

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Iztok BORAK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA
BAKTERIJE VRSTE *Listeria monocytogenes* V MESNIH IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS
AGAINST *Listeria monocytogenes* IN MEAT PRODUCTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvu 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.

Iztok Borak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24: 637.52: 582.929.4 (043) = 163.6
KG patogene bakterije/listerije/*Listeria monocytogenes*/rožmarin/ekstrakt rožmarina/protimikrobno delovanje/karnozolna kislina/minimalna inhibitorna koncentracija/minimalna baktericidna koncentracija/živila/mesni izdelki/razdeto meso/jetrna pašteta/
AV BORAK, Iztok
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 *Listeria monocytogenes* V MESNIH IZDELKIH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 75 str., 14 pregl., 38 sl., 32 vir., 8 pril.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v mesnih izdelkih. Pri tem smo uporabili dva komercialno pripravljena ekstrakta rožmarina Vivox 40 in Vivox 70, ki imata različno vsebnost karnozolne kisline. Kot primera mesnih izdelkov smo uporabili razdeto meso in jetrno pašteto, ki smo ju pripravili v obliki emulzije v tekočem gojišču puferirana peptonska voda (BPW). Protimikrobni učinek ekstraktov smo ugotavljali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Za testiranje protimikrobnega učinka smo celice bakterij vrste *L. monocytogenes* pripravili v tekočem gojišču triptični soja bujon (TSB), za mesne izdelke pa v tekočem gojišču BPW z 10 % mesnega izdelka. Tem gojiščem smo nato dodali tudi določene koncentracije ekstrakta rožmarina (od 4,82 % do 0,009 %) in jih inkubirali določen čas (24 – 168 ur) pri 37 °C ali pri 8 °C. Število preživelih bakterij smo določili z metodo štetja kolonij na gojišču TSA. Izračunali smo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in minimalno baktericidno koncentracijo (MBC). Vrednosti MIC so se gibale med 7,80 in 62,50 µg/ml TSB ali BPW in vrednosti MIC določene v mesnih izdelkih so bile višje kot v gojišču TSB. Vrednosti MBC so bile med 88,00 in 428,00 µg/ml TSB ali BPW, pri čemer so bile vrednosti MBC spet višje v mesnih izdelkih. Vrsta mesnega izdelka je vplivala na protimikrobno učinkovitost ekstraktov rožmarina, saj je bila za inhibicijo rasti listerij v jetrni pašteti potrebna nižja koncentracija ekstrakta kot v razdetem mesu. Znižanje temperature inkubacije s 37 °C na 8 °C ni vplivalo na vrednosti MIC ekstraktov rožmarina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24: 637.52: 582.929.4 (043) = 163.6
CX pathogens /bacteria/*Listeria monocytogenes*/rosemary/rosemary
extracts/antimicrobial activity/carnosic acid/minimal inhibitory
concentration/minimal baktericidal concentration/foods/meat
products/minced meat/liver paste
AU BORAK, Iztok
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 ANTIMICROBAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS AGAINST
Listeria monocytogenes IN MEAT PRODUCTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 75 p., 14 tab., 38 fig., 32 ref., 8 ann.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of our work was to investigate the antimicrobial activity of rosemary
extracts against *Listeria monocytogenes* in meat products. We used two
commercially prepared extracts of rosemary, Vivox 40 and Vivox 70, which
contain different concentrations of carnosic acid. As examples of meat products
we used minced meat and liver paste, which we prepared in the form of
emulsion in a liquid medium buffered peptone water (BPW). The antimicrobial
effects of extracts were established by using broth dilution method in liquid
medium. For testing the antimicrobial effects we prepared bacterial cells *L.*
monocytogenes in triptic soya bujon (TSB), for the meat products we prepared *L.*
monocytogenes in BPW with a 10 % meat product. Certain concentrations of
rosemary extracts (from 4,82 % to 0,009 %) were added to these mediums and
were incubated for 24 – 168 h at 37 °C or 8 °C. The number of surviving bacteria
was determined through a plate count method using TSA medium. We
calculated minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal
concentration (MBC). MIC values were in range from 7.80 to 62.50 µg/ml TSB
or BPW. MIC values in meat products were higher than in TSB. MBC values
were in range between 88,00 and 428,00 µg/ml TSB or BPW, and again MBC
values obtained in meat products were higher. The kind of meat products used in
the experiment influenced the antimicrobial effect of rosemary extracts because
there were lower concentrations of extracts to inhibit growth of listeria in liver
paste than in minced meat. Reduction of incubation temperature from 37 °C to 8
°C did not have any influence on MIC values of rosemary extracts.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.2 PATOGENOST BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	4
2.3 FIZIOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	5
2.4 PROTIMIKROBNA SREDSTVA	6
2.4.1 Kemijski konzervansi.....	6
2.4.2 Naravna protimikrobna sredstva.....	9
2.5 ROŽMARIN.....	11
2.5.1 Uporaba v zdravstvu	12
2.5.2 Uporaba v kulinariki	12
2.5.3 Protimikrobno delovanje rožmarina	13
2.6 RAZDETO MESO	13
2.6.1 Mikrobiologija razdetega mesa	14
2.7 JETRNA PAŠTETA.....	15
2.7.1 Mikrobiologija jetrne paštete	15
3 MATERIAL IN METODEDE	16
3.1 MATERIAL	16
3.1.1 Bakterije	16
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	16
3.1.3 Ekstrakti rožmarina.....	17
3.1.4 Mesni izdelki	17
3.1.5 Druge kemikalije in laboratorijska oprema	17
3.2 METODEDE DELA.....	19
3.2.1 Namnožitev bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.2.2 Priprava ekstraktov rožmarina.....	19
3.2.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču	20
3.2.4 Določitev minimalne inhibitorne koncentracije	21
3.2.5 Določitev minimalne baktericidne koncentracije	21
3.2.6 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču.....	21
4 REZULTATI.....	23

4.1 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU TSB PRI 37 °C.....	23
4.1.1 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml.	23
4.1.2 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml.	26
4.1.3 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml.	28
4.1.4 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml.	31
4.2 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU BPW Z MESOM PRI 37 °C	34
4.2.1 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml.	34
4.2.2 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml.	37
4.2.3 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml.	40
4.2.4 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml.	43
4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU BPW S PAŠTETO PRI 37 °C	45
4.3.1 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml .	45
4.3.2 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ⁷ cfu/ml .	48
4.3.3 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml .	50
4.3.4 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10 ³ cfu/ml .	52
4.4 RAST BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU TSB Z MIC EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI 8 °C	54
4.4.1 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 40 na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	54
4.4.2 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 70 na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	56
4.5 RAST BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU BPW Z MESOM Z MIC EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI 8 °C	58
4.5.1 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 40 na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	58
4.5.2 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 70 na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	60
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	62
5.1 RAZPRAVA.....	62
5.1.1 Vpliv temperature na delovanje ekstrakta	62
5.1.2 Vpliv vrste mesnega izdelka na delovanje ekstrakta in na rast bakterij <i>L. monocytogenes</i>	63
5.1.3 Vpliv sestavin ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	65
5.1.4 Uporaba metode razredčevanja v tekočem gojišču za živila	65
5.2 SKLEPI.....	66
6 POVZETEK.....	67
7 VIRI	69
8 ZAHVALA	72
9 PRILOGE.....	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 3-1 : Laboratorijski aparati.....	18
Preglednica 4-1: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	23
Preglednica 4-2: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	26
Preglednica 4-3: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	28
Preglednica 4-4: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	31
Preglednica 4-5: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	34
Preglednica 4-6: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	37
Preglednica 4-7: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	40
Preglednica 4-8: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	43
Preglednica 4-9: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	45
Preglednica 4-10: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	48
Preglednica 4-11: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C	50
Preglednica 4-12: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C	52
Preglednica 5-1: Vrednosti MIC in MBC pri 37 °C in 8 °C za ekstrakte rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 v TSB, v mesu in pašteti z začetnim številom bakterij 10^7 cfu/ml in 10^3 cfu/ml.....	62

KAZALO SLIK

Slika 2-1: Celica Bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i> (Khelef in sod., 2006).....	4
Slika 2-2: Stopnje okužbe in razvoj humane listerioze	5
Slika 2-3: Prikaz mehanizma razsoljevanja (Bizjak in Bem, 2003).....	8
Slika 2-4: Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	12
Slika 3-1 : Priprava ekstraktov rožmarina	19
Slika 3-2: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov rožmarina na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i>	20
Slika 4-1: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C.....	24
Slika 4-2: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C.....	25
Slika 4-3: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C.....	26
Slika 4-4: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C.....	27
Slika 4-5: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C.....	29
Slika 4-6: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C.....	30
Slika 4-7: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C.....	32
Slika 4-8: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37°C.....	33
Slika 4-9: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	35
Slika 4-10: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	36
Slika 4-11: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	38
Slika 4-12: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	39
Slika 4-13: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	41
Slika 4-14: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	42
Slika 4-15: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	43
Slika 4-16: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	44
Slika 4-17: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	46
Slika 4-18: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	47

Slika 4-19: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	48
Slika 4-20: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) pri 37 °C	49
Slika 4-21: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	50
Slika 4-22: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	51
Slika 4-23: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	52
Slika 4-24: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) pri 37 °C	53
Slika 4-25: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z 15,625 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C	54
Slika 4-26: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 15,625 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C	55
Slika 4-27: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C	56
Slika 4-28: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C	57
Slika 4-29: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,5 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C	58
Slika 4-30: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C	59
Slika 4-31: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,5 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C	60
Slika 4-32: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C	61

KAZALO PRILOG

Priloga A-1: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB s 15,625 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8°C	73
Priloga A-2: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8°C	73
Priloga A-3: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8°C	73
Priloga A-4: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8°C	74
Priloga A-5: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8°C	74
Priloga A-6: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8°C	74
Priloga A-7: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,5 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8°C	75
Priloga A-8: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8°C	75

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
BHI	(ang. Brain Heart Infusion Broth)
BPW	gojišče puferirana peptonska voda (ang. Buffered Pepton Water)
cfu	kolonijska enota
EtOH	etanol
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MIC	mimalna inhibitorna koncentracija
P	odstotki preživelih bakterij
TSA	gojišče triptični soja agar (ang. Tryptone soya agar)
TSB	gojišče triptični soja bujon (ang. Tryptone soya broth)
ŽM	Mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvu, Biotehniška fakulteta
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

1 UVOD

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* so prepoznali kot povzročiteljice okužb s kontaminiranimi živili po vsem svetu. Zaužitje hrane kontaminirane s temi bakterijami ogrozi zdravje rizičnemu delu populacije, kot so imunsko oslabljeni ljudje, otroci, nosečnice in starejši ljudje. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so zmožne preživeti tudi v ekstremnih razmerah, kot so vakuumsko pakiranje, zamrzovanje in ultravijolično sevanje, odporne so tudi na običajno pasterizacijo (Dimitrijevič in sod., 2006).

Vemo, da se za meso in mesne izdelke uporabljajo predvsem kemijski postopki konzerviranja. Obstojnost živil živalskega izvora podaljšujejo z inhibiranjem in/ali uničenjem mikroorganizmov (Bizjak in Bem, 2003).

Kemijske spojine, ki se uporabljajo kot konzervansi, morajo biti popolnoma neškodljive zdravju ljudi in morajo ustrezati vsem obstoječim predpisom. Kot kemikalije za konzerviranje mesa se uporabljajo predvsem razsolice (kuhinjska sol, nitriti, nitrati), razni aditivi (glukono-delta-lakton, askorbinska kislina), dim, šibke organske kisline in njihove soli (citronska, vinska, očetna in mlečna) ter »pravi« konzervansi (sorbinska in benzojska kislina, kot tudi njihove spojine z določenimi elementi, estri idr.) (Bizjak in Bem, 2003).

Delovanje konzervansov je specifično in je odvisno od živila, konzervansa, kot tudi od vrste in skupine mikroorganizmov. Za konzerviranje določenih živil živalskega izvora se lahko uporabljajo samo določeni konzervansi. Za meso se tako uporabljajo le natrijev klorid, ogljikov dioksid, nitrit, sorbinska kislina in lizozim (Bizjak in Bem, 2003).

Vse večje potrebe po varni in naravni hrani, brez prisotnih kemičnih konzervansov, so spodbudile raziskovanje protimikrobnih učinkov naravnih sestavin. Izsledki številnih raziskav so potrdili protimikrobna delovanja eteričnih olj v modelnih suspenzijah in v živilih. Veliko naravnih sestavin, ki imajo protimikrobno delovanje na bakterije vrste *L. monocytogenes*, so našli v ekstraktih rastlin, npr. v ekstraktih zelišč in sadja (Dimitrijevič in sod., 2006).

Številne raziskave kažejo na protimikrobno in protiglavno aktivnost eteričnih olj rožmarina (Angioni in sod., 2004). Ekstrakti rožmarina namreč vsebujejo fenolne spojine, kot so rožmarinska kislina, karnozolna kislina in karnozol, ki so protimikrobno aktivne (Del Campo in sod., 2000).

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je samorasli grm, razširjen v vseh sredozemskih državah. Različne vrste (npr. *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus*, *R. lavandulaceus*) najdemo tudi drugod po svetu (Angioni in sod., 2004).

Uporabljajo ga tako v zdravstvu kot v kulinariki. Med ljudmi je najbolj poznan kot začimba za mnoge jedi. V majhnih količinah za ribe, svinjino in jagnjetino, v omakah in marinadah. Pri tem uporabljamo sveže in posušene lističe, v kulinariki tudi cvetove (Rode, 2001).

1.1 CILJ NALOGE

Namen naloge je bil določiti, ali imata ekstrakta rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 protimikrobni učinek na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v mesu. V praktični del smo vključili metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB in gojišču BPW z mesom ter metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Ugotoviti smo hoteli tudi, če ekstrakta delujeta protimikrobno pri temperaturi hladilnika (8 °C) ter kako manjše število bakterij vrste *L. monocytogenes* vpliva na protimikrobno učinkovitost ekstraktov. Protimikrobni učinek smo želeli ovrednotiti kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in minimalno baktericidno koncentracijo (MBC).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Ektrakta Vivox 40 in Vivox 70 imata protimikroben učinek na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v mesnih izdelkih.
- Zaradi večje vsebnosti karnozolne kisline v ekstraktu Vivox 70 bo imel ta ekstrakt večji inhibitorni učinek kot ekstrakt Vivox 40.
- Vrsta mesnega izdelka bo vplivala na protimikrobno učinkovitost ekstraktov rožmarina.
- Pri nižjem številu bakterij vrste *L. monocytogenes* bo za inhibicijo rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* učinkovita nižja koncentracija ekstraktov rožmarina.
- Temperatura ne bo vplivala na delovanje rožmarinovitih ekstraktov in s tem na vrednosti MIC in MBC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes*

Listerioza, kot bolezen, ki jo povzročajo bakterije vrste *L. monocytogenes*, je bila prvič opisana po letu 1920. Takrat so predvidevali, da pride do okužbe z zaužitjem hrane. Ta hipoteza je bila potrjena leta 1960. Serije izbruhov v industrializiranih državah med leti 1970 in 1980 so dokazale, da so bakterije vrste *L. monocytogenes* zares odgovorne za številne primere listerioze (Khelef in sod., 2006).

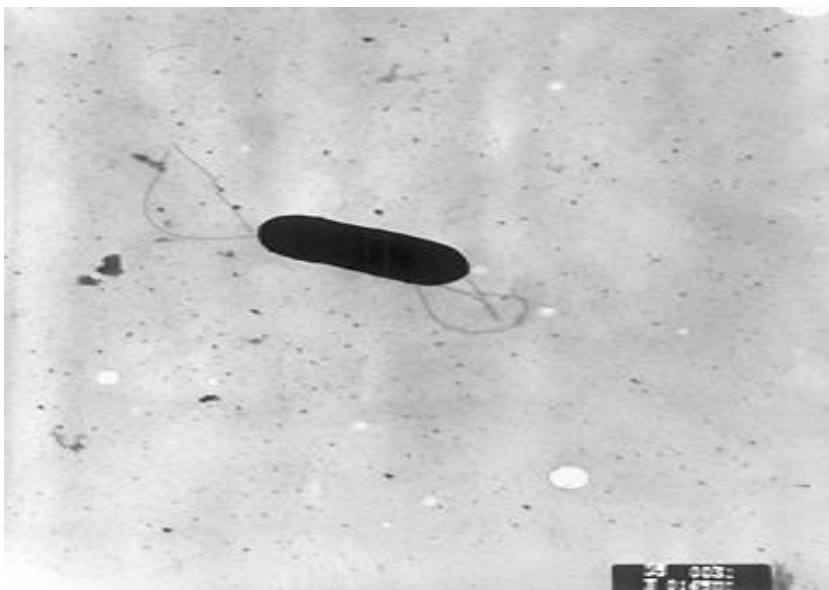
Bakterije vrste *L. monocytogenes* so v naravi zelo razširjene. Izolirali so jih že iz različnih virov, npr. iz razpadajoče vegetacije, zemlje, živalskega blata, odpadne vode, krme v silosih, vode. Približno 5 – 10 % ljudi ima bakterije *L. monocytogenes* v prebavnem traktu (Jeršek, 2006).

Zaradi njihove velike razširjenosti v naravi je tudi pogosta prisotnost v človekovi prehranjevalni verigi. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja. Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v mnogih živilih je posledica navzkrižne kontaminacije končnih izdelkov. Ker bakterije lahko rastejo pri nizkih temperaturah hlajenja in so relativno odporne proti višjim koncentracijam soli, so živila ugodno okolje za njihov razvoj (Jeršek, 2006).

Na podlagi različnih metod kot sta hibridizacija DNA in multilokusna encimska elektroforeza (MEA), ki so jih izvedli na restrikcijskih vzorcih rRNA in sekvencioniranih 16S rRNA, so ugotovili, da rod *Listeria* vsebuje šest vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* in *L. grayi*. *Listeria monocytogenes* je patogena za ljudi in živali, *L. ivanovii* je patogena samo za živali, zlasti za ovce in govedo (Khelef in sod., 2006).

Značilnosti rodu *Listeria* so aerobnost, mikroaerofilnost, fakultativna anaerobnost; po testu katalaze so pozitivne, po testu oksidaze pa negativne (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Bakterije rodu *Listeria* so majhne grampozitivne palčke, ki ne tvorijo spor in kapsul, ter so gibljive pri nizkih temperaturah (20 °C) in negibljive pri 37 °C (Slika 2-1) (Khelef in sod., 2006). Celice najdemo posamično ali v obliki kratkih verižic, ki se lahko formirajo v V- in Y-obliko. Včasih so celice kokoidne oblike, povprečno široke 0,5 µm, zato jih lahko zamenjamo tudi s streptokoki (Rocourt in Buchrieser, 2007). Njihova DNA ima malo parov G+C (36-42 %) zaradi česar so si sorodne z bakterijami iz rodov *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* in *Staphylococcus* (Khelef in sod., 2006).



Slika 2-1: Celica bakterije vrste *Listeria monocytogenes* (Khelef in sod., 2006)

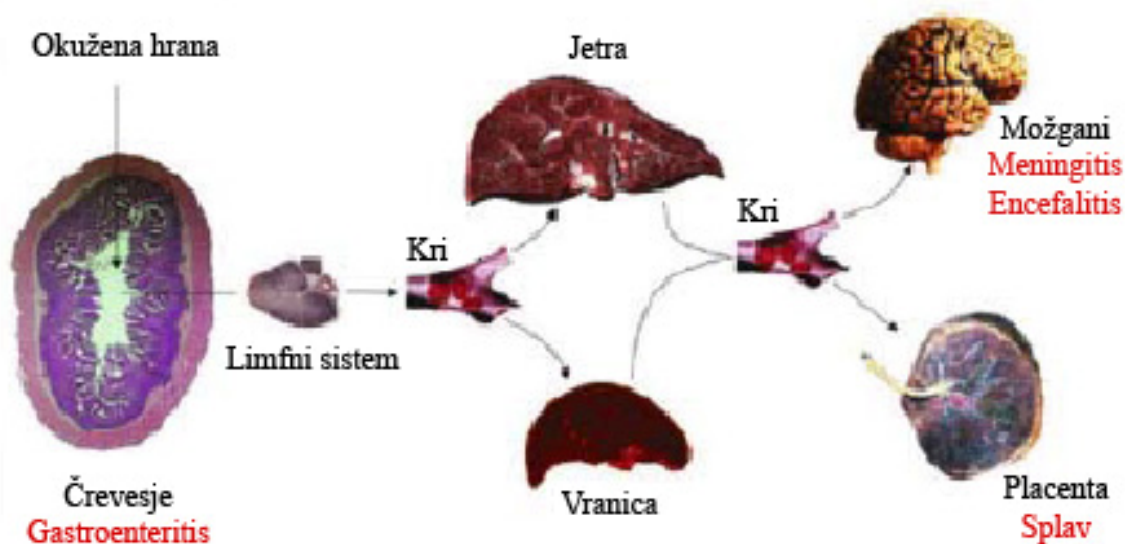
2.2 PATOGENOST BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes*

Prvi uradno potrjen humani sev patogenih bakterij vrste *L. monocytogenes* so izolirali leta 1924 po izbruhu bolezni pri domačih zajcih in morskih prašičkih, ki so kazali različne znake mononukleoze. Klinično izolacijo bakterij vrst *L. monocytogenes* iz primera humanega meningitisa so prvič predstavili na inštitutu Institut Pasteur leta 1921 (Khelef in sod., 2006).

Humana listerioza globalno ostaja redka bolezen; razširjenost v industrializiranih državah, v katerih je vpeljana kontrola živil, upada. V Ameriki je incidenca listerioze ocenjena na razmerje sedem proti milijon, kar pomeni do 2500 primerov okužbe letno, od tega je okoli 500 smrtnih primerov. Za okužbo so bolj dovzetni otroci (100 primerov na milijon prebivalcev) in starejši ljudje (14 primerov na milijon prebivalcev). Medtem ko so nosečnice kar 20-krat bolj dovzetne za razvoj listerioze kot ostala populacija (Khelef in sod., 2006).

Znaki okužbe z bakterijami vrste *L. monocytogenes* so različni: od znakov gripe, driske do meningitisa, pri nosečnicah te bakterije povzročajo splav, pri novorojenčkih pa pogosto smrt. Okužba se prenaša z uživanjem surovega mleka bolnih živali, jajc, bolne perutnine in nezadostno kuhanega ali slabo toplotno (pri prenizkih temperaturah in premalo časa) obdelanega mesa bolnih živali, ter tudi z rastlinskimi živili, kot so vrtnine in zelje. Bakterije vrste *L. monocytogenes* povzročajo abortuse tudi pri živalih. Človek, ki bolni živali pomaga ob abortusu ali porodu, se z listerijo lahko okuži kontaktno. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile izolirane pri govedu, konjih, prašičih, ovcah, srnah, lisicah, činčilah, zajcih, kuncih, morskih prašičkih, miših, fazanih in piščancih. Klicenosci so glodavci, lahko tudi domače živali (psi in mačke). Okužbe osrednjega živčevja potekajo kot absces in kot meningitis. Če se okuži nosečnica, v večini primerov pride do splava

zaradi rasti bakterij na placenti. Novorojenček, ki preživi, ima lahko akutno septo in meningitis. Smrtnost pri okužbi preko placent je 60 % (Kapun-Dolinar, 2001).



Slika 2-2: Stopnje okužbe in razvoj humane listerioze (Khelef in sod., 2006)

Okužba ljudi z bakterijami vrste *L. monocytogenes* poteka preko zaužitja kontaminiranega živilskega proizvoda. Bakterije preidejo črevesno bariero in se razširijo preko limfnega ožilja do vranice in jeter, od tod lahko pridejo tudi do možganov ali do placent, kar lahko povzroči splav. Okužba možganov se pri imunsko oslabeledih ljudeh kaže kot meningitis ali encefalitis (Slika 2-2) (Khelef in sod., 2006).

2.3 FIZIOLOŠKE LASTNOSTI BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes*

Listerije so fakultativno anaerobne bakterije, kar pomeni, da se lahko razmnožujejo med samo okužbo. Tudi v aerobnih laboratorijskih razmerah rastejo odlično. Ena ključnih lastnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* je zmožnost rasti v širokem temperaturnem razponu, od 1 do 45 °C. Optimalna temperatura rasti je 30-37 °C. Listerije lahko ubijemo pri 60 °C, zato je pasterizacija primerna metoda za uničevanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mlečnih proizvodih. Analize rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri različnih temperaturah so pokazale, da lahko spremembe v sestavi maščobnih kislin v bakterijski membrani omogočijo temperaturne prilagoditve. Listerije so relativno odporne na ekstremne vrednosti pH in slane razmere (pH 4,5-9 in do 10 % NaCl), najbolj optimalno pa rastejo pri nevtralnem pH in 0,5 % NaCl (Khelef in sod., 2006).

Za rast bakterij vrste *L. monocytogenes* so potrebni ogljikovi hidrati, aminokisliline (cistein, glutamin izolevcin, levcin in valin) in vitamini (biotin, riboflavin, tiamin in lipojska kislina). Železo in nekatere amino kisline (arginin, histidin, metionin, in triptofan) stimulirajo njihovo rast (Khelef in sod., 2006).

2.4 PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Oksidacija lipidov in bakterijska kontaminacija sta glavna dejavnika, ki vplivata na kvaliteto živila in njegovo uporabo. Oksidacijski procesi v mesu vodijo do razgradnje lipidov in proteinov, kar povzroči spremembo arome, teksture in barve. V mesu in mesnih proizvodih lahko kvarjenje in alimentarne toksikoinfekcije povzročijo tudi različni mikroorganizmi. Zato so v mesni industriji nujni ukrepi za preprečevanje oksidacije lipidov ter za inhibicijo rasti mikroorganizmov, kot tudi za zaščito teh živil pred mikrobnou kontaminacijo (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

2.4.1 Kemijski konzervansi

Kemijski konzervansi so velika skupina živilskih dodatkov oz. aditivov. Zaviralno, tako imenovano mikrobiostatično (le izjemoma destruktivno, mikrobicidno), delujejo na metabolizem in rast mikroorganizmov. Zaradi želje sodobnih potrošnikov po čim bolj svežih in naravnih živilih je uporaba kemijskih konzervansov živilskemu tehnologu opravičljiva le takrat, ko so izključene vse druge možnosti konzerviranja. Res je, da so mnogi živilski dodatki multifunkcionalni – npr., nitritna sol poleg zaviranja sporogenih in nekaterih drugih mikroorganizmov deluje antioksidativno in omogoča tudi razvoj značilne arome in barve razsoljenega mesa. Zato je njihova zamenjava oz. odprava težavna (Smole Možina in Bem, 2003).

Dobre rezultate dajejo kombinirani načini konzerviranja, ki omogočajo uporabo manjših koncentracij nezaželenih kemijskih aditivov v živilih. Med dodatke živilom, ki imajo največji pomen za inhibicijo mikroorganizmov, v mesu, mleku ter mesnih in mlečnih izdelkih prištevamo kuhinjsko sol oz. NaCl, nitritno sol oz. NaNO₂, nekatere začimbe in druge dodatke, ki so omenjeni v nadaljevanju (Smole Možina in Bem, 2003).

Kuhinjska sol

Kuhinjska sol je eden izmed najstarejših konzervansov v hrani. Verjetno so jo uporabljali že v prazgodovinskem obdobju. Danes se uporablja morska in kamena sol. Naravna morska sol se uporablja v proizvodnji nekaterih mesnih izdelkov, npr. pršuta, ker vsebnost magnezijevih ionov in kalcijevih ionov zmanjšuje vezavo vode v mesu in zato pospešuje sušenje. Sol se živilom dodaja v suhem stanju ali pa se uporablja raztopina. Včasih se dodajajo tudi nitriti. NaCl v vodi disociira in močno znižuje vodno aktivnost oz. vrednost a_w . To je osnova protimikrobnega delovanja soli, ki pa je selektivno in včasih ne povsem učinkovito zaradi prisotnosti halotolerantnih in halofilnih mikroorganizmov. Koncentracija teh je lahko visoka, npr. večja od 10⁶ cfu/g ribjega mesa. Najpogostejši so rodovi *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Halococcus*. Povečana koncentracija soli v kombinaciji z začimbami in drugimi protimikrobnimi sestavinami letalno deluje na patogene mikroorganizme, npr. v suhih klobasah in drugih izdelkih (Smole Možina in Bem, 2003).

Natrijev klorid povzroča poleg znižanja aktivnosti vode in pospeševanja vezanja vode, tudi nabrekanje beljakovinskih koloidov mikroorganizmov, in sicer tako, da le-ti postanejo občutljivi za delovanje drugih konzervirajočih postopkov. Kuhinjska sol direktno vpliva na encime in tako pomaga k delovanju drugih konzervansov (Bizjak in Bem, 2003).

V predelavi mesa se kuhinjska sol koristi za soljenje slanine in pršuta. Soljeni izdelki se morajo hraniti pri temperaturah, nižjih od 6 °C, dokler sol ne prodre v globino. Kuhinjska sol povzroči oksidacijo lipidov, ne glede na vrsto prisotnih mikroorganizmov. Ta učinek se povečuje sorazmerno s koncentracijo soli v mesu (od 0,5 do 2,5 %) (Bizjak in Bem, 2003).

Nitriti

Nitriti se v obliki natrijevih soli uporabljajo v proizvodnji mesnih in mlečnih izdelkov zaradi oblikovanja ustreznih senzoričnih lastnosti izdelkov, predvsem barve in arome, njegovih antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti, kar podaljšuje obstojnost izdelkov (Smole Možina in Bem, 2003).

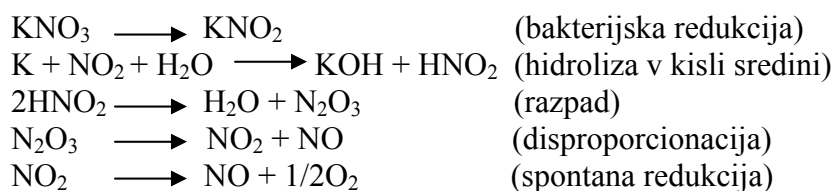
Protimikrobno deluje nitrit, ki ni vezan v nitrozomioglobin, zato je za to potrebna višja koncentracija, kot za doseganje obstojne barve razsoljenega mesa. Ciljni mikroorganizmi so enterobakterije in predvsem klostridiji, v mesnih izdelkih toksigeni *C. botulinum*, v mlečnih izdelkih, npr. sirih, pa kvarljivci, npr. *C. butyrricum* in *C. tyrobutyricum*, ki povzročajo pozno napihovanje sirov (Smole Možina in Bem, 2003).

Mehanizem protimikrobnega delovanja nitrita je kompleksen, nitrit reagira s sulfhidrilnimi skupinami spojin v bakterijskih celicah in jih inaktivira. Prav tako je že dolgo dokazano, da inhibitorni učinek nitrita temelji na reakcijah z encimi, ki imajo vezano železo, npr. nehemno vezano železo v železo-žveplovih proteinih, kot sta feredoksin in hidrogenaza. Oba sodelujeta pri prenosu elektronov v dihalni verigi, zato nitrit zmoti oksidativno fosforilacijo oz. tvorbo ATP v celicah. Mlečnokislinske bakterije so bolj odporne proti nitritu, ker nimajo omenjenih encimov. Nitrit reagira tudi s proteini, ki imajo železo vezano v skupini hem – npr. katalazo in superoksid-dismutazo. Poleg tega nitrit inhibira kaljenje bakterijskih spor, npr. klostridijev. Toplotno poškodovane spore so bolj občutljive za nitrit. Protibotulinsko delovanje nitrita je odvisno od vrednosti pH medija, ker ta določa stopnjo disociacije dušikove (III) kisline. Optimalna protibakterijska aktivnost je dosežena pri pH 4,5-5,5, pomemben pa je tudi vpliv NaCl, temperature in števila mikrobnih celic oz. spor. Verjetno je prav zasluga nitrita v izdelkih, v pločevinkah in razsoljenem mesu v kosih, da je primerov botulizma relativno malo oz. se zelo redko pojavlja zaradi kontaminacije industrijskih mesnih izdelkov, večkrat pa pri doma pripravljenih izdelkih, kjer nitrit ni bil uporabljen (Smole Možina in Bem, 2003).

Ker je dodajanje nitrita mesnim in mlečnim izdelkom nezaželeno zaradi tvorbe kancerogenih nitrozaminov, ga vedno uporabljamo v kombinaciji z drugimi konzervirnimi sredstvi, kot so kuhinjska sol, glukono- δ -lakton (GDL), znižanje a_w , toplotna obdelava, hlajenje ipd. (Smole Možina in Bem, 2003).

Razsoljevanje

Za razsoljevanje se poleg kuhinjske soli uporablja natrijev nitrit (NaNO_2) in kalijev nitrat (KNO_3) ter nekateri drugi aditivi (ogljikovi hidrati, polifosfati, askorbinska kislina idr.). Z razsoljevanjem se doseže poleg konzervirajočega učinka tudi zaželeno senzorične lastnosti izdelkov (okus, barva, tekstura). Mehanizem razsoljevanja se doseže na način prikazan v sliki 2-3 (Bizjak in Bem, 2003), z določenimi popravki..



Slika 2-3: Prikaz mehanizma razsoljevanja (Bizjak in Bem, 2003)

Določeni mikroorganizmi reducirajo nitrat v nitrit. V kisli sredini poteka hidroliza nitrita, ki z redukcijo preide v dušikov oksid, ta pa se veže na železo mioglobina. Tvori se nitrozomioglobin, ki z denaturacijo globina, v času sušenja ali toplotne obdelave, prehaja v nitrozomiokromogen, ki oblikuje v mesu stabilno rdečo barvo (Bizjak in Bem, 2003).

Meso se razsoljuje z različnimi postopki, ki se v glavnem nanašajo na suho in mokro razsoljevanje. Pri suhem razsoljevanju se sol za razsoljevanje utira po površini velikih kosov ali se enakomerno zmeša z drobnimi kosi mesa. Uporablja se v proizvodnji suhomesnatih izdelkov, predvsem suhih šunk in pršuta ter za pripravo mesa za proizvodnjo klobas in konzerv. Za mokro razsoljevanje se uporabljajo vodne raztopine soli za razsoljevanje različnih koncentracij. Jakost razsolice se v praksi meri z aerometrom in izraža v stopinjah Baumè ($^{\circ}\text{Bè}$) (Bizjak in Bem, 2003).

Razsoljevanje ima izrazitejšo protimikrobno delovanje od soljenja. Poleg zniževanja vrednosti a_w , delujejo nitrat in nitrit oziroma produkti njune razgradnje direktno protimikrobno, čeprav je tudi pri razsoljevanju bakteriostatski učinek pomembnejši od baktericidnega. Za nitritne soli (za razsoljevanje) so najobčutljivejši predstavniki iz rodu *Clostridium* – razmnoževati se prenehajo v prisotnosti 5 % soli za razsoljevanje. Bacili za isti učinek potrebujejo 10 %, mikrokoki pa 16 % te soli. Pri koncentraciji od 4 do 6 % soli lahko salmonela preživi od 4 – 6 mesecev, povzročitelji rdečice prašičev 30 dni, bruceloze pa 21 dni. Virusi slinavke in parkljevke ter virusi svinjske kuge so neobčutljivi za te sestavine. V ustreznih razsolnicah pri 15 °C in bogatih s saprofitno mikrofloro bakterije vrste *Staphylococcus aureus* ne tvorijo toksina. Ne razmnožujejo se niti bakterije vrste *Clostridium botulinum*, čeprav spore preživijo. Ko dosežejo optimalne razmere, vzkljujejo in tvorijo toksine. Sestavine razsolice mnogo izraziteje delujejo na parazite. Tako paraziti vrste *Cisticercus cellulose* izginejo v 14 dneh v 25 % razsolici. Običajne koncentracije soli za razsol inaktivirajo toksoplazme in sarkosporidije, učinek na trihinele je slabše proučen (Bizjak in Bem, 2003).

Ko se govori o razsoljevanju ne moremo mimo dejstva, da je nitrit zelo toksična substanca. Veže se na hemoglobin v krvi in tvori stabilen nitrozomioglobin, ki onemogoča prenos in odvajanje kisika tkivom, kar ima za posledico tako imenovano 'notranjo zadušitev'. Nitrit se zaradi tega ne sme direktno uporabljati za razsoljevanje, ampak samo kot 0,3 do 0,5 %-ni sestavni del soli za razsoljevanje. Sol za razsoljevanje lahko proizvajajo samo določeni proizvajalci, ki imajo za to dovoljenje (Bizjak in Bem, 2003).

Nitrat sam po sebi ni toksičen, vendar se mora zaradi možnosti prehoda v nitrit njegovi uporabi in shranjevanju posvečati veliko pozornost. Včasih se je nitrat pogosteje uporabljal, saj je bil čas tehnološkega procesa razsoljevanja daljši in je bilo tako dovolj časa, da se je s pomočjo odgovarjajočih bakterij reduciral v nitrit. V današnji skrajšani industrijski proizvodnji je njegova uporaba omejena le na trajne suhomesnate izdelke. Nevarnost uporabe nitrata je v tem, da lahko iz njega nastanejo nedovoljene količine nitrita. Maksimalna dovoljena količina prostega nitrita je odvisna od vrste mesnega izdelka (Bizjak in Bem, 2003).

Pred približno 30 leti je bilo dokazano, da spadajo nitrozamini (spojine, nastale iz produktov razgradnje nitrita in sekundarnih aminov) med najaktivnejše kancerogene substance. Nevarnost obstaja, ker se vse nastale količine NO ne vežejo na mioglobin in skupaj z drugimi komponentami mesa ostajajo proste, z možnostjo tvorbe nitrozamina (Bizjak in Bem, 2003).

Z nadaljnimi raziskavami pa je bilo potrjeno, da pri strokovno izvedenem procesu razsoljevanja in pri uporabi higiensko neoporečne surovine ni nevarnosti za nastanek nitrozaminov. Nevarnost nastane, kadar se razsoljuje meso, ki ni popolnoma sveže in se je že začela razgradnja proteinov ter tvorba aminov. Nitrit se lahko v tem primeru veže na sekundarne amine in tvori nitrozamine. Pri tem delujejo izrazito katalitično visoke temperaturne toplotne obdelave (nad 160 °C). Zaradi tega se ne priporoča ali celo prepoveduje pečenje razsoljenega mesa (Bizjak in Bem, 2003).

2.4.2 Naravna protimikrobna sredstva

Rastline vsebujejo veliko število snovi s protimikrobnim delovanjem. Že iz antične dobe so ohranjeni zapisi o uporabi rastlinskih izvlečkov za zdravljenje ran in nekaterih bolezni. Danes vemo, da so to kemijsko zelo različne snovi in da se v rastlinskih tkivih sintetizirajo konstitutivno ali pa induktivno, po določenem stresu oz. dražljaju iz okolja. Koncentracija je odvisna od mnogih dejavnikov, predvsem rastlinskih vrst, pogojev rasti, žetve, sušenja, skladiščenja, ekstrakcije itd. Zato so literaturni podatki o vsebnosti sestavin v rastlinah različni. K temu prispevajo še različne metode določanja protimikrobnega delovanja. Prav tako je zelo pomemben medij. Nekateri rastlinski ekstrakti so protimikrobno učinkoviti v laboratorijskih medijih, ne pa tudi v živilih, kjer bi jih želeli uporabiti (Smole Možina in Bem, 2003).

Začimbe so v mikrobiološkem smislu paradoks. So sočasno nosilci številnih mikroorganizmov in pogostoma delujejo izrazito protimikrobno. Pri tem je na primer pri

izdelovanju presnih klobas zelo pomembno, da začimbe ne zavirajo razvoja starter kultur in zaželene mikroflore (Bem in Adamič, 1991).

Čeprav je še danes v mesno-predelovalni industriji običajna uporaba sintetičnih aditivov za preprečevanje oksidacije lipidov in mikrobne rasti, se trend obrača v smer njihovega zmanjšanja, zaradi vse večjega zavedanja potrošnikov o njihovih škodljivih vplivih na zdravje. Zato se je iskanje naravnih aditivov, še posebej tistih rastlinskega izvora, v zadnjih letih znatno povečalo (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

Za podaljšanje obstojnosti živila so se v preteklosti uporabljali predvsem sintetični antioksidanti. Ugotovitve toksikologov in nutricionistov glede kancerogenosti nekaterih izmed njih, kot sta butiliran hidroksitoulen (BHT) in butiliran hidroksianizol (BHA), so povzročile, da so se vladne organizacije in potrošniki začeli zavzemati za večjo varnost živilskih proizvodov ter za smotrno uporabo sintetičnih aditivov (Gachkar in sod., 2006).

Mehanizem protimikrobnega delovanja rastlin oz. njihovih ekstraktov in eteričnih olj je zelo raznovrsten. Večina deluje bakteriostatično in fungistatično. Zavirajo rast prokariontskih in/ali evkariontskih mikrobnih celic. Redko izkazujejo baktericidno delovanje. Mnogokrat ne delujejo direktno na mikroorganizme, pač pa imajo sinergistični učinek z drugimi protimikrobnimi snovmi ali postopki, npr. povečajo občutljivost mikrobnih celic za toplotno obdelavo (Smole Možina in Bem, 2003).

Nekatere snovi rastlinskih tkiv zavirajo kaljenje spor in kot dodatek živilom zmanjšujejo tveganje kvara ali prenosa bolezni s sporogenimi mikroorganizmi. Zanimivo je, da imajo rastlinske protimikrobne sestavine mnogokrat boljši učinek proti grampozitivnim bakterijam kot gramnegativnim, ki so sicer bolj občutljive za številne neugodne okoljske dejavnike. Vzrok je v strukturi zunanje ovojnice, ki je pri gramnegativnih bakterijah bolj kompleksno zgrajena, z zunanjo lipopolisaharidno plastjo v vlogi bariere, ki onemogoča dostop protimikrobnih snovi do bakterijske celice oz. njenih ciljnih organel. Občutljive so tudi kvasovke in plesni, najodpornejše pa so bakterijske spore (Smole Možina in Bem, 2003).

Eterična olja so tekoča aromatična olja pridobljena iz različnih delov rastlin (cvetov, poganjkov, semen, listov, vej, lubja). Dobijo jih s pomočjo stiskanja, fermentacije, ekstrakcije in s parno destilacijo, ki je komercialno najbolj uporabljena metoda za pridobivanje eteričnih olj (Burt, 2004).

Pomembna sestavina začimb so eterična olja, ki so kemijsko mešanica estrov, aldehydov, ketonov, terpenov, enostavnih fenolov in njihovih derivatov. Eterična olja dajejo začimbam značilno aromatičnost, pa tudi antioksidativno in protimikrobno aktivnost (Smole Možina in Bem, 2003).

Sestava oz. struktura funkcionalnih skupin v eteričnem olju igra pomembno vlogo pri njihovi protimikrobni aktivnosti in sestavine z veliko fenolnimi skupinami so najbolj protimikrobno aktivne. Tako so za eterična olja iz česna, origana, rožmarina, timijana, žajblja, in vanilina odkrili, da so najbolj učinkovita proti mikroorganizmom (Patel in Holley, 2005).

Sestavo eteričnih olj so določali s pomočjo plinske kromatografije in masne spektrometrije. Pri tem so ugotovili, da eterična olja vsebujejo več kot 60 posameznih sestavin. Med katerimi je glavnih sestavin do 85 %, ostale sestavine pa so samo v sledovih (Burt, 2004).

Sestava etričnih olj iz posameznih rastlinskih vrst se lahko razlikuje glede na čas žetve in glede na geografsko področje. To nam lahko pojasni nastanek protimikrobnih substanc iz njihovih prekursorjev. Namreč cimen in terpinen sta prekursorja karvakrola in timola v vrstah *Origanum* in *Thymus*. Te štiri substance najdene v grškem origanu so bile skoraj enake v vzorcih iz različnih geografskih področij in so bile tudi nespremenjene v rastlinah skozi različne sezone. Eterična olja proizvedena iz zelišč, ki so pobrana med ali takoj po cvetenju imajo večjo protimikrobno aktivnost. Enantiomeri iz sestavin eteričnega olja tudi kažejo na različno protimikrobno aktivnost. Sestava eteričnih olj iz različnih delov enake rastline se zelo razlikuje. Za primer eterično olje pridobljeno iz semen koriandra nima cilantrona, katerega dobimo iz nezrelh listov iste rastline (Burt, 2004).

Nychas je leta 1995 predstavil protimikrobni učinek eteričnih olj iz origana, timijana, žajblja, rožmarina, klinčkov, koriandra, česna in čebule na bakterije in plesni. Kasneje so spoznali, da so fenolne komponente v eteričnih oljih tiste, ki zavirajo rast naravno prisotnih mikroorganizmov in patogenih bakterij. Nekatero od njih so bile tako spoznane kot varne (GRAS) substance za uporabo pri živilskih proizvodih (Gachkar in sod., 2006).

Protimikrobni mehanizem delovanja začimb ostaja še nejasen. Mnogo raziskovalcev opisuje, da razkroj celičnih membran vodi do puščanja celične vsebine. V novejših študijah domnevajo, da je mehanizem delovanja začimbnih sestavin mnogo bolj kompleksen. Medtem ko iščejo sestavine, ki zmanjšujejo nastajanje biogenih aminov v živilih, so odkrili, da olja iz začimb lahko inhibirajo encimsko aktivnost živil. Pri etanolnih ekstraktih česna, cimeta, žajblja, muškatnega oreška in vseh drugih začimb, so opazili, da te zavirajo delovanje encimov histidin-dekarboksilaze, lizin-dekarboksilaze in ornitin-dekarboksilaze bakterij vrste *Enerobacter aerogenes* (Gill in sod., 2001).

2.5 ROŽMARIN

Navadni rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je do 1, redko tudi do 2 m visok vedno zelen grm s pokončnimi poganjki in z rjavo skorjo. Redkeje raste tudi kot polegli grm. Navzkrižno nameščeni listi so enostavni, črtalasti, 3-5 cm dolgi in do 3,5 mm široki, aromatični, usnjati, zgoraj zeleni, spodaj gosto belo puhasti, listni rob je cel in spodvihan, listni vrh pa je top. Listi so poraščeni z zvezdastimi dlačicami. Cvetovi so združeni v drobne, 3-6 cm dolge obstranske grozde, ki rastejo na poganjkih prejšnjega leta. Cvet je dvospolen, someren, čaša je do 4 mm dolga, zelena ali škrlatna in dvoustna. Venec je moder ali modrobela, do 12 mm dolg in dvousten, zrasel iz 5 venčnih listov, od katerih dva tvorita zgornjo ustno, t. i. čelado, trije pa spodnjo ustno. Plodovi so členasti oreščki, ki razpadejo na 4 drobne enosemenske plodiče (oreške) (Slika 2-4) (Brus, 2008).



Slika 2-4: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) (*Rosmarinus officinalis*, 2006)

Naravno je rožmarin razširjen v Sredozemlju. Njegova samoniklost v Sloveniji je vprašljiva, čeprav ne izključena. V sredozemskem svetu ga povsod in zelo pogosto gojimo, a raste tudi v naravi po prisojnih kamnitih pobočjih, marsikje podivjano. V notranjosti Slovenije ga gojimo kot posodovko, včasih na prostem preživi v zavetnih legah ob hišah (Brus, 2008).

2.5.1 Uporaba v zdravstvu

Rožmarin poživlja krvni obtok, zvišuje tlak, krepi živce in pomaga pri okrevanju. Preprečuje napenjanje, ureja delovanje želodca, pospešuje nastajanje in izločanje žolča ter lajša krče prebavil. Lajša tudi izkašljevanje in čisti dihalne poti. Odvaja vodo iz telesa in pospešuje znojenje ter s tem omili težave pri revmatizmu in protinu. V ljudskem zdravilstvu so ga poznali kot sredstvo za sprožanje splava. Zunanje rožmarin razkužuje in je uporaben za vtiranje ob mišičnem revmatizmu, zmečkaninah, udarninah, izpahih in mozoljasti koži. Uporabljajo ga za grgranje ob vnetjih grla in žrela (Rode, 2001).

2.5.2 Uporaba v kulinariki

Rožmarin je značilna začimba za mnoge jedi, ki niso le sredozemske. Uporabljajo ga v majhnih količinah za ribe, svinjino in jagnjetino, v omakah in marinadah. Tudi enolončnicam in juham, pečenemu krompirju in rižu lahko dopolni okus. Ponekod dodajajo nekaj lističev v jajčne jedi. Je zelišče za zeliščno maslo, zeliščni kis in olje. Cvetove ponekod potresejo na solate in jih kristalizirajo v sladkorju za okras slaščic. Lističe dodajajo za aromatiziranje vinu, zeliščnim likerjem in digestivom. Stebelca brez listov so uporabna kot nabodala za pečenje mesa na žaru (Rode, 2001).

2.5.3 Protimikrobno delovanje rožmarina

Pri rožmarinu so ugotovili, da vsebuje določene sestavine, kot so rožmarinol, rožmarinkinon, rožmarindifenol in karnozol, ki so lahko do štirikrat bolj učinkovite kot butiliran hidoksi anizol in enako učinkovite kot butiliran hidrokso toluen. Številni avtorji potrjujejo, da imajo nekatere sestavine tudi antibakterijsko aktivnost. Tako so ugotovili, da so to fenolni diterpeni, pridobljeni s frakcijo ekstraktov rožmarina (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

Ekstrakti rožmarina delujejo protimikrobno proti mnogim mikroorganizmom. Iz različnih študij, ki so jih naredili z ekstrakti rožmarina so ugotovili, da ekstrakti topni v maščobi kažejo na največjo inhibicijo rasti bakterij. V vodi topni ekstrakti kažejo na večjo antibakterijsko aktivnost kot ekstrakti, ki so topni v vodi in v maščobah. Na različne ekstrakte rožmarina je med bakterijami najbolj občutljiv rod *Brochotrix*. Za protibakterijsko delovanje ekstraktov naj bi bile odgovorne fenolne komponente ekstraktov. Na nepolarne fenolne spojine so bolj občutljive grampozitivne bakterije. S tem razlagamo tudi dejstvo, zakaj nekateri ekstrakti bolje delujejo protimikrobno od ostalih, ki so polarni, in lahko predvidevamo, da so ti ekstrakti bolj bogati z nepolarnimi sestavinami (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

Grampozitivne bakterije so bolj občutljive na eterična olja rožmarina in žajblja. Študija kaže na že znano manjšo občutljivost gramnegativnih patogenih bakterij. Vse bakterije vrste *Echerichia coli* kažejo visoko občutljivost na eterična olja rožmarina in žajblja. Eterični olji kažeta tudi na pomembno delovanje proti bakterijam vrste *Shigella sonnei* in *Salmonella typhi* (Bozin in sod., 2007).

V primerjavi s česnom, origanom, poprom, muškarnim oreščkom, kurkumo, janežom in cimetom sta ekstrakta rožmarina in sladkega korena najbolj učinkovita proti bakterijam vrste *L. monocytogenes*. Iz raziskav so ugotovili, da je med fenolnimi spojinami v rožmarinskem ekstraktu najbolj učinkovita proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* karnozolna kislina. Fenolne spojine s svojim delovanjem lahko razgradijo celično steno in uničijo citoplazemsko membrano, kar povzroči izpuščanje celičnih sestavin, spremembe maščobnih kislin in fosfolipidnih sestavin, ki vplivajo na sintezo DNA in RNA ter uničijo proteinsko translokacijo (Zhang in sod., 2009).

2.6 RAZDETO MESO

Razdeto meso se pridobi z razdevanjem mišičnega tkiva brez dodanih tretmajev, razen hlajenja. Z razdevanjem se hkrati ustvarijo ugodne razmere za razmnoževanje mikroorganizmov, saj se z vsakim rezom povečujeta površina in izcejen mesni sok (Bem in sod., 2003).

2.6.1 Mikrobiologija razdetega mesa

Z razdevanjem se poškodujejo (trgajo) vezivno- tkivne ovojnice, ki so naravna ovira za prodiranje mikroorganizmov. Istočasno se olajša dostop kisika. Z razbitjem strukture mesa se poškodujejo celice in mesni sok začne iztekati. Aktivnost vode je visoka (0,98-0,99) in vrednosti pH se najpogosteje v mejah med 5,8 in 6,0 – to pa so razmere, v katerih se lahko razmnožujejo gnilobni in zdravju škodljivi mikroorganizmi. Samo nizke temperature lahko upočasnijo njihovo razmnoževanje. Razen tega je higienska kakovost odvisna tudi od stopnje kontaminacije. Čim manjša je kontaminacija, manjše je tveganje in obstojnost mesa je daljša (Bem in sod., 2003).

V 1 g razdetega mesa je prisotnih 10^5 do 10^7 aerobnih bakterij. Z dobro odbiro surovine, z ohranjanjem nizkih temperatur in dobro higieno so ta števila lahko znatno nižja, v nasprotnem pa višja. V Nemčiji v 1g mletega mesa tolerirajo do 8×10^6 mezofilnih aerobov in 8×10^2 celic *E. coli*. Obsežne raziskave so pokazale, da 18 % vzorcev mletega mesa iz mesnic in 47,2 % iz supermarketov ni ustrezalo tem zahtevam (Bem in sod., 2003).

Mikrofloro razdetega mesa sestavlja bolj ali manj enaka mikroflora, kot površine izvirne surovine. Dominirajo gramnegativne psihrotrofne bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Pogosto so prisotne tudi bakterije rodov *Acinetobacter* in *Psychrobacter* (*Moraxella*). V manjšem odstotku so zastopane bakterije družine Enterobacteriaceae (10^3 do 10^5 /g). V mesu sveže zaklanih živali se, razen omenjenih, nahajajo še bakterije rodov *Alcaligenes*, *Flavobacterium* in bolj poredko *Aeromonas*. Če je razdeto meso proizvedeno iz surovine, ki je bila pred tem več dni skladiščena, so lahko prisotne tudi vrste iz rodu *Acinetobacter* in *Psychrobacter* (*Moraxella*). Istočasno se poveča število laktobacilov in bakterij vrste *Brochotrix thermosphacta*. V Turčiji so bakterije vrste *B. thermosphacta* prisotne v razdeti govedini v koncentracijah od 10^3 do 10^6 v 1 gramu (Bem in sod., 2003).

V razdetem mesu so pogosto prisotni povzročitelji alimentarnih toksikoinfekcij. Z raziskavami na Poljskem so v 491 vzorcih razdetega prašičjega, govejega, telečjega in mešanega govejega in prašičjega mesa ugotovili v 88,37 % vzorcev prisotnost več kot 10^4 koliformnih bakterij, v 10,3 % patogene bakterije vrste *Staphylococcus aureus* in 0,8 % vzorcev je vsebovalo bakterije rodu *Salmonella*. V Mehiki so bile iz razdetega mesa izolirane bakterije vrste *Staphylococcus aureus* iz 2,3 %, bakterije rodov *Salmonella* iz 11,4 % in *Listeria* iz 62 %, ter bakterije vrst *L. monocytogenes* iz 16 %, ter *Escherichia coli* iz 76 % priskanih vzorcev. V Jugoslaviji so iz razdetega in razdetega oblikovanega mesa v 7,94 % primerih izolirali koagulaza-pozitivne stafilokoke. Prisotnost povzročiteljev alimentarnih toksikoinfekcij je odvisna od številnih dejavnikov, predvsem od higiene surovine, higiene tehnološkega procesa, temperature in dolžine skladiščenja (Bem in sod., 2003).

2.7 JETRNA PAŠTETA

V 22. in 39. členu Pravilnika o kakovosti mesnih izdelkov (2004) je določeno, da se kot pašteta lahko poimenuje izdelek, ki je izdelan iz mesa, slanine ali druge maščobe živalskega ali rastlinskega izvora, bujona ali vode, drobovine (jeter), kožic, dodatnih surovin, aditivov. Stopnja razdetosti nadeva je fina in homogena (Gašperlin in Rajar, 2008).

Pri navajanju imena »jetrna pašteta« mora biti vsebnost jeter v končnem izdelku najmanj 15 % (Gašperlin in Rajar, 2008).

2.7.1 Mikrobiologija jetrne paštete

V proizvodnji jetrne paštete se običajno uporablja blanširana prašičja mišičnina in mastnina. Temperatura blanširanja je okrog 65 °C. Jetra se dodajajo presna ali pražena (v količini 10 – 30 %), oblikujejo značilno aromo izdelka in pripomorejo pri emulgiranju. Skupno število bakterij v 1 g svežih govejih jeter je v mejah med 10^2 do 10^3 , v prašičjih pa od 10^2 do 10^4 . Največkrat so izolirane bakterije rodov *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, pa tudi *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Pseudomonas*. Toda v 1g blanširanih prašičjih jeter je število bakterij ponavadi manjše od 50 (Bem in sod., 2003).

V mikroflori jetrnih paštet so pretežno predstavniki rodu *Bacillus*. Te bakterije so bile izolirane iz 98 % preiskovanih vzorcev. Skupno število je bilo v glavnem do 10^5 cfu/g. Grampozitivne nesporogene palčke so bile identificirane v 49 %, *Micrococcaceae* v 18 %, kvasovke v 5 %, ter gramnegativne palčke v 4 % preiskovanih vzorcev (Bem in sod., 2003).

Najpogostejša oblika kvara je »zakisanje«. Povzročajo ga bakterije rodov *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcaceae* in *Brochothrix thermosphacta*. Bakterije rodu *Bacillus* povzročajo nitasto raztezljive tvorbe. Bakterije rodov *Bacillus* in *Clostridium* so povzročitelji gnitja, *Micrococcaceae* in kvasovke pa sluzaste površine (Bem in Adamič, 1991).

Povzročitelji alimentarnih toksikoinfekcij so v kuhanih klobasah lahko skoraj vse termorezistentnejše vrste kot npr. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* idr. (Bem in Adamič, 1991).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili bakterije vrste *Listeria monocytogenes* ŽM58 (nemški referenčni sev, serotip 4b).

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Gojišče TSA

V 1000 ml steklenico smo zatehtali 20 g gojišča triptični soja agar (TSA) (Oxoid, CM0131, Anglija), 1,25 g dikalijev-hidrogenfosfat (K_2HPO_4) (Kemika, 0705007, Hrvaška), 1,25 g D-(+)-glukoze (Kemika, 0705007, Hrvaška) in 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija). Mešanico smo raztopili v 500 ml destilirane vode. Nato smo gojišče sterilizirali 20 min pri 121 °C. Pripravljeno gojišče smo do uporabe hranili v inkubatorju na temperaturi 50 °C ali pa ga aseptično razlili v petrijevke in jih shranili v hladilnik.

Gojišče TSB

V 1000 ml steklenico smo zatehtali 15 g gojišča triptični soja bujon (TSB) (Oxoid, CM0129, Anglija). Dodali smo 500 ml destilirane vode, dobro premešali do bistre raztopine. Nato smo gojišče sterilizirali 20 min pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku.

Gojišče BHI

V 1000 ml steklenico smo zatehtali 19 g gojišča BHI (Brain Heart Infusion broth, Merck, 2.10493.0500, Nemčija), dodali 500 ml destilirane vode ter dobro premešali. Nato smo gojišče sterilizirali 20 min pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku.

Puferirana peptonska voda (BPW) z 10 % mešanega razdetega mesa ali 10 % paštete

V 1000 ml steklenico smo zatehtali 5 g BPW (puferirana peptonska voda, Oxoid, CM0509, Anglija), dodali 1000 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo raztopino razlili po 90 ml v demetrijeve steklenice in v vsako steklenico zatehtali 10 g mešanega razdetega mesa (Mercator, Slovenija) ali 10 g jetrne paštete (Gavrilovič, Hrvaška). Vsako suspenzijo smo prelili v sterilne vrečke in vsebino 120 sekund homogenizirali v gnetilniku (Stomacher 400) pri delovanju normalne moči. Potem smo homogenizate prelili nazaj v demetrijeve

steklenice ter zaprli z gumijastimi zamaški. Homogenizate smo v demetrijevih steklenicah sterilizirali 20 min pri 121 °C (Owen in Palombo, 2007).

Fiziološka raztopina

3,4 g KH₂PO₄ (Kemika, 11161, Hrvaška) smo raztopili v 100 ml destilirane vode (pH = 7,2). 1,25 ml te raztopine smo razredčili v 1000 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali 20 min pri 121 °C.

3.1.3 Ekstrakti rožmarina

Sestavine:

- Ekstrakt rožmarina Vivox 40, ki vsebuje 40 % karnozolne kisline (Vitiva, d.o.o., Slovenija)
- Ekstrakt rožmarina Vivox 70, ki vsebuje 70 % karnozolne kisline (Vitiva, d.o.o., Slovenija)

3.1.4 Mesni izdelki

Razdeto meso

Za razdeto meso smo uporabljali mešano razdeto meso blagovne znamke Mercator, in sicer v količini 500 g.

Jetrna pašteta

V našem primeru smo uporabili jetrno pašteto Gavrilovič, ki je sestavljena iz svinjskega mastnega tkiva, vode, svinjskih jeter (15 %), svinjskega mesa, mlečnih beljakovin, začimb, jedilne soli, ojačevalca arome mononatrijev glutaminat (E 621) in konzervansa natrijev nitrit (E 250).

3.1.5 Druge kemikalije in laboratorijska oprema

- Absolutni etanol (Merck, 2.00983.1000, Nemčija)
- Etanol 96 % (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)

Aparati, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu so navedeni v preglednici 3-1.

Preglednica 3-1 : Laboratorijski aparati

Aparat	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Inkubator	I – 115 C	Kambič, Slovenija
Gnetilnik	Stomacher 400, BA7021	Seward, Anglija
Avtomatske pipete in nastavki	P 10, P 100, P 1000 (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Gilson, Francija Plastibrand, Nemčija
Tehtnica	Sartorius analytic	Nemčija
Digitalna tehtnica	PB 1502 - S	Mettler
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Zmrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Vibromix 104 EV	Tehtnica, Slovenija
Stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Plinski gorilnik	/	/

Poleg aparatov, ki so navedeni v preglednici 3-1, smo uporabljali tudi drugo drobno laboratorijsko opremo: cepilne zanke, petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice 100 ml, 250 ml in 1000 ml (Duran, Nemčija), merilne valje (Plastibrand, Nemčija), parafilm (PM 992, American National Can), steklovino in računalniško programsko opremo Microsoft Office.

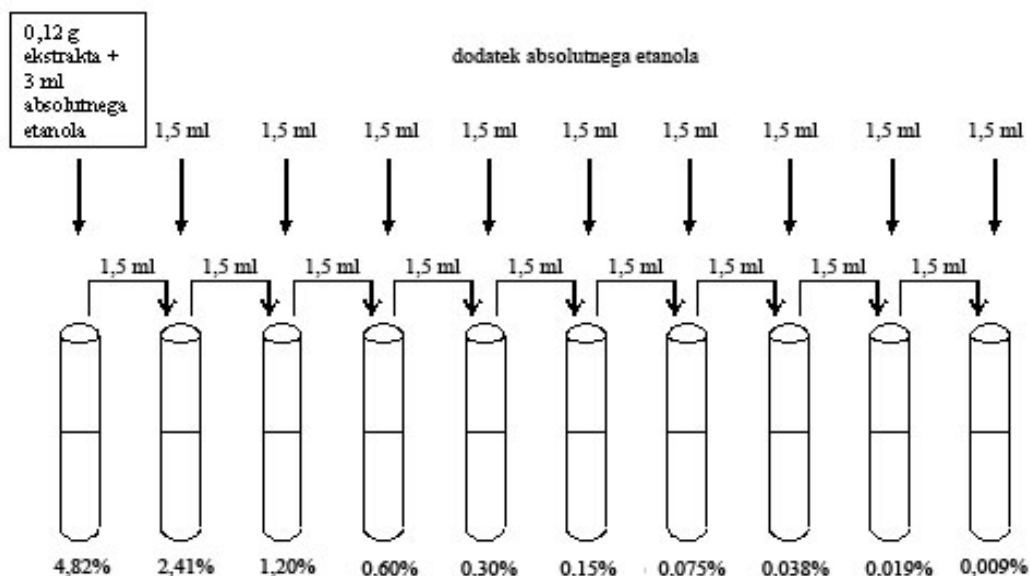
3.2 METODE DELA

3.2.1 Namnožitev bakterij vrste *Listeria monocytogenes*

Za namnožitev smo uporabili kolonijo bakterij vrste *L. monocytogenes* iz gojišča TSA, ki je bilo pred tem 24 ur inkubirano pri 37 °C. Kolonijo smo s cepilno zanko prenesli v sterilno tekoče gojišče BHI (4 ml), vsebino premešali na vrtnem mešalniku, ter suspenzijo 20 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri 37 °C. Tako smo namnožili bakterije do približno 10^8 cfu/ml. Točno število smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Kulturo smo uporabili za določitev protimikrobnega učinka rožmarina, pri višjem in nižjem začetnem številu bakterij oziroma pri 10^7 cfu/ml in 10^3 cfu/ml.

3.2.2 Priprava ekstraktov rožmarina

Osnovno 4,82 % raztopino ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 smo pripravili tako, da smo v epruveto zatehtali 0,12 g ustreznega ekstrakta in mu dodali 3 ml absolutnega etanola. Potem smo vsebino na vrtnem mešalu mešali tako dolgo, dokler ni postala raztopina bistra. Nato smo začetno 4,82 % raztopino ekstrakta razredčili do 0,009 % raztopine s serijo razredčitev z absolutnim etanolom (Slika 3-1).



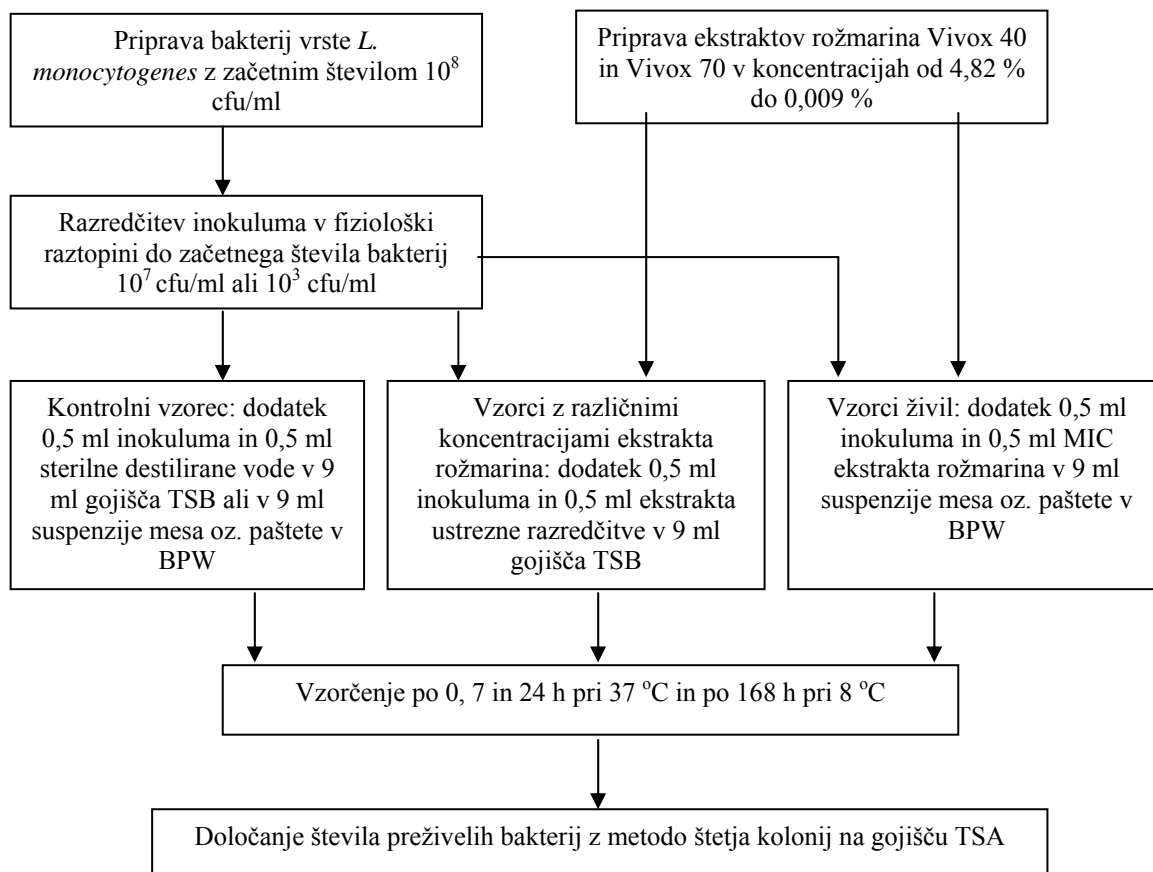
Slika 3-1 : Priprava razredčitev ekstraktov rožmarina

3.2.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču

V 9 ml gojišča TSB smo dodali 0,5 ml čiste kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^7 cfu/ml ali 10^3 cfu/ml in 0,5 ml ekstrakta rožmarina Vivox 40 ali Vivox 70. Vsak ekstrakt smo dodali v koncentracijah od 4,82 % do 0,009 % (Slika 3-2). Glede na rast oziroma preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* smo določili minimalne inhibitorne koncentracije - MIC in minimalne baktericidne koncentracije - MBC ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70.

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo izvedli v treh različicah:

- Pri višjem (10^7 cfu/ml) in nižjem (10^3 cfu/ml) začetnem številu bakterij v gojišču TSB pri 37 °C in 8 °C.
- Pri višjem (10^7 cfu/ml) in nižjem (10^3 cfu/ml) začetnem številu bakterij v vzorcih mesa (10 % mesa v BPW) pri 37 °C in 8 °C.
- Pri višjem (10^7 cfu/ml) in nižjem (10^3 cfu/ml) začetnem številu bakterij v vzorcih paštete (10 % paštete v BPW) pri 37 °C in 8 °C.



Slika 3-2: Shema določanja protimikrobnega učinka ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *L. monocytogenes*

3.2.4 Določitev minimalne inhibitorne koncentracije

Za določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 v gojišču TSB smo števila preživelih bakterij *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji (vzorčenja ob časih 0, 7 in 24 ur) logaritmirali in narisali graf kot odvisnost logaritma števila preživelih bakterij od časa pri različnih koncentracijah ekstrakta v gojišču. Nato smo iz grafa določili MIC posameznega ekstrakta rožmarina pri koncentraciji, pri kateri število preživelih bakterij ni bilo večje od začetnega števila bakterij (Carson in sod., 1995).

3.2.5 Določitev minimalne baktericidne koncentracije

Minimalno baktericidno koncentracijo (MBC) ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta dodanega v gojišče TSB, pri kateri je po 24 - urni inkubaciji preživelo 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* (Canillac in Mourey, 2001).

Za določitev vrednosti MBC smo izračunali odstotke preživelih bakterij (enačba 3.1), izračunane vrednosti logaritmirali ter prikazali v grafu kot odvisnost preživelih bakterij (%) od časa. Nato smo izračunali enačbo premice in iz nje izračunali vrednost MBC (enačba 3.2).

Odstotek (P) preživelih bakterij smo izračunali po enačbi:

$$P = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad \dots(3.1)$$

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij (%); N_1 : število bakterij po 24-urni inkubaciji pri 37 °C; N_0 : začetno število bakterij

Enačba premice, s katero smo določili MBC:

$$y = kx + n$$

ali

$$N(\log P \text{ preživelih}) = C (\mu\text{g/ml TSB}) \times \text{MBC} + n \quad \dots(3.2)$$

Legenda: y: logaritem odstotka preživelih bakterij; k: koncentracija ekstrakta rožmarina v gojišču; x: minimalna baktericidna koncentracija; n: število določeno z enačbo premice

3.2.6 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču

Za določitev števila bakterij (čista kultura *L. monocytogenes* v gojišču BHI, ali v gojišču v TSB ali kultura *L. monocytogenes* v BPW z 10 % mesom ali z 10 % paštete) smo po razredčevanju vzorca s fiziološko raztopino (9 ml) 0,1 ml vzorca prenesli na trdno gojišče TSA in ga razmazali po površini gojišča. Gojišče smo nato 24 h inkubirali pri 37 °C. Po

inkubaciji smo na gojišču prešteli zrasle kolonije in izračunali število bakterij (ISO 4833, 2003).

Za gojišča z od 15 do 300 zraslih kolonij smo uporabili enačbo:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + n_2 \cdot 0,1) \times R} \quad \dots(3.3)$$

Legenda: ΣC : seštevek vseh kolonij na števni plošči; n_1 : število števnih gojišč pri prvi razredčitvi; n_2 : število števnih gojišč pri drugi razredčitvi; R : faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi; N : število bakterij v cfu/ml

Za gojišče z manj kot 15 zraslih kolonij smo uporabili enačbo:

$$N = \frac{\Sigma C}{n_1 \cdot R} \quad \dots(3.4)$$

Legenda: ΣC : seštevek vseh kolonij; n_1 : število petrijevk; R : faktor razredčitve; N : število bakterij v cfu/ml

4 REZULTATI

4.1 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU TSB PRI 37 °C

Protimikroben učinek ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri 37 °C smo določali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB pri višjem in nižjem začetnem številu bakterij (10^7 ali 10^3 cfu/ml).

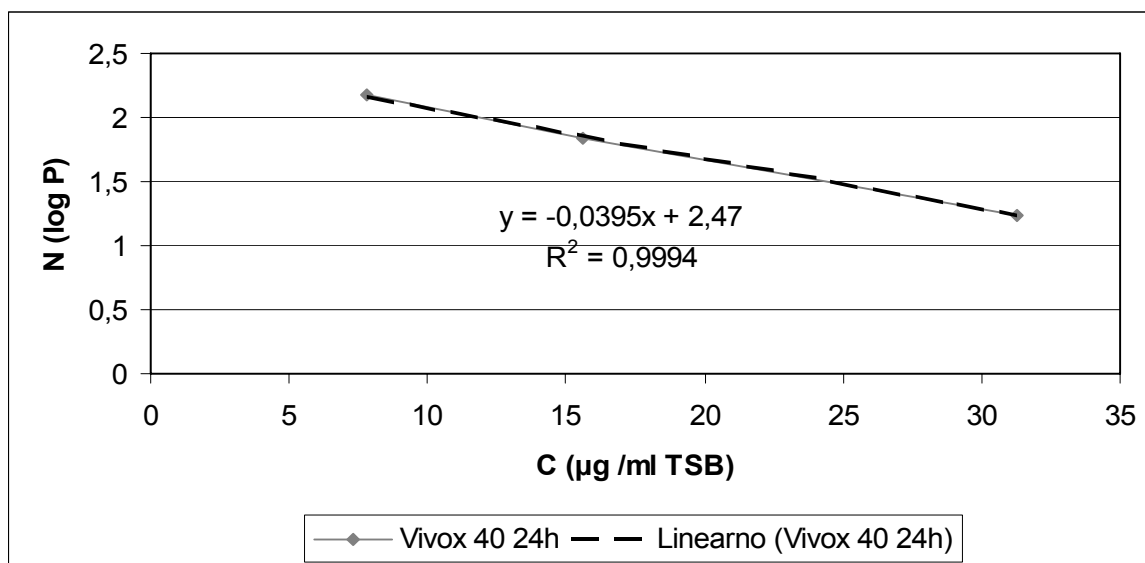
4.1.1 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

Najprej smo določali protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml. Z metodo razredčevanja v gojišču TSB smo dobili število preživelih bakterij pri različnih koncentracijah ekstrakta Vivox 40. Vse poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelek (Preglednica 4-1).

Preglednica 4-1: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstrakta		
C ₁ (µg/ml EtOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	0 ur	7 ur	24 ur
625	31,25	$1,52 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^6$	$3,91 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^6$	$2,63 \times 10^6 \pm 1,99 \times 10^6$
312,5	15,63	$1,56 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^5$	$1,04 \times 10^7 \pm 1,03 \times 10^6$	$1,09 \times 10^7 \pm 2,12 \times 10^5$
156,2	7,81	$1,55 \times 10^7 \pm 5,43 \times 10^5$	$1,16 \times 10^7 \pm 2,88 \times 10^6$	$2,27 \times 10^7 \pm 5,88 \times 10^6$
0,00	0,00	$1,52 \times 10^7 \pm 1,52 \times 10^5$	$1,79 \times 10^9 \pm 7,26 \times 10^7$	$1,19 \times 10^9 \pm 3,18 \times 10^8$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu (µg/ml EtOH); C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v TSB (µg/ml TSB)



Slika 4-1: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

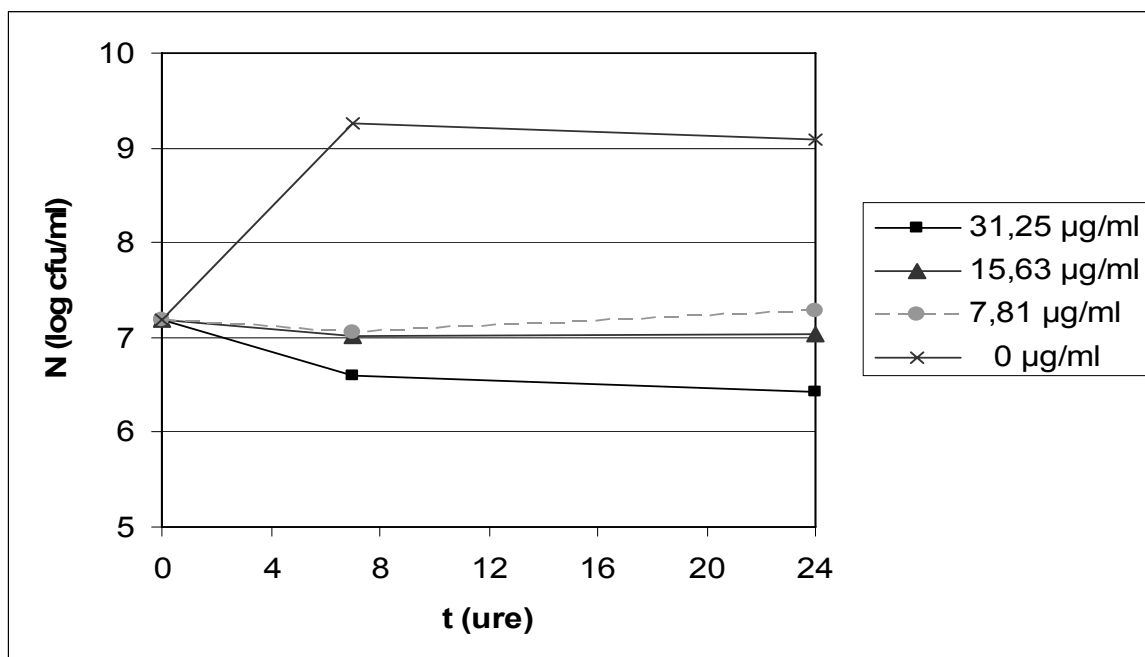
Za določitev MBC smo podatke iz preglednice 4-1 preračunali v odstotkih preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (Slika 4-1). MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji smo izračunali po enačbi premice.

$$-1 = -0,0395 \times \text{MBC} + 2,47$$

$$\text{MBC} = 88,00 \mu\text{g ekstrakta/ml TSB.}$$

Določili smo, da je MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 88,00 µg ekstrakta/ml TSB.

Za določitev MIC smo števila bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-1 logaritmirali in narisali rasne krivulje (Slika 4-2).



Slika 4-2: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

S slike 4-2 smo določili, da je MIC za ekstrakt Vivox 40 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču TSB pri 15,63 µg ekstrakta/ml TSB.

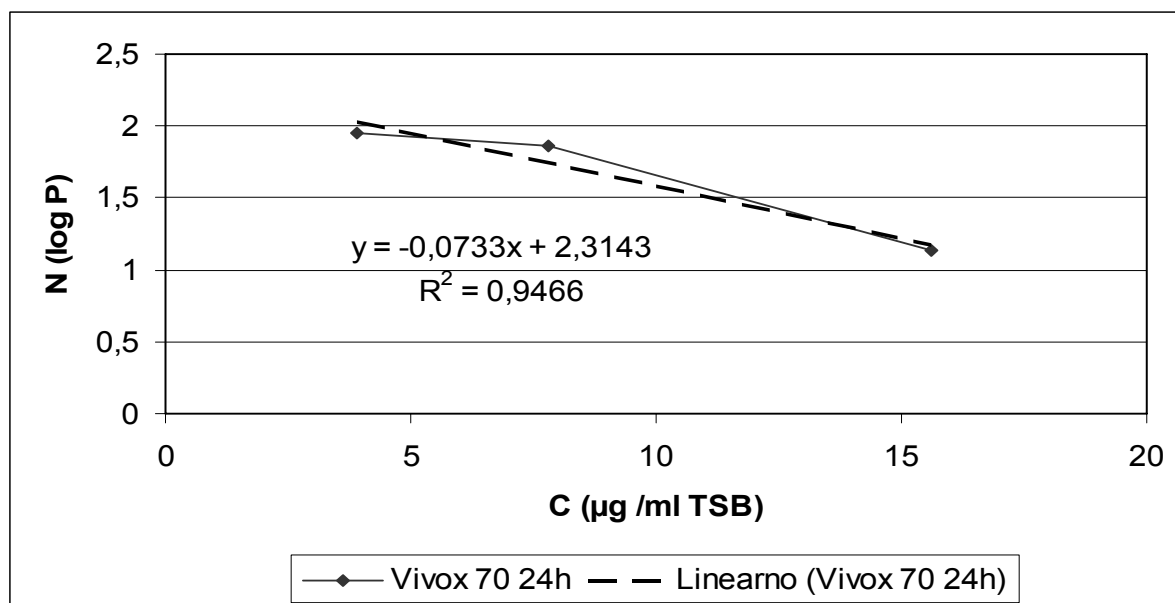
4.1.2 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

Enako kot za ekstrakt Vivox 40 smo določali tudi protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 z metodo razredčevanja v gojišču TSB pri začetnem številu 10^7 cfu/ml. Poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelek (Preglednica 4-2).

Preglednica 4-2: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	0 ur	7 ur	24 ur
312,5	15,63	$1,48 \times 10^7 \pm 8,67 \times 10^5$	$9,90 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^5$	$1,99 \times 10^6 \pm 3,25 \times 10^5$
156,2	7,81	$1,34 \times 10^7 \pm 1,78 \times 10^5$	$1,27 \times 10^7 \pm 1,67 \times 10^6$	$9,79 \times 10^6 \pm 7,56 \times 10^6$
78,1	3,90	$1,31 \times 10^7 \pm 3,03 \times 10^4$	$1,24 \times 10^7 \pm 3,32 \times 10^6$	$1,17 \times 10^7 \pm 2,86 \times 10^6$
0,00	0,00	$1,19 \times 10^7 \pm 1,17 \times 10^6$	$1,56 \times 10^9 \pm 1,29 \times 10^6$	$1,60 \times 10^9 \pm 2,50 \times 10^8$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu; C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v TSB



Slika 4-3: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

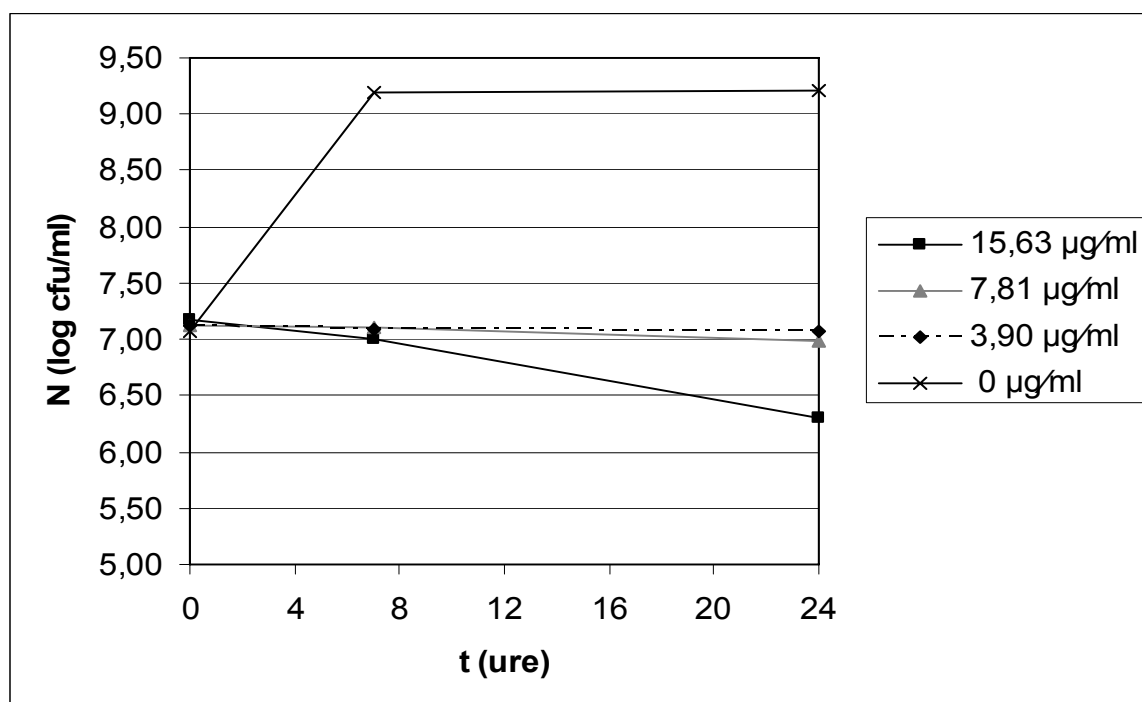
MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji smo izračunali po enačbi premice.

$$-1 = -0,0733 \times \text{MBC} + 2,3143$$

$$\text{MBC} = 45,00 \mu\text{g ekstrakta/ml TSB}$$

Iz enačbe premice smo določili, da je MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 45,00 μg ekstrakta/ml TSB.

Za določitev MIC smo števila zraslih bakterij *L. monocytogenes* iz preglednice 4-3 logaritmirali, narisali rasne krivulje (Slika 4-4) in določili vrednost MIC.



Slika 4-4: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču TSB je 7,81 μg ekstrakta/ml TSB.

4.1.3 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

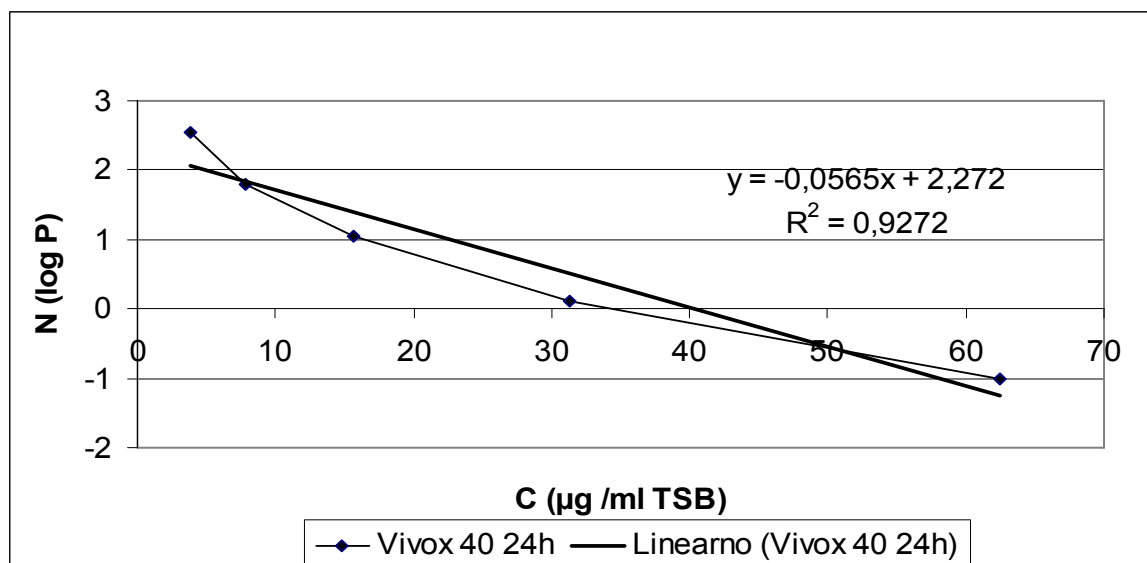
Po določitvi protimikrobnega učinka ekstrakta Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml, nas je zanimalo, kako deluje ekstrakt Vivox 40 na te bakterije pri začetnem številu 10^3 cfu/ml. Pričakovali smo, da bo ekstrakt deloval bolje pri nižjih koncentracijah celic in zato smo poskuse izvajali s še bolj razredčenim ekstraktom. Pri tem smo vse poskuse izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelek. (Preglednica 4-3).

Preglednica 4-3: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	0 ur	7 ur	24 ur
1250	62,50	$1,03 \times 10^4 \pm 2,47 \times 10^2$	$4,25 \times 10^1 \pm 1,06 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1 \pm 2,35$
625	31,25	$1,04 \times 10^4 \pm 2,83 \times 10^2$	$1,07 \times 10^3 \pm 2,65 \times 10^2$	$1,38 \times 10^2 \pm 6,55 \times 10^1$
312,5	15,63	$1,02 \times 10^4 \pm 2,47 \times 10^2$	$4,55 \times 10^3 \pm 5,95 \times 10^2$	$1,17 \times 10^3 \pm 3,75 \times 10^1$
156,2	7,81	$1,22 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^3$	$8,75 \times 10^3 \pm 2,05 \times 10^3$	$7,66 \times 10^3 \pm 1,75 \times 10^3$
78,1	3,90	$1,28 \times 10^4 \pm 1,44 \times 10^3$	$1,38 \times 10^4 \pm 4,41 \times 10^2$	$4,55 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^3$
0,00	0,00	$1,27 \times 10^4 \pm 3,89 \times 10^2$	$7,63 \times 10^6 \pm 5,77 \times 10^6$	$1,32 \times 10^9 \pm 3,43 \times 10^8$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v TSB

MBC smo določili tako, da smo podatke iz preglednice 4-3 preračunali v odstotkih preživelih bakterij in nato te vrednosti logaritmirali (Slika 4-5).



Slika 4-5: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

S slike 4-5 je razvidno, da je MBC za ekstrakt Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji med 60 in 70 µg ekstrakta/ml TSB .

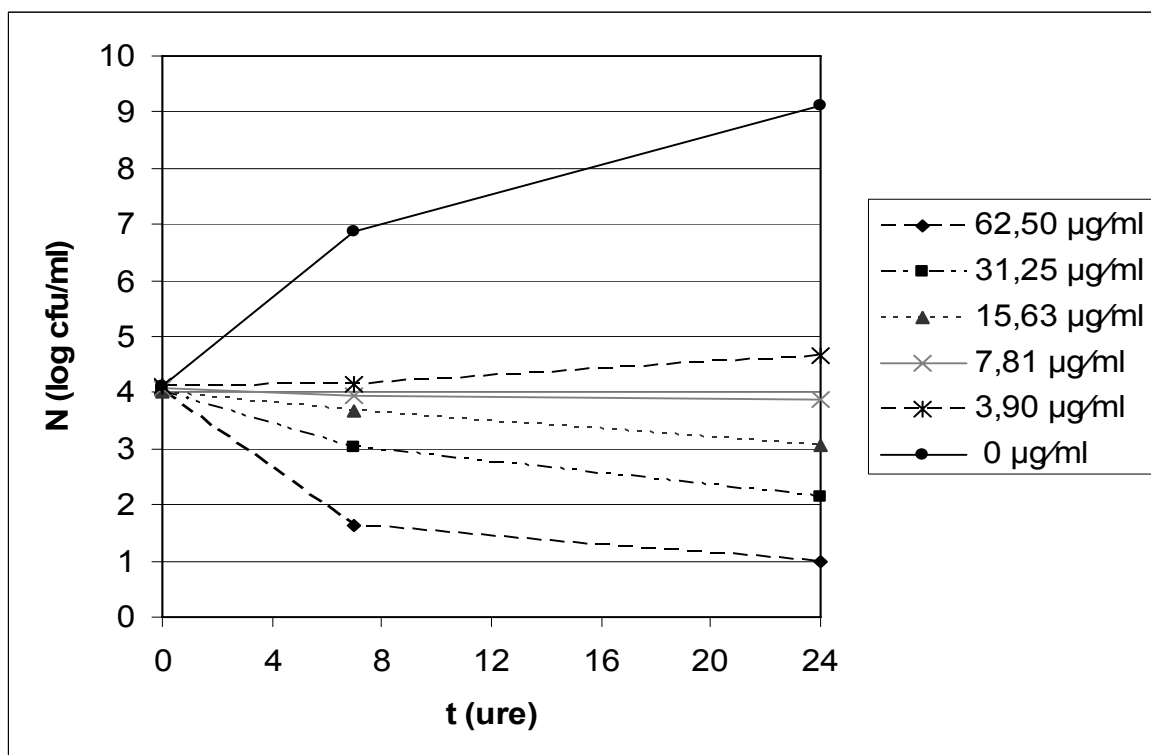
Za natančnejšo določitev smo MBC izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0565 \times \text{MBC} + 2,272$$

$$\text{MBC} = 58,00 \text{ µg ekstrakta/ml TSB}$$

MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji je 58,00 µg ekstrakta/ml TSB.

Za določitev MIC ekstrakta Vivox 40 smo narisali graf, v katerem so prikazana logaritmirana števila bakterij *L. monocytogenes* v odvisnosti od časa inkubacije pri različnih koncentracijah ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB (Slika 4-6) .



Slika 4-6: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Minimalno inhibitorno koncentracijo za ekstrakt rožmarina Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču TSB smo določili pri 7,81 µg ekstrakta/ml TSB (Slika 4-6).

4.1.4 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

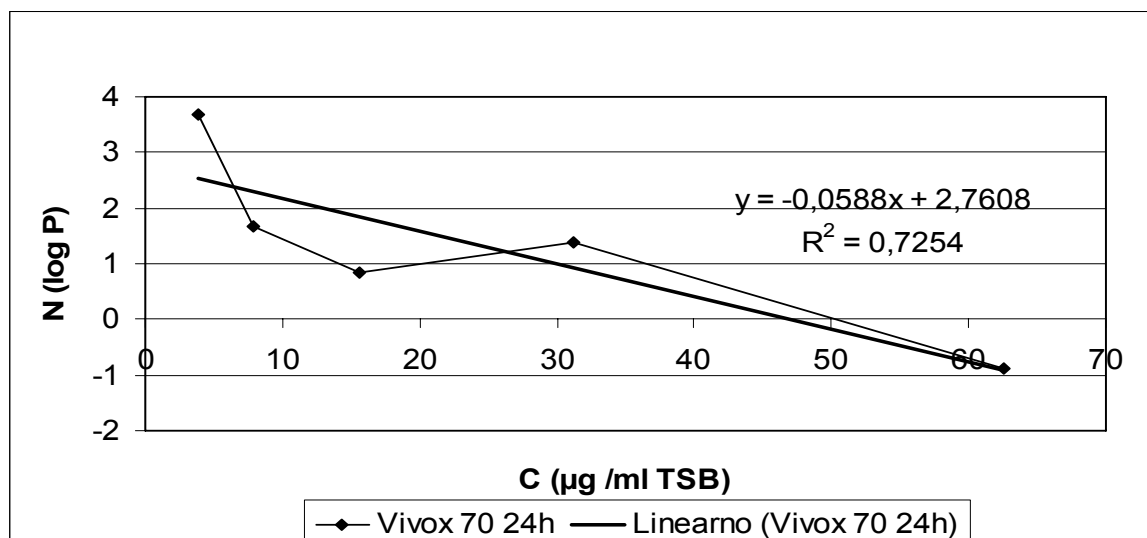
Podobno kot pri ekstraktu Vivox 40 nas je tudi pri ekstraktu Vivox 70 zanimalo, kako bo ekstrakt deloval pri nižjem začetnem številu bakterij. Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri ekstraktu Vivox 40 smo predvidevali, da bo tudi ekstrakt Vivox 70 deloval bolj zaviralno pri nižjih koncentracijah, zato smo tudi uporabljali bolj razredčen ekstrakt. Poskuse smo pri tem izvajali v paralelkah, rezultate pa podali, kot povprečje paralelk. (Preglednica 4-4).

Preglednica 4-4: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	0 ur	7 ur	24 ur
1250	62,50	$7,58 \times 10^3 \pm 4,60 \times 10^2$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
625	31,25	$8,47 \times 10^3 \pm 1,02 \times 10^3$	$4,15 \times 10^3 \pm 3,54 \times 10^2$	$2,04 \times 10^3 \pm 3,34 \times 10^2$
312,5	15,63	$9,05 \times 10^3 \pm 3,54 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 \pm 5,66 \times 10^2$	$6,25 \times 10^2 \pm 1,06 \times 10^2$
156,2	7,81	$8,00 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$	$9,18 \times 10^3 \pm 6,72 \times 10^2$	$3,65 \times 10^3 \pm 4,95 \times 10^2$
78,1	3,90	$1,08 \times 10^3 \pm 1,06 \times 10^3$	$1,14 \times 10^4 \pm 3,11 \times 10^3$	$5,33 \times 10^4 \pm 1,38 \times 10^4$
0,00	0,00	$1,11 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^3$	$2,22 \times 10^7 \pm 5,79 \times 10^5$	$1,65 \times 10^9 \pm 0,00$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v TSB

Za določitev MBC smo števila celic preračunali v odstotkih preživelih bakterij in izračunane vrednosti logaritmirali (Preglednica 4-4).



Slika 4-7: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji je bila iz preglednice 4-4 in slike 4-7 določena v območju med 60 do 70 µg ekstrakta/ml TSB.

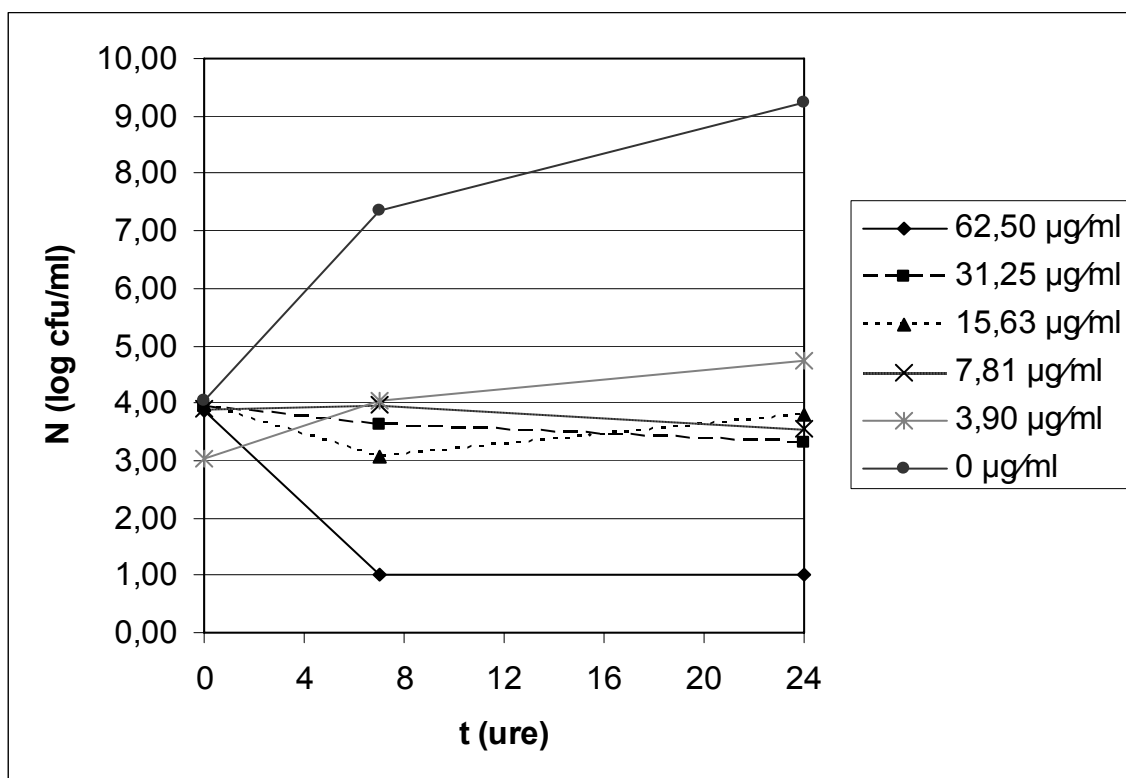
Natančno MBC smo izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0588 \times \text{MBC} + 2,7608$$

$$\text{MBC} = 64,00 \text{ µg ekstrakta/ml TSB}$$

Določili smo, da je MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 64,00 µg ekstrakta/ml TSB.

Za določitev MIC smo iz preglednice 4-4 vrednosti logaritmirali in narisali graf, iz katerega smo določili vrednost MIC.



Slika 4-8: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču TSB za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37°C

Določili smo, da je minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt rožmarina Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču TSB 7,81 µg ekstrakta/ml TSB (Slika 4-8).

4.2 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU BPW Z MESOM PRI 37 °C

S temi eksperimenti smo hoteli dokazati protimikrobno delovanje ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 na bakterije *L. monocytogenes* v gojišču BPW z dodanim razdetim mesom. Za to smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču BPW z 10 % mesa, število zraslih bakterij pa določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

4.2.1 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

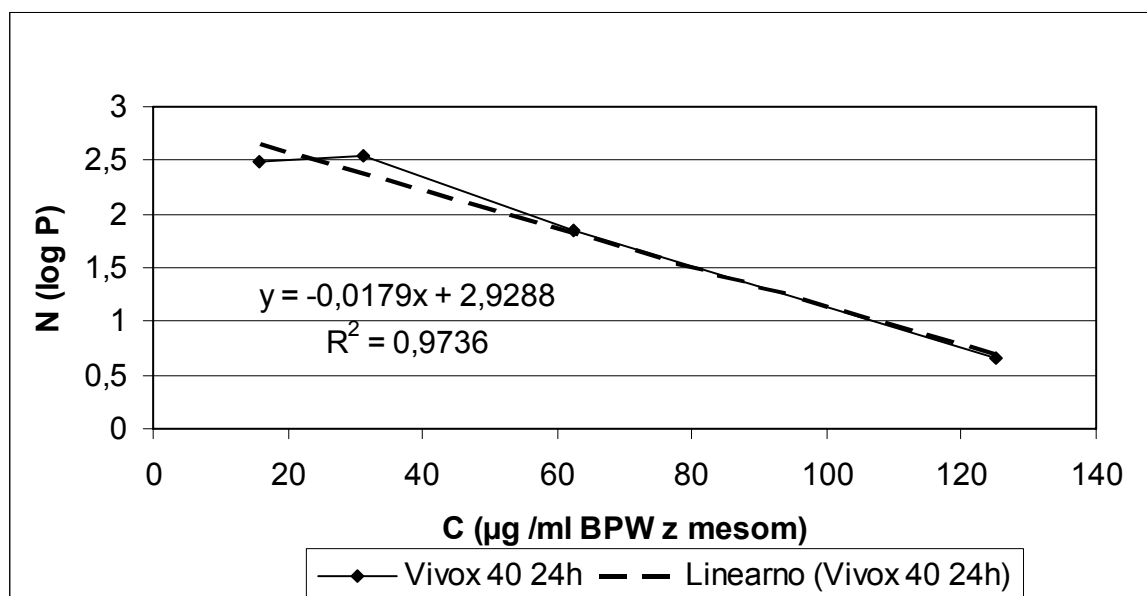
Najprej smo ugotavljali protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml bakterij *L. monocytogenes* v gojišču BPW z 10 % mesa. Pri tem smo upoštevali rezultate iz poglavja 4.1.1, kjer smo določali protimikrobni učinek delovanja Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml. Kar pomeni, da smo vzeli tisto koncentracijo ekstrakta, pri kateri smo določili MIC (15,63 μ g ekstrakta/ml TSB) in tudi višje koncentracije ekstrakta Vivox 40, zaradi slabših pogojev delovanja ekstrakta na bakterije. Vse poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-5.

Preglednica 4-5: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstrakta		
C ₁ (μ g/ml etOH)	C ₂ (μ g/ml BPW z mesom)	0 ur	7 ur	24 ur
2500	125,00	$1,24 \times 10^7 \pm 2,73 \times 10^5$	$3,00 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^6$	$5,50 \times 10^5 \pm 3,61 \times 10^5$
1250	62,50	$1,25 \times 10^7 \pm 2,47 \times 10^5$	$6,25 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^4$	$8,88 \times 10^6 \pm 4,70 \times 10^6$
625	31,25	$1,09 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^4$	$1,33 \times 10^7 \pm 6,94 \times 10^5$	$3,77 \times 10^7 \pm 4,31 \times 10^6$
312,5	15,63	$1,36 \times 10^7 \pm 3,28 \times 10^5$	$1,41 \times 10^7 \pm 4,11 \times 10^6$	$4,12 \times 10^7 \pm 8,04 \times 10^5$
0,00	0,00	$1,27 \times 10^7 \pm 2,19 \times 10^4$	$7,88 \times 10^8 \pm 3,71 \times 10^8$	$3,80 \times 10^8 \pm 3,34 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v BPW z 10 % mesa

MBC smo določili tako, da smo podatke iz preglednice 4-5 preračunali v odstotkih preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (Slika 4-9).



Slika 4-9: Določitev MBC ekstrakta Vivotex 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

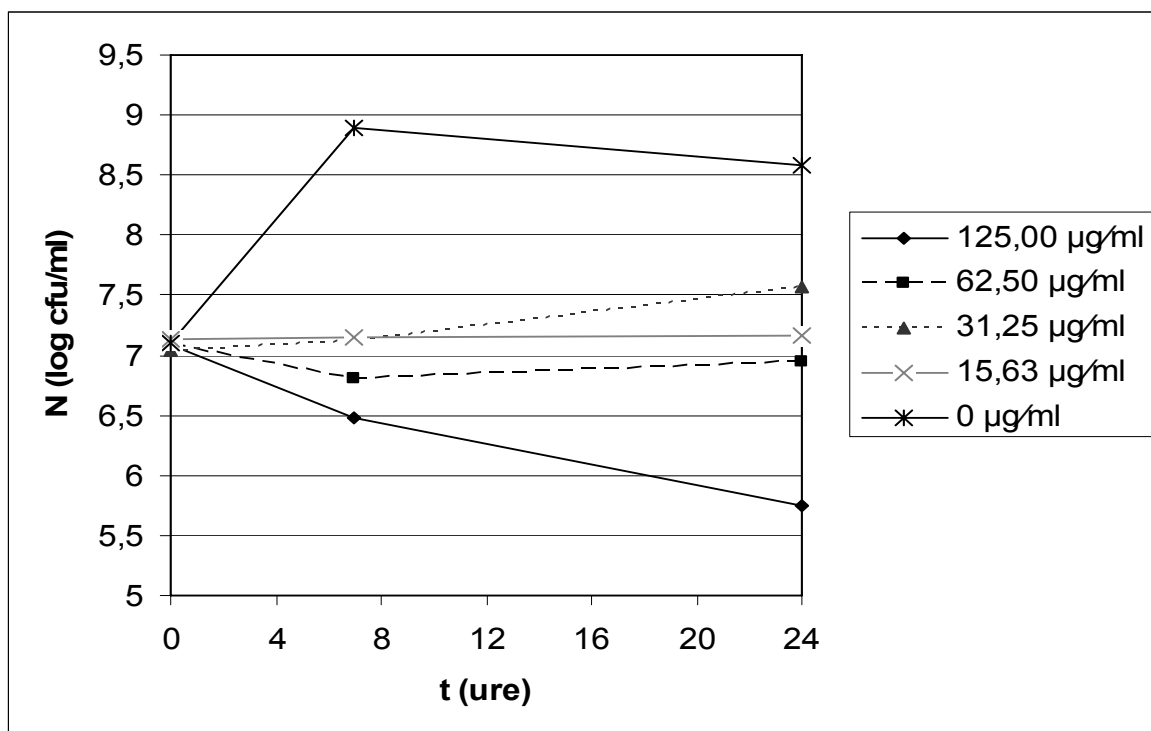
Glede na to, da iz preglednice 4-9 in slike 4-9 nismo določili kje se nahaja MBC ekstrakta Vivotex 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču BPW z razdetim mesom, smo MBC izračunali po enačbi premice.

$$-1 = -0,0179 \times \text{MBC} + 2,9288$$

$$\text{MBC} = 219,00 \mu\text{g ekstrakta/ml TSB}$$

Izračunali smo, da je MBC ekstrakta Vivotex 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 219,00 µg ekstrakta/ml BPW z razdetim mesom.

Podatke iz preglednice 4-5 smo logaritmirali in narisali graf, iz katerega smo določili vrednost MIC.



Slika 4-10: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt rožmarina Vivox 40 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW z razdetim mesom je 62,50 µg ekstrakta/ml BPW z mesom.

4.2.2 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

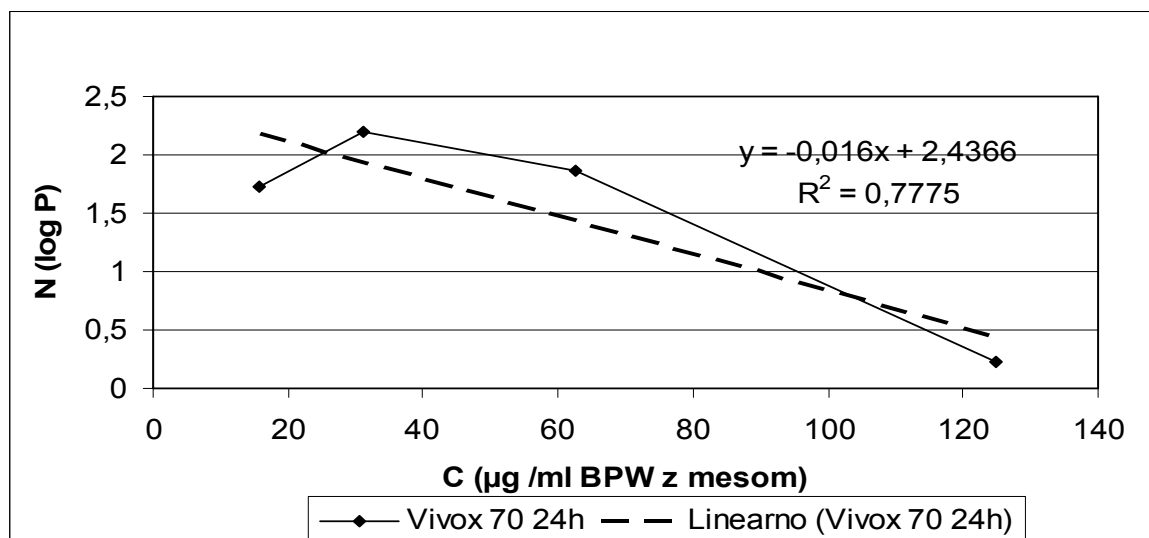
Podobno kot za Vivox 40 v poglavju 4.2.1 smo se tudi pri ekstraktu Vivox 70 ozirali na rezultate iz poglavja 4.1.2, pri katerem smo določali protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v gojišču TSB. Testirali smo višje koncentracije ekstrakta, kot pri poskusih, pri katerih smo določili MIC (7,81 µg ekstrakta/ml TSB) ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v TSB in skleпали, da so zaradi neidealnih pogojev delovanja ekstrakta potrebne višje koncentracije ekstrakta na bakterije. Poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralel (Preglednica 4-6).

Preglednica 4-6: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstrakta		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml BPW z mesom)	0 ur	7 ur	24 ur
2500	125,00	$9,00 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^5$	$2,89 \times 10^6 \pm 2,53 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$
1250	62,50	$1,51 \times 10^7 \pm 2,99 \times 10^6$	$6,53 \times 10^6 \pm 4,70 \times 10^6$	$1,09 \times 10^7 \pm 9,90 \times 10^5$
625	31,25	$1,39 \times 10^7 \pm 2,77 \times 10^6$	$5,56 \times 10^6 \pm 4,12 \times 10^6$	$2,17 \times 10^7 \pm 1,02 \times 10^7$
312,5	15,63	$1,55 \times 10^7 \pm 6,64 \times 10^6$	$8,08 \times 10^6 \pm 5,41 \times 10^6$	$8,20 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6$
0,00	0,00	$1,77 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^6$	$1,15 \times 10^9 \pm 6,01 \times 10^7$	$3,90 \times 10^8 \pm 1,06 \times 10^8$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v BPW z 10 % mesa

Za določitev MBC smo podatke iz preglednice 4-6 preračunali v odstotkih preživelih bakterij in izračunane vrednosti še logaritmirali (Slika 4-11).



Slika 4-11: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

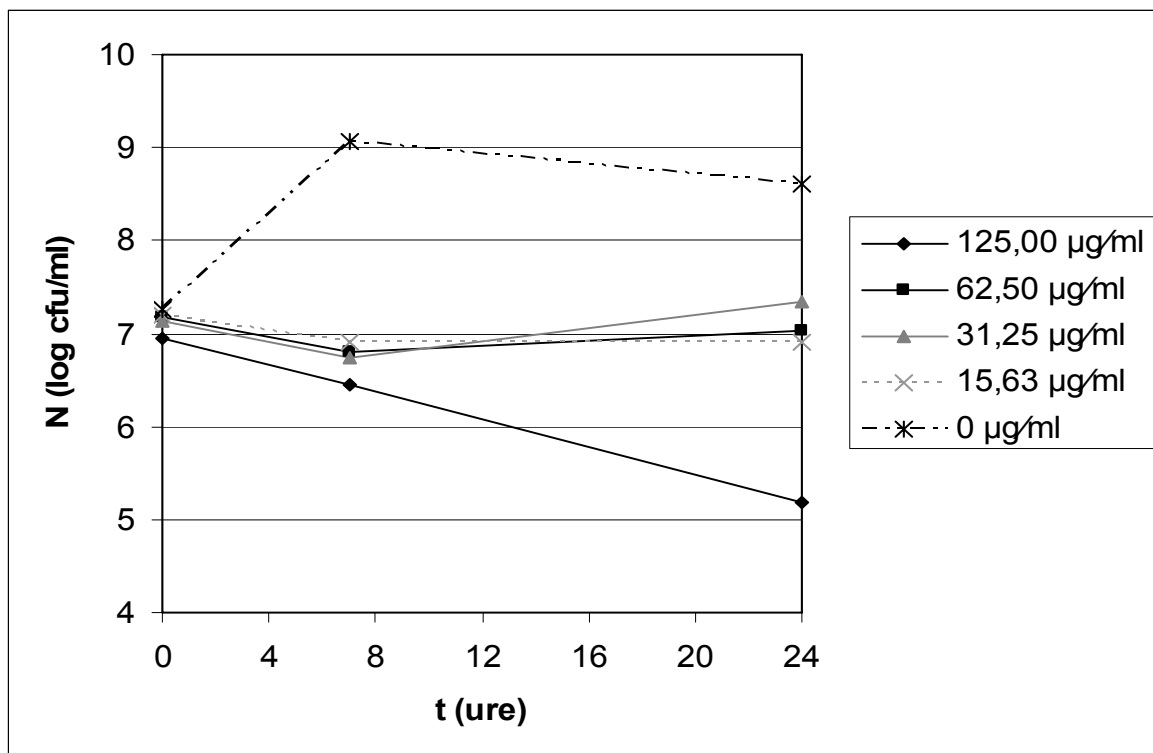
MBC smo izračunali iz enačbe premice:

$$-1 = -0,016 \times \text{MBC} + 2,4366$$

$$\text{MBC} = 215,00 \text{ µg ekstrakta/ml TSB}$$

Določili smo, da je vrednost MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 215,00 µg ekstrakta/ml BPW z razdetim mesom.

Za določitev vrednosti MIC, smo števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-6 logaritmirali in narisali graf, s pomočjo katerega smo določili vrednost MIC (Slika 4-12).



Slika 4-12: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Na podlagi slike 4-12 smo določili, da je minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt rožmarina Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW z razdetim mesom 62,50 μg ekstrakta/ml BPW z mesom.

4.2.3 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

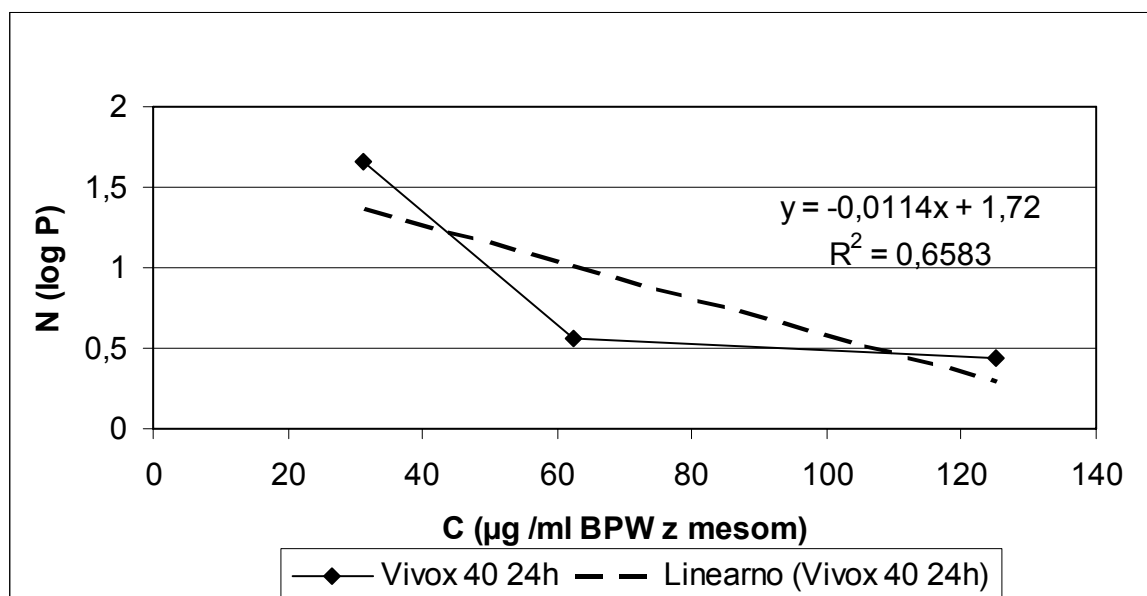
V tem poskusu smo za določanje protimikrobnega učinka uporabili tisto koncentracijo ekstrakta Vivox 40, pri katerih smo določili MIC ($62,50 \mu\text{g}$ ekstrakta/ml BPW z mesom) pri začetnem številu 10^7 cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z mesom. Poleg te koncentracije ekstrakta smo vzeli tudi eno nižjo in višjo koncentracijo ekstrakta. Poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelek (Preglednica 4-7).

Preglednica 4-7: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 40 pri 37°C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ ($\mu\text{g/ml}$ EtOH)	C ₂ ($\mu\text{g/ml}$ BPW z mesom)	0 ur	7 ur	24 ur
2500	125,00	$6,28 \times 10^3 \pm 8,13 \times 10^2$	$9,99 \times 10^2 \pm 8,70 \times 10^2$	$1,73 \times 10^2 \pm 4,24$
1250	62,50	$1,23 \times 10^4 \pm 1,75 \times 10^2$	$1,72 \times 10^3 \pm 3,18 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2 \pm 1,41 \times 10^2$
625	31,25	$9,46 \times 10^3 \pm 5,09 \times 10^1$	$5,00 \times 10^3 \pm 1,73 \times 10^3$	$4,30 \times 10^3 \pm 2,83 \times 10^1$
0,00	0,00	$1,10 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^1$	$7,63 \times 10^6 \pm 1,94 \times 10^6$	$4,10 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v BPW z 10 % mesom

Da smo lahko določili MBC smo podatke iz preglednice 4-7 preračunali v odstotkih preživelih bakterij (Slika 4-13).



Slika 4-13: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

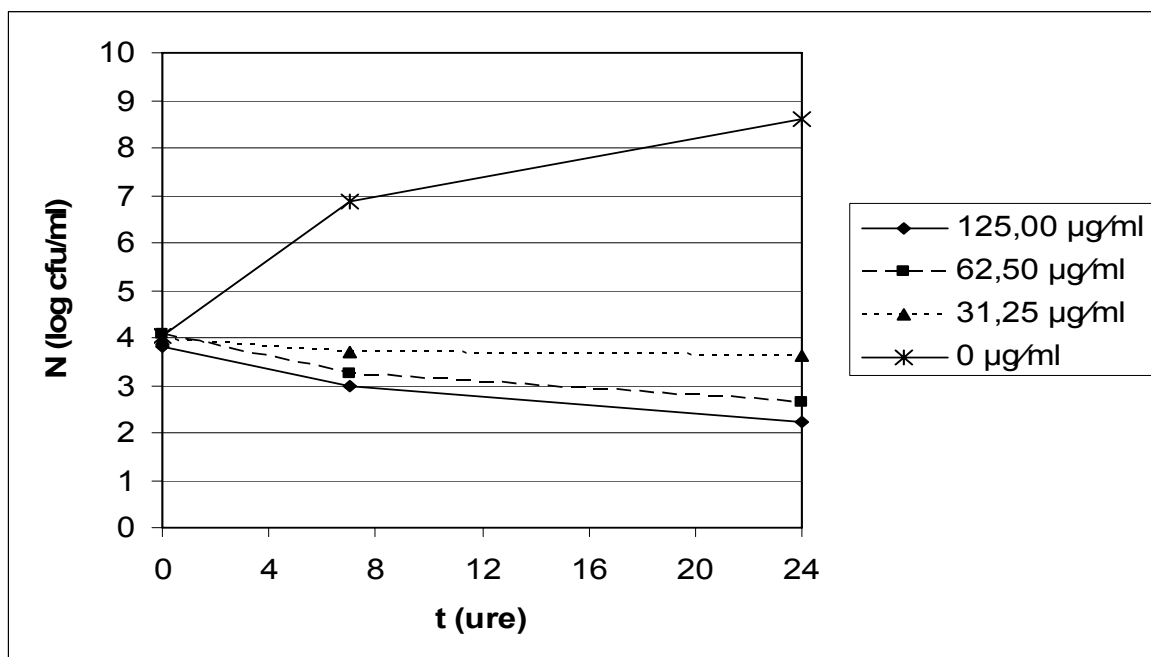
MBC smo izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0114 \times \text{MBC} + 1,72$$

$$\text{MBC} = 239,00 \mu\text{g ekstrakta/ml BPW z mesom}$$

MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji je 239,00 µg ekstrakta/ml BPW z razdetim mesom.

Za določitev vrednosti MIC smo števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-7 logaritmirali in narisali rasne krivulje.



Slika 4-14: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Določili smo, da je MIC za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW z razdetim mesom in z ekstraktom rožmarina Vivox 40 pri 31,25 μg ekstrakta/ml BPW z mesom.

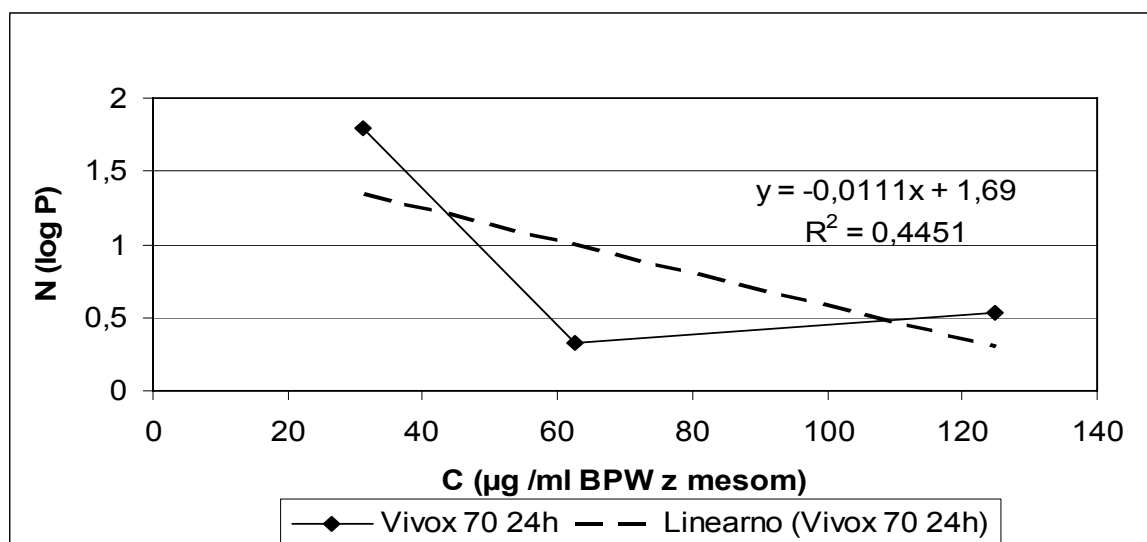
4.2.4 Protimikroben učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

Za ugotavljanje protimikrobnega učinka ekstrakta Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^3 cfu/ml BPW z mesom smo uporabili tiste koncentracije ekstrakta Vivox 70, pri kateri smo določili MIC ($62,50 \mu\text{g}$ ekstrakta/ml BPW z mesom) in eno višjo ter nižjo koncentracijo ekstrakta, kot pri določanju protimikrobnega učinka Vivox 70 na bakterij *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml. Pri tem smo vse poskuse izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelek (Preglednica 4-8).

Preglednica 4-8: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa in ekstraktom Vivox 70 pri 37°C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ ($\mu\text{g/ml}$ etOH)	C ₂ ($\mu\text{g/ml}$ TSB)	0 ur	7 ur	24 ur
2500	125,00	$7,37 \times 10^3 \pm 1,79 \times 10^3$	$4,01 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2 \pm 0,00$
1250	62,50	$1,18 \times 10^4 \pm 4,38 \times 10^2$	$1,75 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2 \pm 7,07 \times 10^1$
625	31,25	$1,11 \times 10^4 \pm 2,02 \times 10^2$	$5,00 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$6,85 \times 10^3 \pm 8,49 \times 10^2$
0,00	0,00	$1,26 \times 10^4 \pm 1,20 \times 10^3$	$2,59 \times 10^7 \pm 3,56 \times 10^4$	$7,28 \times 10^8 \pm 5,30 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v BPW z 10 % mesa



Slika 4-15: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37°C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

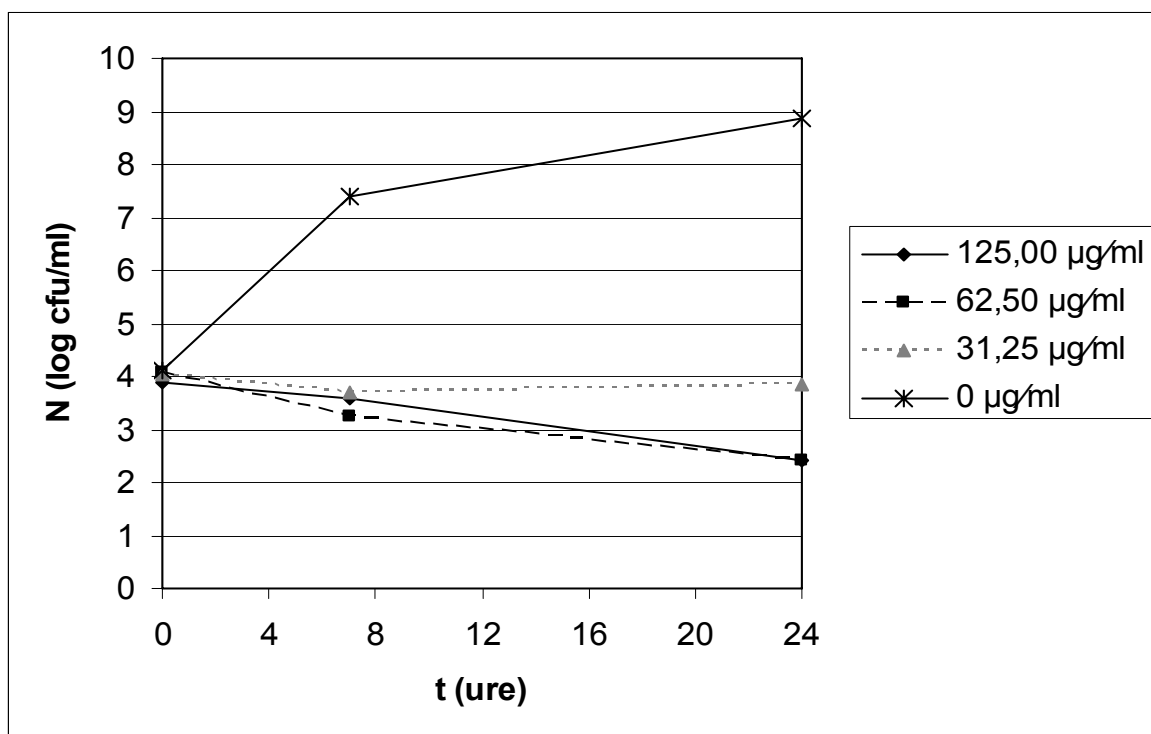
MBC smo izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0111 \times \text{MBC} + 1,69$$

$$\text{MBC} = 242,00 \mu\text{g ekstrakta/ml BPW z mesom}$$

Določili smo, da je MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji pri 242,00 μg ekstrakta/ml BPW z mesom.

Da smo lahko določili MIC, smo števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-8 logaritmirali in narisali graf (Slika 4-16).



Slika 4-16: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % mesa za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Minimalna inhibitorna koncentracija iz slike 4-16 za ekstrakt rožmarina Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW z razdetim mesom je 31,25 μg ekstrakta/ml BPW z mesom.

4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU BPW S PAŠTETO PRI 37 °C

Protimikrobni učinek ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW s pašteto pri 37 °C smo ugotavljali pri začetnem številu bakterij 10^7 cfu/ml in 10^3 cfu/ml z metodo razredčevanja. Pri tem smo upoštevali rezultate, ki smo jih dobili ob določanju protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 v gojišču BPW z mesom. Predpostavili smo tudi, da bodo potrebne nižje koncentracije ekstraktov za inhibitorno delovanje, zaradi že prisotnih protimikrobnih snovi v jetrni pašteti.

4.3.1 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

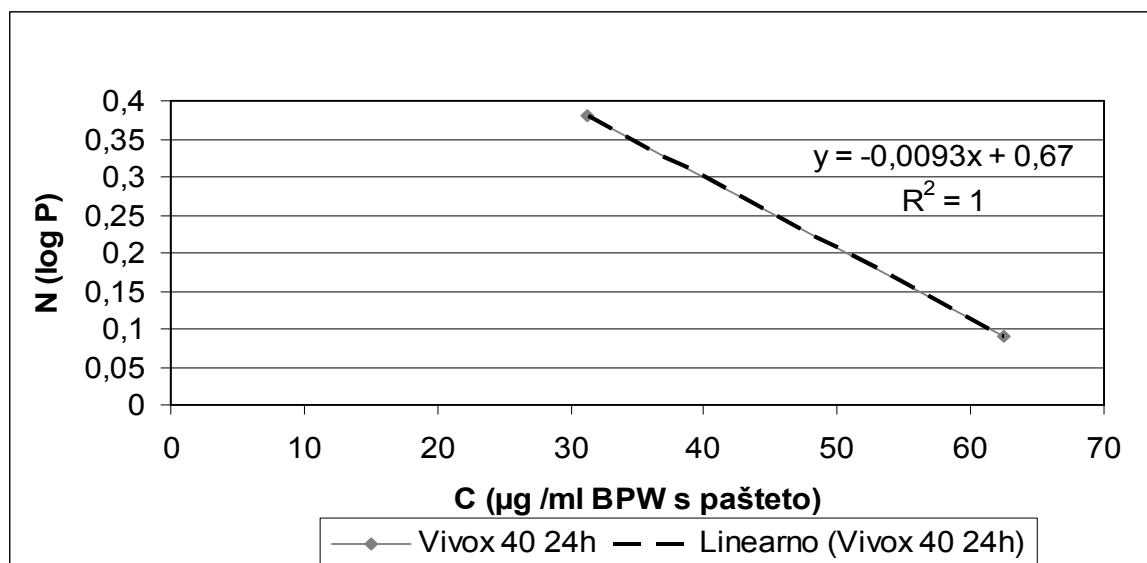
Glede na MIC (62,50 µg ekstrakta/ml BPW z mesom), ki smo ga določili pri delovanju ekstrakta Vivox 40 na bakterije *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^7 cfu/ml v gojišču BPW z mesom smo uporabili isto in eno nižjo koncentracijo ekstrakta Vivox 40 za določanje protimikrobnega učinka na *L. monocytogenes* v gojišču BPW z pašteto z začetnim številom 10^7 cfu/ml bakterij. Pri tem smo vse izvedene poskuse izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelek (Preglednica 4-9).

Preglednica 4-9: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml BPW z mesom)	0 ur	7 ur	24 ur
1250	62,50	$2,25 \times 10^7 \pm 8,33 \times 10^6$	$6,90 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^6$	$2,75 \times 10^5 \pm 1,03 \times 10^5$
625	31,25	$8,73 \times 10^6 \pm 6,72 \times 10^5$	$5,73 \times 10^6 \pm 1,73 \times 10^6$	$2,03 \times 10^5 \pm 7,42 \times 10^4$
0,00	0,00	$1,49 \times 10^7 \pm 1,31 \times 10^6$	$2,32 \times 10^8 \pm 3,33 \times 10^7$	$1,03 \times 10^9 \pm 5,30 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v BPW z 10 % paštete

Za določitev MBC smo iz preglednice 4-9 podatke preračunali v odstotkih preživelih bakterij in izračunane vrednosti logaritmirali.



Slika 4-17: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

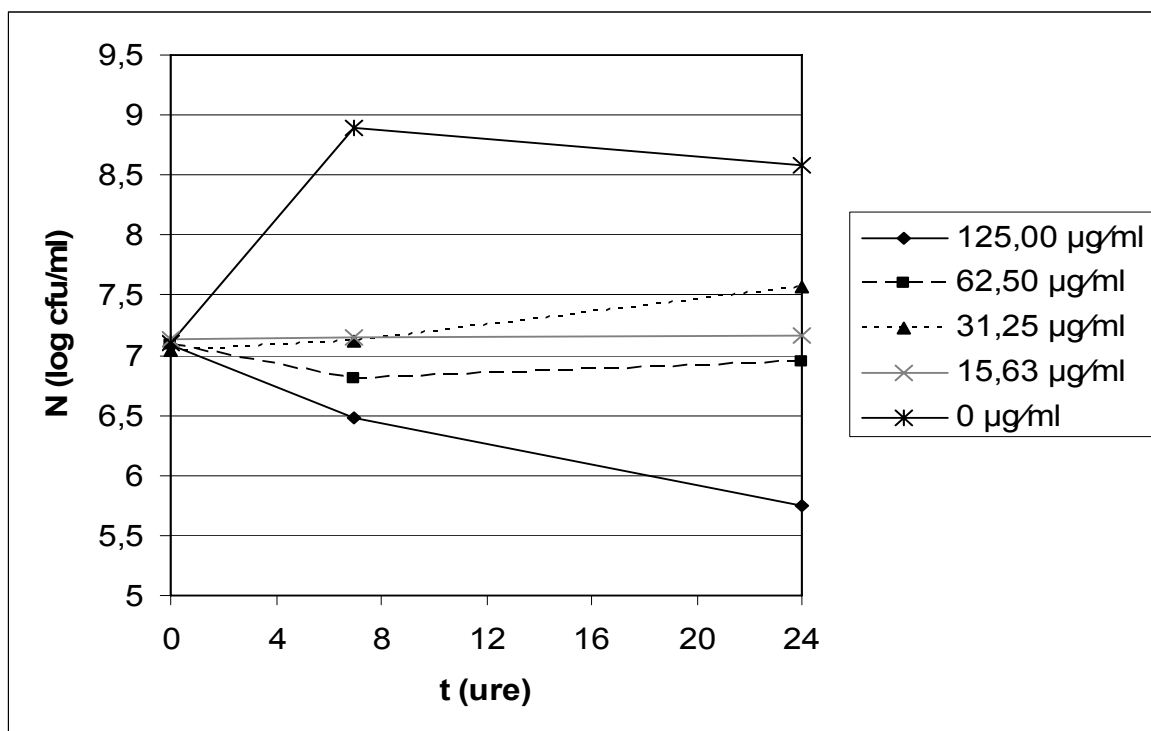
MBC smo določili po enačbi premice:

$$-1 = -0,0093 \times \text{MBC} + 0,67$$

$$\text{MBC} = 179,00 \mu\text{g ekstrakta/ml BPW s pašteto}$$

Določili smo, da je MBC ekstrakta Vivox 40 po enačbi premice za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 179,00 µg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

Za določitev MIC, pa smo logaritmirana števila iz preglednice 4-9 vnesli v graf (Slika 4-18), s pomočjo katerega smo določili vrednost MIC.



Slika 4-18: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Določili smo, da je minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt rožmarina Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW s pašteto pri 15,63 µg ekstrakta/ml BPW s pašteto (Slika 4-18).

4.3.2 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^7 cfu/ml

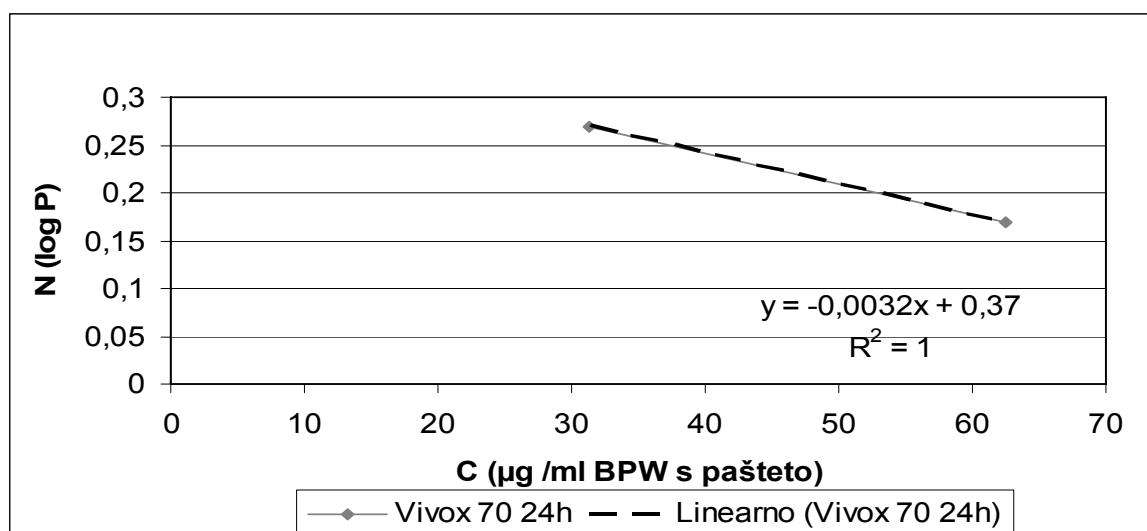
Koncentraciji ekstrakta Vivox 70, pri katerih smo določali protimikrobni učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v gojišču BPW s pašteto sta bili MIC (62,50 μg ekstrakta/ml BPW z mesom) in ena nižja koncentracija od MIC določena pri analizi protimikrobnega učinka Vivox 70 na bakterije *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v gojišču BPW z mesom. Vse poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje le teh (Preglednica 4-10).

Preglednica 4-10: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih (t) inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ ($\mu\text{g}/\text{ml}$ etOH)	C ₂ ($\mu\text{g}/\text{ml}$ BPW s pašteto)	0 ur	7 ur	24 ur
1250	62,50	$1,36 \times 10^7 \pm 3,77 \times 10^6$	$5,12 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5 \pm 1,41 \times 10^5$
625	31,25	$9,05 \times 10^6 \pm 1,70 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^4$	$1,70 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$
0,00	0,00	$1,03 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^6$	$2,22 \times 10^8 \pm 2,66 \times 10^8$	$1,75 \times 10^8 \pm 3,54 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v BPW s pašteto

Za določitev MBC smo podatke iz preglednice 4-10 preračunali v odstotkih preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti logaritmirali .



Slika 4-19: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW s 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

S slike 4-19 nismo določili v katerem območju se nahaja MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču BPW s pašteto.

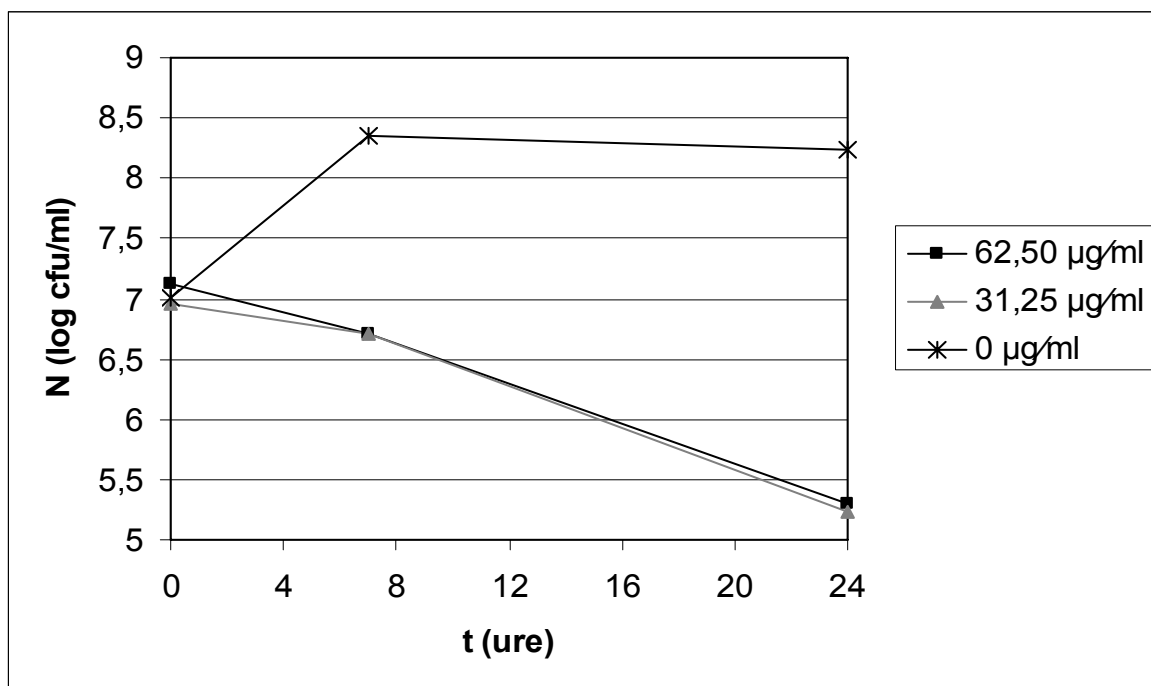
Za določitev smo MBC izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0032 \times \text{MBC} + 0,37$$

$$\text{MBC} = 428,00 \mu\text{g ekstrakta/ml BPW s pašteto}$$

Določili smo, da je MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji pri 428,00 μg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

Pri določitvi MIC smo števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-10 logaritmirali in narisali graf in določili vrednost MIC.



Slika 4-20: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) pri 37 °C

S slike 4-20 smo določili, da je MIC za ekstrakt rožmarina Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW z jetrno pašteto 31,25 μg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

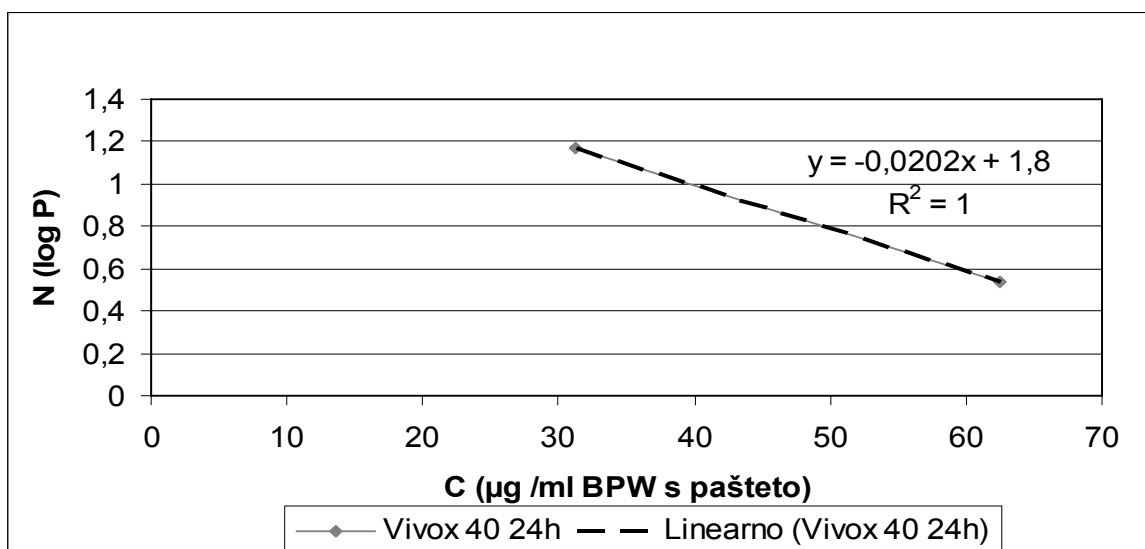
4.3.3 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

Zaradi MIC (31,25 μg ekstrakta/ml BPW s pašteto), ki smo ga določili pri določanju protimikrobnega učinka ekstrakta Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v gojišču BPW z jetrno pašteto smo uporabili za ta eksperiment isto koncentracijo kot je MIC in eno nižjo koncentracijo ekstrakta rožmarina Vivox 40. Vse poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-11.

Preglednica 4-11: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW s 10 % paštete in ekstraktom Vivox 40 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ ($\mu\text{g/ml}$ etOH)	C ₂ ($\mu\text{g/ml}$ BPW s pašteto)	0 ur	7 ur	24 ur
625	31,25	$5,75 \times 10^3 \pm 4,95 \times 10^2$	$3,25 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^1$	$2,00 \times 10^2 \pm 1,41 \times 10^2$
312,5	15,63	$2,00 \times 10^4 \pm 5,80 \times 10^3$	$6,83 \times 10^3 \pm 1,24 \times 10^3$	$2,97 \times 10^3 \pm 1,03 \times 10^3$
0,00	0,00	$1,10 \times 10^4 \pm 3,75 \times 10^3$	$7,63 \times 10^6 \pm 5,66 \times 10^5$	$4,1 \times 10^8 \pm 1,04 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 40 v BPW s 10 % paštete



Slika 4-21: Določitev MBC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

S slike 4-21 nismo določili, v katerem območju je MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču BPW s pašteto.

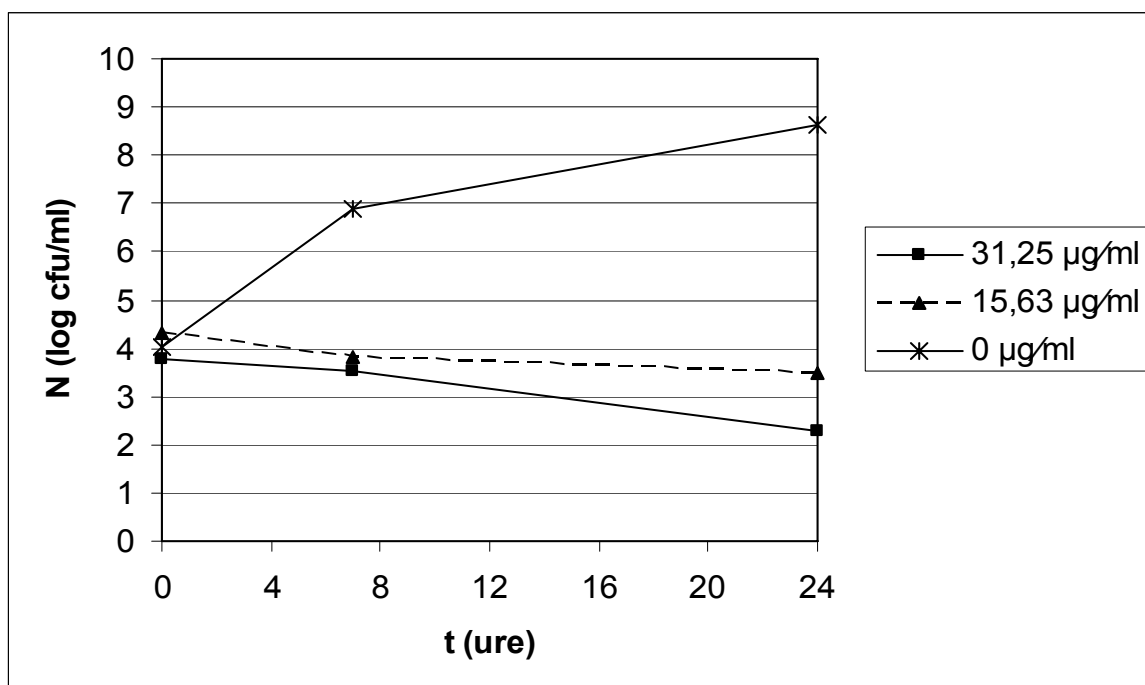
Zato, smo MBC izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0202 \times \text{MBC} + 1,8$$

$$\text{MBC} = 138,00 \mu\text{g ekstrakta/ml BPW s pašteto}$$

Po izračunu smo dobili, da je MBC ekstrakta Vivox 40 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 138,00 μg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

Za določitev MIC, pa smo števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* iz preglednice 4-11 logaritmirali in narisali graf (slika 4-22).



Slika 4-22: Določitev MIC ekstrakta Vivox 40 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Na podlagi slike 4-22 smo določili, da je minimalna inhibitorna koncentracija za ekstrakt rožmarina Vivox 40 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW s pašteto 15,63 μg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

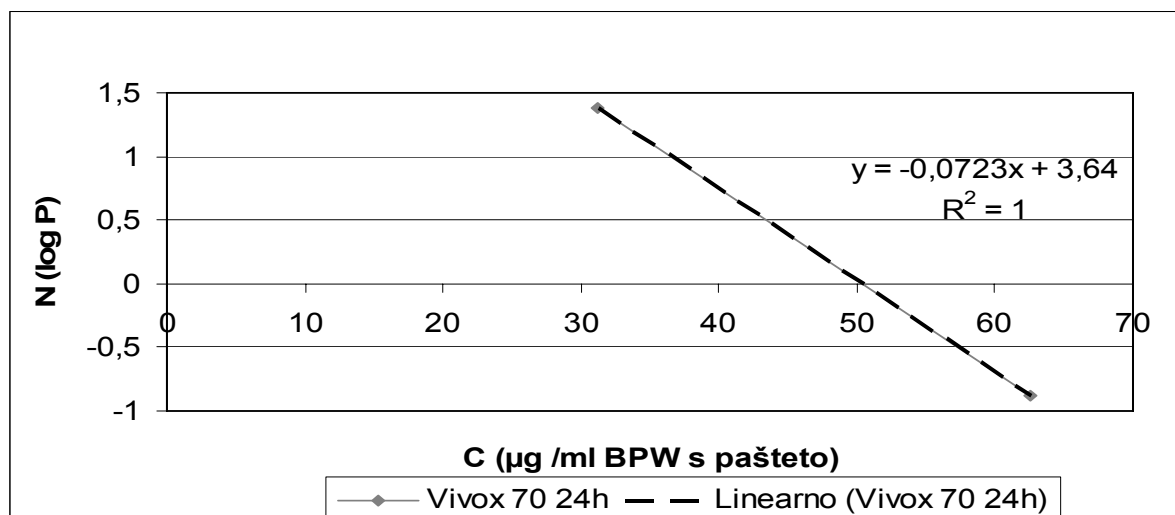
4.3.4 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 pri začetnem številu 10^3 cfu/ml

Za določanje protimikrobnega učinka ekstrakta Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* smo uporabljali MIC ekstrakta Vivox 70, ki smo ga določili pri protimikrobnem delovanju ekstrakta Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri začetnem številu 10^7 cfu/ml v gojišču BPW s pašteto. Poleg te koncentracije smo vzeli tudi eno nižjo koncentracijo ekstrakta Vivox 70, ker smo sklepali, da bo delovala bolj inhibitorno na rast bakterij, zaradi prisotnosti nitritov in soli, ter začimb v pašeti. Pri tem smo vse poskuse izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa navedli kot povprečje paralelek v preglednici 4-12.

Preglednica 4-12: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % paštete in ekstraktom Vivox 70 pri 37 °C

Koncentracija ekstrakta		Število bakterij N (cfu/ml) po različnih časih (t) inkubacije pri različnih koncentracijah ekstraktov		
C ₁ (µg/ml etOH)	C ₂ (µg/ml BPW s pašteto)	0 ur	7 ur	24 ur
625	31,25	$7,63 \times 10^4 \pm 1,31 \times 10^3$	$3,70 \times 10^3 \pm 3,54 \times 10^2$	$<1,00 \times 10^2$
312,5	15,63	$1,23 \times 10^4 \pm 1,31 \times 10^3$	$7,05 \times 10^3 \pm 6,36 \times 10^2$	$2,94 \times 10^3 \pm 4,50 \times 10^2$
0,00	0,00	$1,26 \times 10^4 \pm 2,75 \times 10^3$	$2,59 \times 10^7 \pm 5,30 \times 10^5$	$7,28 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^7$

Legenda: C₁: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v absolutnem etanolu, C₂: koncentracija ekstrakta Vivox 70 v BPW z 10 % paštete



Slika 4-23: Določitev MBC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

Legenda: P: odstotek preživelih bakterij

S slike 4-23 smo določili, da se MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji nahaja v območju med 60 in 70 µg/ml BPW s pašteto.

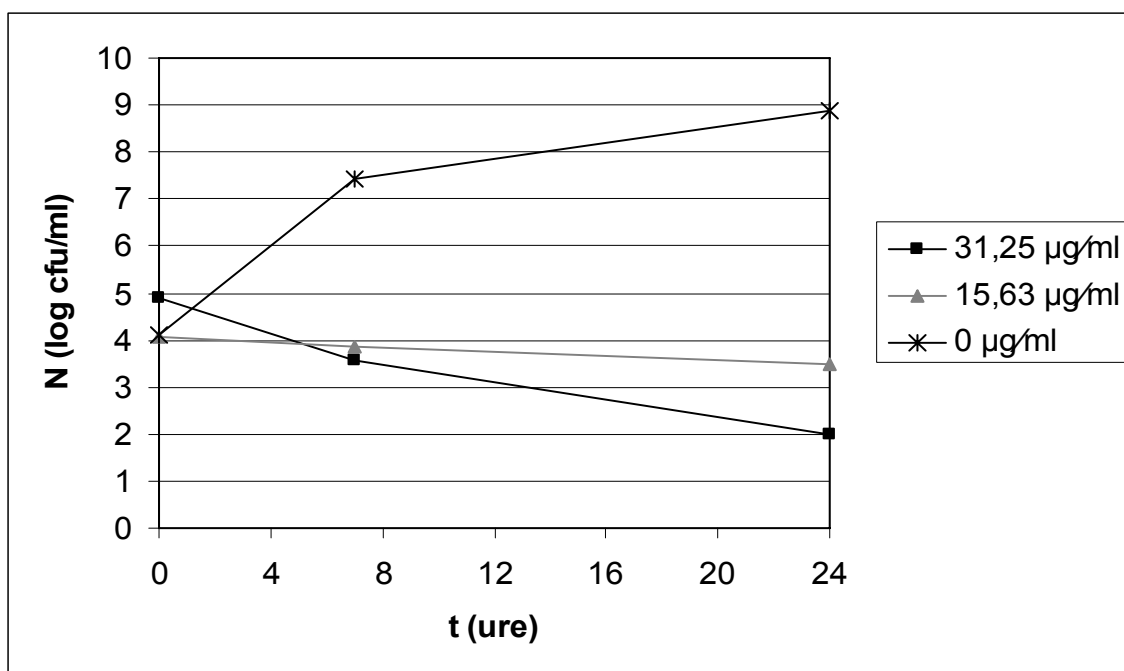
MBC smo izračunali po enačbi premice:

$$-1 = -0,0723 \times \text{MBC} + 3,64$$

$$\text{MBC} = 64,00 \text{ µg ekstrakta/ml BPW s pašteto}$$

Po enačbi premice smo izračunali, da je MBC ekstrakta Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji 64,00 µg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

Za določitev MIC smo iz preglednice 4-12 števila zraslih bakterij vrste *L. monocytogenes* logaritmirali in narisali graf (slika 4-24).



Slika 4-24: Določitev MIC ekstrakta Vivox 70 v gojišču BPW z 10 % paštete za bakterije vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) pri 37 °C

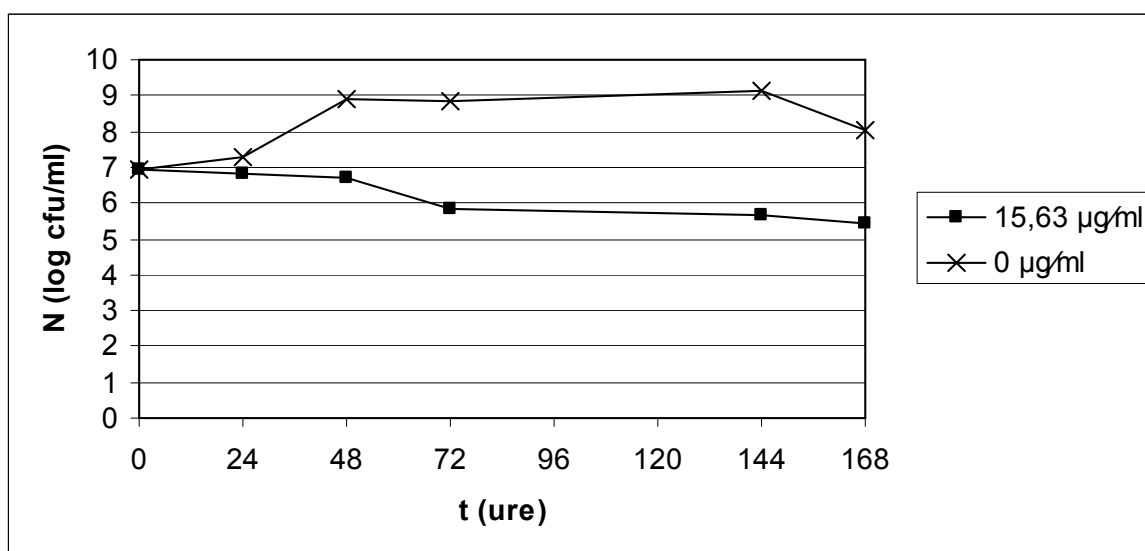
S slike 4-24 smo določili, da je MIC za ekstrakt rožmarina Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji v tekočem gojišču BPW s pašteto 15,63 µg ekstrakta/ml BPW s pašteto.

4.4 RAST BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU TSB Z MIC EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI 8 °C

4.4.1 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 40 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* smo spremljali v gojišču TSB z MIC ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C. Tako smo želeli preveriti, ali MIC, ki smo jo dobili pri določanju MIC v gojišču TSB pri 37 °C zavira rast bakterij tudi pri nižji temperaturi (8 °C). Predvidevali smo, da bo imel ekstrakt Vivox 40 enako protimikrobno učinkovitost na bakterije vrste *L. monocytogenes* tudi pri nižji temperaturi. Število bakterij po različnih časih inkubacije smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA.

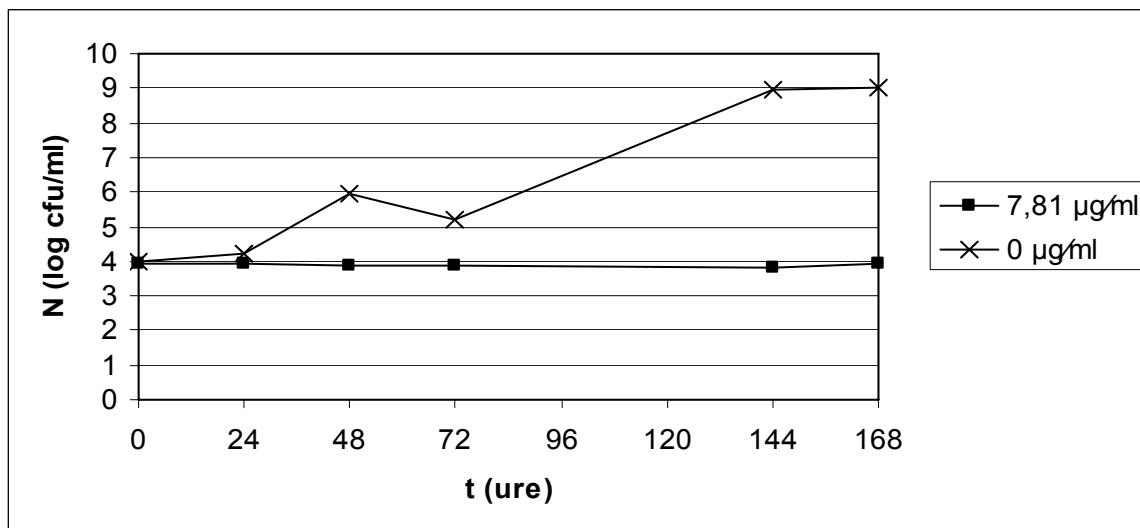
Poskuse smo opravili najprej z višjim začetnim številom bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) in rast smo spremljali 7 dni (Priloga A-1 in Slika 4-25).



Slika 4-25: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB s 15,63 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

S slike 4-25 smo ugotovili, da ekstrakt Vivox 40 pri 8 °C zavira rast bakterij vrste *L. monocytogenes* pri koncentraciji ekstrakta 15,63 µg ekstrakta/ml TSB in sicer vseh 168 h inkubacije.

Drug del poskusov smo opravili z nižjim začetnim številom bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) in rast smo spremljali 7 dni (Priloga A-2 in Slika 4-26).

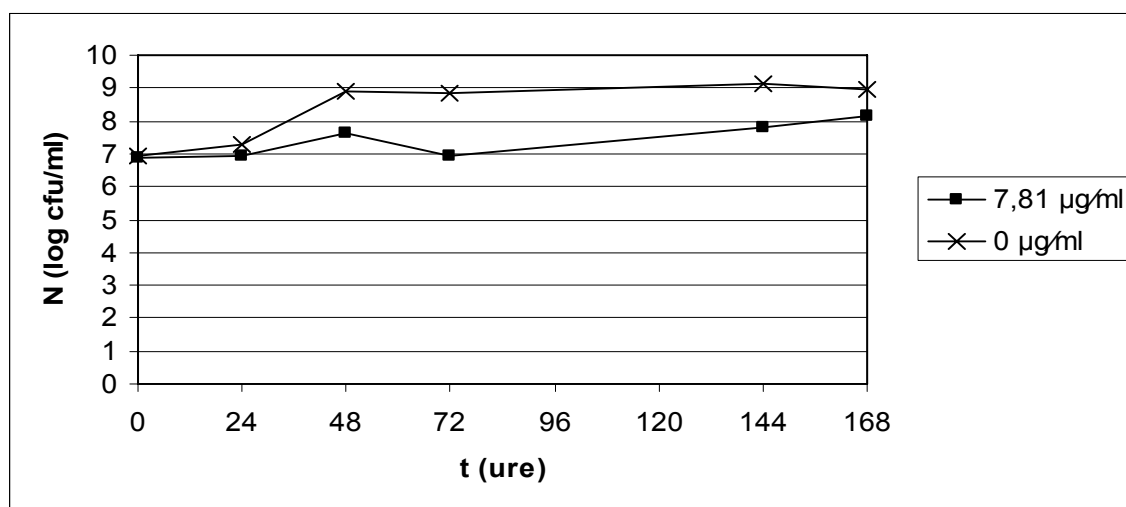


Slika 4-26: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB s 7,8125 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

S slike 4-26 smo ugotovili, da koncentracija ekstrakta Vivox 40 pri 7,81 µg ekstrakta/ml TSB zavira rast bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C podobno kot pri temperaturi 37 °C. Zato bi lahko rekli tudi, da je ta koncentracija Vivox 40 tudi MIC za bakterije z začetnim številom 10^7 cfu/ml pri 8 °C.

4.4.2 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 70 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

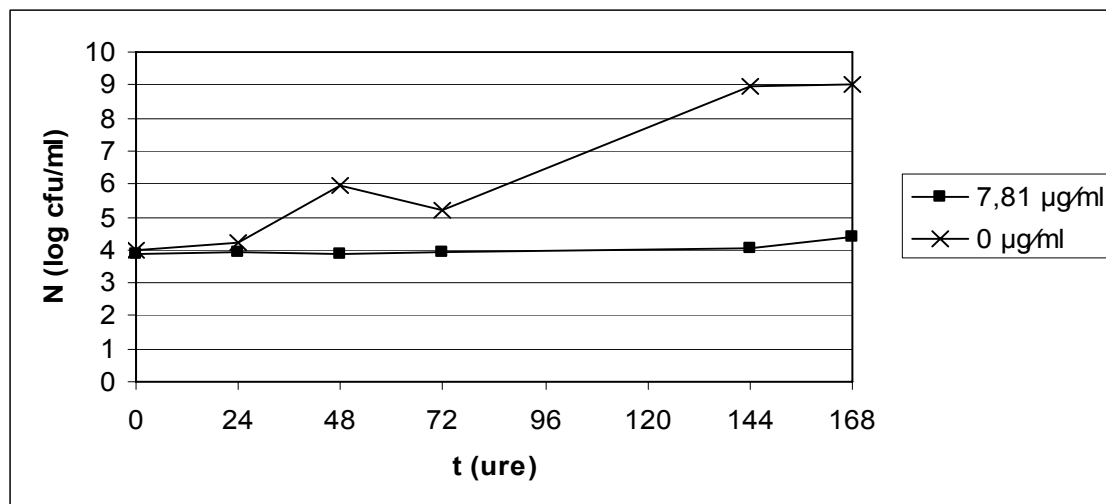
Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^7 cfu/ml v gojišču TSB pri 8 °C, smo določali s tisto koncentracijo, ki je bila določena kot MIC (7,81 µg ekstrakta/ml TSB) za Vivox 70 v gojišču TSB pri 37 °C. Z metodo štetja kolonij na gojišču TSA smo določili število preživelih bakterij (Priloga A-3, Slika 4-27).



Slika 4-27: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

S slike 4-27 smo določili, da koncentracija ekstrakta Vivox 70 pri 7,81 µg ekstrakta/ml TSB zavira rast bakterij vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^7 cfu/ml pri 8 °C.

Drug del poskusov smo opravili z nižjim začetnim številom bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) in rast smo spremljali 7 dni (Priloga A-4 in Slika 4-28).



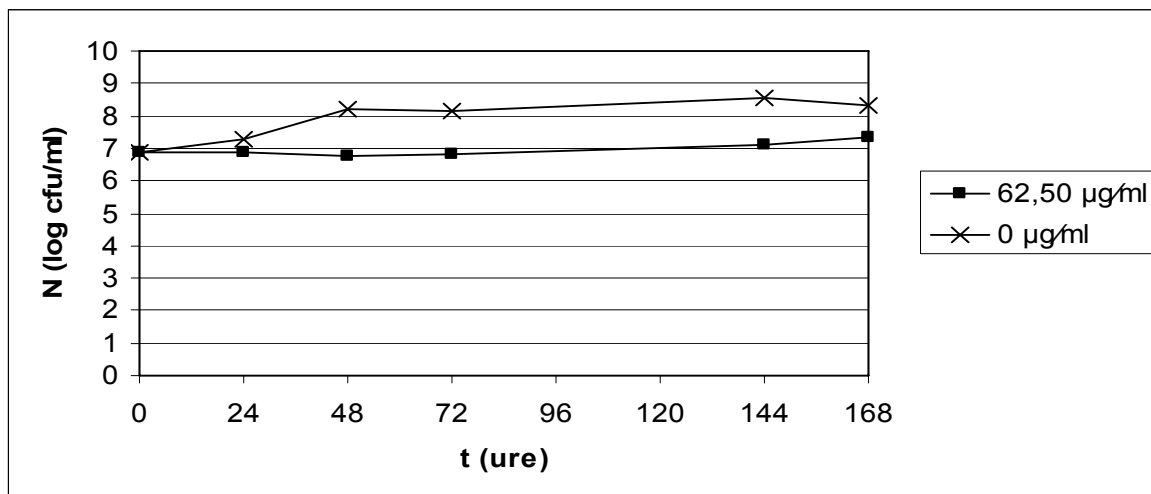
Slika 4-28: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,81 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

MIC ekstrakta Vivox 70 (7,81 µg ekstrakta/ml TSB) TSB zavira rast bakterij *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^3 cfu/ml pri 8 °C.

4.5 RAST BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU BPW Z MESOM Z MIC EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI 8 °C

4.5.1 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 40 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

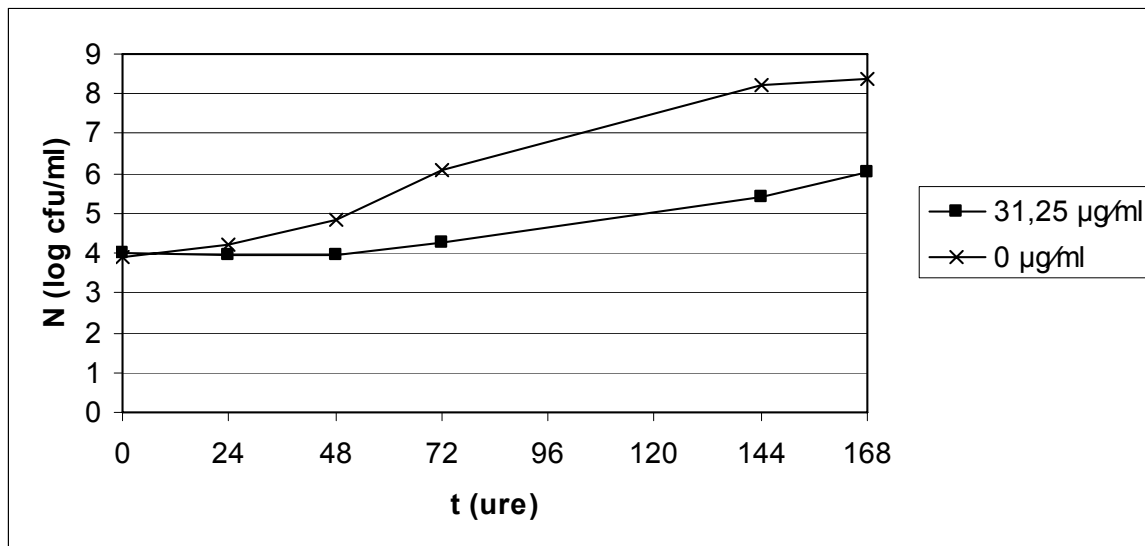
Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^7 cfu/ml v gojišču BPW z 10 % mesa pri 8 °C z ekstraktom Vivox 40 smo določali s koncentracijo (62,50 µg ekstrakta/ml BPW z mesom), ki je bila določena kot MIC za Vivox 40 v BPW z 10 % mesom pri 37 °C. Število bakterij, smo določali z metodo štetja kolonij na gojišču TSA (Priloga A-5, Slika 4-29).



Slika 4-29: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,50 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Slika 4-29 nam prikazuje zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* v gojišču BPW z mesom pri 62,50 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C. Ekstrakt Vivox 40 je protimikrobno deloval na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z mesom tudi pri 8 °C.

Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom 10^3 cfu/ml v gojišču BPW z 10 % mesa pri 8 °C smo določali s tisto koncentracijo, ki je bila določena kot MIC (31,25 µg ekstrakta/ml BPW z mesom) za Vivox 40 na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z 10 % mesa pri 37 °C. Rast bakterij smo opazovali s pomočjo metode štetja kolonij na trdem gojišču TSA (Priloga A-6, Slika 4-30).

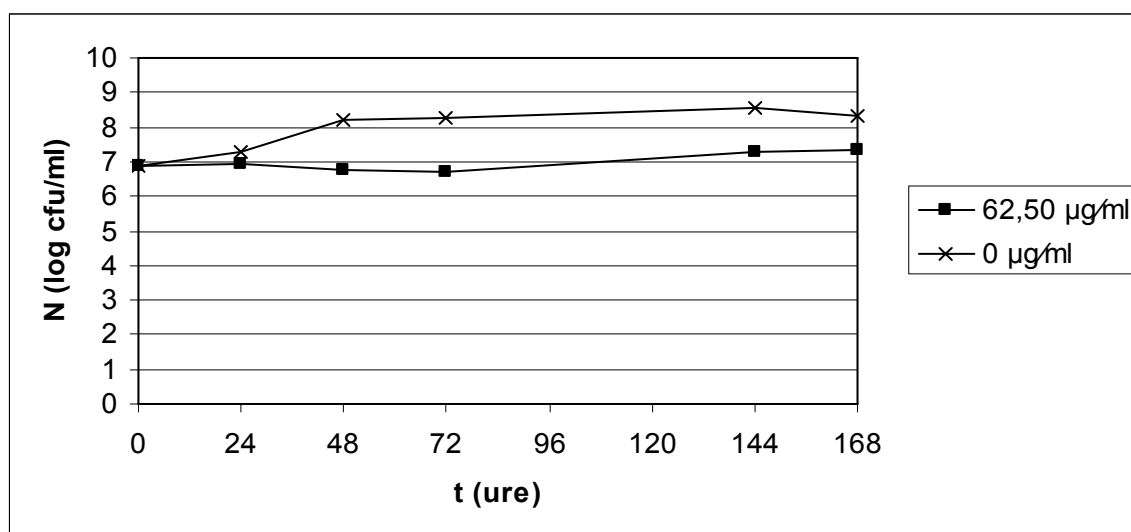


Slika 4-30: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 µg/ml ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Na sliki 4-30 vidimo, da ekstrakt Vivox 40 v gojišču BPW z mesom pri 8 °C zavira rast bakterij vrste *L. monocytogenes* 48 h, potem pa se število bakterij poveča preko začetnega števila. Glede na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v kontrolnem vzorcu, kjer gojišču BPW z mesom ni bil dodan ekstrakt Vivox 40 pa lahko vidimo, da je ekstrakt vseh 168 ur zaviral rast listerij.

4.5.2 Vpliv MIC ekstrakta Vivox 70 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

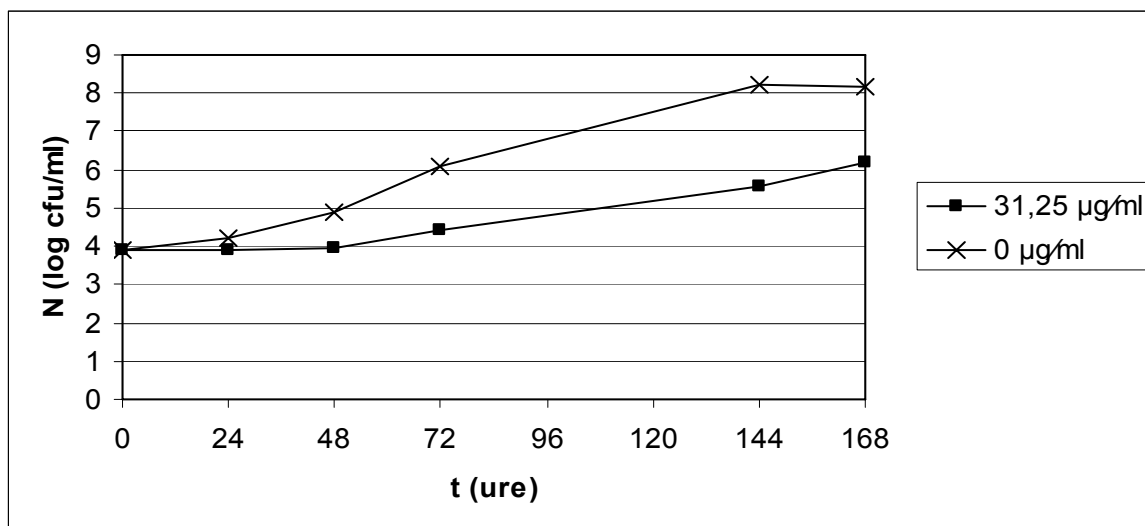
S koncentracijo (62,50 μg ekstrakta/ml BPW z mesom), ki je bila določena kot MIC za Vivox 70 pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z 10 % mesa pri 37 °C smo določali protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z 10 % mesa pri 8 °C. Število bakterij smo določali z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA (Priloga A-7, Slika 4-31).



Slika 4-31: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

S slike 4-31 smo določili, da ekstrakt Vivox 70 pri koncentraciji 62,50 μg ekstrakta/ml BPW z mesom zavira rast bakterij vrste *L. monocytogenes* z začetnim številom bakterij 10^7 cfu/ml tudi pri 8 °C.

Pri analizi protimikrobnega učinka rasti Vivox 70 na bakterije vrste *L. monocytogenes* z manjšim številom bakterij (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z 10 % mesa pri 8 °C smo uporabili tisto koncentracijo, ki je bila določena kot MIC (31,25 µg ekstrakta/ml BPW z mesom) za Vivox 70 za bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BPW z 10 % mesa pri 37 °C. Z metodo štetja kolonij na gojišču TSA smo določali število bakterij (Priloga A-8, Slika 4-32).



Slika 4-32: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

Na sliki 4-32 vidimo, da ekstrakt Vivox 70 ne zavira rasti bakterij v okviru uporabljene definicije MIC. Kljub temu pa vidimo, da ekstrakt Vivox 70 zavira rast listerij v gojišču, ki mu je bil dodan ekstrakt, saj je tudi po 168 urah koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* nižja za skoraj 2 log enoti v primerjavi z številom listerij v kontrolnem vzorcu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V eksperimentalnem delu naloge smo raziskovali protimikrobni učinek ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *L. monocytogenes* v mesnih izdelkih. Pri tem smo uporabljali komercialno pripravljene ekstrakte rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 ter primerjali njihovo učinkovitost. Zanimalo nas je tudi ali ti ekstrakti delujejo pri temperaturi hladilnika (8 °C), pri kateri shranjujemo mesne izdelke, saj bi bilo smotrno uporabiti te ekstrakte v mesnih izdelkih, če bi zavirali rast bakterij vrste *L. monocytogenes* pri tej temperaturi.

Za ugotavljanje protimikrobne učinkovitosti smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Za ovrednotenje učinkovitosti ekstraktov rožmarina smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo - MIC in minimalno baktericidno koncentracijo - MBC. Na podlagi rezultatov bomo opisali vplive temperatur, različnih vrst mesnih izdelkov in ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 na različno začetno število bakterij vrste *L. monocytogenes* (Preglednica 5-1).

Preglednica 5-1: Vrednosti MIC in MBC pri 37 °C in 8 °C za ekstrakte rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 v TSB, v mesu in pašteti z začetnim številom bakterij 10⁷ cfu/ml in 10³ cfu/ml

Temperatura inkubacije	37 °C				8 °C	
	MIC (µg/ml)		MBC (µg/ml)		MIC (µg/ml)	
Protimikroben učinek	10 ⁷ cfu/ml	10 ³ cfu/ml	10 ⁷ cfu/ml	10 ³ cfu/ml	10 ⁷ cfu/ml	10 ³ cfu/ml
Začetno število						
Vivox 40 v TSB	15,63	7,81	88,00	58,00	15,63	7,81
Vivox 70 v TSB	7,81	7,81	45,00	64,00	7,81	7,81
Vivox 40 v BPW z mesom	62,50	31,25	219,00	239,00	62,50	31,25
Vivox 70 v BPW z mesom	62,50	31,25	215,00	242,00	62,50	31,25
Vivox 40 v BPW s pašteto	15,63	15,63	179,00	138,00	/	/
Vivox 70 v BPW s pašteto	31,25	15,63	428,00	64,00	/	/

5.1.1 Vpliv temperature na delovanje ekstrakta

Pri naših eksperimentih smo določali protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 pri 37 °C in 8 °C. Ugotovili smo, da temperatura nima večjega vpliva na delovanje ekstraktov, saj so vrednosti MIC v večini primerov enake (Preglednica 5-1). Razlika je bila le v času inkubacije, saj smo bakterije vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C zaradi počasnejše rasti inkubirali dalj (do 7 dni), kot pri delovanju ekstraktov pri 37 °C

(1 dan). Po 7 dneh oba ekstrakta rožmarina zavirata rast bakterij vrste *L. monocytogenes* tudi pri 8 °C.

Pri nižji temperaturi moramo upoštevati čas faze lag in hitrost rasti (generacijski čas) za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Te bakterije imajo pri 5 °C čas faze lag od 1 do 3 dni, generacijski čas pa od 13 do 25 h (Smole Možina in Bem, 2003). V našem primeru je bil prilagoditveni čas pri 8 °C tudi od 1 do 3 dni, generacijski čas pa se je, zaradi prisotnosti ekstraktov rožmarina, zelo podaljšal.

Naše ugotovitve so podobne raziskavi Zhanga in sodelavcev (2009), ki so ugotovili, da ekstrakt rožmarina in sladkega korena pri 8 °C skupaj učinkovito zavirata rast bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežem svinjskem mesu. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so psihrotrofne bakterije in rastejo pri temperaturah hladilnika in so tudi pri nizkih temperaturah občutljive na ekstrakte rožmarina.

5.1.2 Vpliv vrste mesnega izdelka na delovanje ekstrakta in na rast bakterij *L. monocytogenes*

Mesna izdelka, ki smo ju uporabili pri naših eksperimentih, sta bila razdeto mešano meso in jetrna pašteta. Vrednosti MIC in MBC za ekstrakte rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 so bile v tekočem gojišču BPW z mesnimi izdelki višje od vrednosti, pri katerih smo uporabljali tekoče gojišče TSB (Preglednica 5-1). Zato sklepamo, da so v izdelkih prisotne druge snovi, ki ščitijo bakterijske celice oziroma zavirajo protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina ter tako omogočajo boljšo rast listerij.

Zhang in sodelavci (2009) so ugotovili, da so meso in mesni izdelki kompleksno rastno okolje in vsebujejo nekatere mesne sestavine, ki zagotavljajo mikrobnim celicam dobro zaščito pred protimikrobnimi sredstvi. Pri podrobnejših raziskavah so dokazali, da so bakterije vrste *L. monocytogenes* manj občutljive na ekstrakte v mesu, kot na ekstrakte v gojiščih ter domnevali, da je občutljivost bakterij odvisna od vsebnosti maščobe v mesu. Maščobe v živilih tvorijo zaščitno oblogo okrog bakterij in jih s tem zaščitijo pred protimikrobnimi sredstvi (Zhang in sod., 2009).

Poleg maščobe moramo upoštevati tudi intrinzične (notranje) dejavnike v mesu, ki vplivajo na rast mikroorganizmov. Med te dejavnike sodijo delež vode oz. točneje termodinamska aktivnost vode (vrednost a_w), vrednost pH, oksidoredukcijski potencial, hranilni sestav, prisotnost protimikrobnih snovi in mikro in makrostrukturne lastnosti živila (Smole Možina in Bem, 2003).

Termodinamska aktivnost vode pri mesu je od 1,00 do 0,95, pri jetrni pašteti pa od 0,95 do 0,90, kar pomeni, da se lahko v teh izdelkih razmnožujejo grampozitivne bakterije. Na nizke vrednosti a_w so relativno dobro prilagojene tudi bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki se lahko razmnožuje do vrednosti a_w 0,92 (Smole Možina in Bem, 2003). To je potrdil tudi naš eksperiment, saj smo uporabili oba, zgoraj navedena, mesna izdelka.

Vrednost pH v mesu in mesnih izdelkih se giblje med 5,1 in 6,8. Kar pomeni, da se lahko v teh izdelkih razmnožujejo bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki rastejo v območju pH 4,5-9. Znižanje vrednosti pH na od 5,8 do 5,6 in 5,4 podaljšuje fazo lag in zavira razmnoževanje bakterij *L. monocytogenes*, vendar je rast povsem zavirana šele pri pH okoli 4,3 (Lund in Eklund, 2000).

Redoks potencial za sveže mleto meso je -55 mV, za kuhane klobase pa od -20 do -100 mV. Bakterije vrste *L. monocytogenes* spadajo med fakultativno anaerobne bakterije, kar pomeni, da lahko rastejo v izdelkih, kot sta mleto meso in jetrna pašteta, in sicer od -400 do 600 mV (Smole Možina in Bem, 2003).

Meso je bogato z vsemi hranilnimi snovmi, ki so potrebne za rast, razmnoževanje in metabolizem listerij. Glavni vir energije v mesu je glukoza ter tudi druge nizkomolekularne spojine (Bem in Adamič, 1991).

Primerjava rezultatov vrednosti MIC in MBC za ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70 v jetrni pašteti in razdetem mesu, pokaže, da so vrednosti MIC in MBC pri jetrni pašteti nižje, kot pri razdetem mesu (Preglednica 5-1). To dokazuje, da so v pašteti že prisotne sestavine, ki delujejo protimikrobno in sinhrono s sestavinami ekstrakta rožmarina, kar posledično zniža vrednosti MIC in MBC. Vemo tudi, da so pašteti dodane soli in nitriti, ki preprečujejo rast bakterij. Ugotovitve kažejo, da nitrit skupaj z nitratom izpolnjuje bakteriostatično in baktericidno delovanje soli, kajti nitrit zavira rast bakterij vrste *Clostridium botulinum* in sintezo nevrotoksina botulina (Smole Možina in Bem, 2003). Sklepamo lahko, da je to vzrok za nižje vrednosti MIC in MBC pri pašteti v primerjavi z vrednostmi pri razdetem mesu (Preglednica 5-1). Tudi rezultati raziskave Rožman (2007), kjer so preverili protimikrobno delovanje NaNO₂ na bakterije vrste *L. monocytogenes*, kažejo na to, da že zelo nizka koncentracija NaNO₂ v gojišču TSB pred toplotno sterilizacijo (50 ppm) povzroči popolno uničenje bakterijskih celic (Rožman, 2007).

Nadaljne ugotovitve kažejo, da nitrit deluje protimikrobno na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* tudi v koncentracijah, ki se uporabljajo v mesnih izdelkih, vendar v posebnih razmerah. Protimikrobni učinek je namreč odvisen od koncentracije in načina toplotne obdelave dodanega nitrita, vrednosti pH gojišča ter faze rasti bakterij (Gerbec, 2009).

V enem primeru smo za ekstrakt Vivox 70 v jetrni pašteti določili višjo MBC (428,00 µg/ml) kot v razdetem mesu (215 µg/ml). Razlage v literaturi nismo našli, zato sklepamo, da je lahko prišlo do napake pri laboratorijskem delu (Preglednica 5-1).

5.1.3 Vpliv sestavin ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

Ekstrakt rožmarina vsebuje veliko število sestavin, vključujoč karnozolno kislino, karnozol in rožmarinsko kislino. Protimikrobno najbolj učinkoviti sestavini sta karnozol in karnozolna kislina (Frankel in sod., 1996). Zhang in sod. (2009) so z raziskavami potrdili, da je med fenolnimi sestavinami pri inhibiciji rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* najbolj učinkovita karnozolna kislina.

V našem raziskovalnem delu je ekstrakt rožmarina Vivox 40 vseboval 40,69 % karnozolne kisline, Vivox 70 pa 70,01 % karnozolne kisline. Zato smo pričakovali, da bo ekstrakt Vivox 70 deloval bolj inhibitorno na bakterije vrste *L. monocytogenes*, kar tudi je pri 10^7 cfu/ml. Ker pri primerjavi vrednosti MIC in MBC ni bilo večjih razlik, lahko sklepamo, da na bakterije inhibitorno vplivajo tudi druge sestavine.

Da vsebujeta ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70 še druge sestavine, je potrdila raziskava Jelšekove (2003). Ugotovila je, da ekstrakt rožmarina Vivox 40 vsebuje 40,69 % karnozolne kisline, 9,67 % karnozola in 1,89 % metilkarnozola. Medtem, ko ekstrakt Vivox 70 vsebuje 70,01 % karnozolne kisline, 3,72 % karnozola in 1,89 % metilkarnozola (Jelšek, 2003).

Iz podatkov Jelšekove (2003) lahko sklepamo, da je ekstrakt Vivox 40, zaradi večje vsebnosti karnozola v večini primerov deloval boljše ali enako od ekstrakta Vivox 70. Znano je namreč, da karnozol deluje tudi protimikrobno in preprečuje rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Karnozol obstaja tudi kot lakton karnozolne kisline, v tej obliki je njegov protimikrobni učinek večji (Del Campo in sod., 2000).

Druga možna razlaga zakaj ni ekstrakt rožmarina Vivox 70, kljub večji vsebnosti karnozolne kisline, deloval bolje kot ekstrakt Vivox 40 je, da je ekstrakt Vivox 40 v absolutnem etanolu, v katerem smo raztopili oba ekstrakta, bolj topen. Posledično je tudi bolj učinkovit pri protimikrobnem delovanju na bakterije vrste *L. monocytogenes*. Razlage ne moremo potrditi, ker ni bila omenjena v nam dostopni literaturi.

5.1.4 Uporaba metode razredčevanja v tekočem gojišču za živila

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB se je tudi pri našem delu izkazala za primerno, kadar želimo protimikroben učinek proučiti na živilu. Podobno kot so Owen in Palombo (2007) dokazali protimikrobno učinkovitost rastlinskih ekstraktov na bakterijah vrste *L. monocytogenes* v mleku ter homogenizatih pripravljenih iz salame, paštete in sira, smo tudi pri našem delu lahko ovrednotili protimikrobno učinkovitost rožmarinovih ekstraktov na razdetem mesu in jetrni pašteti.

5.2 SKLEPI

- Ekstrakta rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 imata protimikrobni učinek na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v mesnih izdelkih kot sta razdeto meso in pašteta.
- Vrednosti MIC in MBC določene v mesnih izdelkih za ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70 so pričakovano višje od vrednosti MIC in MBC določenih v gojišču.
- Vrsta mesnega izdelka vpliva na vrednosti MIC in MBC določene za ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70.
- Pri nižjem začetnem številu bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) so vrednosti MIC nižje ali enake kot pri višjem začetnem številu bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml)
- Znižanje temperature iz 37 °C in 8 °C ni vplivalo na delovanje rožmarinovitih ekstraktov in s tem tudi ne na vrednosti MIC.

PREDLOGI ZA NADALJNO DELO

Glede na naše rezultate predlagamo, da bi preverili protimikrobni učinek ekstraktov na bakterije vrste *L. monocytogenes* še v drugih mesnih izdelkih. Zaradi prisotnosti različnih protimikrobnih snovi v mesnih izdelkih, kot so nitriti, soli in začimbe, bi bilo dobro preveriti delovanje ekstraktov skupaj z ostalimi začimbami in soljo in vključiti še različne načine pakiranja. Pri temperaturah hladilnika bi morali preveriti delovanje ekstraktov rožmarina v mesnih izdelkih tudi po več kot 7 dneh oz. v času obstojnosti posameznega mesnega izdelka.

6 POVZETEK

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so patogene bakterije, ki spadajo med povzročitelje alimentarnih toksikoinfekcij. Po obliki so kratke nesporogene grampozitivne palčke. V rodu *Listeria* so za človeka patogene bakterije vrste *L. monocytogenes*, za živali pa so patogene tudi bakterije vrste *L. ivanovii*. Glavni vir listerij je hrana, kontaminirana z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Posamezni primeri in množični izbruhi listerioze kažejo, da je incidenca listerioze zelo nizka, kljub dejstvu, da se bakterije *L. monocytogenes* pojavljajo v mnogih živilih. Vzrok za to je tudi zmožnost preživetja in rasti listerij v ekstremnih razmerah, kot so nizke temperature, višja koncentracija soli in nizek pH. Tako preživijo različne tehnološke postopke in ostanejo v živilu vse do zaužitja le-tega. Zaskrbljujoče dejstvo pri listeriozi je zelo visoka smrtnost, ki je značilna predvsem za rizične skupine ljudi.

Oksidacija lipidov in bakterijska kontaminacija sta glavna dejavnika, ki vplivata na kvar živila. Za preprečitev tega se lahko uporabljajo sintetični in naravni antioksidanti in konzervansi. Mnogo raziskav v zadnjih letih poteka v smeri uporabe naravnih antioksidantov in konzervansov v živilih. Najbolj znane naravne snovi, ki imajo protimikroben učinek so ekstrakti in eterična olja pridobljena iz rastlin oziroma začimb, med katere spada tudi rožmarin. Začimbe se lahko uporabljajo v obliki eteričnih olj ali izoliranih sestavin, s pomočjo katerih potekajo raziskave protimikrobnega delovanja kot alternativa uporabi sintetičnih aditivov. Poleg tega začimbe s svojimi aromatičnimi snovmi vplivajo tudi na senzorične lastnosti živil.

Za konzerviranje mesnih izdelkov se uporabljajo mešanice za razsoljevanje, ki vsebujejo nitrite in soli. Nitriti so umetni konzervansi, ki se v obliki natrijevih soli uporabljajo v proizvodnji mesnih izdelkov za oblikovanje ustreznih senzoričnih lastnosti, kot so barva, okus in aroma, ter tudi zaradi njihovih antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti, s katerimi se podaljšuje obstojnost živil. Pri nitritih ne moremo mimo dejstva, da so škodljivi za zdravje ljudi, ker se v telesu lahko vežejo z amini in tvorijo nitrozamine, ki so kancerogeni. Da bi zmanjšali količino dodanih aditivov smo v naši diplomski nalogi raziskali protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Protimikrobno aktivnost ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70 smo določali s pomočjo metode razredčevanja v tekočem gojišču. Za ovrednotenje protimikrobnega delovanja ekstraktov smo izračunali vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije - MIC in minimalne baktericidne koncentracije - MBC. Vivox 40 vsebuje 40,69 % karnozolne kisline, medtem, ko jo Vivox 70 vsebuje 70,01 %. Razlike v vrednostih MIC in MBC za testirana ekstrakta rožmarina niso bile značilne glede na vrsto uporabljenega ekstrakta. Pri mesnih izdelkih, kot sta razdeto meso in jetrna pašteta, je bilo podobno, saj so bile vrednosti MIC tako za Vivox 40 kot za Vivox 70 enake ali podobne. Vrednosti MIC in MBC so bile, kot smo pričakovali, višje v mesnih izdelkih kot v tekočem gojišču TSB, saj sestavine živila nudijo ugodne razmere za rast listerij in hkrati zmanjšajo delovanje protimikrobnih snovi kot sta rožmarinova ekstrakta. Če primerjamo vrednosti MIC in

MBC med jetrno pašteto in razdetim mesom, vidimo, da so MIC in MBC nižje za jetrno pašteto. Jetrna pašteta ima dodane aditive (nitriti in soli), ki jih razdeto meso nima in zato so koncentracije rožmarinovitih ekstraktov, ki zavirajo rast listerij v pašteti nižje.

Pri primerjavi delovanja ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri različnih temperaturah (37 °C in 8 °C) smo ugotovili, da so vrednosti MIC enake in sklepamo, da znižanje temperature nima večjega vpliva na delovanje ekstraktov rožmarina Vivox 40 in Vivox 70. S preizkusi protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na večjem številu različnih mesnih izdelkov, ki bi bili hranjeni na nizki temperaturi, bi lahko našo hipotezo dokončno potrdili.

7 VIRI

Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Cosson J. D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. Food Chemistry, 52: 3530-3535

Bem Z., Adamič J. 1991. Mikrobiologija mesa in mesnih izdelkov. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 111-112

Bem Z., Žlender B., Savič I. 2003. Meso. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 291-332

Bizjak K. Bem Z. 2003. Podaljšanje obstojnosti živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 255-288

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. Food Chemistry, 55: 7879-7885

Brus B. 2008. Sto grmovnih vrst na Slovenskem. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 204 - 204

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

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

Carson C. F., Riley T. V. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of the *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology, 78: 264-269

Del Campo J., Amiot M. J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection, 10: 1359-1368

Dimitrijević S. I., Mihajlovski K. R., Antonović D. G., Milanović-Stevanović M. R., Mijin D. Ž. 2006. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Oriaganum vulgare* L. Food Chemistry, 204: 774-782

Frankel E. N., Huang S., Aeschbach R., Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, and rosmarinic acid, in bulk oil-in-water emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 131-135

Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J. A., Kuri V. 2004. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380

Gachkar L., Yadegari D., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Alipoor Astaneh S., Rasooli I. 2006. Chemical and biological characteristic of *Cuminum cyinum* and *Rosmarinuss officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102: 898-904

Gašperlin L., Rajar A. 2008. Tehnologija mesnin: zbirka vaj za predmet Tehnologija mesnin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 32-37

Gerbec T. 2009 Protimikrobno delovanje nitrita na bakterije vrste *Listeria monocytogenes*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 - 62

Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. 2001. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Internationa Journal of Food Microbiology*, 73: 83-92

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.

Jelšek N. 2003. Večstopenjska ekstrakcija rožmarina. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 64 str.

Jeršek B. 2006. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-20

Kapun-Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 195-196

Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. *Prokaryotes*, 4: 404-476

Lund B. M., Eklund T. 2000. Control of pH and use of organic acids. V: The microbiological safety and quality of food. Vol. 1. Lund B. M., Baird-Parker T.C., Gould G. W. (eds.). Gaithersburg, Aspen Publishers: 175-199

Owen R. J., Palombo E. A. 2005. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control*, 18: 387-390

Patel D., Holley R. A. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292

Pravilnik o kakovosti mesnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenija, 12, 60: 6290-6292

Rosmarinus officinalis – pravi rožmarin. 2006. Ljubljana, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo (21.3.2009)

http://www.ssfkz.si/datoteke/elektronska_gradiva/Farmakognozija/rastline/rozmarin_pravi.html (19.05.2009): 1-1

Rocourt J., Buchrieser S. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E. T., Marth E. H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc.: 1-20

Rode J. 2001. Zeliščni vrt: domača lekarna. Ljubljana, Kmečki glas: 183-186

Rožman T., 2007. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na različne vrste bakterij rodu *Listeria*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 - 60

Smole Možina S., Bem Z. 2003 Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-86

Zhang H., Kong B., Xiong Y. L., Sun X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81: 686-692

8 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za strokovno pomoč in odlične nasvete, ki so mi pomagali tako pri laboratorijskem delu kot tudi pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se ji za podporo in spodbudo, za stalno dosegljivost in dobro voljo, skratka za odlično mentorstvo.

Zahvaljujem se recenzentki dr. Veroniki Abram za natančen in strokoven pregled diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem laborantki Tanji Rožman za strokovno pomoč pri laboratorijskem delu.

Za pregled diplomske naloge se zahvaljujem univ. dipl. ing. Ivici Hočevar, za pomoč pri iskanju literature pa univ. dipl. bibl. Barbari Slemenik.

Nazadnje bi se rad zahvalil svoji puncu in staršem, ki so mi dali vso podporo in razumevanje.

Hvala sošolcem za dobro prijateljstvo.

9 PRILOGE

Priloga A-1: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB s 15,625 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 40	Kontrola
0	$8,58 \times 10^6 \pm 1,77 \times 10^5$	$8,89 \times 10^6 \pm 4,12 \times 10^5$
24	$6,30 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^5$	$1,84 \times 10^7 \pm 4,95 \times 10^6$
48	$5,09 \times 10^6 \pm 3,73 \times 10^5$	$8,50 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^8$
72	$6,70 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	$7,25 \times 10^8 \pm 2,05 \times 10^8$
144	$4,73 \times 10^5 \pm 2,53 \times 10^4$	$1,42 \times 10^9 \pm 2,12 \times 10^7$
168	$2,83 \times 10^5 \pm 6,72 \times 10^5$	$1,07 \times 10^8 \pm 1,20 \times 10^8$

Priloga A-2: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 40	Kontrola
0	$8,43 \times 10^3 \pm 3,54 \times 10^1$	$9,05 \times 10^3 \pm 1,91 \times 10^3$
24	$8,05 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^1$	$1,74 \times 10^4 \pm 3,54 \times 10^2$
48	$7,55 \times 10^3 \pm 3,54 \times 10^2$	$9,20 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^6$
72	$7,51 \times 10^3 \pm 6,15 \times 10^2$	$1,68 \times 10^5 \pm 1,77 \times 10^6$
144	$6,85 \times 10^3 \pm 1,06 \times 10^3$	$9,48 \times 10^8 \pm 3,54 \times 10^6$
168	$8,90 \times 10^3 \pm 4,24 \times 10^2$	$9,80 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$

Priloga A-3: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 70	Kontrola
0	$7,78 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^6$	$8,95 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^5$
24	$8,75 \times 10^6 \pm 2,19 \times 10^5$	$1,84 \times 10^7 \pm 1,74 \times 10^6$
48	$4,32 \times 10^7 \pm 4,41 \times 10^6$	$8,50 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^8$
72	$9,10 \times 10^6 \pm 1,84 \times 10^6$	$7,25 \times 10^8 \pm 2,05 \times 10^8$
144	$6,61 \times 10^7 \pm 7,63 \times 10^6$	$1,42 \times 10^9 \pm 4,21 \times 10^7$
168	$1,42 \times 10^8 \pm 1,50 \times 10^8$	$8,95 \times 10^8 \pm 1,20 \times 10^8$

Priloga A-4: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču TSB z 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 70	Kontrola
0	$7,90 \times 10^3 \pm 9,19 \times 10^2$	$9,05 \times 10^3 \pm 1,91 \times 10^3$
24	$8,10 \times 10^3 \pm 5,66 \times 10^2$	$1,74 \times 10^4 \pm 3,54 \times 10^2$
48	$7,55 \times 10^3 \pm 2,05 \times 10^3$	$9,20 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^6$
72	$8,17 \times 10^3 \pm 3,25 \times 10^2$	$1,68 \times 10^5 \pm 1,77 \times 10^6$
144	$1,17 \times 10^4 \pm 2,02 \times 10^3$	$9,48 \times 10^8 \pm 3,54 \times 10^6$
168	$2,56 \times 10^4 \pm 1,94 \times 10^3$	$9,80 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$

Priloga A-5: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 40	Kontrola
0	$7,93 \times 10^6 \pm 2,23 \times 10^6$	$7,35 \times 10^6 \pm 6,36 \times 10^5$
24	$7,90 \times 10^6 \pm 1,27 \times 10^6$	$1,78 \times 10^7 \pm 1,98 \times 10^6$
48	$5,60 \times 10^6 \pm 1,84 \times 10^6$	$1,62 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^7$
72	$6,70 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^6$	$1,45 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^7$
144	$1,27 \times 10^7 \pm 1,03 \times 10^6$	$3,80 \times 10^8 \pm 9,90 \times 10^7$
168	$2,10 \times 10^7 \pm 8,49 \times 10^7$	$2,20 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^8$

Priloga A-6: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakta Vivox 40 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 40	Kontrola
0	$9,88 \times 10^3 \pm 4,60 \times 10^2$	$7,53 \times 10^3 \pm 2,47 \times 10^2$
24	$8,45 \times 10^3 \pm 7,78 \times 10^2$	$1,56 \times 10^4 \pm 8,99 \times 10^2$
48	$8,80 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^2$	$7,48 \times 10^4 \pm 9,53 \times 10^5$
72	$1,75 \times 10^4 \pm 3,54 \times 10^2$	$1,22 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$
144	$2,70 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	$1,72 \times 10^8 \pm 3,61 \times 10^7$
168	$1,09 \times 10^6 \pm 4,91 \times 10^5$	$1,56 \times 10^8 \pm 1,20 \times 10^8$

Priloga A-7: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^7 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 62,5 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 70	Kontrola
0	$7,43 \times 10^6 \pm 3,89 \times 10^5$	$7,35 \times 10^6 \pm 6,36 \times 10^5$
24	$6,95 \times 10^6 \pm 1,77 \times 10^6$	$1,78 \times 10^7 \pm 1,98 \times 10^6$
48	$8,40 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^6$	$1,62 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^7$
72	$5,05 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^6$	$1,45 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^7$
144	$2,12 \times 10^7 \pm 5,90 \times 10^6$	$3,80 \times 10^8 \pm 9,90 \times 10^7$
168	$2,02 \times 10^7 \pm 5,66 \times 10^6$	$2,20 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^8$

Priloga A-8: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml) v gojišču BPW z mesom in 31,25 µg/ml ekstrakta Vivox 70 pri 8 °C

Čas (ure)	Število bakterij N (cfu/ml)	
	Vivox 70	Kontrola
0	$7,80 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^2$	$7,53 \times 10^3 \pm 2,47 \times 10^2$
24	$7,95 \times 10^3 \pm 9,19 \times 10^2$	$1,56 \times 10^4 \pm 8,99 \times 10^2$
48	$8,85 \times 10^3 \pm 1,48 \times 10^3$	$7,48 \times 10^4 \pm 9,53 \times 10^3$
72	$2,55 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^4$	$1,22 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$
144	$3,80 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	$1,72 \times 10^8 \pm 3,61 \times 10^7$
168	$1,60 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^5$	$1,56 \times 10^8 \pm 1,20 \times 10^8$