros.conh, kar pomeni, da je vrednost MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču za te bakterije enaka. Pri metodi difuzije v trdem gojišču smo za bakterije vrste *A. hesperidum* prav tako dobili MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh pri enaki vrednosti koncentracije, to je  $5000 \mu\text{g}$  ekstrakta Ros.conh/ml EtOH.

Ugotovili smo, da je protimikroben učinek ekstraktov rožmarina odvisen od vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

## 5.2 SKLEPI

- Potrdili smo protimikrobeno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris*.
- Učinkovitejši je bil ekstrakt rožmarina Ros.conh z večjo vsebnostjo karnozolne kisline, razlike v MBC in MIC med ekstraktoma so bile velike, tudi do petkrat večje, kar pomeni, da k protimikrobnemu delovanju ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh prispevajo tudi druge sestavine ekstraktov, to so karnozol, ursolna, oleanolna, betulinska in rožmarinska kislina.
- Vrednosti MIC, ki smo jih določili z metodo difuzije v trdem gojišču AM in z metodo razredčevanja v tekočem gojišču AM, so različne, kar potrjuje navedbe v različnih člankih, da rezultatov teh dveh metod ne moremo kvantitativno primerjati.
- Protimikrobeni učinek ekstraktov rožmarina je odvisen od vrste ekstrakta in bakterij vrste *Alicyclobacillus*, koncentracije ekstrakta in števila bakterij v inokolumu.
- MIC ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh določeni za bakterije vrste *A. acidoterrestris* sta bili protimikrobeno učinkoviti tudi na druge bakterije rodu *Alicyclobacillus*: *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*.

## 6 POVZETEK

Bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* so grampozitivne, sporogene, acidofilne paličaste bakterije. So vse pogostejši kvarljivci pasteriziranih sadnih sokov in vod z okusom, ker njihove spore preživijo temperature pasterizacije. Najdemo jih v zemlji in vodi, kjer se surovine za proizvodnjo sokov, tudi kontaminirajo s sporami bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Za človeka niso patogene, naredijo pa zelo veliko škodo proizvajalcem pijač. V sokovih tvorijo tudi spojino gvajakol, ki ima neprijetno aroma, zato sokovi niso več organoleptično sprejemljivi za porabnika.

Zelišča in začimbe že zelo dolgo uporabljam za čaj in aroma v živilih, znani pa so tudi njihovi zdravilni učinki, tako protimikrobni, protivirusni in antioksidativni, zato bi jih lahko uporabili kot naravna protimikrobna sredstva. Zanje se povečuje zanimanje tudi, ker potrošniki vse bolj dajejo prednost tistim živilom, ki so brez umetnih konzervansov in obdelani brez ekstremnih postopkov. Rožmarin je začimba, ki se uporablja za izboljšanje senzoričnih lastnosti živil, ima pa tudi protimikrobne in antioksidativne lastnosti (Burt, 2004).

Čedalje več raziskav vključuje rožmarin, njegove ekstrakte, eterična olja in aktivne učinkovine za ugotavljanje protimikrobnega učinka na različne vrste mikroorganizmov, ki kvarijo živila in patogene bakterije (Romano, 2009). Vendar se njihovi rezultati zelo težko primerjajo zaradi različne metodike in različno pridobljenih aktivnih učinkovin. Težave se pojavijo tudi zaradi različnih definicij MIC avtorjev v študijah (Burt, 2004). V diplomski nalogi smo uporabili dva ekstraka rožmarina Ros.con in Ros.conh z različno vsebnostjo karnozolne kisline in dve različni metodi določanja protimikrobne aktivnosti na bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Ekstrakt Ros.con je vseboval 22,04 % karnozolne kisline in ekstrakt Ros.conh 40,49 % karnozolne kisline.

Najprej smo uporabili metodo difuzije v trdem gojišču AM, s katero smo določili minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov Ros.con in Ros.conh za različne vrste bakterij *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus*. Za MIC smo določili tisto koncentracijo, pri kateri je bila inhibicijska cona vzorca za 1 do 3 mm večja kot inhibicijska cona absolutnega etanola (Proestos in sod., 2006).

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču smo določali MBC in MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije *A. acidoterrestris*. Kot MBC smo določili najnižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, pri kateri po 24-urni inkubaciji preživi 0,1 % bakterij (Cannilac in Mourey, 2001). MIC smo določili kot najnižjo koncentracijo ekstrakta Ros.con in Ros.conh, ki preprečuje razmnoževanje bakterij (Carson in sod., 1995).

MIC pri metodi difuzije v trdem gojišču za ekstrakt Ros.con smo za bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus* določili pri 20.000 µg ekstrakta/ml EtOH, za bakterije vrst *A. acidoterrestris* in *A. hesperidum* pri 5000 µg ekstrakta/ml EtOH in za bakterije vrste *A. acidiphilus* pri 625 µg ekstrakta/ml EtOH. MIC ekstrakta Ros.conh smo za bakterije vrste *A. acidocaldarius* določili pri 10.000 µg ekstrakta/ml EtOH, za bakterije vrst *A. hesperidum* in *A. cycloheptanicus* pri 5000 µg ekstrakta/ml EtOH, za bakterije vrste *A. acidoterrestris* pri 2500 µg ekstrakta/ml EtOH in za bakterije vrste *A. acidiphilus* pri 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH.

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču AM smo določili MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *A. acidoterrestris* pri 34,59 µg ekstrakta/ml tekočega gojišča AM in za ekstrakt Ros.conh pri 6,083 µg ekstrakta/ml tekočega gojišča AM. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču AM smo določali tudi MIC za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, ki smo jo za ekstrakt Ros.con določili pri 7,813 µg/ml tekočega gojišča AM in za Ros.conh pri 3,906 µg/ml tekočega gojišča AM.

Z MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh, določeno za bakterije vrste *A. acidoterrestris*, smo ugotavljali učinek na različne koncentracije inokoluma teh bakterij. Največji učinek sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na najnižjo koncentracijo teh bakterij. Na višji koncentraciji bakterij vrste *A. acidoterrestris* sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh inhibitorni učinek, kar potrjuje rezultate določanja MIC pri metodi razredčevanja v gojišču AM.

Določali smo tudi protimikrobeno delovanje MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrste *A. acidoterrestris* na druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Največji učinek sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidiphilus*, na katere sta imeli baktericidni učinek. Na bakterije vrst *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus* sta imeli MIC ekstraktov Ros.con in Ros.conh inhibitorni učinek.

## 7 VIRI

Albuquerque L., Rainey F. A., Chung A. P., Sunna A., Nobre M. F., Grote R., Antranikian G., DeCosta M. S. 2000. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. International Journal and Evolutionary Microbiology, 50: 451–457.

Barry A. L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theoretical considerations. V: Antibiotics in laboratory medicine. 2<sup>nd</sup> edition. Lorian V. (ed.). Baltimore. Williams & Wilkins: 1-26

Berglez T. 2002. Določanje aktivnih učinkovin v rožmarinu. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 130 str.

Bevilacqua A., Sinigaglia M., Corbo M. R. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. Journal of Food Microbiology, 125: 103–110.

Blotcher J. C., Busta F. F. 1983. Bacterial spore resistance to acid. Food Technology, 37: 87-99.

Brown K. L. 2000. Control of bacterial spores. British Medical Bulletin, 56: 158-171.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

Cannilac N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiology, 18: 261-268.

Cannilac N., Mourey A. 2003. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. International Journal of Food Microbiology, 92: 95–103.

Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 35: 421–424.

Cerny G., Hennlich W., Poralla K. 1984. Fruchsaftverderb durch *Bacillen*: isolierung und charakterisierung des verderbsregens. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A: 179: 224-227.

Chang S.S., Kang D-H. 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. Critical Reviews in Microbiology, 30: 55-74

Conner D. E., Beuchat L. R. 1984 b. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essencial oils of plants. Applied in Environmental Microbiology, 47: 229–233.

Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29: 130-135.

Davidson P. M., Parish M. E. 1989. Methods for testing the efficiency of food antimicrobials. Journal of Food Technology, 43: 148–155.

Darland G., Brock T. D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. Journal of Genetic Microbiology, 67: 9–15.

Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essencial oils. International Journal of Food Microbiology, 74: 101–109.

Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection, 63, 1359–1368.

Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. System of Applied Microbiology, 10: 47–53.

Deinhard G., Saar J., Krischke W., Poralla K. 1987. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids. System of Applied Microbiology, 10: 68–73.

Doores S. 1983. The microbiology of apples and apple products. Critical Reviews of Food Science, 19: 133-149.

Dorman H.J.D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.

Duong H. A., Jensen N. 2000. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. Food Australia. 52: 292-292.

Eiroa M. N. U., Junquerira V. C. A., Schmidt F. 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. Journal of Food Protection, 62: 883–886.

Furag R. S., Daw Z. Y., Hewedi F. M., El-Baroty G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection, 52: 665–667.

Goto K., Matsubara H., Mochida K., Matsubara T., Hara Y., Niwa M., Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 109–113.

- Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1537–1544.
- Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Ozawa C., Kasai H., Yokota A. 2006. Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Microbiology culture column, 22: 1-14.
- Goto K., Tanimoto Y., Tamura T., Mochida K., Arai D., Asahara M., Suzuki M., Tanaka H., Inagaki K. 2002. Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. Extremophiles, 6: 333–340.
- Ibanez E., Kubatova A., Senorans F. J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S. B. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 375–382.
- ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Colony-count technique at 30 degrees C. 2003: 9 str.
- Jensen N., Whitfield F.B. 2003. Role of *Alocyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. Letters in Applied Microbiology, 36: 9-14.
- Karavaiko G. I., Bogdanova T. I., Tourova T. P., Kondrat'eva T. F., Tsaplina I. A., Egorova M. A., Krasil'nikova E. N., Zaharchuk L. M. 2005. *Reclassification of 'Sulfovbacillus thermosulfooxidans' subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfovbacillus disulfidooxidans*.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 941–947.
- Keynan A., Evenchik Z. 1969. Activation. V: The bacterial spore. Gould G.W., Hurst A. (eds.). London, United Kingdom, Academic Press: 359-396.
- Komitopoulou E., Boziaris I. S., Davies E. A., Delves-Broughton J., Adams M. R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science and Technology, 34: 81-85.
- Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Alzamora S.M. 2005 a. Naturally occurring compounds. V: Antimicrobials in food. 33<sup>rd</sup> ed. Davidson M.P., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.), Boca Raton, Taylor & Francis Group: 429-451.
- Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Parish E. M., Davidson P. M. 2005 b. Methods for activity assay and evaluation of results. V: Antimicrobials in food. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson M.P., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.), Boca Raton, Taylor & Francis Group: .
- Mallidis C. G., Drizou D. 1991. Effect of simultaneous application of heat and pressure on the survival of bacterial spores. Journal of Applied Bacteriology, 71: 285–288.

Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a new thermo-acidiphilic  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 1681–1685.

McIntyre S., Ikawa J. Y., Parkinson N., Haglund J., Lee J. 1995. Characterization of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. Journal of Food Protection, 58: 319–319.

Mendoza-Yepes M.J., Sanchez-Hidalgo L.E., Maertens G., Marin-Iniesta F. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oils (DMC) in Spanish soft cheese. Journal of Food Safety, 17: 47–55.

Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkvabek J. 2009. Antimicrobial properties of selected essencial oils in vapour phase against foodborne bacteria. Food Control, 20: 157–160.

Nicolaus B., Improta R., Manca C. M., Lama L., Esposito E., Gambacorta A. 1998. *Alicyclobacilli* from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. Polar Biology, 19: 133–141.

Nychas G. J. E. 1995. Natural antimicrobials from plants. V: New methods of food preservation. Gould G. W. (ed.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 58–89.

Oita S. 2002. Control of thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* by barley and wheat  $\alpha$ - in  $\beta$ -thionins. Bulletin of National Agriculture Center, 1: 49–59.

Onawunmi G.O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Letters in Applied Microbiology, 9: 105–108.

Pandit V. A., Shelef L. A. 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary. (*Rosmarinus officinalis* L.). Food Microbiology, 11: 57–63.

Parish M.E., Davidson P.M. 1993. Methods for evaluation. V: Antimicrobials in foods. 2<sup>nd</sup> ed. Davidson P.M., Branen A.L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 597–615.

Pettipher G. L., Osmundson M.E., Murphy J. M. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice-containing drinks. Letters in Applied Microbiology, 24: 185–189.

Piddock L. J. 1990. Techniques used for determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Journal of Applied Microbiology, 68: 307–318.

Piskernik S. 2008. Protomikroben delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.

- Poralla K., Knig W. A. 1983. The occurrence of  $\omega$ -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. Letters in Applied Microbiology, 16: 303-306.
- Proestos C., Boziaris I. S., Nychas G.-J. E., Komaitis M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry, 95: 664–671.
- Rižner-Hraš A. 2000. Izolacija aktivnih učinkovin rožmarina. Doktorska disertacija, Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 102 str.
- Romano C. S., Abadi K., Reppet V., Vojnov A. A., Moreno S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry, 115: 456-461.
- Rožman T. 2007. Protimikrobeno delovanje ekstraktov rožmarina na različne vrste bakterij rodu *Listeria*. Dipl. delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 70 str.
- Shelef L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. Journal of Food Safety, 6: 29–44.
- Silva F. M., Gibbs P., Vieira M. C., Silva C. L. M., 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids, and pH conditions for the design of fruit processes. International Journal of Food Microbiology, 51: 95–103.
- Simbahan J., Drijber R., Blum P. 2004 *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Spring, California, USA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1703–1707.
- Sofos J. N., Beuchat L. R., Davidson P. M., Johnson E. A. 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 28: 71-72.
- Solberg P., Castberg H. B. Osmunsen J. I. 1990. Packaging systems for fruit juices and non-carbonated beverages. V: Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. 1<sup>st</sup> ed. Hicks D. (ed.), London, Blackie and Son: 330-330.
- Splittstoesser D. F., Churey J. J. 1996. Unique spoilage organisms of musts and wines. V: Wine spoilage microbiology conference. Toland T., Fulgesang K. C. (eds.). Fresno, California State University: 36-41.
- Splittstoesser D. F., Lee C. Y., Churey J. J. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 585-587.
- Springett M. B. 1996. Formation of off-flavors due to microbiological and enzymatic action. V: Food taints and off flavors. 2<sup>nd</sup> ed. Glasgow, Velika Britanija, Blackie Academic & Professional: 275-275.

Takahashi T., Kokubo R., Sakaino M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Letters in Applied Microbiology. 39: 60–64.

Tainter D.R., Grenis A.T. 2001. Spices and seasonings: a food technology handbook. New York, VCH Publishers: 249 str.

Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T. 2003. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1081–1084.

Uchino F., Doi S. 1967. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Journal of Agricultural and Biological Chemistry, 31: 817–822.

Walls I., Chuyate R. 1998. *Alicyclobacillus* - Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 499-503.

Walls I., Chuyate R. 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia. 52: 286–288.

Wilkins K.M., Board R.G. 1989. Natural antimicrobial systems. V: Mechanisms of action of food preservation procedures. Gould G.W. (ed.). London, Elsevier Applied Sciences: 285-362

Wisotzkey J. D., Jurtschuk J. R. P., Fox G. E., Deinhard G., Poralla K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 263–269.

Wisse C. A., Parish M. 1998. Isolation and enumeration of spore forming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Dairy Food Environmental Sanitation. 18: 504–509.

Woods G.L., Washington J.A. 1999. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: Manual of clinical microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Pfader M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341.

Yamazaki K., Tezuka H., Shinano H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acid beverages. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 60: 543-545.

Yokota A., Fujii T., Goto K. 2007. *Alicyclobacillus* - thermophilic acidophilic bacilli. Japan, Springer: 180 str.

Zaika L.L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety, 9: 97-118.

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Barbari Jeršek se najlepše zahvaljujem za zelo zanimiv naslov diplomske naloge, strokovno pomoč in nasvete, ter za skrben in natančen pregled diplomske naloge.

Prof. dr. Veroniki Abram se zahvaljujem za strokoven pregled diplomske naloge.

Univ. dipl. živ. tehn. Tanji Rožman in Jani Avbelj za pomoč in nasvete pri praktičnem delu diplome v laboratoriju.

Univ. dipl. živ. tehn. Ivici Hočevar za pregled in urejanje virov.

Posebna zahvala tudi Sašu, mojim staršem, starim staršem, sestri Teji in bratu Nejcu, Slavku, Duši za potrežljivost in vso podporo in razumevanje skozi vsa leta študija.

Hvala sestriču Mihu Mrak za strokovno pomoč pri računalniških zadevah.

Zahvaljujem se tudi prof. Vesni Penec za lektoriranje diplomske naloge.

Hvala tudi sošolkam in sošolcem za zanimivne in zabavne dni, ki smo jih preživeli skupaj na faksu in izven njega.

## 8 PRILOGE

Priloga A 9-1: Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidoterrestris*, določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM

EKSTRAKT	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>							
	Inhibicijska cona (mm)							
	Ros.con		Ros.conh					
C (µg/ml EtOH)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD
80000	3,46	3,71	3,59	0,18	5,80	7,77	6,79	1,39
40000	3,20	4,56	3,88	0,96	5,29	4,95	5,12	0,24
20000	4,56	4,76	4,66	0,14	5,40	7,21	6,31	1,28
10000	3,95	4,05	4,00	0,07	4,50	5,78	5,14	0,91
5000	2,97	3,13	3,05	0,11	3,75	6,15	4,95	1,70
2500	2,79	2,36	2,58	0,30	3,75	3,67	3,71	0,06
1250	1,86	2,96	2,41	0,78	2,32	2,62	2,47	0,21
625	1,78	1,77	1,78	0,01	2,42	2,02	2,22	0,28
312,5	0,91	1,80	1,36	0,63	1,13	1,92	1,53	0,56
156,25	0,56	0,85	0,71	0,21	0,98	1,50	1,24	0,37
78,125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,56	0,56	0,00
39,063	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KONTROLNE RAZTOPINE								
Ster. dest. H <sub>2</sub> O				0,00	0,00	0,00	0,00	
Ab. EtOH				1,50	1,50	1,50	0,00	
OTC (0,067 mg/ml)				19,29	18,56	18,93	0,52	

Legenda: **P<sub>1</sub>**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **P<sub>2</sub>**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **POVP.**: povprečje; **SD**: standardna deviacija; **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni alkohol; **OTC**: oksitetraciklin

**Priloga A 9-2: Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidocaldarius*, določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM**

EKSTRAKT	Alicyclobacillus acidocaldarius							
	Ros.con				Inhibicijska cona (mm)			
	C (µg/ml EtOH)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.
80000	6,32	4,04	5,18	1,61	5,88	4,71	5,30	0,83
40000	6,18	3,53	4,86	1,87	5,29	4,12	4,71	0,83
20000	5,81	3,75	4,78	1,46	5,15	3,90	4,53	0,88
10000	4,34	2,58	3,46	1,24	4,50	3,45	3,98	0,74
5000	3,65	2,46	3,06	0,84	3,67	2,87	3,27	0,57
2500	1,75	2,22	1,99	0,33	3,05	2,59	2,82	0,33
1250	1,40	1,77	1,59	0,26	3,08	1,75	2,42	0,94
625	1,35	1,18	1,27	0,12	2,21	1,86	2,04	0,25
312,5	1,50	1,27	1,39	0,16	1,68	1,40	1,54	0,20
156,25	1,51	1,18	1,35	0,23	1,54	0,91	1,23	0,45
78,125	1,62	0,88	1,25	0,52	0,56	0,56	0,56	0,00
39,063	1,25	0,59	0,92	0,47	0,42	1,40	0,91	0,69
KONTROLNE RAZTOPINE								
Ster. dest. H <sub>2</sub> O					0,00	0,00	0,00	0,00
Ab. EtOH					1,10	1,69	1,40	0,42
OTC (0,067 mg/ml)					20,07	20,88	20,48	0,57

Legenda: **P<sub>1</sub>**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **P<sub>2</sub>**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **POVP.**: povprečje; **SD**: standardna deviacija; **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni alkohol; **OTC**: oksitetraciklin

**Priloga A 9-3: Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. acidiphilus*, določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM**

EKSTRAKT	Alicyclobacillus acidiphilus							
	Ros.con				Inhibicijska cona (mm)			
	C (µg/ml EtOH)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.
80000	13,99	13,08	13,54	0,64	15,23	14,73	14,98	0,35
40000	13,51	14,48	14,00	0,69	15,04	14,59	14,82	0,32
20000	13,87	12,87	13,37	0,71	14,91	13,95	14,43	0,68
10000	12,81	12,25	12,53	0,40	13,83	13,39	13,61	0,31
5000	13,92	12,66	13,29	0,89	13,07	14,11	13,59	0,74
2500	10,73	10,14	10,44	0,42	12,64	12,71	12,68	0,05
1250	12,24	8,95	10,60	2,33	11,24	12,03	11,64	0,56
625	8,68	7,43	8,06	0,88	9,36	9,73	9,55	0,26
312,5	5,39	3,78	4,59	1,14	6,23	5,18	5,71	0,74
156,25	2,66	3,15	2,91	0,35	8,39	4,48	6,44	2,76
78,125	0,70	3,08	1,89	1,68	3,99	3,85	3,92	0,10
39,063	0,49	2,28	1,39	1,27	3,08	4,11	3,60	0,73
KONTROLNE RAZTOPINE								
Ster. dest. H <sub>2</sub> O				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ab. EtOH				1,68	2,73	2,21	0,74	
OTC (0,067 mg/ml)				26,51	28,75	27,63	1,58	

Legenda: **P<sub>1</sub>**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **P<sub>2</sub>**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **POVP.**: povprečje; **SD**: standardna deviacija; **ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni alkohol; **OTC**: oksitetraciklin

**Priloga A 9-4: Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. hesperidum*, določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM**

EKSTRAKT	Alicyclobacillus hesperidum							
	Ros.con				Inhibicijska cona (mm)			
	C (µg/ml EtOH)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.
80000	5,46	6,02	5,74	0,40	4,34	4,97	4,66	0,45
40000	5,07	4,55	4,81	0,37	5,04	4,62	4,83	0,30
20000	4,34	3,71	4,03	0,45	3,22	4,83	4,03	1,14
10000	3,78	3,22	3,50	0,40	2,87	3,71	3,29	0,59
5000	3,01	2,80	2,91	0,15	3,50	2,87	3,19	0,45
2500	2,59	2,59	2,59	0,00	2,17	1,96	2,07	0,15
1250	2,10	1,44	1,77	0,47	1,96	1,68	1,82	0,20
625	1,71	1,33	1,52	0,27	0,63	0,98	0,81	0,25
312,5	0,91	1,89	1,40	0,69	1,12	1,26	1,19	0,10
156,25	0,77	1,40	1,09	0,45	0,49	1,12	0,81	0,45
78,125	1,61	0,84	1,23	0,54	0,32	0,73	0,53	0,29
39,063	0,35	1,05	0,70	0,49	0,28	0,56	0,42	0,20
KONTROLNE RAZTOPINE								
Ster. dest. H <sub>2</sub> O					0,00	0,00	0,00	0,00
Ab. EtOH					1,68	1,40	1,54	0,20
OTC (0,067 mg/ml)					16,79	18,19	17,49	0,99

Legenda: **P<sub>1</sub>**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **P<sub>2</sub>**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **POVP.**: povprečje; **SD**: standardna deviacija; **Ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni alkohol; **OTC**: oksitetraciklin

**Priloga A 9-5: Protimikrobn učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije vrste *A. cycloheptanicus*, določen z metodo difuzije v trdem gojišču AM**

EKSTRAKT	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>							
	Ros.con				Inhibicijska cona (mm)			
	C (µg/ml EtOH)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.	SD	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	POVP.
80000	3,36	2,17	2,77	0,84	5,25	4,83	5,04	0,30
40000	3,71	2,24	2,98	1,04	4,69	4,55	4,62	0,10
20000	3,50	2,66	3,08	0,59	4,62	4,13	4,38	0,35
10000	3,08	1,96	2,52	0,79	3,19	2,94	3,07	0,18
5000	1,89	1,68	1,79	0,15	2,87	2,59	2,73	0,20
2500	2,03	1,75	1,89	0,20	2,87	1,54	2,21	0,94
1250	0,77	2,03	1,40	0,89	2,24	1,40	1,82	0,59
625	0,63	1,19	0,91	0,40	1,54	1,26	1,40	0,20
312,5	0,91	0,56	0,74	0,25	0,69	0,70	0,70	0,01
156,25	0,56	0,77	0,67	0,15	0,70	0,63	0,67	0,05
78,125	0,35	0,35	0,35	0,00	0,49	0,84	0,67	0,25
39,063	0,63	0,70	0,67	0,05	0,28	0,82	0,55	0,38
KONTROLNE RAZTOPINE								
Ster. dest. H <sub>2</sub> O					0,00	0,00	0,00	0,00
Ab. EtOH					0,77	0,84	0,81	0,05
OTC (0,067 mg/ml)					17,98	17,77	17,88	0,15

Legenda: **P<sub>1</sub>**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **P<sub>2</sub>**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **POVP.**: povprečje; **SD**: standardna deviacija; **Ster. dest. H<sub>2</sub>O**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni alkohol; **OTC**: oksitetraciklin

**Priloga A 9-6: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con ob začetku inkubacije**

ČAS 0 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.con			
% ekstrakta v AM	C (µg/ml AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>p</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
2	2000	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,25	250	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,125	125	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,0625	62,5	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	2,95 × 10 <sup>2</sup>	1,50 × 10 <sup>2</sup>	2,05 × 10 <sup>2</sup>
0,03125	31,25	4,07 × 10 <sup>3</sup>	1,81 × 10 <sup>3</sup>	2,94 × 10 <sup>3</sup>	1,60 × 10 <sup>3</sup>
0,01563	15,625	6,25 × 10 <sup>3</sup>	3,12 × 10 <sup>4</sup>	1,87 × 10 <sup>4</sup>	1,76 × 10 <sup>4</sup>
0,0078125	7,8125	5,50 × 10 <sup>4</sup>	3,40 × 10 <sup>4</sup>	4,45 × 10 <sup>4</sup>	1,48 × 10 <sup>4</sup>
0,00390625	3,90625	1,45 × 10 <sup>5</sup>	1,52 × 10 <sup>5</sup>	1,49 × 10 <sup>5</sup>	4,95 × 10 <sup>3</sup>
0,00195313	1,953125	3,51 × 10 <sup>5</sup>	3,26 × 10 <sup>5</sup>	3,38 × 10 <sup>5</sup>	1,70 × 10 <sup>4</sup>
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>1,14 × 10<sup>6</sup></b>	<b>8,51 × 10<sup>5</sup></b>	<b>9,98 × 10<sup>5</sup></b>	<b>2,04 × 10<sup>5</sup></b>

Legenda: **%:** utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; **C:** koncentracija ekstrakta µg/ml EtOH, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml):** število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.con; **N<sub>p</sub>:** povprečno število bakterij; **SD:** standardna deviacija; **/:** poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda, \* : kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-7: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con po osemurni inkubaciji**

ČAS 8 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.con			
% ekstrakta v AM	C (µg/ml AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>p</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
2	2000	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,25	250	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,125	125	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,0625	62,5	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0
0,03125	31,25	1,50 × 10 <sup>1</sup>	1,00 × 10 <sup>1</sup>	1,25 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>
0,01563	15,625	1,50 × 10 <sup>1</sup>	1,00 × 10 <sup>1</sup>	1,25 × 10 <sup>1</sup>	<1,00 × 10 <sup>1</sup>
0,0078125	7,8125	1,50 × 10 <sup>1</sup>	9,10 × 10 <sup>2</sup>	4,63 × 10 <sup>2</sup>	6,33 × 10 <sup>2</sup>
0,00390625	3,90625	1,25 × 10 <sup>5</sup>	1,27 × 10 <sup>5</sup>	1,26 × 10 <sup>5</sup>	1,41 × 10 <sup>3</sup>
0,00195313	1,953125	1,28 × 10 <sup>5</sup>	2,30 × 10 <sup>6</sup>	1,23 × 10 <sup>6</sup>	1,50 × 10 <sup>6</sup>
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>2,84 × 10<sup>6</sup></b>	<b>2,22 × 10<sup>6</sup></b>	<b>2,53 × 10<sup>6</sup></b>	<b>4,38 × 10<sup>5</sup></b>

Legenda: % : utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; C: koncentracija ekstrakta µg/ml EtOH, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml): število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.con; N<sub>p</sub>: povprečno število bakterij; SD: standardna deviacija; /: poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; ster. dest. H<sub>2</sub>O: sterilna destilirana voda, \* : kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-8: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji**

ČAS 24 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.con			
% ekstrakta v AM	C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>P</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	0
2	2000	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	0
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	0
0,25	250	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	0
0,125	125	$1,50 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
0,0625	62,5	$1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
0,03125	31,25	$4,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$3,50 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
0,01563	15,625	$1,34 \times 10^4$	$1,32 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$	$<1,00 \times 10^1$
0,0078125	7,8125	$1,00 \times 10^3$	$2,99 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$2,04 \times 10^4$
0,00390625	3,90625	$1,40 \times 10^5$	$8,50 \times 10^5$	$4,95 \times 10^5$	$5,02 \times 10^5$
0,00195313	1,953125	$1,28 \times 10^5$	$3,19 \times 10^5$	$2,23 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	$2,34 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	<b><math>1,93 \times 10^6</math></b>	$5,87 \times 10^5$

Legenda: **%:** utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; **C:** koncentracija ekstrakta  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtOH, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml):** število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.con; **N<sub>P</sub>:** povprečno število bakterij; **SD:** standardna deviacija; **/:** poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda, \* : kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-9: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh ob začetku inkubacije**

ČAS 0 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.conh			
% ekstrakta v AM	C (µg/ml AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>p</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	/	/	/	/
2	2000	/	/	/	/
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	/	/	/	/
0,25	250	/	/	/	/
0,125	125	/	/	/	/
0,0625	62,5	/	/	/	/
0,03125	31,25	$1,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,41 \times 10^1$
0,01563	15,625	$4,66 \times 10^3$	$2,08 \times 10^3$	$3,37 \times 10^3$	$1,82 \times 10^3$
0,0078125	7,8125	$5,55 \times 10^4$	$2,17 \times 10^4$	$3,86 \times 10^4$	$2,39 \times 10^4$
0,00390625	3,90625	$7,25 \times 10^4$	$7,90 \times 10^4$	$7,57 \times 10^4$	$4,56 \times 10^3$
0,00195313	1,953125	$1,33 \times 10^5$	$1,83 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$	$3,52 \times 10^4$
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b><math>1,56 \times 10^6</math></b>	<b><math>5,33 \times 10^5</math></b>	<b><math>9,44 \times 10^5</math></b>	<b><math>7,26 \times 10^5</math></b>

Legenda: **%:** utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; **C:** koncentracija ekstrakta µg/ml EtOH, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml):** število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.conh; **N<sub>p</sub>:** povprečno število bakterij; **SD:** standardna deviacija; **/:** poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda; **\* :** kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-10: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh po osemurni inkubaciji**

ČAS 8 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.conh			
% ekstrakta v AM	C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>p</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	/	/	/	/
2	2000	/	/	/	/
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	/	/	/	/
0,25	250	/	/	/	/
0,125	125	/	/	/	/
0,0625	62,5	/	/	/	/
0,03125	31,25	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	0
0,01563	15,625	$<1,0 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$1,41 \times 10^1$
0,0078125	7,8125	$5,00 \times 10^1$	$7,00 \times 10^1$	$6,00 \times 10^1$	$1,41 \times 10^1$
0,00390625	3,90625	$6,02 \times 10^3$	$9,83 \times 10^3$	$7,95 \times 10^3$	$2,72 \times 10^3$
0,00195313	1,953125	$4,10 \times 10^4$	$7,25 \times 10^4$	$5,68 \times 10^4$	$2,23 \times 10^4$
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	$3,71 \times 10^6$	$1,76 \times 10^6$	<b><math>2,54 \times 10^6</math></b>	$1,38 \times 10^6$

Legenda: **%:** utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; **C:** koncentracija ekstrakta  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtOH, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml):** število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.con; **N<sub>p</sub>:** povprečno število bakterij; **SD:** standardna deviacija; **/:** poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda, \* : kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-11: Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM z različnimi koncentracijami ekstrakta Ros.conh po 24-urni inkubaciji**

ČAS 24 h					
Koncentracija ekstrakta		Ros.conh			
% ekstrakta v AM	C ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ AM)	N <sub>1</sub> (cfu/ml)	N <sub>2</sub> (cfu/ml)	N <sub>p</sub> (cfu/ml)	SD
4	4000	/	/	/	/
2	2000	/	/	/	/
1	1000	/	/	/	/
0,5	500	/	/	/	/
0,25	250	/	/	/	/
0,125	125	/	/	/	/
0,0625	62,5	/	/	/	/
0,03125	31,25	$1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
0,01563	15,625	$1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
0,0078125	7,8125	$3,33 \times 10^3$	$9,85 \times 10^2$	$2,16 \times 10^3$	$1,65 \times 10^3$
0,00390625	3,90625	$2,59 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$2,30 \times 10^4$	$4,19 \times 10^3$
0,00195313	1,953125	$1,82 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$5,13 \times 10^5$
<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	$4,59 \times 10^6$	$6,04 \times 10^6$	<b><math>5,46 \times 10^6</math></b>	$1,03 \times 10^6$

Legenda: **%:** utežni odstotek ekstrakta v tekočem mediju AM; **C:** koncentracija ekstrakta  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtOH, **N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> (cfu/ml):** število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v gojišču AM po dodatku ekstrakta Ros.conh; **N<sub>p</sub>:** povprečno število bakterij; **SD:** standardna deviacija; **/:** poskus pri tej koncentraciji ni bil izveden; **ster. dest. H<sub>2</sub>O:** sterilna destilirana voda, \* : kontrolni vzorec, kjer je bila namesto ekstrakta dodana sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-12: Protimikrobn učinek dodatka MIC ekstrakta Ros.con (7,8125 µg/ml) na različne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris***

N <sub>1</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>1</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
1,50 × 10 <sup>1</sup>	7,07 × 10 <sup>1</sup>	3,85 × 10 <sup>2</sup>	7,07 × 10 <sup>1</sup>
< 1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	2,21 × 10 <sup>3</sup>	1,13 × 10 <sup>2</sup>
< 1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	3,50 × 10 <sup>3</sup>	1,13 × 10 <sup>2</sup>
< 1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	4,20 × 10 <sup>3</sup>	7,07 × 10 <sup>2</sup>
< 1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	7,00 × 10 <sup>3</sup>	5,66 × 10 <sup>3</sup>
< 1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	9,30 × 10 <sup>5</sup>	3,54 × 10 <sup>4</sup>
N <sub>2</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>2</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
1,40 × 10 <sup>3</sup>	8,49 × 10 <sup>2</sup>	1,47 × 10 <sup>4</sup>	4,89 × 10 <sup>3</sup>
7,50 × 10 <sup>2</sup>	0	2,33 × 10 <sup>4</sup>	6,95 × 10 <sup>3</sup>
7,70 × 10 <sup>2</sup>	0	6,50 × 10 <sup>4</sup>	4,24 × 10 <sup>3</sup>
1,75 × 10 <sup>3</sup>	0	1,60 × 10 <sup>5</sup>	5,18 × 10 <sup>4</sup>
1,74 × 10 <sup>3</sup>	0	3,93 × 10 <sup>6</sup>	1,85 × 10 <sup>6</sup>
2,75 × 10 <sup>4</sup>	4,95 × 10 <sup>1</sup>	8,99 × 10 <sup>6</sup>	4,24 × 10 <sup>5</sup>
N <sub>3</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>3</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
3,28 × 10 <sup>4</sup>	9,56 × 10 <sup>3</sup>	1,05 × 10 <sup>5</sup>	1,41 × 10 <sup>3</sup>
9,90 × 10 <sup>3</sup>	7,07 × 10 <sup>2</sup>	3,27 × 10 <sup>5</sup>	9,90 × 10 <sup>4</sup>
1,46 × 10 <sup>4</sup>	9,26 × 10 <sup>2</sup>	2,25 × 10 <sup>5</sup>	7,78 × 10 <sup>4</sup>
1,41 × 10 <sup>4</sup>	1,25 × 10 <sup>3</sup>	6,50 × 10 <sup>5</sup>	7,07 × 10 <sup>4</sup>
1,35 × 10 <sup>4</sup>	7,64 × 10 <sup>2</sup>	4,40 × 10 <sup>6</sup>	7,07 × 10 <sup>4</sup>
3,36 × 10 <sup>5</sup>	1,92 × 10 <sup>4</sup>	2,00 × 10 <sup>6</sup>	< 10 × 10 <sup>2</sup>

Legenda: N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>: povprečna koncentracija bakterij ob dodatku ekstrakta Ros.con, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>: povprečna koncentracija bakterij v kontrolnem vzorcu, ster. dest. voda: sterilna destilirana voda

**Priloga A 9-13: Protimikrobnob učinek dodatka ekstrakta Ros.conh (3,90625 µg/ml) na različne koncentracije bakterij vrste *A. acidoterrestris***

N <sub>1</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>1</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
7,70 × 10 <sup>2</sup>	7,07 × 10 <sup>1</sup>	4,33 × 10 <sup>3</sup>	1,13 × 10 <sup>2</sup>
8,50 × 10 <sup>1</sup>	4,95 × 10 <sup>1</sup>	4,11 × 10 <sup>3</sup>	4,60 × 10 <sup>2</sup>
1,10 × 10 <sup>2</sup>	1,41 × 10 <sup>1</sup>	1,44 × 10 <sup>4</sup>	1,63 × 10 <sup>3</sup>
3,50 × 10 <sup>1</sup>	2,12 × 10 <sup>1</sup>	9,62 × 10 <sup>4</sup>	1,05 × 10 <sup>4</sup>
1,00 × 10 <sup>1</sup>	1,41 × 10 <sup>1</sup>	2,32 × 10 <sup>5</sup>	2,26 × 10 <sup>4</sup>
<1,00 × 10 <sup>1</sup>	0	4,45 × 10 <sup>6</sup>	1,68 × 10 <sup>6</sup>
N <sub>2</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>2</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
1,95 × 10 <sup>3</sup>	2,76 × 10 <sup>3</sup>	5,30 × 10 <sup>4</sup>	5,66 × 10 <sup>3</sup>
2,50 × 10 <sup>1</sup>	3,19 × 10 <sup>2</sup>	4,26 × 10 <sup>4</sup>	3,54 × 10 <sup>2</sup>
4,50 × 10 <sup>1</sup>	2,83 × 10 <sup>2</sup>	8,50 × 10 <sup>4</sup>	2,26 × 10 <sup>4</sup>
7,00 × 10 <sup>1</sup>	1,41 × 10 <sup>1</sup>	2,08 × 10 <sup>6</sup>	1,06 × 10 <sup>5</sup>
5,50 × 10 <sup>1</sup>	8,49 × 10 <sup>1</sup>	2,49 × 10 <sup>7</sup>	4,24 × 10 <sup>5</sup>
3,50 × 10 <sup>1</sup>	0	8,35 × 10 <sup>6</sup>	1,06 × 10 <sup>6</sup>
N <sub>3</sub> (cfu/ml) Ros.con	SD	K <sub>3</sub> (cfu/ml) ster. dest. voda	SD
5,80 × 10 <sup>4</sup>	4,24 × 10 <sup>3</sup>	9,80 × 10 <sup>5</sup>	4,24 × 10 <sup>4</sup>
3,50 × 10 <sup>2</sup>	<1,00 × 10 <sup>2</sup>	9,20 × 10 <sup>5</sup>	1,27 × 10 <sup>5</sup>
2,50 × 10 <sup>2</sup>	<1,00 × 10 <sup>2</sup>	7,90 × 10 <sup>6</sup>	1,10 × 10 <sup>6</sup>
4,50 × 10 <sup>2</sup>	<1,00 × 10 <sup>2</sup>	1,32 × 10 <sup>7</sup>	3,39 × 10 <sup>6</sup>
3,15 × 10 <sup>2</sup>	1,06 × 10 <sup>2</sup>	2,98 × 10 <sup>7</sup>	1,41 × 10 <sup>5</sup>
4,00 × 10 <sup>2</sup>	1,41 × 10 <sup>2</sup>	6,00 × 10 <sup>4</sup>	2,83 × 10 <sup>4</sup>

Legenda: N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>: povprečna koncentracija bakterij ob dodatku ekstrakta Ros.conh, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>: povprečna koncentracija bakterij v kontrolnem vzorcu, ster. dest. voda: sterilna destilirana voda