

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tina GERBEC

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE NITRITA NA BAKTERIJE VRSTE
*Listeria monocytogenes***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NITRITE ON *Listeria monocytogenes*

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo in Katedre za tehnologijo mesa in gotovih jedi na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Odbor za študijske zadeve univerzitetnega študija živilske tehnologije je za mentorico diplomskega dela imenoval doc. dr. Barbaro Jeršek, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: doc. dr. Barbara JERŠEK

Somentor: dr. Tomaž POLAK

Recenzentka: prof. dr. Veronika ABRAM

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Gerbec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 579.24:546.173(043)=163.6
KG patogeni mikroorganizmi/*Listeria monocytogenes*/nitrit/protimikrobno delovanje/tehnologija ovir/določanje vsebnosti nitrita/HPLC
AV GERBEC, Tina
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE NITRITA NA BAKTERIJE VRSTE *Listeria monocytogenes*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 69 str., 25 pregl., 23 sl., 51 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje nitrita na bakterije vrste *Listeria monocytogenes*, ki so z živili prenosljive in za človeka patogene bakterije. Uporabili smo tri različne koncentracije nitrita (50 ppm, 148 ppm in 909 ppm), ki smo ga tekočemu gojišču dodali na dva načina: pred avtoklaviranjem gojišča in po avtoklaviranju gojišča s filtrno sterilizacijo. Vsebnost nitrita v gojišču smo določili z novo vpeljano in validirano metodo HPLC. Protimikrobno delovanje nitrita smo kombinirali tudi z nižjo vrednostjo pH gojišča (6,0 in 5,3) ter preverili učinek nitrita na listerije iz različnih faz rasti (logaritemska in stacionarna faza rasti). Učinek nitrita na bakterije vrste *L. monocytogenes* smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču BHI. Protimikroben učinek smo ovrednotili na dva načina: letalnost smo izračunali v primerih, ko je imel nitrit na bakterije vrste *L. monocytogenes* baktericiden učinek; bakteriostatičen učinek pa v primerih, ko je nitrit na bakterije deloval inhibitorno. Ugotovili smo, da je imel nitrit večji učinek, ko smo uporabili kulturo iz logaritemske faze rasti, saj so bakterije takrat občutljivejše kot v stacionarni fazi. Pri nevtralni vrednosti pH gojišča smo večji protimikroben učinek dosegli, ko smo nitrit dodali gojišču pred avtoklaviranjem, kljub temu da je bila izmerjena vsebnost nitrita nižja v primerjavi z nitritom, ki smo ga dodali po avtoklaviranju. Lahko sklepamo, da se med toplotno obdelavo tvorijo nove protimikrobne komponente. Protimikroben učinek nitrita v kombinaciji z nižjo vrednostjo pH gojišča je bil največji, ko smo nitrit dodali gojišču po avtoklaviranju pri vrednosti pH gojišča 5,3. Slabše protimikrobno delovanje smo določili, ko smo nitrit dodali gojišču pri vrednosti pH 5,3 pred avtoklaviranjem. Pri vrednosti pH 6,0 v obeh primerih sterilizacije ter pri koncentracijah nitrita 50 ppm in 148 ppm je imel le-ta zelo majhen protimikroben učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
DC UDC 579.24:546.173(043)=163.6
CX pathogens/*Listeria monocytogenes*/nitrite/antimicrobial activity/hurdle technology/detection of nitrite/HPLC
AU GERBEC, Tina
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NITRITE ON *Listeria monocytogenes*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 69 p., 25 tab., 23 fig., 51 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this research was to verify antimicrobial activity of nitrite on *Listeria monocytogenes*, which are food-borne and human pathogenic bacteria. Three different concentrations of nitrite were used: 50 ppm, 148 ppm, and 909 ppm, and these were added to the broth in two ways: before autoclaving and after autoclaving of the broth with the filter sterilization. The content of the nitrite in the broth was measured with the HPLC method. Furthermore, the antimicrobial activity was combined with the lower pH of the broth (6.0 and 5.3), and we checked what effect the nitrite has on listeria in a different stages of the growth (logarithmic and stationary growth phase). The effect of nitrite on the bacteria was determined with the broth dilution method. The antimicrobial effect was evaluated in two ways: lethality was calculated in cases when the nitrite had bactericidal effect on bacteria, and the bacteriostatic effect was calculated when the nitrite inhibited bacterial growth. It was established that the nitrite had a greater effect when we used bacteria from the logarithmic growth phase because bacteria are more sensitive to the nitrite in this phase than in the stationary phase. With the neutral pH of broth, we have achieved a greater antimicrobial effect when the nitrite was added to the broth before autoclaving, even though, the concentration of the nitrite was lower in comparison with the nitrate that was added after autoclaving. We could assume that new antimicrobial components were formed during the heating process. The antimicrobial effect of the nitrate in the combination with the lower pH value of the broth was the biggest when we added the nitrate after autoclaving with the pH of the broth 5.3. Antimicrobial effect was lower when the nitrate was added to the broth with the pH 5.3 before autoclaving. When broth had pH 6.0, in the both cases of the sterilization and with 50 ppm and 148 ppm of nitrite there was very little antimicrobial effect on *L. monocytogenes*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KEMIJSKI KONZERVANSI	3
2.2 NITRIT	3
2.2.1 Uporaba nitrita v živilstvu.....	4
2.2.2 Vpliv nitrita na zdravje.....	6
2.2.2.1 Toksičnost nitrita	6
2.2.2.2 Nitrozo spojine	6
2.2.3 Zmanjšanje količine nitrita v živilstvu	7
2.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE NITRITA	8
2.3.1 Mehanizem protimikrobnega delovanja nitrita	9
2.3.2 Učinek segrevanja na protimikrobno delovanje nitrita	10
2.3.3 Protimikrobno delovanje nitrita na bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i> ...	11
2.3.3.1 Kombinirano konzerviranje živil	11
2.4 VPLIV ČASA, TEMPERATURE IN pH NA VSEBNOST NITRITA V ŽIVILIH	13
2.5 DOLOČANJE VSEBNOSTI NITRITA	14
2.5.1 Griessova reakcija	14
2.6 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Listeria</i>	15
2.6.1 Taksonomija	15
2.6.2 Morfološke značilnosti	16
2.6.3 Fiziološke in metabolične značilnosti	17
2.6.4 Ekološke značilnosti	17
2.7 PATOGENOST BAKTERIJ RODU <i>Listeria</i>	18
3 MATERIAL IN METODE	20

3.1 POTEK DELA	20
3.2 MATERIAL	22
3.2.1 Bakterije	22
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	22
3.2.3 Natrijev nitrit	23
3.2.4 Reagenti za določanje vsebnosti nitrita	24
3.2.5 Ostale kemikalije	25
3.2.6 Laboratorijska oprema	25
3.3 METODE DELA.....	26
3.3.1 Revitalizacija bakterij	26
3.3.2 Priprava inokuluma	26
3.3.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču BHI	26
3.3.3.1 Izvedba metode	26
3.3.3.2 Določanje preživelosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz različnih faz rasti v gojišču BHI z dodanim NaNO ₂	28
3.3.3.3 Določanje preživelosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI z znižanim pH gojišča in z dodanim NaNO ₂	29
3.3.4 Določitev števila preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču 30	
3.3.4.1 Izračun števila bakterij v gojišču.....	30
3.3.5 Vrednotenje protimikrobnega delovanja nitrita	30
3.3.6 Določanje vsebnosti NaNO₂, dodanega v gojišče BHI s HPLC	32
3.3.6.1 Izvedba metode	33
3.3.6.2 Priprava vzorca.....	33
3.3.6.3 Pogoji določanja vsebnosti prostega NaNO ₂ s HPLC-DAD.....	33
3.3.6.4 Priprava umeritvenih krivulj	33
3.3.6.5 Ponovljivost metode.....	34
3.3.6.6 Linearnost metode	34
3.3.6.7 Meje detekcije in kvantifikacije	34
3.3.7 Statistična obdelava podatkov	34
4 REZULTATI	36
4.1 RAZVOJ ANALITSKE METODE	36
4.1.1 Validacija analitske metode	37
4.1.1.1 Selektivnost.....	37
4.1.1.2 Ponovljivost.....	40
4.1.1.3 Linearnost.....	40
4.1.1.4 Meje detekcije in kvantifikacije	41
4.2 RASTNA KRIVULJA BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	42
4.3 PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO ₂ NA BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU BHI PRI pH 7,2	42
4.3.1 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti	43

4.3.2 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti	46
4.4 PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO₂ NA BAKTERIJE VRSTE <i>L. monocytogenes</i> V GOJIŠČU BHI Z ZNIŽANIM pH	49
4.4.1 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste <i>L.monocytogenes</i> v gojišču BHI pri pH 6,0	49
4.4.2 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI pri pH 5,3	52
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1 RAZPRAVA	56
5.5.1 Vpliv načina sterilizacije NaNO ₂ na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	57
5.1.2 Vpliv NaNO ₂ na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> iz različnih faz rasti	58
5.1.3 Vpliv pH gojišča in NaNO ₂ na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	58
5.1.4 Vpliv različnih koncentracij NaNO ₂ na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	59
5.1.5 Vpliv toplotne obdelave in pH na vsebnost NaNO ₂ v gojišču BHI	59
5.2 SLKEPI	62
6 POVZETEK.....	63
7 VIRI.....	65
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izdelki, v katerih je dovoljena uporaba Na- in K-nitrita z dovoljenimi vhodnimi količinami in dovoljenim največjim ostankom (Pravilnik o aditivih za živila, 2004; Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila, 2008)	7
Preglednica 2: Vsebnost rezidualnega nitrita v klobasi (mg/kg) med shranjevanjem pri 2 °C (Honikel, 2007)	13
Preglednica 3: Vsebnost rezidualnega nitrita med shranjevanjem pri različnih vrednostih pH in različnih začetnih dodatkih nitrita (Honikel, 2007)	13
Preglednica 4: Aparature	25
Preglednica 5: Ponovljivost vsebnosti nitrita, dodanega v gojišče po avtoklaviranju pri vrednosti pH 7,2	40
Preglednica 6: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	43
Preglednica 7: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti	44
Preglednica 8: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	45
Preglednica 9: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti	46
Preglednica 10: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	46
Preglednica 11: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze	47
Preglednica 12: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	48
Preglednica 13: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti	49
Preglednica 14: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI (pH 6,0) pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	50
Preglednica 15: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 6,0) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	51
Preglednica 16: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI (pH 6,0) pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	51
Preglednica 17: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 6,0) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	52
Preglednica 18: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI (pH 5,3) pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	53
Preglednica 19: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 5,3) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	54

Preglednica 20: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI (pH 5,3) pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	54
Preglednica 21: Protimikroben učinek NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 5,3) na rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	55
Preglednica 22: Povzetek protimikrobnih učinkov NaNO ₂ na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> v različnih razmerah	56
Preglednica 23: Izmerjene vrednosti NaNO ₂ v gojišču BHI pri pH 7,2	59
Preglednica 24: Izmerjene vrednosti NaNO ₂ v gojišču BHI pri pH 6,0	60
Preglednica 25: Izmerjene vrednosti NaNO ₂ v gojišču BHI pri pH 5,3	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna kemijska reakcija oblikovanja barve razsoljenega mesa (Višnjevec, 2006)..	5
Slika 2: Kemizem Griessove reakcije (Tsikas, 2006)	14
Slika 3: <i>Listeria monocytogenes</i> (Smith, 2008)	16
Slika 4: InterCelularno gibanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (Pamper, 2004).....	19
Slika 5: Shema predposkusa.....	20
Slika 6: Shema eksperimentalnega dela	21
Slika 7: Shema določanja preživelosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču BHI z različnimi koncentracijami NaNO ₂ in z različnimi Ph.....	27
Slika 8: Shema določanja vsebnosti NaNO ₂ v tekočem gojišču BHI s HPLC.....	32
Slika 9: Umeritvene krivulje za nitrit v gojiščih BHI, TSB in MHB.....	36
Slika 10: Signal reagentov brez gojišča BHI in nitrita (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)	37
Slika 11: Signal standardnega dodatka nitrita (150 ppm) (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)	38
Slika 12: Primerjava kromatogramov: A – gojišče BHI s 50 ppm nitrita; B – gojišče BHI s 50 ppm nitrita + 150 ppm standardnega dodatka nitrita (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)	39
Slika 13: Umeritvena krivulja A – vpliv matriksa gojišča BHI na signal nitrita	40
Slika 14: Umeritvena krivulja B –vpliv postopka in matriksa na signal nitrita	41
Slika 15: Rastne krivulje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> pri različnih vrednostih pH v gojišču BHI pri 37 °C	42
Slika 16: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	44
Slika 17: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	45
Slika 18: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča	47
Slika 19: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča	48
Slika 20: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča pri pH 6,0	50
Slika 21: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega po sterilizaciji gojišča pri pH 6,0	52
Slika 22: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v BHI pri različnih koncentracijah NaNO ₂ , dodanega pred sterilizacijo gojišča pri pH 5,3	53

Slika 23: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI pri različnih koncentracijah NaNO_2 ,
dodanega po sterilizaciji gojišča pri pH 5,3 54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	pomen
ALOA	gojišče ALOA (ang. Agar Listeria acc. to Ottaviani&Agosti)
BHI	neselektivno tekoče gojišče (ang. Brain Heart Infusion Broth)
CCMP	pigment kuhanega razsoljenega mesa (ang. cooked cured meat pigment)
cfu	kolonijska enota (ang. Colony forming unit)
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
KV	koeficient variabilnosti
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Mb	mioglobin
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton
NaNO ₂	natrijev nitrit
NOMb	nitrozomioglobin
pH	negativni logaritem aktivnosti vodikovih ionov
ppm	(ang. parts per milion)
R ²	Pearsonov korelacijski koeficient
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 živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani

1 UVOD

Kemijski konzervansi so velika skupina živilskih dodatkov oziroma aditivov, s katerimi se podaljšuje obstojnost živil. Poleg tega, da zavirajo rast mikroorganizmov, inhibirajo tudi kemijske procese, npr. oksidacijo. Zaradi želje sodobnih potrošnikov po čim bolj svežih in naravnih živilih je uporaba kemijskih konzervansov v živilski industriji opravičljiva le takrat, ko so izključene vse druge možnosti konzerviranja (Bizjak in Bem, 2003).

Nitrit je poleg kuhinjske soli eden najbolj široko uporabljenih konzervansov v proizvodnji mesnih izdelkov. V obliki natrijeve soli se uporablja zaradi protimikrobnih lastnosti, poleg tega deluje tudi kot antioksidant in oblikuje ustrezne senzorične lastnosti, predvsem značilno rožnato barvo razsoljenih mesnih izdelkov in aromo (Shahidi in Pegg, 1992). Protimikrobno deluje prosti nitrit, torej tisti, ki ni vezan v nitrozomioglobin, zato je za inhibitorno delovanje na bakterije potrebna višja koncentracija kot za doseganje barve razsoljenega mesa (Bizjak in Bem, 2003). Problem za zdravje ljudi predstavlja prosti nitrit, ki s sekundarnimi amini tvori kancerogene nitrozamine. Zato ga je potrebno uporabljati v čim nižjih koncentracijah in v kombinaciji z drugimi protimikrobnimi dejavniki.

Listeria monocytogenes je za človeka patogena bakterija, najpogostejši vir okužbe pa je uživanje kontaminirane hrane. Listerioza je redka bolezen, ki ogroža predvsem rizične skupine ljudi, vendar je smrtnost zaradi listerioze najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano (20 do 60 %). Listerije preživijo sorazmerno dolgo v neugodnih razmerah, saj rastejo v širokem temperaturnem območju (1 °C do 45 °C), pri vrednosti pH od 4,4 do 9,6 in pri a_w do 0,92. Posledica je relativno pogosta prisotnost teh bakterij v živilih. Razmnoževanje listerij v živilih lahko preprečimo z nizko temperaturo (0 °C), s soljenjem (15 % NaCl) ali z znižanjem vrednosti pH živila na 4,1. Vendar je vsakega od omenjenih postopkov težko zagotoviti oziroma so takšni izdelki za posameznika nesprejemljivi (preslano, prekislo živilo). Druga možnost je uporaba kombiniranega konzerviranja, pri katerem uporabimo več protimikrobnih dejavnikov hkrati (Adamič in sod., 2003; Smole Možina in Bem, 2003).

Veliko raziskovalcev se je ukvarjalo s protimikrobnim učinkom nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*, pri čemer so upoštevali koncept ovir, saj so dodan nitrit kombinirali z drugimi tehnologijami konzerviranja (nižja vrednost pH, toplotna obdelava, hlajenje, uporaba soli, nižja a_w). Le tako so lahko uspešno zaustavili rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo določili protimikroben učinek nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* glede na način sterilizacije nitrita. Primerjali smo, kakšen učinek ima na rast bakterij nitrit, ki smo ga toplotno sterilizirali z avtoklaviranjem

skupaj z gojiščem, ter nitrit, ki smo ga dodali gojišču po avtoklaviranju s pomočjo filtrne sterilizacije. Poleg tega smo protimikrobno delovanje nitrita kombinirali z nižjo vrednostjo pH ter preverili, kakšen učinek ima nitrit na bakterije iz različnih faz rasti oziroma starosti kulture. Protimikrobno delovanje smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, ki je široko uporabna in zanesljiva metoda za določanje učinkovitosti protimikrobnih snovi.

Vsebnost nitrita v gojišču smo določili z metodo HPLC, ki je hitrejša, občutljivejša in selektivnejša kot metode, ki temeljijo na kolorimetriji. Poleg tega zagotavlja zanesljive in natančne rezultate.

1.1 NAMEN NALOGE

Glavni namen eksperimentalnega dela diplomskega dela je bila določitev protimikrobnega delovanja nitrita na bakterije vrste *L. monocytogenes* glede na način sterilizacije dodanega nitrita. Primerjali smo, kako učinkuje nitrit, ki smo ga dodali v gojišče pred toplotno sterilizacijo oziroma avtoklaviranjem gojišča, in kako nitrit, ki smo ga dodali gojišču po toplotni sterilizaciji oziroma avtoklaviranju s filtrno sterilizacijo.

Ugotoviti smo želeli tudi, kakšen učinek ima nitrit na bakterije vrste *L. monocytogenes* različnih starosti oziroma iz različnih faz rasti.

Poleg tega smo protimikroben učinek nitrita kombinirali z nižjo vrednostjo pH gojišča in tako pričakovali boljše protimikrobno delovanje.

V eksperimentalnem delu diplomskega dela smo razvili novo metodo za določanje vsebnosti nitrita v tekočem gojišču.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Raztopina natrijevega nitrita (NaNO_2) ima protimikroben učinek na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Med toplotno obdelavo nitrit razpade. Pri tem se tvorijo nove komponente, ki naj bi bile še bolj učinkovite kot nitrit sam.

V logaritemski fazi rasti so bakterije občutljivejše kot v stacionarni fazi, zato ima nitrit v logaritemski fazi večji protimikroben učinek.

Pri nižji vrednosti pH se poveča protimikrobno delovanje nitrita.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KEMIJSKI KONZERVANSI

Zagotavljanje varnih živil od pridelave do proizvodnje, skladiščenja, distribucije in vse do končne uporabe je dandanes glavna naloga živilskopredelovalne industrije. Ne samo zdravstvena ustreznost, ampak tudi visoka mikrobiološka kakovost živil je cilj proizvajalcev, želja potrošnikov in splošna zahteva nadzora nad živili (Klun in Šedlbauer, 2004).

Kemijski konzervansi so velika skupina živilskih dodatkov oziroma aditivov, ki zagotavljajo mikrobiološko varnost in tako zmanjšajo tveganje okužb z živili. Poleg tega tudi podaljšujejo obstojnost živil in zavirajo kemijske procese, npr. oksidacijo (Bizjak in Bem, 2003).

Trend v razvoju živilskih proizvodov gre v smeri čim manjše porabe kemijskih konzervansov, predvsem zaradi želje sodobnih potrošnikov po čim bolj svežih in naravnih živilih. Uporaba kemijskih konzervansov je v živilski industriji opravičljiva le takrat, ko so izključene vse druge možnosti konzerviranja. Kljub temu pa njihova uporaba predstavlja manjše tveganje kot opuščanje njihove uporabe, kar ima lahko za posledico pojav alimentarnih toksikoinfekcij (okužbe in zastrupitve z živili), kvarjenje živil ter izgubo hranilne in senzorične vrednosti živil. Alternativo kemijskim konzervansom predstavljajo kombinirani postopki konzerviranja, uvedba sistema HACCP, prisotnost kompetitivne mikrobne kulture in nekateri naravni konzervansi (Pokorn in sod., 1994).

Konzervansi, ki imajo največji praktičen pomen za inhibicijo oziroma uničenje mikroorganizmov v živilih, so kuhinjska sol (NaCl), nitrit (NaNO_2), nekatere začimbe, polifosfati, šibke organske kisline (citronska, mlečna, očetna, propanojska, benzojska in sorbinska), dim, glukono-delta-lakton (Bizjak in Bem, 2003).

2.2 NITRIT

Uporaba nitrita, enega najbolj znanih konzervansov za zaščito mesa in mesnih izdelkov, je dolga, saj so ga uporabljali že 3000 let pred našim štetjem v Mezopotamiji. Koristnost nitrita so odkrili po naključju, saj so meso konzervirali le s kameno soljo, ki je kot nečistočo vsebovala tudi natrijev nitrit (Shahidi in Pegg, 1992).

Do leta 1940 ni bilo jasno, ali ima nitrit poleg razvoja barve in arome tudi protimikrobne lastnosti. Kasneje so ugotovili, da je dušikova(III) kislina, ki nastane iz nitrita v kislem okolju, odgovorna za mikrobno inhibicijo (Tompkin, 2005).

Nitrit je anorganski ion (NO_2^-), ki predstavlja del kroženja dušika in se v okolju nahaja v zemlji, vodi in živih organizmih. Ljudje smo nitritom izpostavljeni preko zelenjave, mesa in pitne vode, lahko pa se tvori tudi v človeškem telesu. Endogeni vir nitrita se pojavi z oksidacijo dušikovega monoksida (NO) ali pa z mikrobno redukcijo nitrata. NO se sintetizira v celicah iz L-arginina preko oksidacijskih reakcij, ki so katalizirane s flavo-hemoprotein-NO-sintazo. Endogena produkcija NO igra pomembno vlogo v vaskularni homeostazi, nevrottransmisiji in obrambnem mehanizmu (Bryan, 2006; Jobgen in sod., 2007).

Z mesnimi izdelki zaužijemo v povprečju 39 % nitrita, z žitaricami 34 %, z zelenjavo pa 16 %. Zelenjava, še posebej solata, špinača, zelena in pesa, predstavlja 86 % dnevnega vnosa nitrata, ki se reducira do nitrita. Poleg naštetih živil je nitrit prisoten tudi v nekaterih zdravilih (Brambilla in Martelli, 2006).

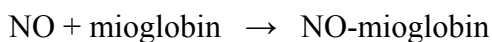
2.2.1 Uporaba nitrita v živilstvu

Nitrit se v procesu razsoljevanja v obliki natrijeve soli uporablja v proizvodnji mesnih in mlečnih izdelkov zaradi oblikovanja ustreznih senzoričnih lastnosti izdelkov, predvsem barve in arome, njegovih antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti (Smole Možina in Bem, 2003). Kljub mnogim funkcionalnim lastnostim nitrita je njegova uporaba omejena zaradi varnostnih razlogov, saj nekateri avtorji označujejo nitrit kot človeški strup v prehrani. Vendar spojina, ki bi pokrila vse lastnosti pri ohranjanju razsoljenih mesnih izdelkov in tako popolnoma zamenjala nitrit, še ni bila odkrita (Shahidi in Pegg, 1992).

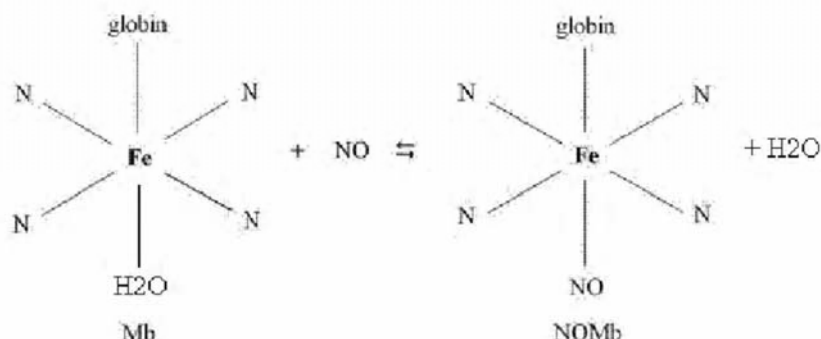
Za razsoljevanje se poleg kuhinjske soli uporablja natrijev nitrit (NaNO_2) in kalijev nitrit (KNO_2) ter nekatere druge aditive (sladkorji, polifosfati, askorbinska kislina). Z razsoljevanjem se doseže poleg protimikrobnega učinka tudi zaželeno senzorične lastnosti izdelkov (Bizjak in Bem, 2003). Sam nitrat kot sredstvo za razsoljevanje ni učinkovit, zato se mora z bakterijami najprej reducirati v nitrit (Cammack in sod., 1999). V zadnjem času se v mešanicah za razsol uporaba nitrata opušča, ker je težje predvideti količino rezidualnega nitrita v končnih izdelkih (Bizjak in Bem, 2003).

Nitrit je zelo reaktiven ion, ki lahko deluje kot reaktant, oksidant ali nitrozirajoče sredstvo in se tako pretvori v dušikovo kislino, dušikov oksid in nitrat (Sebranek in Bacus, 2007).

Mehanizem razsoljevanja poteka na naslednji način (Honikel, 2007):



Pri razsoljevanju je nitrat glavni vir nitrita, v katerega se razgradi v anaerobnih razmerah ob redukativnem delovanju denitrifikacijskih bakterij. Nastali nitrit in nitrit, dodan mesu, se še naprej razgrajujeta na razne vmesne in končne produkte (Cammack in sod., 1999). Nitrit se pri ugodni vrednosti pH razgradi do dušikove (III) kisline (HNO_2), ta pa nato z redukcijo preide v dušikov monoksid (NO), ki se veže na železo v hemu porfirinskega obroča mioglobina. Tvori se nitrozomioglobin (NO-mioglobin), ki z denaturacijo globina v času sušenja ali toplotne obdelave prehaja v nitrozomiokromogen, ki oblikuje v mesu stabilno rdečo barvo (Bizjak in Bem, 2003). Pri tvorbi nitrozomioglobina sodeluje le del dodanega nitrita, znaten del pa ostaja nespremenjen, torej ostane kot rezidualni nitrit. Del tega rezidualnega nitrita se oksidira nazaj v nitrat, del pa direktno ali preko razgradnih produktov reagira s sestavinami mesa, pri čemer nastajajo različne spojine, med drugim tudi kancerogeni N-nitrozamini (Tompkin, 2005).



Slika 1: Osnovna kemijska reakcija oblikovanja barve razsoljenega mesa (Višnjevec, 2006)

Antioksidativen učinek nitrita se pokaže z zaviranjem oksidacije lipidov v mesu. Pojav postane (WOF) in žarke arome je zato manjši problem v razsoljenem mesu. Nitrit kot antioksidant v razsoljenem mesu učinkuje na več načinov:

- oblikuje kompleks s hem pigmenti in prepreči sproščanje železa med toplotno obdelavo mesa,
- stabilizira nenasičene lipide v membrani,
- reagira s kovinskimi ioni in prepreči njihov katalitični učinek na oksidacijo (Žlender, 2000).

Pri razsoljevanju se oblikuje tipična aroma, ki je posledica reakcije določenih komponent mesa z nitritom ali NO, vendar so kemijske spremembe, ki so odgovorne za aromo, še vedno nerazjasnjene (Sebranek in Bacus, 2007).

2.2.2 Vpliv nitrita na zdravje

2.2.2.1 Toksičnost nitrita

Nitrit se veže na hemoglobin v krvi in tvori stabilen nitrozohemoglobin, 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 % sestavni del soli za razsoljevanje (Bizjak in Bem, 2003). Toksičen učinek povzroča nitrit v višjih koncentracijah, kot se uporablja pri razsoljevanju (Cammack in sod., 1999).

2.2.2.2 Nitrozo spojine

Pred približno 30 leti je bilo dokazano, da nekatere N-nitrozo spojine v hrani pri večini poskusnih živali delujejo kancerogeno. Najpogosteje povzročajo raka na jetrih, pljučih, želodcu, mozgu in perifernemu živčnemu sistemu (Cammack in sod., 1999).

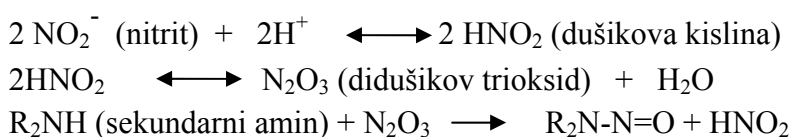
Nitrozo spojine nastanejo z nitroziranjem organskih amino spojin. Organske amino spojine v hrani so lahko primarni amini (v siru, kumaricah, zelenjavi in mesu), sekundarni amini (dimetilamin v ribah, pirolidin, ki nastane iz poliaminov v mesu), aminokisliline, aromatski amini, gvanidini (kreatin v mesu) in urea (citrulin v sadežih in zelenjavi). Nitrozo spojine delimo na stabilne nitrozoamine in nitrozoamide, ki so relativno nestabilne spojine, saj jih toplotna obdelava uniči in zato ne predstavljajo tolikšnega tveganja (Abram, 1994).

V razsoljenih mesnih izdelkih obstaja nevarnost, ker se vse nastale količine NO ne vežejo na mioglobin in ostajajo proste za reakcijo z drugimi komponentami mesa in tako z možnostjo tvorbe nitrozamina. Prosti nitrit se v razsoljenem mesu veže na amine, zlasti sekundarne, in tako pri višji temperaturi in nižji vrednosti pH prispeva k nastanku

nitrozaminov. Pri tem delujejo izrazito katalitično visoke temperature toplotne obdelave (nad 160 °C). Zaradi tega se ne priporoča ali celo prepoveduje pečenje razsoljenega mesa (Bizjak in Bem, 2003).

Možnost tvorbe N-nitrozo spojin obstaja tudi v človeškem telesu. Endogena tvorba N-nitrozo spojin je posledica reakcij med nitriti in amini, amidi ali alkil ureo. V kislih razmerah želodca je N-nitrozacija kislinsko katalizirana (Cammack in sod., 1999; Rajar in sod., 2005).

Kemizem tvorbe nitrozaminov (Brambilla in Martelli, 2006):



Zaradi kancerogenih nitrozaminov ter same toksičnosti nitrita je količina dodanega nitrita tudi zakonsko omejena. V preglednici 1 so navedene vhodne količine ter največji dovoljeni ostanek v mesnih izdelkih (Pravilnik o aditivih za živila, 2004; Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila, 2008).

Preglednica 1: Izdelki, v katerih je dovoljena uporaba Na- in K-nitrita z dovoljenimi vhodnimi količinami in dovoljenim največjim ostankom (Pravilnik o aditivih za živila, 2004; Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila, 2008)

Vrsta izdelka	Vhodna količina Na- in K-nitrita (mg/kg)	Ostanek (mg/kg)	Ostanek (mg%)
Termično neobdelani, razsoljeni sušeni mesni izdelki	150	50	(5 mg%)
Sterilizirani mesni izdelki	100	100	(10 mg%)
Tradicionalni mesni izdelki, izdelani po postopku mokrega razsoljevanja		175	(17,5 mg%)

2.2.3 Zmanjšanje količine nitrita v živilstvu

Zaradi negativnih zdravstvenih učinkov nitrita in želje potrošnikov po čim bolj naravnih živilih se v mesnopredelovalni industriji usmerjajo v uporabo nitrita v čim manjših možnih odmerkih ali v zamenjavo nitrita z drugimi solmi in pigmenti (betalaini, ksantofili, antociani, CCMP – "cooked cured meat pigment"). Količina rezidualnega nitrita v mesnih

izdelkih se je v zadnjih dvajsetih letih občutno znižala, tudi do 80 % (Jimenez-Colmenero in sod., 2001).

Zamenjava nitrita je zaradi njegove multifunkcionalnosti zelo težavna naloga, zato je zelo majhna verjetnost, da bi se našla ena sama spojina, ki bi nadomestila vse njegove funkcije (Shahidi in Pegg, 1992). Rešitev je kombinacija več spojin, ki bi skupaj imele vpliv na barvo, aromo ter protimikrobne in antioksidativne lastnosti (Jimenez-Colmenero in sod., 2001).

Nastanek zdravju škodljivih nitrozaminov lahko preprečimo tudi z uporabo inhibitorjev. V mesni industriji se je v procesu razsoljevanja povečala uporaba spojin, kot sta askorbat in eritorbat, ki inhibirata nastanek nitrozaminov. Askorbinska kislina v vodni raztopini inhibira tvorbo N-nitrozaminov preko hitre redukcije dušikove kisline do dušikovega oksida in nastanka dehidroaskorbinske kisline. Problem predstavlja slabša topnost askorbata in eritorbata v adipoznem tkivu in posledično slabša aktivnost (Jimenez-Colmenero in sod., 2001). Nastanek nitrozaminov zavirajo tudi vitamin E, fenolne in žveplove spojine (Brambilla in Martelli, 2006).

2.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE NITRITA

Poleg vseh ostalih vlog nitrita v razsoljenih izdelkih, se kot najpomembnejša funkcija smatra njegovo protimikrobno delovanje, saj inhibira rast spor bakterije vrste *Clostridium botulinum* in tako preprečuje nastanek nevarnih toksinov. Protimikrobno deluje rezidualni nitrit, to je tisti, ki ni vezan v nitrozomioglobin, zato je potrebna višja vsebnost nitrita kot za doseganje obstojne barve razsoljenega mesa (Smole Možina in Bem, 2003).

Verjetno je prav zasluga nitrita v mesnih izdelkih, v pločevinkah in razsoljenem mesu v kosih, da je primerov botulizma relativno malo oziroma se zelo redko pojavlja zaradi kontaminacije industrijskih mesnih izdelkov, večkrat pa pri doma pripravljenih izdelkih, kjer nitrit ni bil uporabljen (Bem in Smole Možina, 2003).

Ciljni mikroorganizmi so enterobakterije in predvsem klostridiji, v mesnih izdelkih toksigene bakterije vrste *Cl. botulinum*, v mlečnih izdelkih, npr. sirih, pa kvarljivci, npr. *Cl. butyricum* in *Cl. tyrobutyricum*, kar povzroča pozno napihovanje sirov (Smole Možina in Bem, 2003).

Za nitritne soli so torej najobčutljivejši predstavniki iz rodu *Clostridium* – razmnoževati se prenehajo v prisotnosti 5 % soli za razsoljevanje. Bacili za isti učinek potrebujejo 10 %, mikrokokci pa 16 % te soli (Bizjak in Bem, 2003).

Določene skupine in vrste mikroorganizmov dobro prenašajo proces razsoljevanja. Lahko se razmnožujejo v razsolici in postajajo dominantne vrste. Sem sodijo predstavniki rodov *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* in določene skupine kvasovk ter plesni (Bizjak in Bem, 2003).

Škodljivost N-nitrozaminov in toksičnost nitrita je potrebno primerjati s škodljivostjo rasti in nastajanja toksina *Cl. botulinum*. Zaradi vseh pozitivnih funkcij, ki jih doprinese uporaba nitrita, je njegova uporaba v živilstvu upravičena.

2.3.1 Mehanizem protimikrobnega delovanja nitrita

Mehanizem, s katerim nitrit zavira bakterijsko rast, je kompleksen in se proučuje že več kot 50 let, vendar njegovo delovanje še vedno ni povsem jasno (Cammack in sod., 1999).

Nitrit reagira s sulfhidrilnimi skupinami spojin bakterijskih celic in jih inaktivira. Prav tako je že dolgo dokazano, da inhibitorni učinek nitrita oziroma dušikovega oksida, ki nastane preko dušikove(III) kisline iz nitrita, temelji na reakcijah z encimi, ki imajo vezan železov ion, 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 oziroma tvorbo ATP v celicah. Zaviranje respiracije je že dolgo eden od možnih mehanizmov bakteriostatičnega delovanja nitrita pri aerobnih bakterijah. 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 (Smole Možina in Bem, 2003; Cammack in sod., 1999; Tompkin, 2005, Sebranek in Fox, 1985).

Protimikrobno delovanje nitrita je odvisno predvsem od:

- vsebnosti rezidualnega nitrita,
- pH izdelka ali medija (določa stopnjo disociacije dušikove (III) kisline),
- začetnega števila mikroorganizmov in spor,
- temperature,
- količine askorbata,
- količine »razpoložljivih« ionov železa v izdelku,
- vrste mesa in drugih sestavin,
- vrste toplotne obdelave,
- rasti kompetativne mikroflore (Tompkin, 2005).

Znano je, da inhibitornega učinka nima nitrit sam. Bakteriostatični produkti, ki nastanejo iz nitrita, so:

- dušikova (III) kislina (HNO_2): v mikrobioloških medijih je povečan inhibitoren učinek nitrita na bakterije z nižjo vrednostjo pH, še posebej pri pH 6,0 ali nižje;
- peroksinitrit (ONOO^- ; reakcija med NO in superoksidnim radikalom v prisotnosti kisika);
- kompleks Fe-S-NO (pri segrevanju mešanice nitrita, cisteina in železovih ionov nastanejo učinkovite protimikrobne sestavine);
- nitrozotioili in N-nitrozo sestavine (Cammack in sod., 1999).

2.3.2 Učinek segrevanja na protimikrobno delovanje nitrita

V toplotno obdelanih medijih z dodatkom nitrita nastajajo različne spojine. Učinek so najbolje proučili v mikrobioloških gojiščih in ga poimenovali po avtorju – Perigo dejavnik. V prisotnosti nitrita in določenih drugih snovi verjetno prihaja do tvorbe novih sestavin, ki so protimikrobno okoli 10-krat bolj učinkovite od nitrita. Mehanizem ni podrobno raziskan, vendar se lahko pojavi tudi v živilih, a v odvisnosti od sestavin in načina toplotne obdelave (Smole Možina in Bem, 2003; Cammack in sod., 1999). Nitrit, ki ga segrevamo v mikrobioloških gojiščih, je bolj učinkovit proti vegetativnim celicam kot nitrit, ki ga aseptično dodamo mediju po avtoklaviranju. Protimikrobne sestavine nastanejo iz nitrita, ki se med toplotno obdelavo razgradi. Ta učinek se zgodi v temperaturnem razponu med 95 in 125 °C pri pH okoli 6. Enak učinek se doseže, če dodamo 8 mg nitrita /kg pred segrevanjem medija kot pa 52 mg/kg dodanega po segrevanju. Reducirajoče snovi, kot so askorbat, cistein, tioglikolat, so potrebne komponente mikrobiološkega gojišča za nastanek tega učinka. Situacija v mesnih izdelkih je bolj kompleksna kot v tekočem mediju. (Cammack in sod., 1999; Tompkin, 2005).

McClure in sodelavci (1991) so proučevali učinke segrevanja na NaNO_2 , in sicer so primerjali protimikroben vpliv avtoklaviranega in s filtrno sterilizacijo steriliziranega nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Inhibicija bakterij vrste *L. monocytogenes* s toplotno obdelanim NaNO_2 je bila manjša v primerjavi z NaNO_2 , ki so ga sterilizirali s filtrno sterilizacijo, pri kateri je 50 μg nitrita/ml gojišča pri pH 5,0 preprečilo vidno rast. Ko je bil NaNO_2 avtoklaviran, več kot 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tudi pri nizkem pH ni zaustavilo rasti, šele koncentracija 400 μg nitrita /ml pri pH 5,0 je imela protimikroben učinek. Avtoklaviranje namreč povzroči razpad nitrita in zato je uporaba filtra boljši način sterilizacije. To pa je v nasprotju z raziskavo, v kateri je Perigo dokazal, da segrevanje nitrita v mikrobiološkem gojišču povzroči nastanek protimikrobnih sestavin, ki so še bolj inhibitorne kot nitrit sam (Lado in Yousef, 2007).

2.3.3 Protimikrobno delovanje nitrita na bakterije vrste *Listeria monocytogenes*

Veliko raziskovalcev se je ukvarjalo s protimikrobnim učinkom nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*, pri čemer so upoštevali koncept ovir, saj so dodan nitrit kombinirali z drugimi tehnologijami konzerviranja (nižja vrednost pH, toplotna obdelava, hlajenje, uporaba soli, nižja a_w). Protimikroben učinek nitrita je namreč boljši v kombinaciji z ostalimi dejavniki konzerviranja (Birzele in sod., 2005).

2.3.3.1 Kombinirano konzerviranje živil

Uporaba neugodnih okoljskih dejavnikov, ki onemogočajo rast in preživetje mikroorganizmov v živilih v postopkih konzerviranja hrane, ima zelo jasen namen. Preusmerjanje energije mikrobnih celic iz biosintetskih reakcij v vzdrževanje celične homeostaze pomeni inhibicijo rasti. Če poraba za vzdrževanje homeostaze preseže energetske kapacitete celice, ta propade. To pa je mnogo lažje doseči s kombiniranjem različnih dejavnikov, kjer se doseže še boljše ali vsaj enake rezultate kot z uporabo enega dejavnika. Najbolj pomembne ovire, ki se uporabljajo v živilih, so visoka ali nizka temperatura, vodna aktivnost (a_w), nizka vrednost pH, redoks potencial (Eh), konzervansi (nitrit, sorbat, sulfid) in kompetitivni mikroorganizmi (npr. mlečnokislinske bakterije). Vzajemni vpliv dejavnikov okolja na rast mikroorganizmov oziroma »tehnologija ovir« je razvita že nekaj let in predstavlja nov koncept za proizvodnjo varnih, stabilnih, prehransko in senzorično vrednih in varčnih živilskih izdelkov (Leistner, 2000; Smole Možina in Bem, 2003).

Razmnoževanje bakterij vrste *Listeria monocytogenes* lahko preprečimo z nizko temperaturo (0 °C), s soljenjem (15 % NaCl) ali z znižanjem vrednosti pH živila na 4,1. Vsakega od omenjenih dejavnikov je težko zagotoviti, saj so takšni izdelki za potrošnika nesprejemljivi (preslano, prekislo živilo). Druga možnost je uporaba kombiniranega konzerviranja, pri katerem uporabimo vse tri načine hkrati. Zaradi kombiniranega delovanja uporabljenih dejavnikov za inhibicijo listerij zadostujejo temperatura 14 °C, vrednost pH 5,5 in 5 % koncentracije soli. Na tak način prav tako dobimo mikrobiološko varno živilo, ki ustreza tudi drugim zahtevam potrošnika. Ta si želi poleg mikrobiološko varnega in obstojnega živila tudi čim bolj naravno in zato bolj zdravo živilo s čim manj dodatki, kot sta sol ali kemijski zakisovalec (Adamič in sod., 2003; Smole Možina in Bem, 2003).

Za uspešno inhibitorno delovanje nitrita je poleg njegove koncentracije potrebna istočasna aktivnost drugih dejavnikov, ki preprečujejo razmnoževanje mikroorganizmov. Protimikrobna aktivnost nitrita proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* je odvisna od temperature, vrednosti pH in koncentracije NaCl. Dokazali so, da ima nitrit v koncentracijah, ki se uporabljajo v mesnih izdelkih, inhibitoren učinek le v tistih izdelkih,

ki so ohlajeni na temperaturo hladilnika, vsebujejo vsaj 3 % NaCl in imajo vrednost pH 5,5 ali manj (Buchanan in sod., 1989; Vignolo in sod., 1998).

Temperatura močno vpliva na učinkovitost nitrita proti listerijam. Temperatura, ki je višja od temperature hladilnika, ne more biti optimalna za bakteriostatično delovanje nitrita. Samo povečanje koncentracije nitrita v živilskih izdelkih ni dovolj učinkovito za kontrolo rasti in preživelosti teh patogenov (Junttila in sod., 1989).

V podobni raziskavi so primerjali učinek temperature (5–30 °C), pH (4,6–7,4), NaCl (0,5–8,0 % w/v) in natrijevega nitrita (0–400 µg/ml) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču. Rezultati so pokazali, da pri pH 5,3 ali manj ni vidne rasti ob dodatku 50 µg NaNO₂/ml pri 20 °C. Pri pH 6,0 in več ima NaNO₂ majhen učinek na zmanjšanje rasti, čeprav so uporabili višjo koncentracije nitrita (400 µg/ml) in nižjo temperaturo inkubacije (McClure in sod., 1991).

Kamat in Nair (1996) sta prav tako raziskovala kombiniran učinek pH, NaNO₂ in NaCl na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Pri pH 4,0 in 10 g NaCl/l ter 50 mg NaNO₂/kg bakterije niso rasle, medtem ko pri pH 7,0 niti koncentracija 200 mg nitrata/kg in 10 g NaCl/l ni zaustavila rasti.

Prav tako je bila učinkovita kombinacija nitrita z bakteriocini, kot so nizin, laktocin 705 in enterocin EJ97. Nitrit poveča protimikrobno učinkovitost tudi lizocimu (García in sod., 2004; Gill in Holley, 2003, Vignolo in sod., 1998).

Protimikroben učinek nitrita je torej močno odvisen od vrednosti pH. Pri določeni vrednosti pH medija oziroma živila je raztopina nitrita v ravnotežju med nitritnim ionom in dušikovo (III) kislino. Pri višji vrednosti pH (nad 6,0) je NO₂⁻ prevladujoč inhibitor, medtem ko pri nižji vrednosti pH (pod 6,0) prevladuje dušikova (III) kislina (Lambert in Bidlas, 2007). Višja vrednost pH omogoča, da po toplotni obdelavi ostane več rezidualnega nitrita, vendar je pri višji vrednosti pH nitrit manj učinkovit (Duffy in sod., 1994).

2.4 VPLIV ČASA, TEMPERATURE IN pH NA VSEBNOST NITRITA V ŽIVILIH

Največje zmanjšanje vsebnosti nitrita v živilih je opaziti med predelavo in ob koncu toplotne obdelave. Začetna izguba je običajno okoli 65 %, neodvisno od začetne koncentracije. Po 20 dneh shranjevanja pri nizki temperaturi pade koncentracija nitrita pod tretjino v primerjavi s koncentracijo po toplotni obdelavi (Honikel, 2007).

Preglednica 2: Vsebnost nitrita v klobasi (mg/kg) med shranjevanjem pri 2 °C (Honikel, 2007)

Čas shranjevanja	Vsebnost nitrita (mg/kg)			
	75	100	150	200
Po toplotni obdelavi	21,9	30,5	59,5	53,7
20 dni	7,5	9,3	10,2	15,4
40 dni	3,6	6,4	10,2	7,7
60 dni	0,5	0,9	4,0	5,8

V spodnji preglednici je razvidno, da je pri višji vrednosti pH počasnejše zmanjšanje vsebnosti nitrita (Honikel, 2007).

Preglednica 3: Vsebnost nitrita med shranjevanjem pri različnih vrednostih pH in različnih začetnih dodatkih nitrita (Honikel, 2007)

pH vrednost	Čas shranjevanja (dnevi)	Vsebnost nitrita (mg/kg)	
		100	200
5,3	0 (po toplotni obdelavi)	28	70
	6	20	41
	12	5	18
6,3	0 (po toplotni obdelavi)	58	135
	6	41	112
	12	31	90

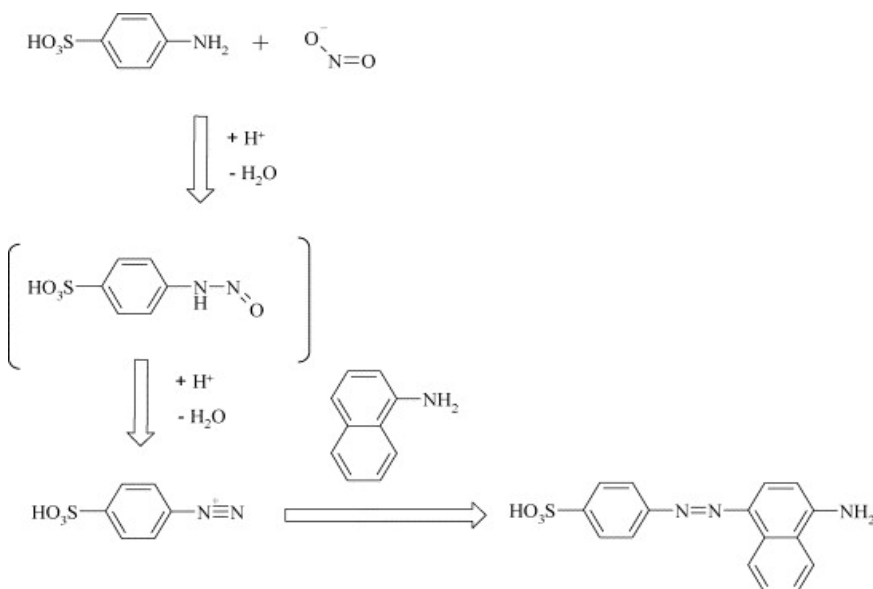
2.5 DOLOČANJE VSEBNOSTI NITRITA

Nitrit, ki ga dodamo živilom ali gojišču, reagira z mnogimi komponentami. Večina dodanega nitrita je prisotna kot NO-vez z mioglobinom (5–15 %), sulfhidrilnimi skupinami (SH) (5–15 %), lipidi (1–5 %) in proteini (20–30 %), delno je prisoten tudi kot nitrat (pod 10 %) in kot nitrit (10–15 %). Z analitičnimi metodami se običajno določa rezidualni nitrit, ki pa ne odraža dejanske količine dodanega konzervansa (Ferreira in Silva, 2007).

Za merjenje nitrita v bioloških tekočinah, hrani in vzorcih iz okolja je znanih veliko metod. Nitrit in nitrat absorbirata pri valovnih dolžinah med 210 in 220 nm, zato se ju lahko direktno določi z UV detektorjem. Ker ne absorbirata vidne svetlobe, večina metod za analizo zahteva postopek derivatizacije, pri kateri se nitrit pretvori v produkt, ki absorbira svetlobo pri specifični valovni dolžini ali fluorescira. Večina teh reakcij je specifičnih za nitrit. Ena najbolj znanih je Griessova reakcija (Jobgen, 2006).

2.5.1 Griessova reakcija

Najbolj pogosta metoda, ki se uporablja za določanje nitrata in nitrita, je zasnovana na Griessovi reakciji. Odkril jo je nemški kemik Johann Peter Griess leta 1879. Pri tej reakciji nitrit pod kislimi pogoji reagira z amino skupino sulfanilne kisline ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) in tako se tvori diazonijev kation ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{-NN}^+$). Ta se nato poveže z aromatskim aminom 1-naftilaminom ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}_2$) na para položaj in nastane vodotopna rdeče vijolična spojina ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_{10}\text{H}_6\text{NH}_2$), ki se jo določi pri 540 nm (Moorcroft in sod., 2001; Tsikas, 2006).



Slika 2: Kemizem Griessove reakcije (Tsikas, 2006)

Prednost analiz, ki temeljijo na Griessovi reakciji, je enostavnost in cenenost izvedbe, vendar je veliko interakcij, ki motijo določanje nitrita. Prav zaradi tega se je Griessova reakcija modificirala in avtomatizirala. Klasične kolorimetrične metode, ki se pogosto uporabljajo za določanje nitrita, so težavne zaradi motenj, ki nastanejo v samem mediju. Pri Griessovi reakciji je potrebna priprava vzorca, pri kateri se odstrani proteine ter druge spojine, ki povzročajo interferenco. Proteine se običajno odstrani z ultrafiltracijo ali obarjanjem. Manipulacija z vzorcem, ki vsebuje nitrit, mora biti minimalna zaradi nestabilnosti nitritnega iona za oksidacijo do dušikove(V) kisline in nitrata (Ferreira in Silvaa, 2007; Tsikas, 2006).

V zadnjih letih je Griessova reakcija združena s HPLC ločbo. HPLC je zelo primerna, saj je hitrejša, občutljivejša in selektivnejša kot metode, ki temeljijo na redukciji/kolorimetriji. Poleg tega zagotavlja zanesljive in natančne rezultate (Di Matteo in Esposito, 1997).

Sistem HPLC sestavljajo: injektor, kolona, črpalka, detektor, računalniška oprema za detekcijo in integracijo vrhov ter obdelavo podatkov. V zadnjih letih se je razvilo nekaj analitičnih postopkov za separacijo in detekcijo nitrita z ionsko izmenjevalno ali reverzno fazno visokotlačno tekočinsko kromatografijo. Detektorji običajno temeljijo na konduktometriji, indirektni fotometriji, UV-absorbciji, fluorometriji, kemiluminiscenci ali elektrokemijski detekciji (Di Matteo in Esposito, 1997; Jobgen in sod., 2007).

2.6 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Listeria*

2.6.1 Taksonomija

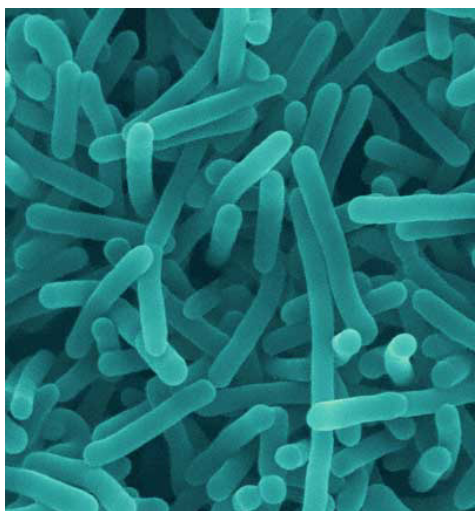
E. G. D. Murray, kanadski mikrobiolog, je izoliral bakterije vrste *Listeria monocytogenes* že leta 1926 in ta je bila mnogo let po njenem odkritju edina vrsta v rodu *Listeria*. Odnos bakterij rodu *Listeria* do drugih bakterij je ostal nejasen vse do leta 1970. Danes je znotraj rodu *Listeria* vključenih šest vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* in *L. grayi* (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Vse vrste rodu *Listeria* so si fenotipsko zelo podobne zaradi visoke genomske homologije. Med seboj jih ločimo z naslednjimi testi: hemoliza, proizvodnja kisline iz D-ksiloze, L-ramnoze, α -metil-D-manozida in manitola. Za ločevanje med vrstama *L. monocytogenes* in *L. innocua* so potrebni še dodatni testi, kot so: določanje aktivnosti fosfolipaze C, hidroliza D-alanin-p-nitroanilida in hidroliza DL-analin- β -naftilamida. Za rutinsko identifikacijo izolatov bakterij rodu *Listeria* iz živil se običajno uporabljajo fenotipski in genotipski markerji (Rocourt in Buchrieser, 2007).

2.6.2 Morfološke značilnosti

Bakterije rodu *Listeria* so majhne (široke 0,5 μm in dolge 1 do 2 μm), po Gramu pozitivne, gibljive paličaste bakterije z zaokroženim koncem, sicer nesporogene, a relativno zelo odporne proti neugodnim dejavnikom okolja. Bakterije se nahajajo posamezno ali kot kratke verige, ki so lahko razporejene v obliki črk V ali Y. Včasih se pojavijo kot koki ali diplokoki in se jih lahko zlahka zamenja s streptokoki. Po 3 do 5 dneh inkubacije se razvijejo dolge palčke velikosti 6 do 20 μm , ki se pogosto po Gramu obarvajo negativno, saj starejše kulture izgubijo sposobnost ohranjanja in tvorbe grampozitivnih celičnih sten. Tako se jih lahko zamenja za bakterije rodu *Hemophilus* (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Listerije so gibljive med 20 in 25 °C, pri 37 °C pa niso oziroma so zelo slabo gibljive (Rocourt in Buchrieser, 2007).



Slika 3: *Listeria monocytogenes* (Smith, 2008)

Na hranljivem agarju so kolonije po 24-urni inkubaciji okrogle, premera 0,2 do 0,8 mm, gladke, modrosive, prosojne in rahlo izbočene, s fino površino in celim, gladkim robom. Po 5- do 10-dnevni inkubaciji imajo kolonije premer 5 mm in več. Bakterije rodu *Listeria* rastejo dobro na večini bakterioloških gojišč. Rast se pospeši s prisotnostjo fermentabilnih sladkorjev, še posebej z glukozo. Na trdih gojiščih lahko te bakterije povzročijo oster vonj, ki je posledica tvorbe karboksilnih in hidroksi kislin ter alkoholov (Rocourt in Buchrieser, 2007).

2.6.3 Fiziološke in metabolične značilnosti

Bakterije rodu *Listeria* so aerobne, mikroaerofilne, fakultativno anaerobne, katalaza-pozitivne in oksidaza-negativne. Sladkorje razgrajujejo do kislin brez nastanka plina. Značilne biokemične reakcije listerij so: metil-rdeče pozitivno, Voges-Proskauer pozitivno, citrat negativno in indol negativno. Za vrsto *L. monocytogenes*, ki je patogena za človeka, je značilno, da povzroči β -hemolizo na krvnem agarju, izkorišča ramnozo in ne ksiloze, ter ima pozitiven test CAMP (Adamič in sod., 2003). Vse vrste rodu *Listeria* rastejo na glukozi. V aerobnih razmerah kot glavni končni produkti metabolizma nastajajo laktat, acetat in acetoin (Rocourt in Buchrieser, 2007).

2.6.4 Ekološke značilnosti

Bakterije rodu *Listeria* so v naravi zelo razširjene. Izolirali so jih iz različnih virov, na primer: iz zemlje, površinske in odpadne vode, iz razpadajoče vegetacije, živalskega blata, krme v silosih. Približno 5 do 10 % ljudi ima bakterije vrste *L. monocytogenes* v prebavnem traktu. Posledica ubikvitarnosti narave bakterij vrste *L. monocytogenes* je njihova pogosta prisotnost v človekovi prehranjevalni verigi. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja (Jeršek, 2007; Sauders in Wiedmann, 2007).

Listerije se razmnožujejo v širokem temperaturnem območju od 1 °C do 45 °C, pri vrednosti pH od 4,4 do 9,6, optimalno pri pH 7 in vrednosti a_w do 0,92. Sposobne so rasti v mediju, ki vsebuje 10 % NaCl, preživijo pa tudi višje koncentracije (do 20 %) (Sauders in Wiedmann, 2007). Zato jih razmeroma pogosto izoliramo v okolju. Rast bakterij je ustavljena ali močno inhibirana v anaerobnih razmerah in pri pH manjših od 5,6. Tudi pri temperaturah hlajenja je rast bakterij upočasnjena. Listerije se uničijo šele pri 80 °C v času 15 sekund; pri 22 °C se hitro razmnožujejo, preživijo sušenje, zmrzovanje, soljenje in razsoljevanje (Milohnoja, 2003).

Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v mnogih živilih je predvsem 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. Najbolj pogosto so bakterije vrste *L. monocytogenes* v naslednjih živilih: mleko, mehki siri, sladoled, pripravljena in ohlajena živila, surovo meso, predpripravljena perutnina, pašteta, surova zelenjava, solate, ribe, ribji izdelki, sendviči in riž (Jeršek, 2007).

Poleg velikih gospodarskih škod, ki jih povzroča v živinoreji (abortusi, pogini živali), predstavlja tudi veliko nevarnost za zdravje ljudi (Marinšek in Grebenc, 2002).

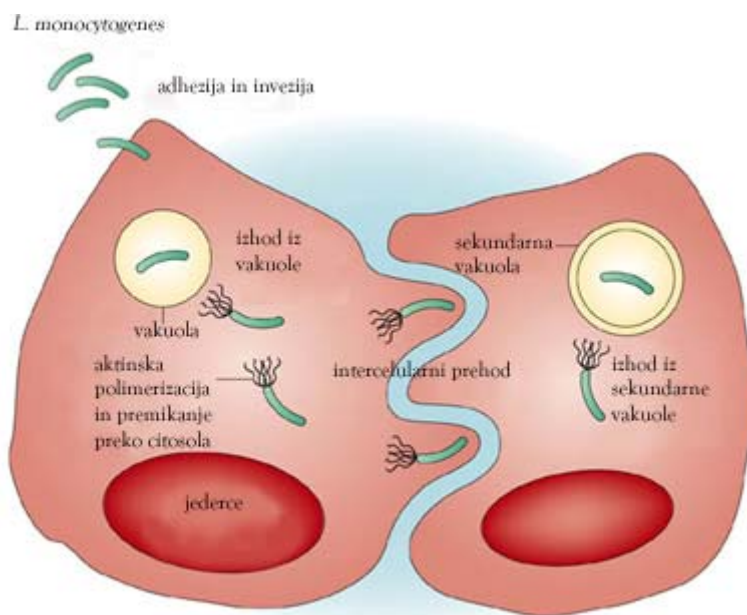
2.7 PATOGENOST BAKTERIJ RODU *Listeria*

V rodu *Listeria* so za človeka in živali patogene tri vrste: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* in *L. seeligeri*. Primeri okužbe z bakterijami vrste *L. seeligeri* so bili zelo redki tako pri živalih kot pri ljudeh. Prav tako so bili redki primeri okužbe ljudi z bakterijami vrste *L. ivanovii* (Jeršek, 2007; Sauders in Wiedmann, 2007). Večino listerioz pri ljudeh povzročajo bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki je poznana kot patogena bakterija od leta 1929, način prenosa pa je bil nejasen vse do 1980, ko se je pojavilo veliko izbruhov okužb, povzročenih z bakterijami vrste *L. monocytogenes* v hrani (Painter in Slutsker, 2007).

Listerioza, ki se lahko pojavi v različnih oblikah, je oportunistična infekcija, ki najbolj pogosto ogroža nosečnice, še nerojene otroke, dojenčke in starejše od 65 let. Zelo nevarna je za bolnike z levkemijo ali drugimi malignimi tvorbami, za tiste, ki se zdravijo s kortikosteroidi ali s sevanjem, za ljudi z motnjami imunskega sistema (npr. za ljudi z aidsom), za alkoholike, za ljudi s sladkorno boleznijo in za ljudi s protetičnimi srčnimi zaklopkami. Klinična znamenja listerioze so zelo različna (Jeršek, 2007).

Meningitis, septikemija in druge infekcije centralnega živčnega sistema so najbolj pogosti znaki pri pacientih z listeriozo (Ghandi in Chikindas, 2007). Ostali simptomi so še vročina, bolečine v mišicah in včasih gastrointestinalni simptomi, kot sta slabost in diareja. Kadar se okužba razširi na živčni sistem, se pojavi glavobol, otrdel vrat, zmedenost, težave z ravnotežjem, krči in splav pri nosečnicah.

Listerioza ima dolgo inkubacijsko dobo, kar otežuje identifikacijo patogena. Celice listerij dosežejo notranjost gostiteljske celice s fagocitozo tako, da se obdajo z membrano v vakuolo, ki po prehodu razpade in bakterije se lahko začnejo razmnoževati v citoplazmi gostiteljske celice. Za intercelularno gibanje uporabljajo polimerizacijo aktina. Pri prehodu v naslednjo gostiteljsko celico se obdajo z dvojno membrano (Ghandi in Chikindas, 2007).



Slika 4: Intercelularno gibanje bakterij vrste *L. monocytogenes* (Pamper, 2004)

Listerioza se na človeka prenaša alimentarno z nezadostno kuhanim mesom, mlekom in mlečnimi izdelki ter s svežimi jajci bolne perutnine, kontaktno (s sekreti in ekskreti bolnih živali), možna je tudi kontaminacija okolja (zemlja – uživanje surove zelenjave) (Marinšek in Grebenc, 2002).

Smrtnost zaradi listerioze je najvišja med bakterijskimi okužbami (med 20 in 50 %) s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca zelo nizka, kljub dejstvu, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* pogosto pojavljajo v različnih živilih (Jeršek, 2007). Infekcijska doza je že 100 bakterij (Milohnoja, 2003).

Bolezen se pojavlja posamično pa tudi epidemično. V zadnjih desetletjih obolevnost ljudi za listeriozo v svetu postopoma narašča (Gandhi in Chikindas, 2007). V Sloveniji je bilo 31 prijavljenih primerov bolezni v letih od 1994 do 2004, med katerimi so se trije primeri končali s smrtnim izidom (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006). Problematika kontaminiranosti živil živalskega izvora z bakterijami vrste *L. monocytogenes* je pri nas razmeroma malo raziskana (Marinšek in Grebenc, 2002).

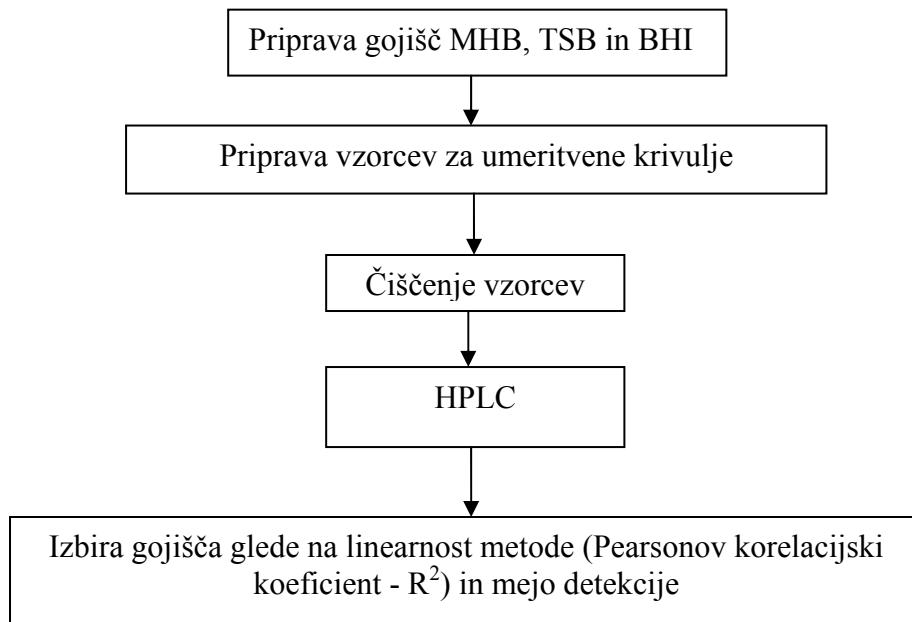
3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

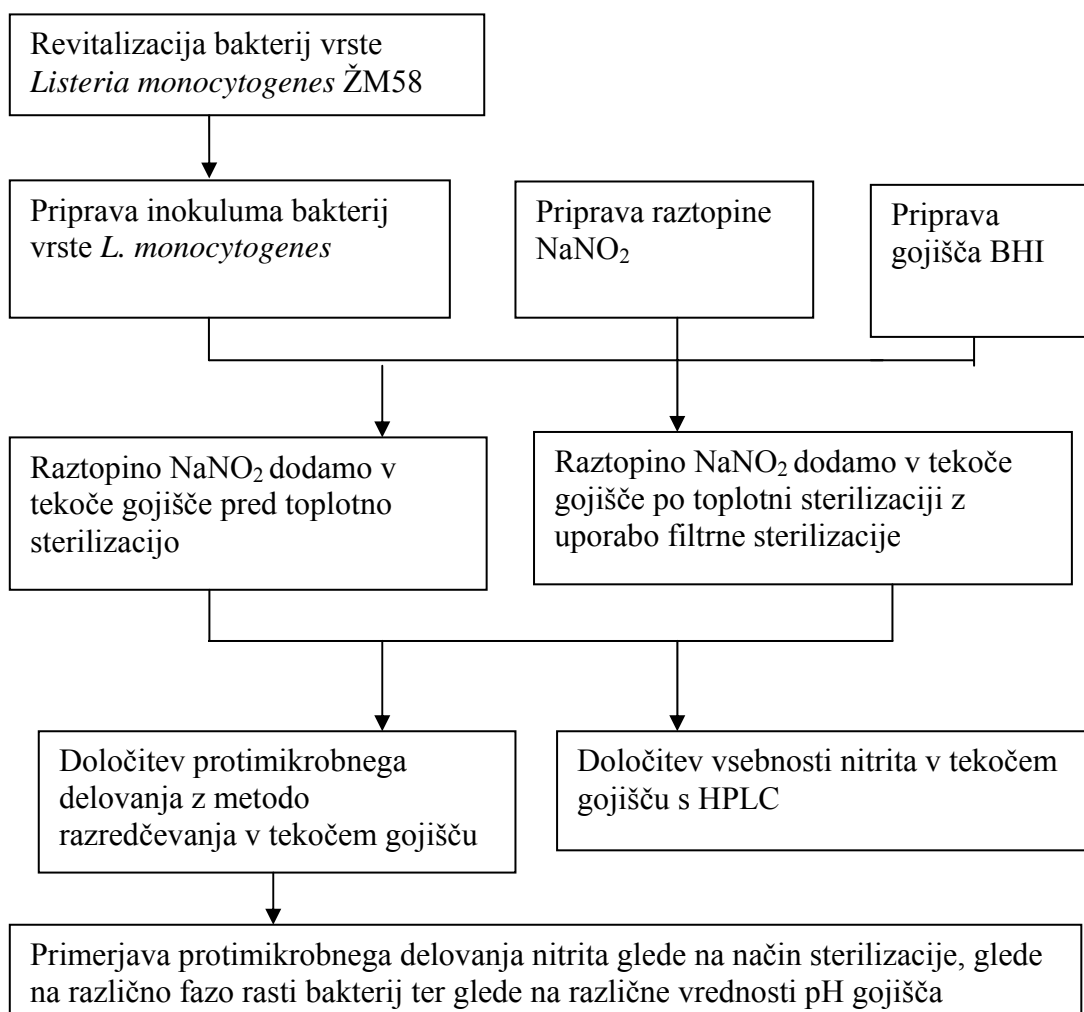
Namen našega dela je bil proučiti protimikrobno delovanje različnih koncentracij natrijevega nitrita v kombinaciji z različnimi vrednostmi pH na rast bakterij vrste *Listeria monocytogenes* v različnih fazah rasti. Raztopino NaNO_2 smo gojišču dodali pred in po toplotni sterilizaciji gojišča in tako primerjali vpliv temperature na učinkovitost NaNO_2 . Pri vseh eksperimentih smo določali vsebnost nitrita v gojišču s HPLC, za kar je bilo potrebno razviti in validirati metodo.

Preden smo dejansko začeli s proučevanjem protimikrobnega učinka nitrita, smo izvedli predposkus, kjer smo določili gojišče, ki je najbolj ustrezalo naši metodi določanja nitrita s sistemom HPLC. Izbirali smo med gojišči MHB, TSB in BHI ter na koncu izbrali tako, pri katerem se je metoda izkazala za najbolj linearno in je bila meja detekcije najnižja.

Potek predposkusa je shematsko prikazan na sliki 5, potek eksperimentalnega dela pa na sliki 6.



Slika 5: Shema predposkusa



Slika 6: Shema eksperimentalnega dela

Protimikrobno delovanje nitrita smo določali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, ki je široko uporabna in referenčna metoda za določanje učinkovitosti protimikrobnih snovi.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili bakterije vrste *Listeria monocytogenes* ŽM58 (referenčni sev, Inštitut za higieno in mikrobiologijo, Wuerzburg, Nemčija, serotip 4b) iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Selektivno gojišče ALOA

Sestavine:

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

Priprava:

35,3 g gojišča ALOA smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C, dodali selektivni dodatek ALOA ter 5 ml 96 % etanola in sterilne destilirane vode v razmerju 1:1. Tako pripravljeno gojišče smo razlili v sterilne petrijevke.

Neselektivno gojišče TSA

Sestavine:

- triptični soja agar (TSA) (Oxoid, CM0131, Anglija),
- dikalijhidrogenfosfat (K_2HPO_4) (Kemika, 1116108, Hrvaška),
- D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška),
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202, Italija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 20 g gojišča TSA, 1,25 g K_2HPO_4 , 1,25 g D-(+)-glukoza in 3 g kvasnega ekstrakta ter dodali 500 ml destilirane vode. Vse smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Neselektivno gojišče BHI

Sestavine:

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

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 19 g gojišča BHI in dodali 500 ml destilirane vode. Nato smo vsebino dobro premešali in gojišče sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Neselektivno gojišče TSB

Sestavine:

- triptični soja bujon (TSB) (Oxoid, CM0129, Anglija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 15 g gojišča TSB, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Neselektivno gojišče MHB

Sestavine:

- osnovni medij Mueller Hinton (Oxoid, CM0405, Anglija).

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo odtehtali 10 g gojišča Mueller Hinton, dodali 500 ml destilirane vode in dobro premešali. Nato smo gojišče sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- KH_2PO_4 (Kemika, 11161, Hrvaška).

Priprava:

3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 ml destilirane vode (pH=7,2). 1,25 ml te raztopine smo razredčili v 1000 ml destilirane vode. Po 9 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v epruvete in jih nato sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

3.2.3 Natrijev nitrit

Sestavine:

- NaNO_2 (Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover, 31444, Nemčija).

Priprava:

V 100 ml bučko smo zatehtali 1 g NaNO_2 in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Vsebinsko smo dobro premešali, da se je nitrit v vodi raztopil. Dobili smo raztopino s

koncentracijo 10000 ppm. Tako pripravljeno raztopino smo dodali v določenih volumnih v gojišče BHI in pripravili gojišča z naslednjimi koncentracijami nitrita:

- 50 $\mu\text{g NaNO}_2$ /ml BHI (50 ppm)
0,2 ml raztopine nitrita (10000 ppm) smo prenesli v tekoče gojišče BHI (40 ml) in tako dosegli končno koncentracijo 49,8 ppm. V nadaljnem delu smo to koncentracijo zaokrožili na 50 ppm.

- 150 $\mu\text{g NaNO}_2$ /ml BHI (150 ppm)
0,6 ml raztopine nitrita (10000 ppm) smo prenesli v tekoče gojišče BHI (40 ml) in tako dosegli končno koncentracijo 148 ppm.

- 1000 $\mu\text{g NaNO}_2$ /ml BHI (1000 ppm)
4 ml raztopine nitrita (10000 ppm) smo prenesli v tekoče gojišče BHI (40 ml) in tako dosegli končno koncentracijo 909 ppm.

3.2.4 Reagenti za določanje vsebnosti nitrita

- **Nasičena raztopina boraksa $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$** (Kemika, 100589, Hrvaška)

- **Carezzova raztopina II**

Priprava:

300 g cinkovega sulfata $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.08883.1000, Nemčija) smo raztopili v 1000 ml destilirane vode.

- **Griessov reagent I**

Priprava:

0,6 g sulfanilne kisline (Merck, 1. 686.02500, Nemčija) smo raztopili v malo vode v 100 ml bučki, dodali 20 ml ledocetne kisline (Merck, 1.00063.2500, Nemčija) ter dopolnili z destilirano vodo do oznake 100 ml.

- **Griessov reagent II**

Priprava:

0,03 g alfa-naftil amina (Merck, 3638167, Nemčija) smo dodali 70 ml destilirane vode, zavreli, in vroče filtrirali v 100 ml bučko. Filtratu smo dodali 20 ml led očetne kisline ter dopolnili z destilirano vodo do oznake 100 ml. Tako pripravljen Griessov reagent II smo pustili v temi.

3.2.5 Ostale kemikalije

- Etanol 96 % (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)
- HCl (Merck, 1.00317.100, Nemčija)
- Ocetna kislina (Merck, 1.00063.250, Nemčija)
- Metanol (Merck, 1.06007.250, Nemčija)
- Pufer (pH 6 in 7)

3.2.6 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, so prikazane v preglednici 4.

Preglednica 4: Aparature

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Tehtnica	Sartorius analytic	Sartorius, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill1300	Sanyo, Japonska
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Yellowline TTS2	IKA, ZDA
Stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
pH-meter	HI8519N	Hanna Instruments, Portugalska
Kolona	Gemini C18	Phenomenex, ZDA
sistem HPLC Agilent 1100, sestavljen iz: črpalke, vakuumskega razplinjevalnika, avtomatskega podajalnika vzorcev, termostata za kolono, detektor z diodno matriko (DAD)	G1312A G1379A G1330B G1316A G1315B	Agilent, ZDA

Poleg aparatur, ki so navedene v preglednici 4, smo uporabljali še filtre za enkratno uporabo s porami velikosti 0,2 μm (Sartorius, 16534, Nemčija), injekcijske brizgalke (2,5 ml), petrijeve plošče (Labor Tehnika Golias, Slovenija), cepilne zanke, parafilm (PM 992, American National Can), filter papir, avtomatske pipete in nastavke (P10, P100, P1000, Gilson, Francija) ter ostalo steklovino (viale, epruvete, pipete, steklenice, bučke, erlenmajerice, lije).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM58 so bile pred začetkom eksperimentalnega dela shranjene pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kot suspenzija glicerola (0,15 ml) in čiste kulture (0,85 ml v tekočem gojišču BHI). Bakterije smo odtajali in jih prenesli v gojišče BHI (9 ml) ter vsebino premešali na vrtničnem mešalu. Sledila je 24-urna inkubacija na stresalniku (100 obratov/min) pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Priprava inokuluma

0,1 ml 24-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 smo s cepilno zanko prenesli iz tekočega gojišča BHI na selektivno gojišče ALOA ter inkubirali 48 ur pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zrasle so za bakterije vrste *L. monocytogenes* značilne modre kolonije z motno cono. Iz gojišča ALOA smo nato s cepilno zanko prenesli eno kolonijo na gojišče TSA in 48 ur inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med eksperimentalnim delom smo vsak teden znova precepili bakterije vrste *L. monocytogenes* iz gojišča TSA na novo gojišče TSA, inkubirali 48 ur pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter nato kulturo na gojišču shranili v hladilnik.

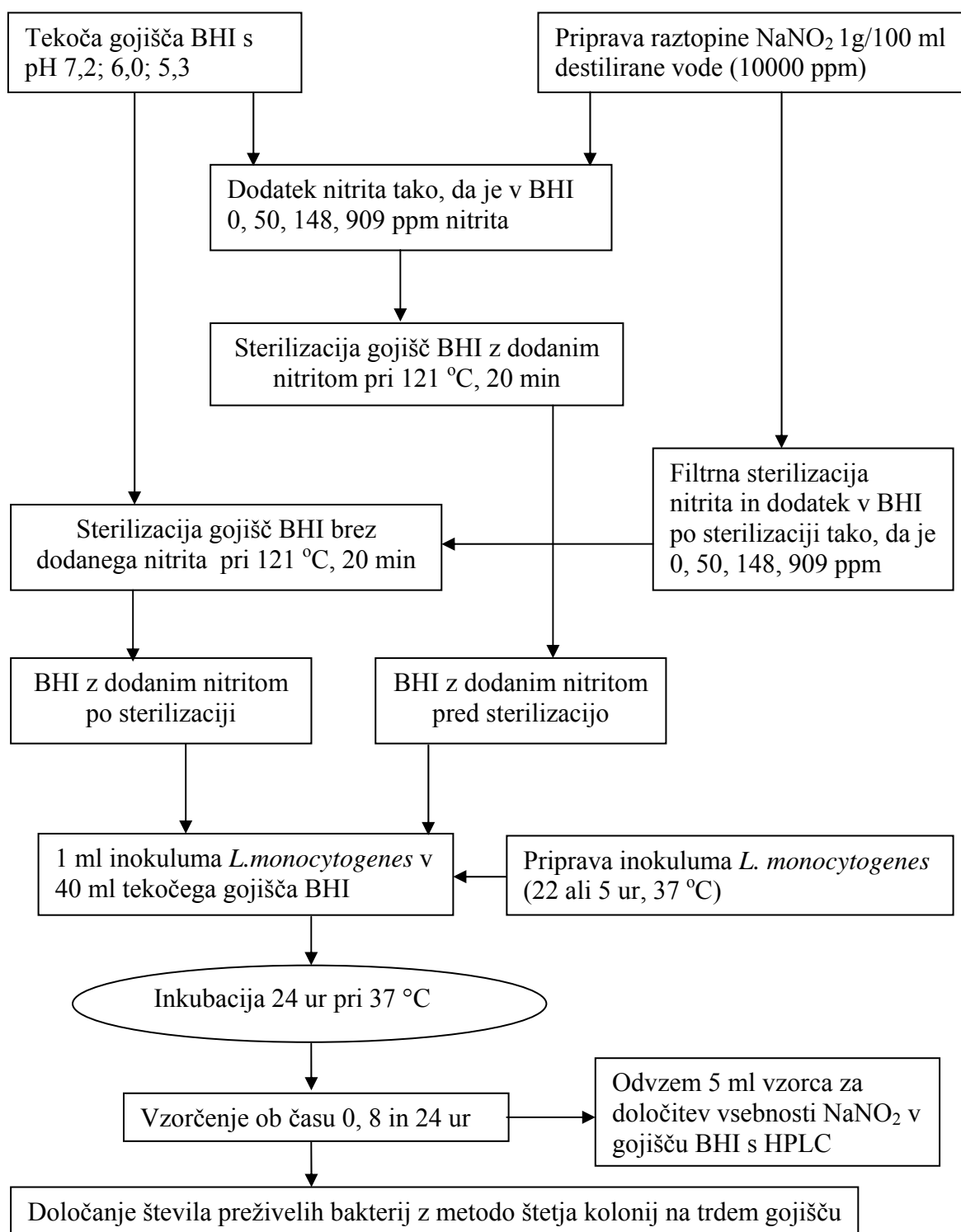
Po 48 urah smo eno kolonijo iz gojišča TSA s cepilno zanko prenesli v 4 ml gojišča BHI, vsebino premešali na vrtničnem mešalniku in 22 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na takšen način smo pripravili čisto kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI. Ker smo predvidevali, da so bakterije zrasle do koncentracije 10^8 cfu/ml, smo 22-urno kulturo razredčili po Kochu do koncentracije 10^4 cfu/ml in 1 ml tako razredčene kulture prenesli v 40 ml gojišča BHI. Točno število bakterij smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

3.3.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču BHI

3.3.3.1 Izvedba metode

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču BHI smo določili protimikroben učinek nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Gojišču BHI z določeno koncentracijo nitrita, dodanega pred oziroma po sterilizaciji gojišča ter pri določeni vrednosti pH, smo dodali 1 ml pripravljene bakterijske kulture in suspenzijo inkubirali 24 ur pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rast oziroma inhibicijo rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* in vsebnost NaNO_2 smo določali ob času 0, 8 in 24 ur. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Shema določanja preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI z različnimi koncentracijami NaNO₂ in z različnimi Ph

Raztopino natrijevega nitrita (10000 ppm) smo dodali gojišču BHI na dva načina:

A) pred sterilizacijo gojišča BHI v avtoklavu: pripravili smo gojišče BHI s tremi različnimi koncentracijami NaNO₂: v prvem primeru smo iz bučke prenesli 0,2 ml raztopine NaNO₂ v predhodno pripravljene steklenički (2 paralelki), ki sta vsebovali 40 ml nesterilnega gojišča BHI. Tako smo dobili 50 µg NaNO₂ /ml BHI (50 ppm). V drugem primeru smo iz bučke prenesli 0,6 ml raztopine NaNO₂ v steklenički, ki sta vsebovali 40 ml nesterilnega gojišča BHI in tako dobili 148 µg NaNO₂ /ml BHI (148 ppm). V tretjem primeru smo iz bučke prenesli 4 ml raztopine NaNO₂ v steklenički s 40 ml nesterilnega gojišča BHI. Dobili smo 909 µg NaNO₂ /ml BHI (909 ppm). Vsa gojišča BHI z dodanim nitritom smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C;

B) po sterilizaciji gojišča BHI v avtoklavu: raztopino NaNO₂ (10000 ppm) smo sterilizirali tako, da smo jo filtrirali preko filtra z velikostjo por 0,2 µm. Nato smo za dosego koncentracije 50 µg NaNO₂ /ml BHI (50 ppm) prenesli 0,2 ml sterilne raztopine NaNO₂ v predhodno pripravljene steklenički, ki sta vsebovali 40 ml že sterilnega gojišča BHI. Za dosego 148 µg NaNO₂ /ml BHI (148 ppm) smo prenesli 0,6 ml raztopine NaNO₂, za dosego 909 µg NaNO₂ /ml BHI (909 ppm) pa 4 ml sterilne raztopine NaNO₂ v predhodno pripravljene steklenički, ki sta vsebovali 40 ml sterilnega gojišča BHI.

3.3.3.2 Določanje preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* iz različnih faz rasti v gojišču BHI z dodanim NaNO₂

Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* smo določili v gojišču BHI s 50 ppm, 148 ppm in 909 ppm NaNO₂, ki smo ga dodali v gojišče pred toplotno sterilizacijo oziroma po toplotni sterilizaciji gojišča s filtrno sterilizacijo. Kot kontrolni vzorec smo uporabili gojišče BHI brez dodatka raztopine NaNO₂.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske in stacionarne faze rasti v gojišču BHI z dodanim NaNO₂ pred toplotno sterilizacijo**

V gojišča BHI z dodanim NaNO₂ pred sterilizacijo smo dodali 1 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* iz eksponentne faze rasti (5 ur stara kultura) oziroma iz stacionarne faze rasti (22 ur stara kultura). Gojišča smo nato 24 ur inkubirali pri 37 °C. Vzorčili smo ob začetku inkubacije, po osmih urah inkubacije ter po končani inkubaciji in tako določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA ter vsebnost NaNO₂ v gojišču s HPLC.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI iz logaritemske in stacionarne faze rasti z dodanim NaNO₂ po toplotni sterilizaciji**

V gojišču BHI z dodanim NaNO₂ po sterilizaciji smo dodali 1 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* iz eksponentne faze rasti (5 ur stara kultura) oziroma iz stacionarne faze rasti (22 ur stara kultura). Inkubacija in nadaljnji postopek metode je enak kot pri dodanem nitritu pred avtoklaviranjem.

3.3.3.3 Določanje preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI z znižanim pH gojišča in z dodanim NaNO₂

Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* smo določili v gojišču BHI, ki smo mu znižali vrednost pH na 6,0 oziroma 5,3 z 0,1 M HCl (pred uporabo smo pH-meter umerili s pufrnima raztopinama s pH 6 in 7). Nato smo pred oziroma po toplotni sterilizaciji gojišča s filtrno sterilizacijo gojišču dodali NaNO₂, da smo dosegli koncentracijo 50 ppm, 148 ppm in 909 ppm NaNO₂. Kot kontrolni vzorec smo uporabili gojišče BHI, ki smo mu znižali vrednost pH na 6,0 oziroma 5,3 z 0,1 M HCl, vendar brez dodatka raztopine NaNO₂.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI z znižanim pH na 6,0 in 5,3 z dodanim NaNO₂ pred toplotno sterilizacijo**

V gojišču BHI z znižanim pH na 6,0 oziroma 5,3 smo dodali določen volumen NaNO₂ pred sterilizacijo. Nato smo dodali 1 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti (22 ur stara kultura). Gojišča smo nato 24 ur inkubirali pri 37 °C. Vzorčili smo ob začetku inkubacije, po osmih urah inkubacije ter po končani inkubaciji in tako določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA ter vsebnost NaNO₂ v gojišču s HPLC.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI z znižanim pH na 6,0 in 5,3 z dodanim NaNO₂ po toplotni sterilizaciji**

Gojišču BHI smo najprej znižali vrednost pH na 6,0 oziroma 5,3 in po sterilizaciji dodali določen volumen NaNO₂ ter 1 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti (22 ur stara kultura). Postopek, metode, inkubacije ter določanje vsebnosti nitrita v gojišču so enaki kot pri dodanem nitritu pred toplotno sterilizacijo.

3.3.4 Določitev števila preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču

Za določitev števila bakterij smo uporabili metodo štetja kolonij na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003). V 9 ml fiziološke raztopine smo dodali 1 ml vzorca, v katerem smo določali število bakterij in vsebino premešali na vrtničnem mešalu. Razredčevanje vzorca smo po enakem postopku ponovili do ustrezne razredčitve. 0,1 ml ustreznega razredčenega vzorca smo nato v dveh paralelkah cepili na že vnaprej razlito gojišče TSA ter ga razporedili po površini s sterilno palčko. Gojišče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C.

3.3.4.1 Izračun števila bakterij v gojišču

Po inkubaciji smo na gojišču TSA prešteli zrasle kolonije ter izračunali število preživelih bakterij N , pri čemer smo upoštevali le gojišča, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij. Pri izračunu smo uporabili enačbo 3.1:

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

Legenda: $\sum C$ je vsota vseh kolonij na števni ploščah; n_1 : število prešteti plošč pri prvi razredčitvi; n_2 : število prešteti plošč pri drugi razredčitvi; d : razredčitveni faktor pri prvi upoštevani razredčitvi; N : število preživelih bakterij v cfu/ml

3.3.5 Vrednotenje protimikrobnega delovanja nitrita

Protimikrobno delovanje nitrita na bakterije vrste *L. monocytogenes* smo ovrednotili na dva načina (Pokorn, 1990):

- A) letalnost smo izračunali v primerih, ko je imel nitrit na bakterije vrste *L. monocytogenes* baktericiden učinek

$$\lambda = \frac{\log_2 N_0 - \log_2 N_{24}}{\log_2 N_0} \quad \dots (3.2)$$

Legenda: λ je baktericiden učinek nitrita na rast bakterije, N_0 : začetno število bakterij (log cfu/ml), N_{24} : število bakterij po 24 urah (log cfu/ml)

B) bakteriostatičen učinek smo izračunali v primerih, ko je imel nitrit na *L. monocytogenes* zaviralen učinek

$$N_{24} = \frac{\log N_{24} - \log N_0}{\log 2} \quad \dots (3.3)$$

Legenda: N_{24} je število generacij (delitev) bakterij pri rasti v gojišču z dodatkom natrijevega nitrita z bakteriostatičnim delovanjem po 24 urah, N_0 : začetno število bakterij (log cfu/ml) v gojišču z dodanim natrijevim nitritom, N_{24} : število bakterij po 24 urah (log cfu/ml) v gojišču z dodanim natrijevim nitritom

$$N_{24,k} = \frac{\log N_{24,k} - \log N_{0,k}}{\log 2} \quad \dots (3.4)$$

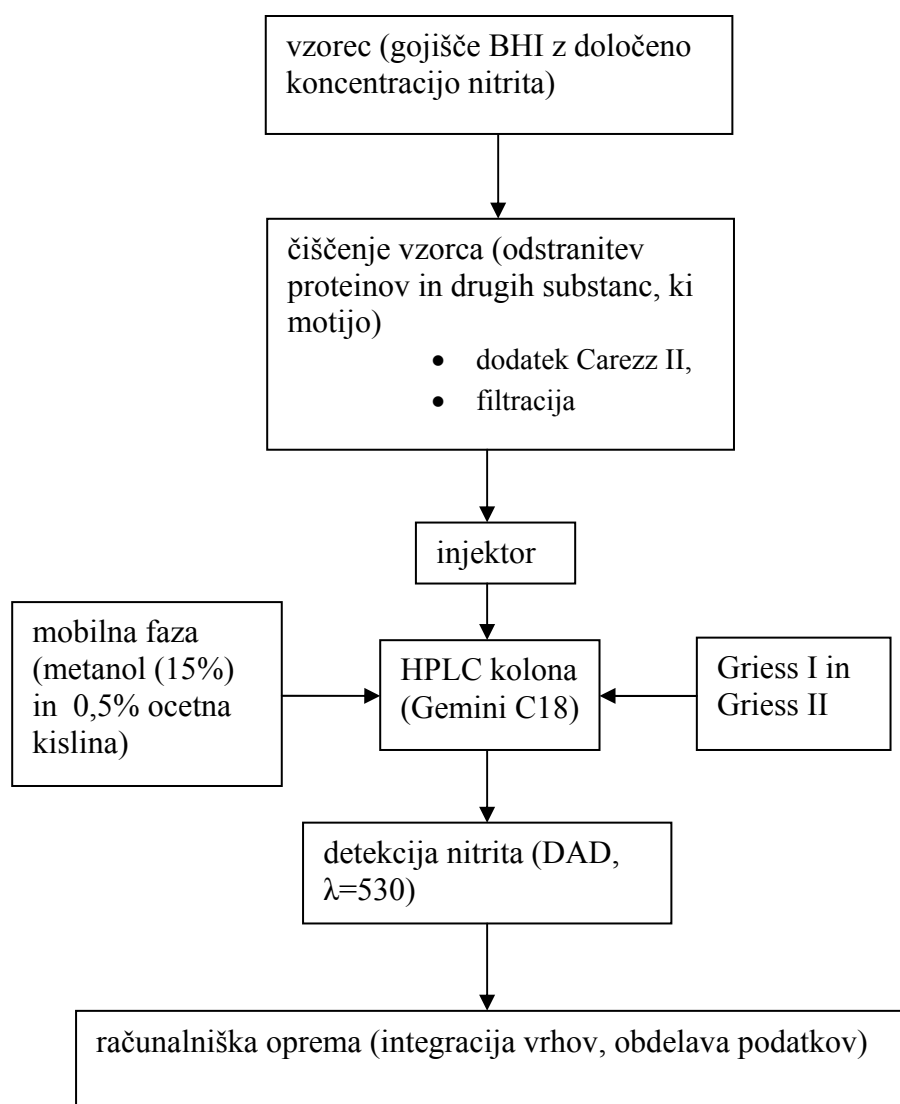
Legenda: $N_{24,k}$ je število generacij (delitev) bakterij pri rasti v gojišču brez dodanega natrijevega nitrita po 24 urah, $N_{0,k}$: začetno število bakterij (log cfu/ml) v gojišču brez dodanega natrijevega nitrita, $N_{24,k}$: število bakterij po 24 urah (log cfu/ml) v gojišču brez dodanega natrijevega nitrita

$$\eta = \frac{(N_{24} - N_{24,k})}{N_{24,k}} \quad \dots (3.5)$$

Legenda: η je bakteriostatičen učinek snovi na rast bakterij, $N_{24,k}$: število generacij (delitev) bakterij pri rasti v gojišču brez dodanega natrijevega nitrita po 24 urah, N_{24} : število generacij (delitev) bakterij pri rasti v gojišču z dodatkom natrijevega nitrita z bakteriostatičnim delovanjem po 24 urah

3.3.6 Določanje vsebnosti NaNO_2 , dodanega v gojišče BHI s HPLC

Preden smo začeli z eksperimentalnim delom diplomskega dela, kjer smo določili protimikroben učinek nitrita, smo morali razviti novo metodo za določanje nitrita v gojišču z metodo HPLC. Izvedli smo tudi predposkus, s katerim smo določili gojišče, ki je imelo pri merjenju najmanj interferenc oziroma se je pri merjenju izkazalo za najbolj linearno in je imelo nizko mejo detekcije. Izmed treh gojišč (BHI, TSB in MHB) smo izbrali gojišče BHI. Potek dela je shematsko prikazan na sliki 8.



Slika 8: Shema določanja vsebnosti NaNO_2 v tekočem gojišču BHI s HPLC

3.3.6.1 Izvedba metode

Vsebnost nitrita v vzorcih gojišča BHI smo določali z modificirano metodo (AOAC Official Method 973.31, 1999). Metoda je zasnovana na pojavu rdeče barve produkta, ki nastane med reakcijo dušikove (III) kisline z alfa-naftil-aminom in sulfanilno kislino v prisotnosti oetne kisline. Nadaljnja določitev vsebnosti produkta rdeče barve je potekala s HPLC.

3.3.6.2 Priprava vzorca

V 50 ml merilno bučko smo zatehtali 5 g gojišča BHI, dodali 2,5 ml nasičene boraksove raztopine in okoli 25 ml vroče destilirane vode, vsebino dobro premešali in segrevali 15 minut v vreli vodni kopeli. Takoj za tem smo med mešanjem po kapljicah dodajali 0,5 ml Carrez II raztopine, dobro ohladili, dopolnili z vodo do oznake in filtrirali najprej z navadnim filter papirjem, nato še s filtrom za filtrno sterilizacijo z velikostjo por 0,2 μm . Tako dobljeni filtrat smo prenesli v vialo (približno 1 ml). Vzorci so bili pripravljani za nadaljnje analize z visokotlačno tekočinsko kromatografijo.

3.3.6.3 Pogoji določanja vsebnosti prostega NaNO_2 s HPLC-DAD

Analiza HPLC je bila opravljena na sistemu Agilent 1100, sestavljenim iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A), avtomatskega podajalnika vzorcev (Agilent 1100, G1330B), termostata za kolono (Agilent 1100, G1316A) in DAD detektorja (Agilent 1100, G1315B). Uporabili smo kolono Gemini C18 (3 μm , 150 mm \times 2 mm i.d.) znamke Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00F-4439-B0). Prosti nitrit smo določili s primerjavo retencijskega časa (12,3 min) in spektra kompleksa, ki je nastal med reakcijo standarda NaNO_2 z Griessovim reagentom I in Griessovim reagentom II. Kromatografija je potekala izokratsko pri pretoku mobilne faze 0,3 ml/min, pri čemer je bila mobilna faza A metanol (15 %) in mobilna faza B 0,5 % oetna kislina v vodi (85 %). Čas ločbe je bil 16 minut. Avtomatski podajalnik vzorcev je bil programiran tako, da je zmešal 5 μl Griessovega reagenta I, 5 μl Griessovega reagenta II in 10 μl vzorca ter po dveh minutah injiciral mešanico na kolono pri temperaturi kolone 25 °C. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 530 nm.

3.3.6.4 Priprava umeritvenih krivulj

Umeritvena krivulja A: vpliv matriksa analiziranega vzorca (gojišča) na mejo detekcije smo preverili tako, da smo v vsako epruveto odpipetirali 10 ml gojišča in jih pripravili po

postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.6.2. Sledil je še dodatek različnih volumnov predhodno pripravljene standardne raztopine NaNO₂ in tako smo dobili raztopine s koncentracijami 0, 50, 150, 200, 400, 600, 800 in 1000 µg NaNO₂ /ml gojišča, ki smo jim nato določili vsebnost NaNO₂ z metodo HPLC-DAD.

Umeritvena krivulja B: Za pripravo smo uporabili 10 ml gojišča BHI in odpipetirali določen volumen osnovne raztopine (10000 ppm NaNO₂) in tako dobili standardne raztopine s koncentracijami 0, 50, 150, 200, 400, 600, 800 in 1000 µg NaNO₂ /ml gojišča. Tako dobljene standardne raztopine smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.3.6.3 in nato v teh vzorcih izmerili vsebnost prostega nitrita s HPLC.

3.3.6.5 Ponovljivost metode

Ponovljivost med paralelkami smo določili tako, da smo v vzorcih gojišča BHI (pH 7,2) z dodanim nitritom po avtoklaviranju gojišča, določili vsebnost nitrita v šestih paralelkah. Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficienta variabilnost (KV).

3.3.6.6 Linearnost metode

O linearnosti metode govorimo, če je zveza $y = kx + n$ v določenem koncentracijskem območju med koncentracijo komponente v vzorcu in odzivom linearna. Linearnost metode smo določili s pripravo dveh umeritvenih krivulj ter jo ovrednotili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (R^2).

- Umeritvena krivulja A – linearnost vpliva matriksa.
- Umeritvena krivulja B – linearnost vpliva postopka in matriksa.

3.3.6.7 Meje detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (Chem Station) smo po metodi »Peak to Peak« določili razmerje (»Signal to noise« – S/N) med signalom in šumom opazovanega nitrita v gojišču. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovanega nitrita v gojišču BHI, pri kateri je razmerje S/N = 3 (detekcije) oziroma S/N = 10 (kvantifikacije).

3.3.7 Statistična obdelava podatkov

Rezultate, pridobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, smo pripravili in uredili v računalniškem programu Microsoft Office Exel 2003.

Vse analize smo izvedli v dveh paralelkah in dveh ali treh ponovitvah. Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost \bar{X} s standardnim odklonom σ_x , ki smo ju dobili s pomočjo enačb:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (\dots 3.6)$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n X_i^2 \right) - \bar{X}^2} \quad (\dots 3.7)$$

Legenda: \bar{X} je povprečna vrednost; n: število vzorcev; X_i : vrednost i-te ponovitve; σ_x : standardni odklon

4 REZULTATI

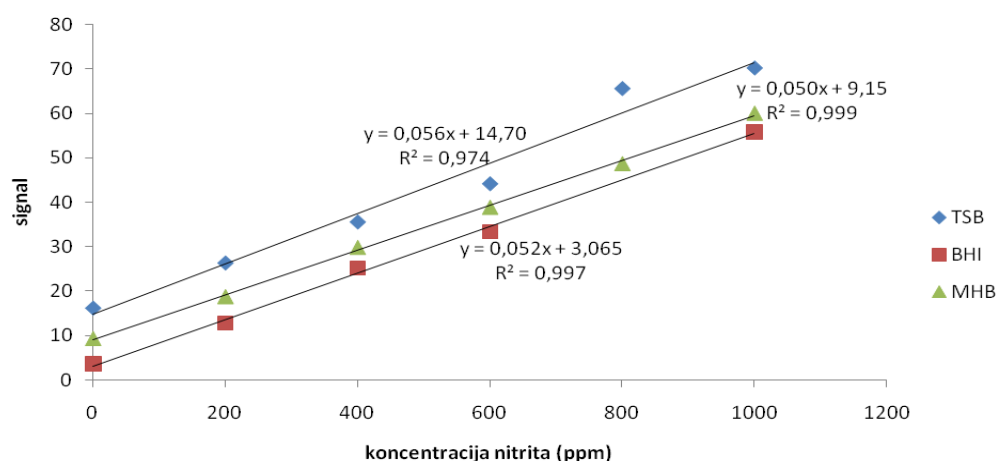
Predpostavili smo, da bo imel nitrit protimikroben učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes*. Inhibicijo rasti oziroma bakteriostatično in baktericidno delovanje dodatka nitrita v tekoče gojišče smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Nitrit smo dodali na dva načina:

- pred toplotno sterilizacijo gojišča,
- po toplotni sterilizaciji gojišča s filtrno sterilizacijo.

Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in v dveh ali treh ponovitvah. Vsebnost nitrita, dodanega v gojišče pred oziroma po njegovi toplotni sterilizaciji, smo določili z novo metodo, ki jo je bilo potrebno najprej razviti in validirati.

4.1 RAZVOJ ANALITSKE METODE

Pred pričetkom eksperimentalnega dela diplomskega dela, kjer smo ovrednotili protimikroben učinek nitrita, smo morali najprej določiti mikrobiološko gojišče, ki je najbolj ustrezalo novi metodi določanja vsebnosti nitrita. Primerjali smo tri tekoča neselektivna gojišča: BHI, MHB in TSB. Iz rezultatov na sliki 9 je razvidno, da je glede na Pearsonov korelacijski koeficient (R^2) in mejo detekcije gojišče BHI najbolj ustrezno (najnižja meja detekcije in visok R^2), zato smo pri eksperimentalnem delu uporabljali to gojišče.



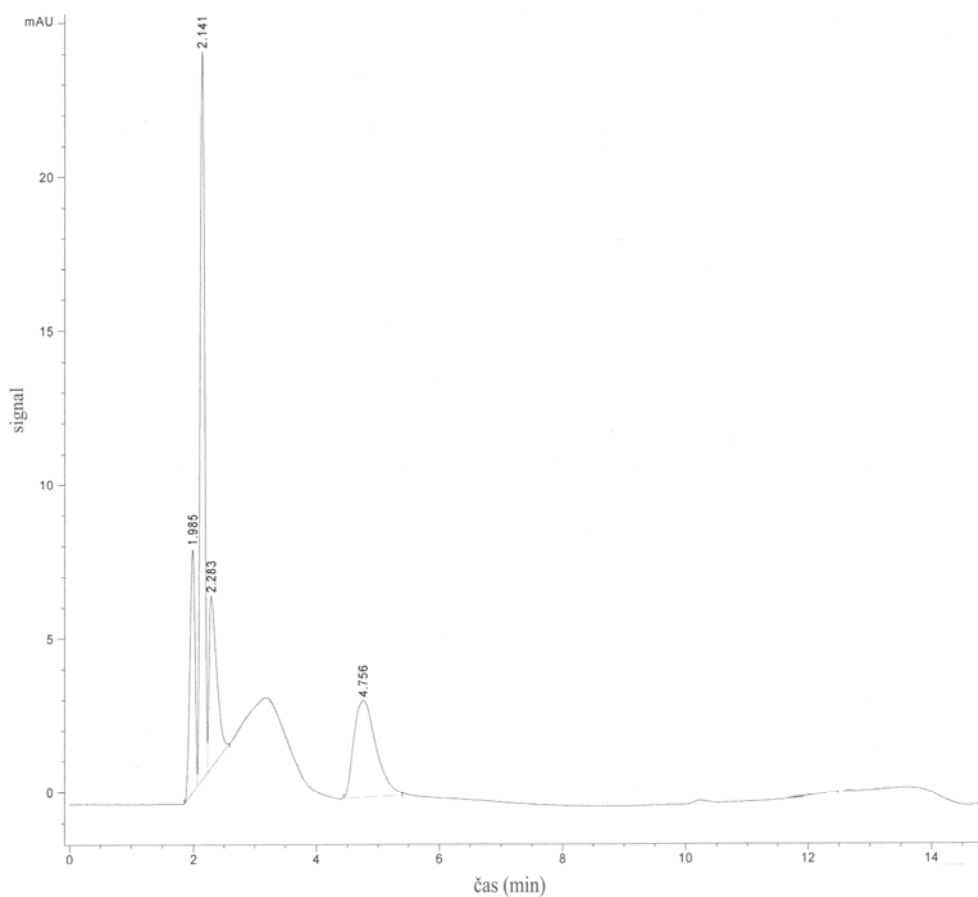
Slika 9: Umeritvene krivulje za nitrit v gojiščih BHI, TSB in MHB

4.1.1 Validacija analitske metode

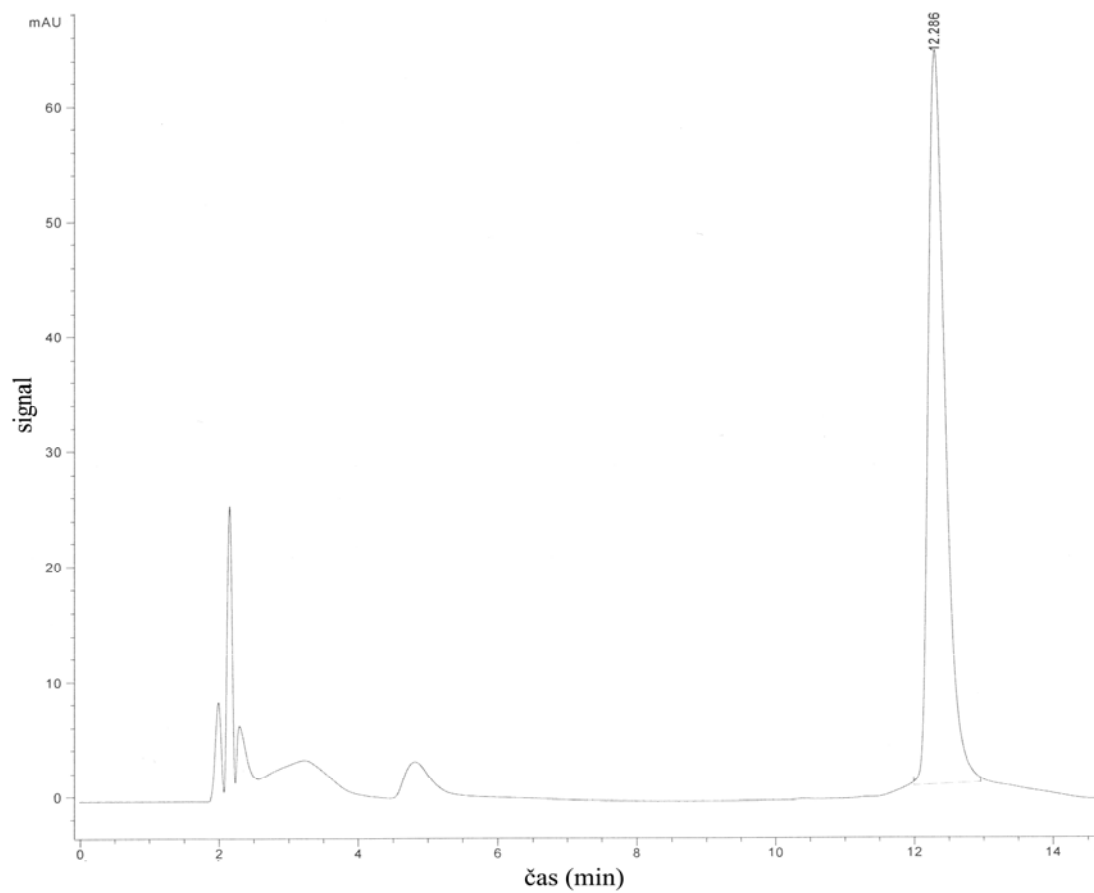
4.1.1.1 Selektivnost

Selektivnost oziroma specifičnost metode smo določili z zaporednim injiciranjem sledečih raztopin v HPLC sistem:

- reagenti brez gojišča BHI in nitrita (slika 10),
- standardni dodatek nitrita (slika 11),
- vzorec gojišča BHI s 50 ppm nitrita + standardni dodatek (150 ppm) nitrita (slika 12).

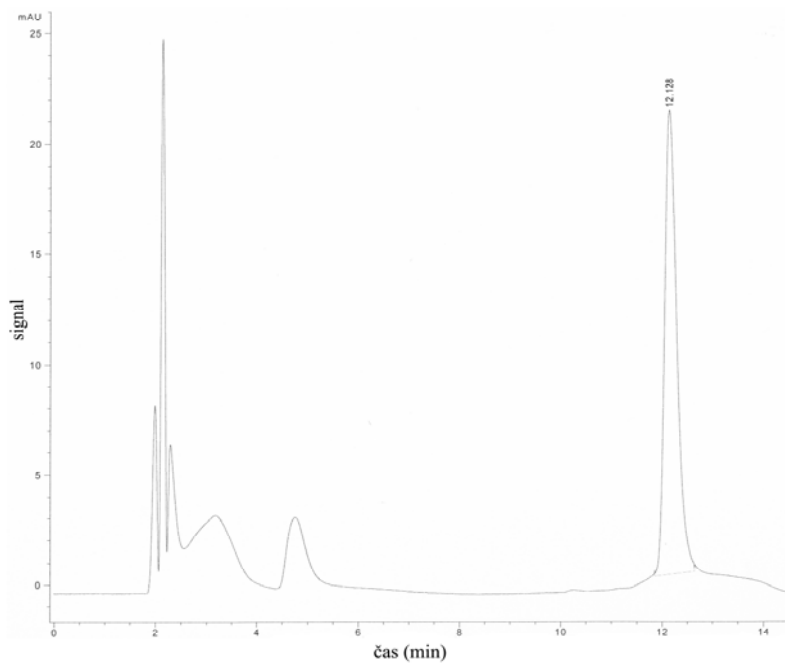


Slika 10: Signal reagentov brez gojišča BHI in nitrita (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)

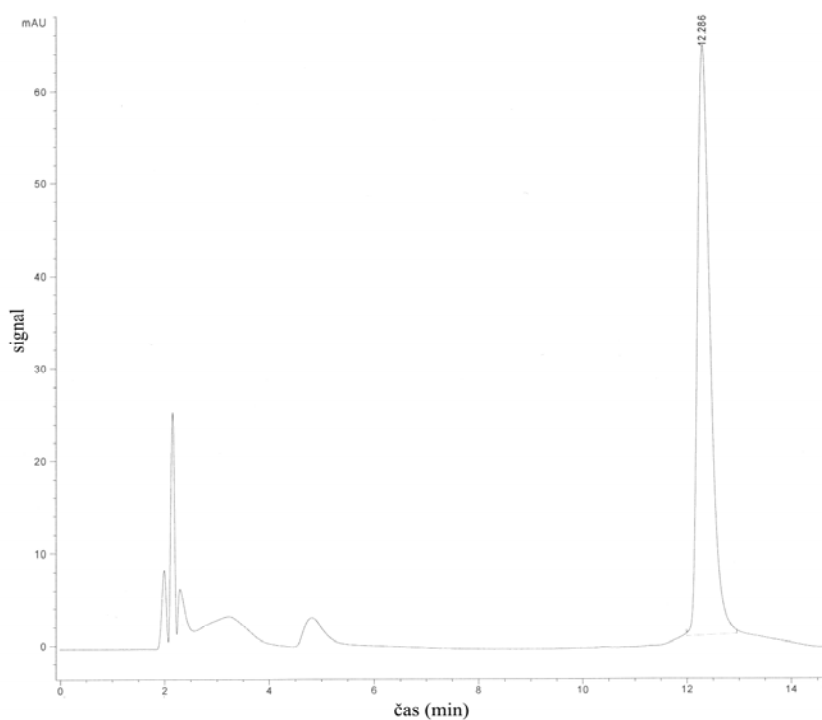


Slika 11: Signal standardnega dodatka nitrita (150 ppm) (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)

A



B



Slika 12: Primerjava kromatogramov: A – gojišče BHI s 50 ppm nitrita; B – gojišče BHI s 50 ppm nitrita + 150 ppm standardnega dodatka nitrita (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.3.6.4)

4.1.1.2 Ponovljivost

Preglednica 5: Ponovljivost vsebnosti nitrita, dodanega v gojišče po avtoklaviranju pri vrednosti pH 7,2

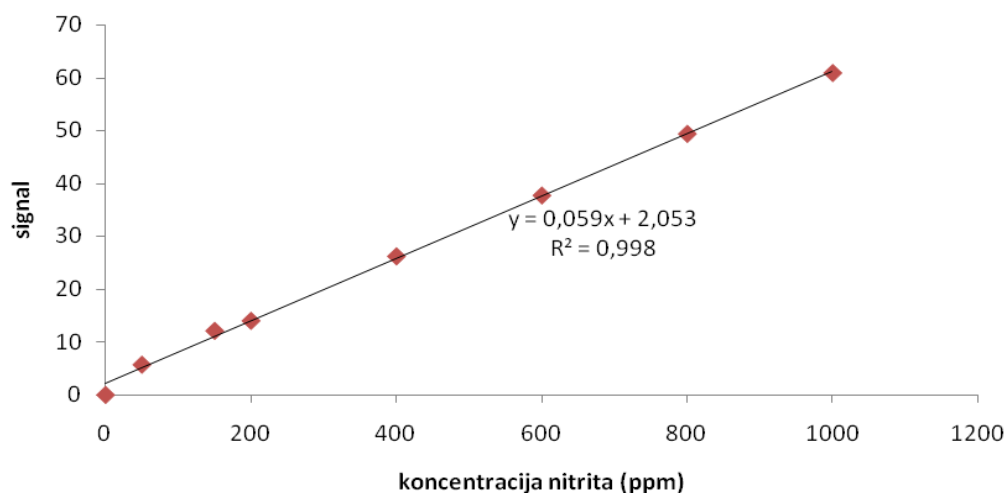
C (µg NaNO ₂ /ml BHI)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	\bar{x}	σ_x	KV (%)
50	49,24	51,58	50,14	48,98	52,47	51,14	50,59	1,37	2,71
148	149,78	147,25	152,96	150,12	147,99	146,58	149,11	2,34	1,57
909	905,47	900,89	910,75	915,78	903,36	930,47	911,12	10,89	1,20

Legenda: C: koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; 1.- 6.: koncentracija NaNO₂, določena s HPLC (1. - 6. paralelka); \bar{x} : povprečna vrednost; σ_x : standardni odklon; KV: koeficient variabilnosti ($KV = (\sigma_x / \bar{x}) \times 100$)

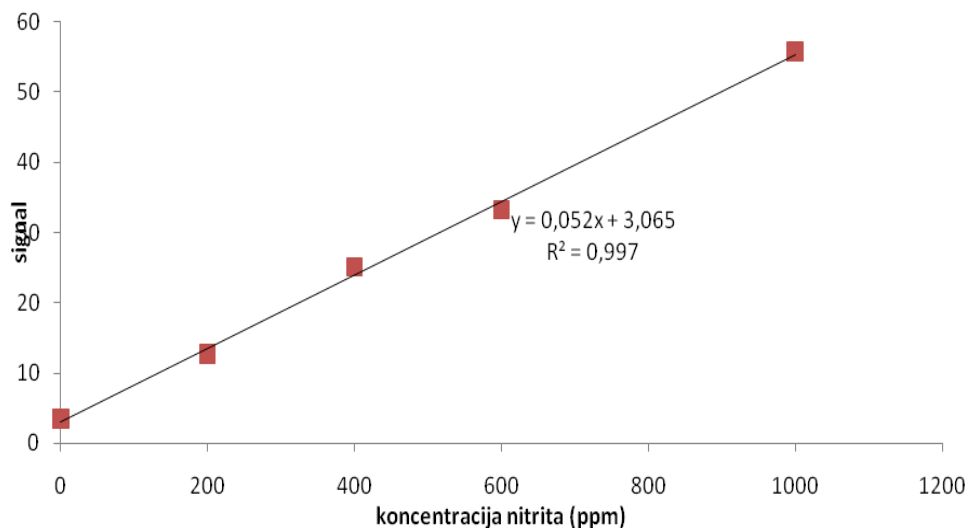
Na osnovi izračunanih KV lahko zaključimo, da je naša metoda zelo ponovljiva, saj so izračunani koeficienti variabilnosti nizki.

4.1.1.3 Linearnost

Linearnost vpliva matriksa gojišča BHI ter linearnost vpliva postopka čiščenja gojišča in matriksa na signal nitrita smo preverili z umeritvenima krivuljama A in B. Dobljena Pearsonova korelacijska koeficienta – R^2 (sliki 13 in 14) potrjujeta linearnost signala nitrita v preiskovanem območju.



Slika 13: Umeritvena krivulja A – vpliv matriksa gojišča BHI na signal nitrita



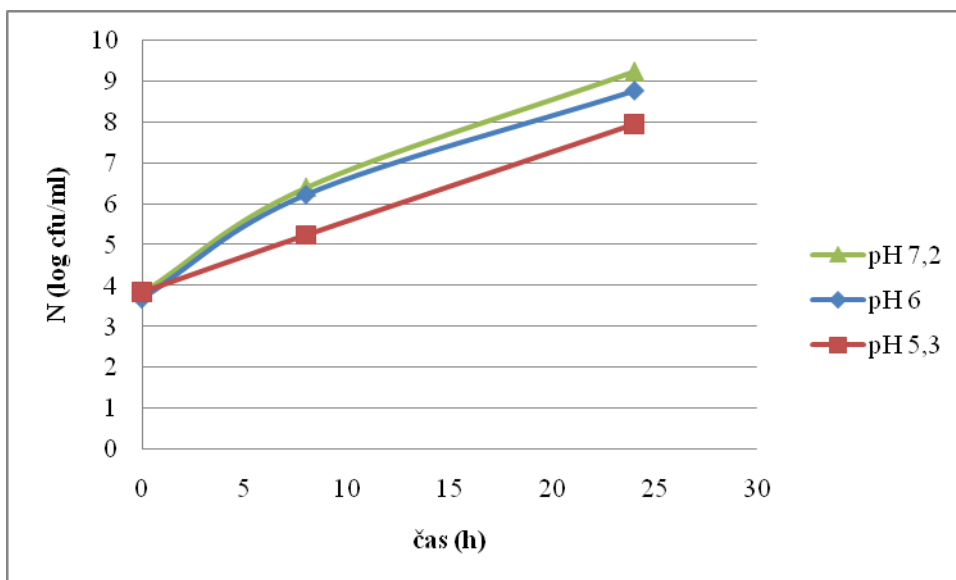
Slika 14: Umeritvena krivulja B –vpliv postopka in matriksa na signal nitrita

4.1.1.4 Meje detekcije in kvantifikacije

Pogoji določanja meje detekcije in kvantifikacije so opisani v poglavju 3.3.6.7. Meja detekcije pri določevanju vsebnosti nitrita v gojišču BHI je 1,1 ppm, meja kvantifikacije pa znaša 3,7 ppm. Določene meje detekcije in kvantifikacije samega sistema HPLC so majhne, kar nam omogoča detekcijo zelo majhnih vsebnosti nitrita.

4.2 RASTNA KRIVULJA BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes*

Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* smo 24 ur spremljali v gojiščih BHI z različnimi vrednostmi pH pri 37 °C na stresalniku (100 obratov/min).



Slika 15: Rastne krivulje bakterij vrste *L. monocytogenes* pri različnih vrednostih pH v gojišču BHI pri 37 °C

S slike 15 je razvidno, da traja eksponentna faza rasti pri pH 7,2 približno od 4. do 8. ure rasti, stacionarna faza pa nastopi po približno 10 urah. Za določitev protimikrobnega učinka nitrita na listerije smo vzeli 22-urno kulturo, saj so bile takrat bakterije v stacionarni fazi rasti. Predvidevali smo, da so zrasle do koncentracije okoli 10^8 cfu/ml. Ko pa smo želeli preveriti, kakšen učinek ima nitrit na bakterije med eksponentno fazo rasti, smo vzeli 5 ur staro kulturo. Takrat naj bi bile bakterije občutljivejše in tako bi imel nitrit večji učinek.

Na sliki 15 lahko vidimo tudi vpliv pH na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Pri nižji vrednosti pH gojišča je rast bakterij manjša v primerjavi z nevtralnim gojiščem, vendar se bakterije kljub nižjemu pH še vedno razmnožujejo in rastejo.

4.3 PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO_2 NA BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU BHI PRI pH 7,2

Bakteriostatičen oziroma baktericiden učinek različnih koncentracij nitrita, ki smo ga dodali pred oziroma po toplotni sterilizaciji gojišča, na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

smo opazovali med 24-urno inkubacijo v tekočem gojišču BHI. Poleg tega smo primerjali protimikrobni učinek nitrita glede na fazo rasti bakterij. Najprej smo vzeli 22 ur staro kulturo, torej iz stacionarne faze rasti, nato pa še 5 ur staro kulturo iz logaritemske faze rasti. Predvidevali smo, da bo imel nitrit večji učinek na bakterije iz logaritemske faze rasti, saj so takrat bakterije občutljivejše.

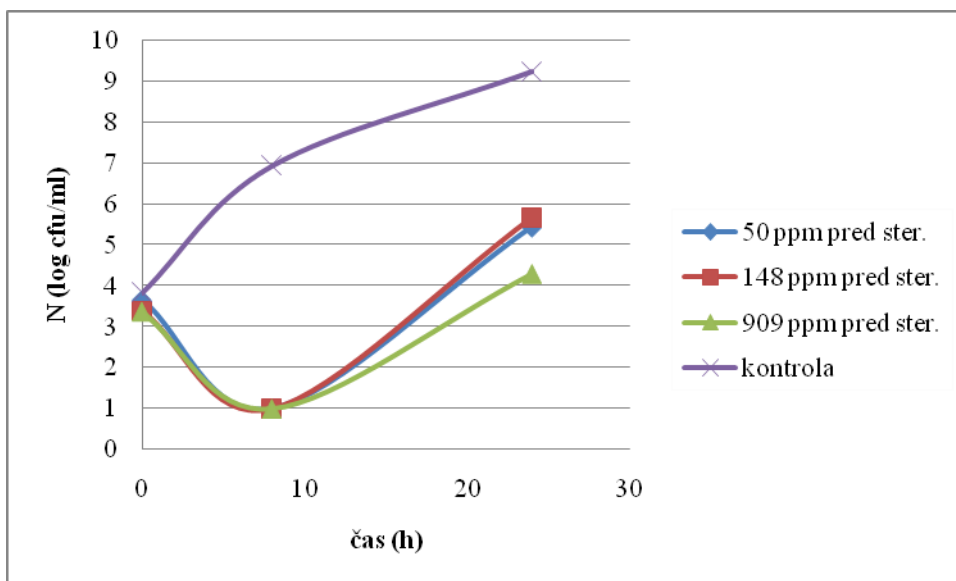
4.3.1 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti

V 40 ml tekočega gojišča BHI smo dodali 1 ml 22 ur stare kulture bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki smo jo razredčili tako, da smo dobili začetno število 10⁴ cfu/ml. Gojišču smo dodali nitrit pred oziroma po toplotni sterilizaciji gojišča in nato z metodo razredčevanja določili protimikroben učinek nitrita. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo prikazali kot povprečje paralelk v preglednicah 6 in 8.

Preglednica 6: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	N ₀ ±SD (log cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	N ₈ ±SD (log cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	N ₂₄ ±SD (log cfu/ml)	
0	6,76×10 ⁴	3,83±0,09	8,71×10 ⁶	6,94±0,1	1,78×10 ⁹	9,25±0,12	0
50	4,68×10 ³	3,67±0,03	<10	<1±0,00	2,75×10 ⁵	5,44±0,30	40,4
148	2,51×10 ³	3,40±0,29	<10	<1±0,00	4,68×10 ⁵	5,67±0,84	127,8
909	2,34×10 ³	3,37±0,46	<10	<1±0,00	1,95×10 ⁴	4,29±0,30	581,7

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂ dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 16: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

Iz preglednice 6 in slike 16 je razvidno, da ima nitrit, ki ga dodamo gojišču pred toplotno sterilizacijo oziroma avtoklaviranjem, na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* bakteriostatičen učinek. Število bakterij je v gojišču z dodanim nitritom pri vseh koncentracijah in po 24 urah inkubacije občutno nižje v primerjavi s kontrolo, kjer v gojišču ni bilo prisotnega nitrita. Protimikroben učinek smo izračunali po enačbah, ki so podane v poglavju 3.3.5 in ga prikazali v preglednici 7.

Preglednica 7: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti

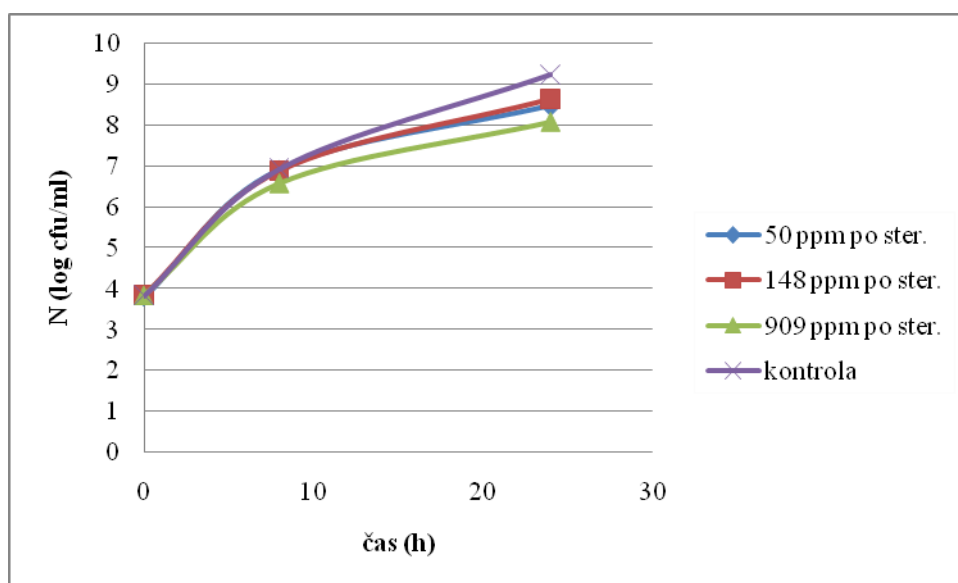
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,67	40,4
148	0,58	127,8
909	0,83	581,7

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, c₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Preglednica 8: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

C ₁ (μg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (μg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	6,76×10 ⁴	3,83±0,09	8,71×10 ⁶	6,94±0,1	1,78×10 ⁹	9,25±0,12	0
50	6,29×10 ³	3,80±0,02	8,32×10 ⁶	6,92±0,05	3,02×10 ⁸	8,48±0,18	49,5
148	6,92×10 ³	3,84±0,08	7,24×10 ⁶	6,89±0,16	4,47×10 ⁸	8,65±0,24	149,9
909	7,08×10 ³	3,85±0,02	3,89×10 ⁶	6,59±0,19	1,23×10 ⁸	8,09±0,21	871,5

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 17: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

Iz preglednice 8 in slike 17 opazimo, da ima nitrit, ki smo ga dodali gojišču BHI po toplotni sterilizaciji oziroma avtoklaviranju gojišča, veliko manjši inhibitorni učinek na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v primerjavi z dodanim nitritom pred avtoklaviranjem. Število bakterij v gojišču BHI, kjer je bil dodan nitrit, se po 8 urah inkubacije ni bistveno razlikovalo od števila bakterij v kontrolnem vzorcu, medtem ko je bilo po 24 urah inkubacije manjše za približno eno logaritemsko enoto.

Preglednica 9: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz stacionarne faze rasti

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,14	49,5
148	0,11	149,9
909	0,22	871,5

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, c₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

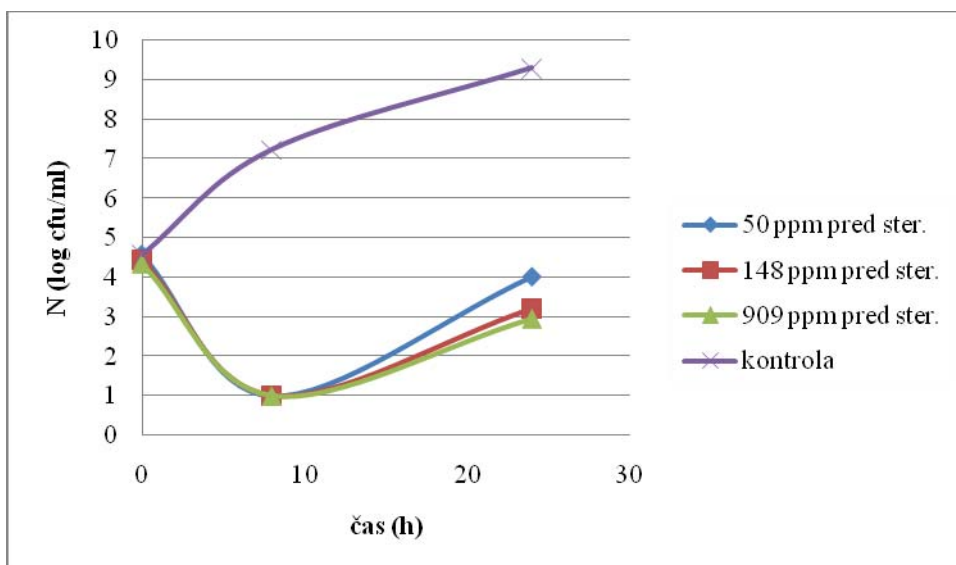
4.3.2 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti

Pri teh eksperimentih smo vzeli 1 ml 5 ur stare kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* in jo dodali v 40 ml tekočega gojišča BHI. Prav tako smo dodali nitrit pred in po toplotni sterilizaciji gojišča in nato z metodo razredčevanja določili protimikroben učinek nitrita. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah in rezultate prikazali kot povprečje paralelek v preglednicah 10 in 12.

Preglednica 10: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	3,64×10 ⁴	4,56±0,11	1,67×10 ⁷	7,23±0,01	2,64×10 ⁹	9,30±0,49	0
50	3,80×10 ⁴	4,58±0,06	<10	<1±0,00	1,05×10 ⁴	4,02±0,11	35,0
148	2,86×10 ⁴	4,45±0,10	<10	<1±0,00	1,52×10 ³	3,21±0,08	101,9
909	2,20×10 ⁴	4,34±0,06	<10	<1±0,00	900	2,95±0,00	649,6

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 18: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

Iz preglednice 10 in slike 18 je razvidno, da je imel nitrit na rast bakterij baktericiden učinek, ki smo ga izračunali po enačbah v poglavju 3.3.5, in ga prikazali v preglednici 11.

Preglednica 11: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze

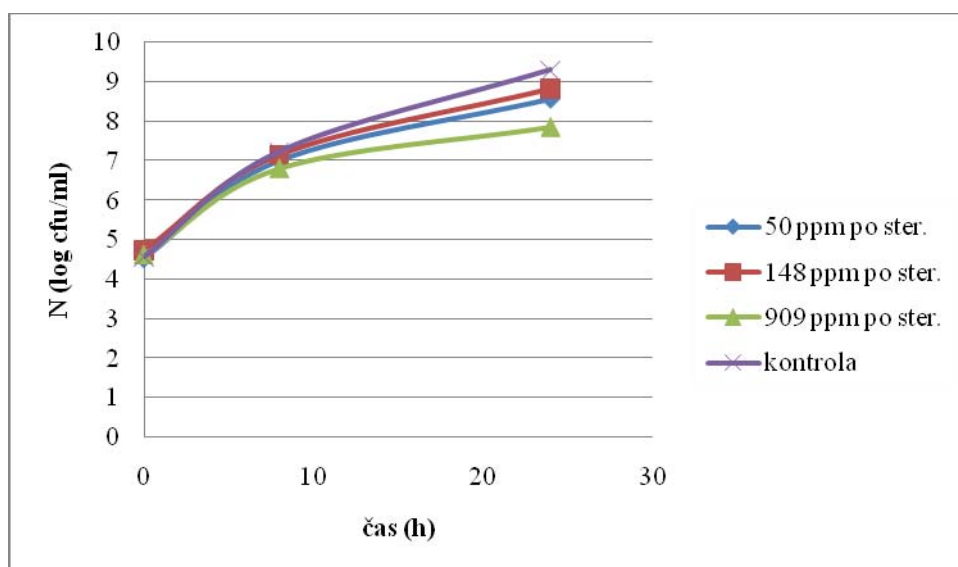
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	λ	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,12	35,0
148	0,27	101,9
909	0,33	649,9

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča, λ: baktericiden učinek NaNO₂ na rast bakterije, c₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Preglednica 12: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

C ₁ (μg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (μg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	3,64×10 ⁴	4,56±0,11	1,67×10 ⁷	7,23±0,01	2,64×10 ⁹	9,30±0,49	0
50	3,58×10 ⁴	4,55±0,08	1,04×10 ⁷	7,02±0,01	3,76×10 ⁸	8,58±0,01	58,8
148	5,50×10 ⁴	4,73±0,14	1,52×10 ⁷	7,16±0,21	6,92×10 ⁸	8,84±0,82	169,4
909	3,64×10 ⁴	4,62±0,01	6,51×10 ⁶	6,81±0,01	7,21×10 ⁷	7,85±0,11	885, 8

Legenda: C₁: koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 19: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti v gojišču BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

Tudi v tem primeru nitrit, ki smo ga dodali gojišču po avtoklaviranju, ni imel velikega protimikrobnega učinka v primerjavi s kontrolo.

Preglednica 13: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 7,2) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,15	58,8
148	0,13	169,4
909	0,32	885,8

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Bakterije iz logaritemske faze rasti so bile občutljivejše kot bakterije iz stacionarne faze, saj je imel nitrit, ki smo ga dodali pred avtoklaviranjem gojišča, na bakterije iz logaritemske faze baktericiden učinek pri vseh koncentracijah v primerjavi s kontrolo, medtem ko je imel na bakterije iz stacionarne faze bakteriostatičen učinek.

Rezultati tega dela eksperimenta so zelo zanimivi tudi zato, ker je imel nitrit, ki je bil dodan pred avtoklaviranjem gojišča večji učinek, kljub temu da smo ga s HPLC določili manj.

4.4 PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO₂ NA BAKTERIJE VRSTE *L. monocytogenes* V GOJIŠČU BHI Z ZNIŽANIM pH

V tem delu eksperimentalnega dela smo opazovali protimikroben učinek različnih koncentracij nitrita, dodanega pred oziroma po toplotni sterilizaciji na bakterije vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču BHI, ki smo mu znižali vrednost pH. Predvidevali smo, da bo imel nitrit pri nižji vrednosti pH večji protimikroben učinek.

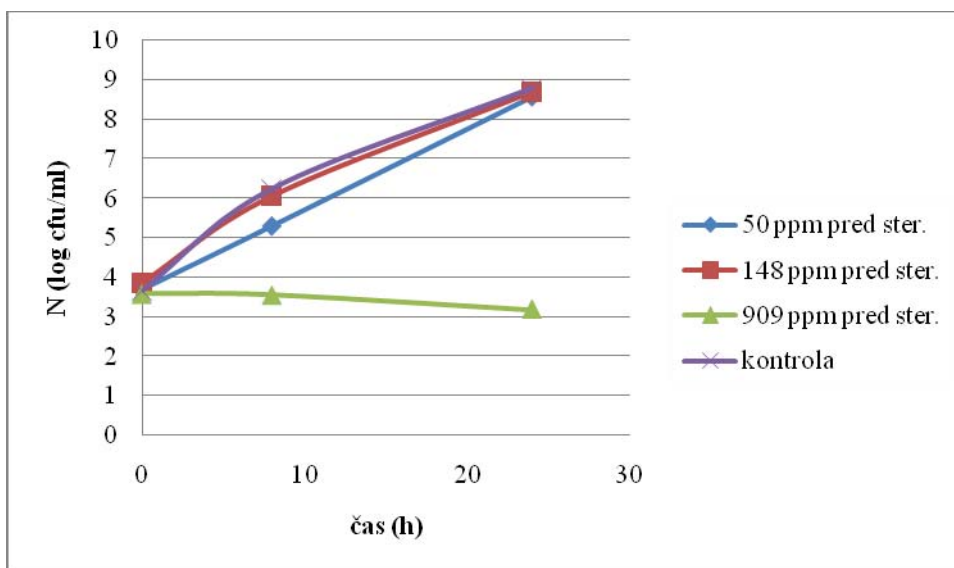
4.4.1 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste *L.monocytogenes* v gojišču BHI pri pH 6,0

Vse poskuse smo z dodatkom NaNO₂ pred in po sterilizaciji gojišča izvajali v paralelkah in dveh ponovitvah ter rezultate prikazali kot povprečje paralelk v preglednicah 14 in 16.

Preglednica 14: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI (pH 6,0) pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

C ₁ (μg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (μg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	5,75×10 ³	3,67±0,33	1,97×10 ⁶	6,24±0,29	6,32×10 ⁸	8,78±0,16	0
50	5,45×10 ³	3,68±0,26	9,01×10 ⁵	5,29±0,21	3,92×10 ⁸	8,56±0,21	0
148	7,25×10 ³	3,85±0,14	5,10×10 ⁵	6,06±0,17	5,47×10 ⁸	8,71±0,25	0
909	3,96×10 ³	3,58±0,17	4,00×10 ³	3,55±0,26	2,48×10 ³	3,19±0,50	118,7

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 20: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča pri pH 6,0

Rezultati pokažejo, da nitrit, ki smo ga dodali pred sterilizacijo gojišča in pri pH 6,0, v koncentracijah 50 ppm in 148 ppm skoraj nima učinka na rast bakterij v primerjavi s kontrolo. Le pri koncentraciji 909 ppm smo opazili inhibicijo rasti, zato smo lahko izračunali baktericiden učinek.

Preglednica 15: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 6,0) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,05	0
148	0,05	0
909	0,11 (λ)	118,7

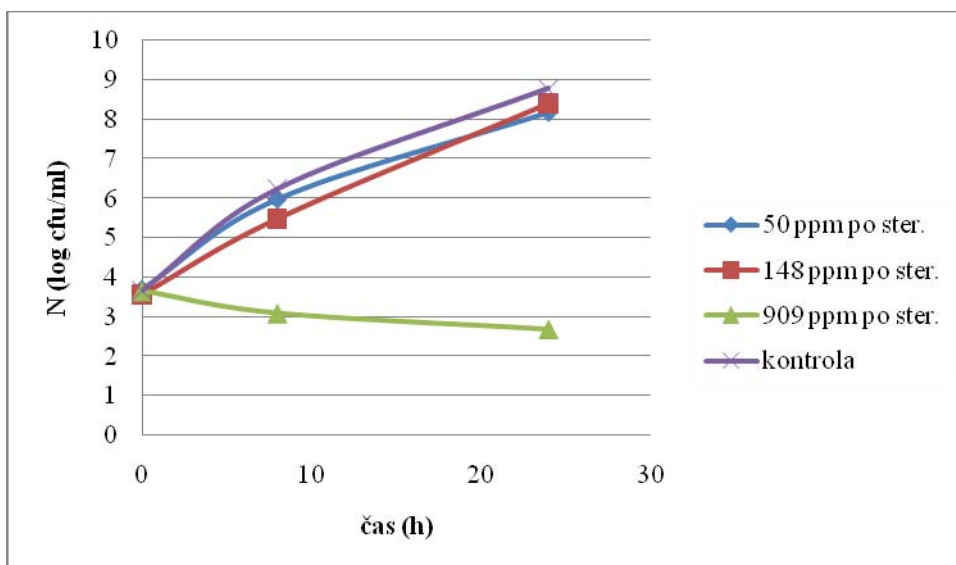
Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, λ: baktericiden učinek NaNO₂ na rast bakterije, C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Če smo dodali nitrit po sterilizacijo gojišča z vrednostjo pH 6,0, smo dobili rezultate, ki so zbrani v preglednici 16 in 17 ter na sliki 21.

Preglednica 16: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI (pH 6,0) pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	5,75×10 ³	3,67±0,33	1,97×10 ⁶	6,24±0,29	6,32×10 ⁸	8,78±0,16	0
50	5,61×10 ³	3,68±0,29	1,19×10 ⁶	5,98±0,36	1,56×10 ⁸	8,19±0,10	59,7
148	4,64×10 ³	3,65±0,13	4,15×10 ⁵	5,49±0,45	3,14×10 ⁸	8,42±0,29	162,2
909	4,66×10 ³	3,65±0,15	1,33×10 ³	3,09±0,21	7,66×10 ²	2,68±0,51	924,6

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur



Slika 21: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča pri pH 6,0

Tudi ko smo dodali nitrit v gojišče s pH 6,0 po avtoklaviranju, ta pri koncentraciji 50 ppm in 148 ppm skoraj ni imel učinka na rast bakterije vrste *L. monocytogenes*, le pri koncentraciji 909 ppm smo opazili baktericiden učinek.

Preglednica 17: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 6,0) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,12	59,7
148	0,07	162,2
909	0,27 (λ)	924,6

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, λ: baktericiden učinek NaNO₂ na rast bakterije, C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

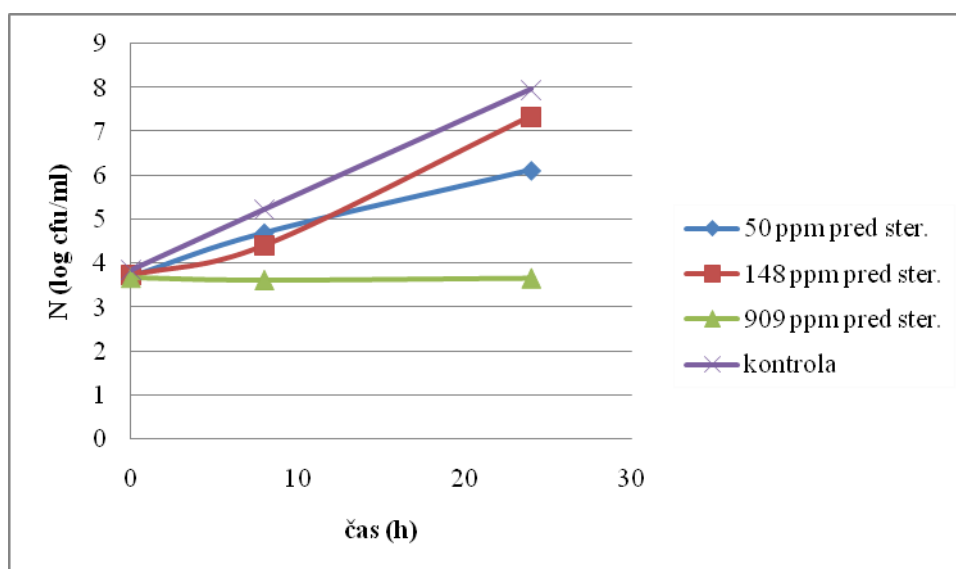
4.4.2 Protimikroben učinek NaNO₂ na bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI pri pH 5,3

Vse poskuse smo z dodatkom NaNO₂ pred in po sterilizaciji izvajali v paralelkah in dveh ponovitvah ter rezultate prikazali kot povprečje paralelk v preglednicah 18 in 20.

Preglednica 18: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI (pH 5,3) pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča

C ₁ (μg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (μg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	7,35×10 ³	3,85±0,14	1,26×10 ⁵	5,23±0,35	7,53×10 ⁷	7,96±0,50	0
50	5,52×10 ³	3,71±0,19	5,01×10 ⁴	4,70±0,73	1,32×10 ⁶	6,12±0,72	0
148	5,63×10 ³	3,73±0,16	2,57×10 ⁴	4,41±0,84	2,24×10 ⁷	7,35±1,32	0
909	5,42×10 ³	3,76±0,23	4,56×10 ³	3,62±0,22	8,70×10 ³	3,66±0,64	51,6

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur

**Slika 22: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča pri pH 5,3**

Iz preglednice 18 in slike 22 je razvidno, da je nitrit, dodan pred sterilizacijo gojišča in pri vrednosti pH gojišča 5,3, v primerjavi s kontrolo zaviral rast bakterij pri vseh koncentracijah, vendar smo pri tej vrednosti pH pričakovali večjo učinkovitost. Protimikroben učinek nitrita je prikazan v preglednici 19.

Preglednica 19: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega pred sterilizacijo gojišča BHI (pH 5,3) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

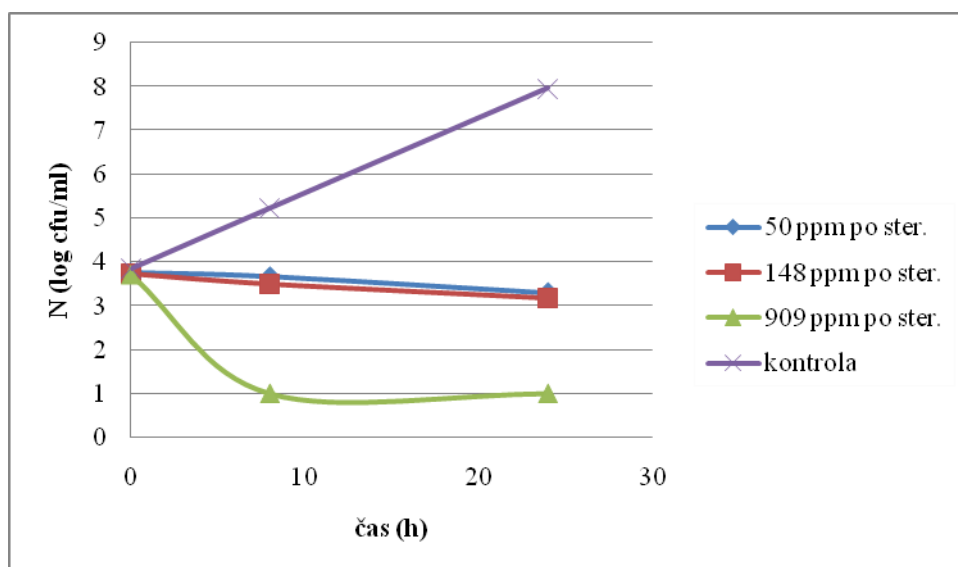
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	η	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,41	0
148	0,12	0
909	0,03 (λ)	51,6

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI pred sterilizacijo gojišča, η: bakteriostatičen učinek NaNO₂ na rast bakterij, λ: baktericiden učinek NaNO₂ na rast bakterije, C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Preglednica 20: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI (pH 5,3) pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Število preživelih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>						C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
	Začetek inkubacije		8-urna inkubacija		24-urna inkubacija		
	N ₀ (cfu/ml)	log N ₀ ±SD (cfu/ml)	N ₈ (cfu/ml)	log N ₈ ±SD (cfu/ml)	N ₂₄ (cfu/ml)	log N ₂₄ ±SD (cfu/ml)	
0	7,35×10 ³	3,85±0,14	1,26×10 ⁵	5,23±0,35	7,53×10 ⁷	7,96±0,50	0
50	6,04×10 ³	3,76±0,13	4,97×10 ³	3,67±0,17	2,09×10 ³	3,31±0,12	53,1
148	5,61×10 ³	3,73±0,15	3,37×10 ³	3,50±0,16	1,85×10 ³	3,18±0,29	145,7
909	5,76×10 ³	3,72±0,19	(<10)*	(<1±0,00)*	(<10)*	(<1±0,00)*	825,8

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča; C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; N₀, N₈, N₂₄: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču BHI v času 0, 8 in 24 ur; *: ocena, rezultat je pod mejo občutljivosti



Slika 23: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v BHI pri različnih koncentracijah NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča pri pH 5,3

Pri preglednici 20 in sliki 23 smo opazili, da je imel nitrit, dodan po sterilizaciji in pri vrednosti pH gojišča 5,3, pri vseh dodanih koncentracijah baktericiden učinek, ki je izračunan v preglednici 21.

Preglednica 21: Protimikroben učinek NaNO₂, dodanega po sterilizaciji gojišča BHI (pH 5,3) na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	λ	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)
50	0,12	53,1
148	0,15	145,7
909	0,99*	825,8

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI po sterilizaciji gojišča, λ: baktericiden učinek NaNO₂ na rast bakterije, C₂: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC; *Rezultat baktericidnega učinka pri 909 ppm (0,99) je naša ocena, saj je bila določitev števila preživelih bakterij pod mejo občutljivosti metode

Vsebnost nitrita v gojišču pri nižani vrednosti pH je zanimiva. Ko smo dodali nitrit gojišču z nižano vrednostjo pH pred avtoklaviranjem gojišča, pri koncentraciji 50 ppm in 148 ppm ni bilo prostega nitrita oziroma ga z metodo HPLC nismo zasledili (preglednica 19). Izmerili smo ga le pri koncentraciji 909 ppm, vendar v precej nižji koncentraciji, kot smo ga dejansko dodali na začetku (51,6 ppm – nitrit dodali gojišču s pH 5,3; 118,7 – nitrit dodali gojišču s pH 6,0). Kadar smo dodajali nitrit po predhodni sterilizaciji gojišča, smo dokazali skoraj enake ali pa le malo nižje koncentracije od dodanih (preglednica 21).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V eksperimentalnem delu diplomskega dela smo določali protimikrobno delovanje NaNO_2 na rast bakterij vrste *Listeria monocytogenes* z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Pri vseh poskusih smo gojišču BHI dodali tri različne koncentracije NaNO_2 : 50 ppm, ki je najvišji dovoljen ostanek nitrita v termično neobdelanih razsojenih mesnih izdelkih, 148 ppm (150 ppm je najvišja vhodna količina tem izdelkom) in 909 ppm, ki presega zakonske omejitve, vendar nas je zanimalo, kakšen učinek bo imela tako visoka koncentracija nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Poleg teh koncentracij smo vedno uporabili tudi kontrolo, kjer v gojišče nitrita nismo dodali.

V preglednici 22 so glede na proučevane razmere (koncentracija NaNO_2 , NaNO_2 dodan v gojišče BHI pred oziroma po sterilizaciji, vrednost pH, faza rasti) povzeti rezultati protimikrobnega delovanja NaNO_2 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Preglednica 22: Povzetek protimikrobnih učinkov NaNO_2 na bakterije vrste *L. monocytogenes* v različnih razmerah

Protimikroben učinek nitrita na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> v različnih razmerah								
Faza rasti	Logaritemska faza rasti		Stacionarna faza rasti					
pH gojišča	pH 7,2		pH 7,2		pH 6,0		pH 5,3	
Dodatek NaNO_2	Pred ster.	Po ster.	Pred ster.	Po ster.	Pred ster.	Po ster.	Pred ster.	Po ster.
c ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	λ	η	η	η	η	η	η	λ
50	0,12	0,15	0,67	0,14	0,05	0,12	0,41	0,12
148	0,27	0,13	0,58	0,11	0,05	0,07	0,12	0,15
909	0,33	0,32	0,83	0,22	0,11 (λ)	0,27 (λ)	0,03 (λ)	(0,99)*

Legenda: C je koncentracija NaNO_2 , dodanega v gojišče BHI pred ali po sterilizaciji gojišča, η : bakteriostatičen učinek NaNO_2 na rast bakterij, λ : baktericiden učinek NaNO_2 na rast bakterije (poudarjeno); *: ocena

5.5.1 Vpliv načina sterilizacije NaNO_2 na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

Nitrit smo v vseh poskusih v gojišče BHI dodali na dva različna načina. Najprej smo ga dodali pred avtoklaviranjem in ga nato skupaj z gojiščem toplotno sterilizirali 20 minut pri 121 °C. Drugi način sterilizacije raztopine nitrita je bil uporaba filtra z velikostjo por 0,2 µm. S filtrno sterilizacijo steriliziran nitrit smo dodali gojišču po avtoklaviranju gojišča.

Pri nespremenjeni vrednosti pH gojišča (7,2) smo v gojišču, v katerega smo dodali nitrit pred avtoklaviranjem določili manj nitrita kot v gojišču z dodanim nitritom po avtoklaviranju, vendar je bil inhibitoren učinek nitrita večji. Ti rezultati lahko potrdijo dejstvo, da nitrit pri temperaturi sterilizacije delno razpade, pri tem pa se tvorijo nove komponente, ki imajo še večji protimikroben učinek kot nitrit sam (Cammack in sod., 1999; Honikel, 2007; Tompkin, 2005).

Perigo-faktor so raziskali le pri bakterijah rodu *Clostridium*, vendar lahko isti učinek velja tudi za bakterije rodu *Listeria*. V termično obdelanih izdelkih bakterije rodu *Listeria* sicer ne predstavljajo takšnega tveganja kot sporogeni klostridiji, saj listerije uniči že temperatura 80 °C v času 15 sekund (Milohnoja, 2003). Nitrit se tako v največji meri dodaja termično obdelanim mesnim izdelkom za preprečitev zastrupitve s toksinom, ki ga proizvajajo sporigene bakterije vrste *Clostridium botulinum*.

Pri vrednosti pH 6,0 način sterilizacije nitrita ni vplival na njegovo protimikrobno učinkovitost, saj je bil učinek nitrita na bakterije v obeh načinih sterilizacije podoben. Baktericiden učinek nitrita smo dosegli le pri koncentraciji 909 ppm, medtem ko je bil pri koncentracijah 50 ppm in 148 ppm nitrit skoraj brez učinka.

Ravno obraten učinek kot pri nevtralni vrednosti pH smo dosegli pri nižani vrednosti pH gojišča na 5,3. Večji protimikroben učinek smo namreč dosegli, ko smo nitrit dodali v gojišče z uporabo filtrne sterilizacije, torej po avtoklaviranju. Ti rezultati lahko potrdijo raziskavo, v kateri so McClure in sodelavci (1991) trdili, da je bila inhibicija bakterij vrste *L. monocytogenes* s toplotno obdelanim NaNO_2 manjša v primerjavi z NaNO_2 , ki so ga sterilizirali s filtrno sterilizacijo pri pH gojišča 5,0. Sterilizacija nitrita s filtrom naj bi bila tako primernejša za uporabo.

V proizvodnji mesnih izdelkov filtrna sterilizacija nitrita oziroma dodajanje nitrita po toplotni obdelavi izdelkov ne pride v poštev, saj se nitrit vedno dodaja pred toplotno obdelavo ali sušenjem.

5.1.2 Vpliv NaNO₂ na bakterije vrste *L. monocytogenes* iz različnih faz rasti

Ko primerjamo sliki 18 in 19, lahko opazimo, da ima nitrit na bakterije iz logaritemske faze rasti večji učinek kot na bakterije iz stacionarne faze.

To dejstvo lahko uporabimo pri pripravljenih jedeh, kot so npr. poltrajni mesni izdelki, ki so podvrženi navzkrižni kontaminaciji. Jedi oziroma izdelki se lahko kontaminirajo po pripravi, še znotraj predelovalnega obrata (slaba higiena, nezadostno ohlajeni prostori itd.) ali pa med nadaljnjo verigo (skladiščenje, transport, priprava) do potrošnika. Pri navzkrižni kontaminaciji so bakterije lahko še v eksponentni fazi rasti. Ker so v tej fazi rasti občutljivejše, nitrit učinkoviteje deluje in tako preprečuje nadaljevanje razmnoževanja teh bakterij.

5.1.3 Vpliv pH gojišča in NaNO₂ na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

Mnogi avtorji navajajo, da ima nitrit na bakterije večji učinek v kombinaciji z nižjo vrednostjo pH, še posebej pri pH 6,0 ali manj, ko prevladuje dušikova (III) kislina (HNO₂) (Cammack in sod., 1999). Pri določeni vrednosti pH medija oziroma živila je raztopina nitrita v ravnotežju med nitritnim ionom in dušikovo (III) kislino. Pri višji vrednosti pH (nad 6,0) je NO₂⁻ prevladujoč inhibitor, medtem ko pri nižji vrednosti pH (pod 6,0) prevladuje dušikova (III) kislina (Lambert in Bidlas, 2007).

Pri nižani vrednosti pH gojišča na 6,0, ko naj bi bila raztopina nitrita v ravnotežju med dušikovo (III) kislino in nitritnim ionom, smo pričakovali večji protimikroben učinek, kot smo ga dejansko dosegli. Zanimivo je, da je bilo pri nižani vrednosti pH slabše protimikrobno delovanje nitrita kot pri nevtralnem gojišču. Pri koncentracijah 50 ppm in 148 ppm, v obeh primerih sterilizacije nitrita, ni bilo učinka oziroma je bil ta minimalen. Le pri koncentraciji 909 ppm smo lahko določili baktericiden učinek nitrita.

Rezultati so nas zopet presenetili pri vrednosti pH 5,3. Ponovno smo pričakovali večji protimikroben učinek nitrita dodanega pred avtoklaviranjem gojišča v primerjavi z nevtralnimi pH, saj viri navajajo, da ima nitrit v kombinaciji z nizko vrednostjo pH večji učinek (Buchanan in sod., 1989; Cammack in sod., 1999; Duffy in sod., 1994; Kamat in Nair, 1995). Pri dodanem nitritu po avtoklaviranju gojišča pa smo dobili večji protimikrobni učinek v primerjavi z učinkom v gojišču z nevtralno vrednostjo pH. V tem primeru smo lahko izračunali baktericiden učinek, ki je bil med vsemi poskusi največji.

5.1.4 Vpliv različnih koncentracij NaNO₂ na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*

Iz preglednic in slik v 4. poglavju je razvidno, da različne koncentracije nitrita vplivajo različno na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*. Pri vseh poskusih smo največji protimikrobni učinek dosegli pri koncentraciji 909 ppm, vendar je ta koncentracija za mesne izdelke previsoka.

Koncentraciji 50 ppm in 148 ppm nitrita sta imeli na rast bakterij zelo podoben učinek, kljub temu da je 148 ppm skoraj trikrat višja koncentracija. Rast listerij je torej bolj kot od same koncentracije dodanega nitrita odvisna od kombinacije nitrita z drugimi dejavniki, kot so način sterilizacije, vrednost pH gojišča in sama starost bakterij. Še večji učinek se doseže, če se upošteva nižja temperatura, ki smo jo tudi hoteli vključiti med potekom praktičnega dela diplomskega dela.

5.1.5 Vpliv toplotne obdelave in pH na vsebnost NaNO₂ v gojišču BHI

Vsebnost prostega nitrita v gojišču smo določili z metodo HPLC, ki je temeljila na Griessovi reakciji. Pri tej reakciji nitrit v kislih razmerah reagira z amino skupino sulfanilne kisline in tako nastane diazonijev kation. Ta se nato združi z aromatskim aminom 1-naftilaminom in nastane vodotopna, rdeče vijolična spojina, ki se jo določi pri 540 nm (Tsikas, 2006).

V preglednicah 23, 24 in 25 smo zbrali vse izmerjene vrednosti NaNO₂ ter izračunali, v kolikšni meri je NaNO₂ razpadel med toplotno sterilizacijo, pri nižani vrednosti pH gojišča ali med samim postopkom priprave vzorca.

Preglednica 23: Izmerjene vrednosti NaNO₂ v gojišču BHI pri pH 7,2

pH 7,2				
NaNO ₂ dodan pred avtoklaviranjem			NaNO ₂ dodan po avtoklaviranju	
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)	C ₃ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)
50	40,4	18,8	49,5	0
148	127,8	13,7	149,9	0
909	581,7	36,0	871,5	4,1

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI; C₂, C₃: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Nitrit, ki je bil dodan pred avtoklaviranjem gojišča, je imel večji učinek na rast bakterij, kljub temu da je bila izmerjena vsebnost s HPLC nižja. Med toplotno obdelavo je razpadel del natrijevega nitrita, medtem ko je vsebnost nitrita, ki smo ga dodali s filtrno sterilizacijo, ostala praktično nespremenjena.

Izmerjene rezultate lahko potrdimo z viri, ki razlagajo, da je nitrit v mesnih izdelkih med toplotno obdelavo prisoten kot NO vez z mioglobinom (5–15%), žveplovimi skupinami (5–15%), lipidi (1–5%) in s proteini (20–30%) ter ga kot takega ne moremo določiti s HPLC, saj ni prisoten v prosti obliki kot rezidualen nitrit (Ferreira in Silva, 2007).

Preglednica 24: Izmerjene vrednosti NaNO₂ v gojišču BHI pri pH 6,0

	pH 6,0			
	NaNO ₂ dodan pred avtoklaviranjem		NaNO ₂ dodan po avtoklaviranju	
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)	C ₃ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)
50	0	100	59,7	0
148	0	100	145,7	1,6
909	118,6	87,0	924,6	0

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂, dodanega v gojišče BHI; C₂, C₃: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Nitrit, ki smo ga gojišču s pH 6,0 dodali pred avtoklaviranjem, je pri koncentraciji 50 ppm in 148 ppm popolnoma razpadel, le pri koncentraciji 909 ppm smo določili 118,6 ppm rezidualnega nitrita.

Izredno nas je presenetila visoka vsebnost nitrita, ki smo ga dodali gojišču s pH 6,0 po avtoklaviranju s filtrno sterilizacijo. Nitrit kljub nižji vrednosti pH ni razpadel.

Preglednica 25: Izmerjene vrednosti NaNO₂ v gojišču BHI pri pH 5,3

	pH 5,3			
	NaNO ₂ dodan pred avtoklaviranjem		NaNO ₂ dodan po avtoklaviranju	
C ₁ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	C ₂ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)	C ₃ (µg NaNO ₂ /ml BHI)	Razpad (%)
50	0	100	53,1	0
148	0	100	145,7	1,6
909	51,6	94,3	825,8	9,2

Legenda: C₁ je koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI; C₂, C₃: koncentracija NaNO₂ v gojišču BHI določena s HPLC

Pri vrednosti pH 5,3 so bile izmerjene vsebnosti podobne kot pri vrednosti pH 6,0. Ko smo dodali nitrit gojišču s pH 5,3 pred avtoklaviranjem, v gojišču ravno tako ni bilo ostanka nitrita, le pri koncentraciji 909 ppm ga je ostalo 51,6 ppm. Pri takšni vrednosti pH v raztopini prevladuje dušikova(III) kislina, ki je z uporabljenimi metodo nismo določali.

Tudi nekatere druge raziskave kažejo, da nitrit pri nižji vrednosti pH večinoma razpade. Honikel (2007) navaja, da pri pH medija 5,3 in z dodatkom 100 mg NaNO₂/kg po toplotni obdelavi ostane le 28 mg NaNO₂/kg, po 12 dneh shranjevanja pa ga je le še 5 mg NaNO₂/kg.

Ponovno nas je presenetila visoka vsebnost izmerjenega nitrita v gojišču, ki smo ga dodali s filtrno sterilizacijo po avtoklaviranju, saj je, kljub nizki vrednosti pH, ostal praktično nespremenjen v primerjavi z dodanim.

5.2 SLKEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov, lahko podamo naslednje sklepe:

- Nitrit deluje protimikrobno na rast bakterij vrste *Listeria monocytogenes* tudi v koncentracijah, ki se uporabljajo v mesnih izdelkih, vendar v posebnih razmerah. Protimikrobni učinek nitrita je namreč odvisen od koncentracije in načina sterilizacije dodanega nitrita, vrednosti pH gojišča ter faze rasti bakterij.
- V gojišču BHI z vrednostjo pH 7,2 ima večji protimikrobni učinek nitrit, ki smo ga dodali gojišču pred avtoklaviranjem, kot nitrit dodan po avtoklaviranju, kljub temu da je bila izmerjena vsebnost nitrita nižja. Sklepamo, da med toplotno obdelavo nitrit razpade in se pri tem tvorijo nove protimikrobne komponente.
- Nitrit, dodan gojišču BHI z vrednostjo pH 7,2 pred sterilizacijo, ima na bakterije vrste *L. monocytogenes* iz logaritemske faze rasti baktericiden učinek, medtem ko ima nitrit, dodan po sterilizaciji, bakteriostatičen učinek, ki pa je še vedno večji kot bakteriostatičen učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* v stacionarni fazi rasti.
- Nitrit dodan gojišču BHI po toplotni sterilizaciji ima pri vrednosti pH gojišča 5,3 baktericiden učinek.
- V vseh preizkušanih primerih je imel največji protimikroben učinek nitrit pri koncentraciji 909 ppm, ki pa je za meso in mesne izdelke previsoka vrednost.
- Razvili smo metodo za določanje nitrita v tekočem gojišču, ki temelji na HPLC. S procesom validacije smo potrdili, da je nova metoda selektivna, linearna in ponovljiva znotraj preiskovanega območja.

PREDLOGI ZA NADALJNJE DELO:

Predlagamo, da se ponovno preveri protimikroben učinek nitrita pri nižji vrednosti pH, ter preveri katere spojine se tvorijo iz nitrita pri določenem pH (dušikova (III) kislina, dušikov monoksid) in kakšen protimikroben učinek imajo te spojine na določene bakterije. Predvidevamo, da se pri nizkem pH tvori dušikov monoksid (NO) in ta deluje baktericidno na bakterije, vendar bi bili za potrditev potrebni dodatni poskusi in analize. Dobro bi bilo tudi, če se ponovno preveri, kako vplivata toplotna obdelava in nižja vrednost pH na vsebnost nitrita.

6 POVZETEK

Nitrit je poleg kuhinjske soli eden najbolj široko uporabljenih konzervansov v proizvodnji mesnih in mlečnih izdelkov. Poleg oblikovanja ustreznih senzoričnih lastnosti izdelkov, predvsem barve in arome, se uporablja tudi zaradi antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti. Inhibira rast spor bakterij vrste *Clostridium botulinum* in tako preprečuje nastanek nevarnih toksinov. Kljub mnogim funkcionalnim lastnostim nitrita pa je njegova uporaba omejena zaradi tvorbe kancerogenih nitrozaminov.

Veliko raziskovalcev se je ukvarjalo s protimikrobnim učinkom nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*, pri čemer so upoštevali koncept ovir, saj je protimikroben učinek nitrita boljši v kombinaciji z ostalimi dejavniki konzerviranja, kot so nižja vrednost pH, toplotna obdelava, hlajenje, uporaba soli in nižja a_w .

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so grampozitivne paličaste bakterije, ki so v naravi zelo razširjene. Ker bakterije lahko rastejo pri nizkih temperaturah, nizki vrednosti pH in so relativno odporne proti višjim koncentracijam soli, so živila ugodno okolje za njihov razvoj. Listerioza, ki jo povzročajo bakterije vrste *L. monocytogenes*, je oportunistična infekcija, ki najbolj pogosto ogroža nosečnice, še nerojene otroke, dojenčke in starejše od 65 let. Smrtnost je pri listeriozi, med bakterijskimi okužbami s hrano, najvišja.

V eksperimentalnem delu diplomskega dela smo določali protimikroben učinek nitrita na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Primerjali smo, kakšen učinek ima na rast bakterij nitrit, ki smo ga dodali gojišču pred avtoklaviranjem, ter nitrit, ki smo ga dodali gojišču po avtoklaviranju s pomočjo filtne sterilizacije. Poleg tega smo protimikrobno delovanje nitrita kombinirali z nižjo vrednostjo pH ter preverili, kakšen učinek ima nitrit na bakterije iz različnih faz rasti.

Vsebnost nitrita v gojišču smo določili s sistemom HPLC, za katerega je bilo potrebno razviti novo metodo določanja. Potrdili smo, da je metoda selektivna, ponovljiva, linearna in da ima nizko mejo detekcije in kvantifikacije. Pred samim pričetkom eksperimentalnega dela smo izmed treh neselektivnih tekočih gojišč (TSB, MHB in BHI) izbrali tekoče gojišče BHI, ki je najbolj ustrezalo našim pogojem določanja vsebnosti nitrita, saj je imela metoda pri tem gojišču najnižjo mejo detekcije in je bila linearna.

Največji učinek nitrita smo dosegli, ko smo uporabili kulturo iz logaritemske faze rasti. V njej so namreč bakterije občutljivejše na nitrit kot v stacionarni fazi. Pri nevtralni vrednosti pH gojišča smo večji protimikrobni učinek dosegli, ko smo nitrit dodali pred avtoklaviranjem, kljub temu da je bila izmerjena vsebnost nitrita nižja v primerjavi z nitritom, ki smo ga dodali po avtoklaviranju. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da

med toplotno obdelavo nitrit razpade in se pri tem tvorijo nove protimikrobne komponente, ki so še bolj učinkovite kot nitrit sam. Baktericiden učinek nitrita smo določili tudi, ko smo dodali nitrit gojišču po toplotni sterilizaciji pri vrednosti pH gojišča 5,3.

7 VIRI

Abram V. 1994. Interakcije aditivov s sestavinami živil. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi. Bled, 9.–10. jun. 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 137–143.

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45.

AOAC Official Method 973.31. Nitrites in cured meat: Colorimetric method.1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol.2 . Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International , Chapter 39.: 8- 9 (modificirana po Mirna A in Rau G.)

Birzele B., Djordjević S., Krämer J. 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. Food Control, 16: 695–699.

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: 255–282.

Brambilla G., Martelli A. 2007. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of grug-nitrite interaction products. Reviews in Mutation Research, 635: 17–52.

Bryan N.S. 2006. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. Free Radical Biology & Medicine, 41: 691–701.

Buchanan R. L., Stahl H. G., Whiting R. C. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 12: 884–851.

Cammack R., Joannou C. L., Cui X. Y., Martinez C. T., Maraj S. R., Hughes M. N. 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Biochimica et Biophysica Acta, 1411: 475–488.

Di Matteo V., Esposito E. 1997. Methods for the determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 789: 213–219.

Duffy L. L., Vanderlinde P. B., Grau F. H. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: Effects of pH, a_w , nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology*, 23:377–390.

Ferreira I. M. P. L. V. O., Silva S. 2007. Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector. *Talanta*, 74: 1598–1602.

Gandhi M., Chikindas M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1–15.

García M. T., Cañamero M. M., Lucas R., Omar N. B., Pulido R. P., Gálvez A. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 161–170.

Gill A. O., Holley R. A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 251–259.

Honikel K. 2007. The use and control of nitrite and nitrate for the processing of meat products. *Meat Science*, 78: 68–76.

Jeršek B., Poklar Ulrih N., Dekleva N., Sever D. 2004. Kemijski dejavniki tveganja v živilih in njihov nadzor. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18.–19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45–64.

Jeršek B. 2007. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 19

Jimenez-Colmenero F., Carballo J., Cofrades S. 2001. Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Science*, 59: 5–13.

Jobgen W. S., Jobgen S. C., Li H., Meininger C. J., Wu G. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 851: 71–82.

Junttila J., Hirn J., Hill P., Nurimi E. 1989. Effects of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 3:158–161.

Kamat A. S., Nair P. M. 1996. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 29: 714–720.

Klun N., Šedlbauer M. 2004. Mikrobiološka kakovost živil in standardi. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7–35.

Lado B. H., Yousef A. E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed. Ryser E. T., Math E. H. (eds.). New York, CRS Press & Francis Group, Inc.: 21–54.

Lambert R. J. W., Bidlas E. 2007. Gamma study of pH, nitrite and salt inhibition of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2239–2246.

Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 181–186.

McClure P. J., Kelly T. M., Roberts T. A. 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 14: 77–92.

Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117–139.

Marinšek J., Grebenc S. 2002. *Listeria monocytogenes* v mletem mesu in toplotno neobdelanih mesnih izdelkih v Sloveniji. *Slovenian Veterinary Research*, 39: 131–136.

Moorcroft M. J., Davis J. M., Compton R. G. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, 54: 785–803.

Painter J., Slutsker L. 2007. Listeriosis in humans. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed. Ryser E. T., Math E. H. (eds.). New York, CRS Press & Francis Group, Inc.: 85–110.

Pamper E. G. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, 4: 812–823.

www.nature.com/nri/journal/V4/n10/fig_tab/nri1461_F1.html/

Pravilnik o aditivih za živila. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14,43: 5263-5335

Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18,16: 1235-1240

Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006. 2005. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 1–99.

www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/program-zoonoze2006.pdf

(10. 6. 2006)

Pokorn J. 1990. Mikrobiologija v živilskih procesih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 98–112.

Pokorn J., Jeršek B., Trkov M. 1994. Zmanjšana uporaba konzervansov. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi. Bled, 9.–10. jun. 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87–95.

Rajar, A., Gašperlin L., Žlender B. 2006. Karcinogene komponente v predelanih in toplotno obdelanih živilih. V: Karcinogene in antikancerogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 9.–10. nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 89–101.

Rocourt J., Buchrieser C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E. T., Math E. H. (eds.). New York, CRS Press & Francis Group, Inc.: 21–54.

Sauders B. D., Wiedmann M. 2007. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E. T., Math E. H. (eds.). New York, CRS Press & Francis Group, Inc.: 21–54.

Sebranek J. G., Bacus J. N. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues? *Meat Science*, 77: 136–147.

Sebranek J. G., Fox J. B. 1985. A review of nitrite and chloride chemistry: Interactions and implications for cured meats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 1169–1182.

Shahidi F., Pegg R. B. 1992. Nitrite-free meat curing systems: Update and review. *Food Chemistry*, 43: 185–191.

SIS EN ISO 4833. 2003. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 °C. 2nded.: 3-4.

Smith D. 2008. Bacteria to rescue. New York, A Bonnier Corporation Company: 1
<http://www.popsoci.com/inspired-nature/article/2008-04/bacteria-rescue>
(04. 17. 2008): 1 str.

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: 49–82.

Tompkin R. B. 2005. Nitrite. V: Antimicrobials in food. 3rd ed. Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 169–237.

Tsikis D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851: 51–70.

Vignolo G., Fadda S., Kairuz M. N., Holgado A. P. R., Oliver G. 1998. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. *Food Microbiology*, 15: 259–264.

Višnjevec I. 2006. Vpliv različnih metod soljenja in razsoljevanja na kakovost kraškega zašinka. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49 str.

Žlender B. 2000. Postopki za zmanjšanje oksidativnega kvara maščob v mesu in mesnih izdelkih. V: Meso in mesnine za kakovostno prehrano. 2. posvet o vlogi in pomenu mesa v normalni – zdravi in dietni prehrani, Portorož, 10. in 11. feb. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 153-160

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici doc. dr. Barbari Jeršek in somentorju dr. Tomažu Polaku za nasvete in vodenje med eksperimentalnim delom v laboratoriju in vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Veroniki Abram za natančen pregled diplomskega dela.

Gospo Jani Avbelj in Tanji Rožman hvala za pomoč in spodbudo pri delu v laboratoriju.

Zahvala gre tudi univ. dipl. ing. Ivici Hočevar za urejanje diplomske naloge in Ani Kodelja za lektoriranje.

Posebna zahvala je namenjena Iztoku, staršem, starim staršem in prijateljem za podporo in razumevanje v času študija.