

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina HOSTNIK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZBRANIH
ETERIČNIH OLJ IN NJIHOVIH SESTAVIN NA
MIKOTOKSIGENE PLESNI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina HOSTNIK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZBRANIH ETERIČNIH OLJ IN
NJIHOVIH SESTAVIN NA MIKOTOKSIGENE PLESNI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS
AND THEIR COMPONENTS AGAINST MYCOTOXIGENIC MOLDS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter v Laboratoriju za opčo mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-Biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Peter Raspor.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Recenzent: prof. dr. Peter RASPOR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter RASPOR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Hostnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.24:582.123:615.9:547.913(043)=163.6
- KG mikotoksigene plesni/rod *Aspergillus*/rod *Penicillium*/mikotoksini/aflatoksini/
ohratoksini/protimikrobne snovi/minimalna inhibitorna koncentracija/eterična
olja/timijan/ koromač/srebrna jelka/origano/poprova meta/anisaldehyd/karvakrol/
mentol/timol/
- AV HOSTNIK, Nina
- SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ RASPOR, Peter (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2012
- IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZBRANIH ETERIČNIH OLJ IN NJIHOVIH
SESTAVIN NA MIKOTOKSIGENE PLESNI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 64 str., 20 pregl., 20 sl., 4 pril., 83 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen našega raziskovalnega dela je bil preučiti vpliv eteričnih olj (meta, origano, koromač, timijan in jelka) ter njihovih sestavin (timol, karvakrol, mentol, in anisaldehyd) na rast in sintezo mikotoksinov pri plesnih vrst *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nordicum* in *Penicillium verrucosum*. Z metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici smo ugotavljali minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) posameznih olj pri testiranih sevih. Glede na dobljene rezultate so se kot najboljši inhibitorji izkazali timol, mentol, karvakrol (MIK<0,4 µL/mL) ter eterični olji origana in timijana (MIK<2,4 µL/mL). Z merjenjem premerov kolonij na trdnem gojišču in merjenjem teže suhe biomase v tekočem gojišču smo ugotovili, da je večina testiranih olj delno inhibirala rast delovnih sevov. S tankoplastno kromatografijo (TLC) smo kvalitativno ovrednotili mikotoksigeni potencial sevov in ugotovili, da so plesni vrste *A. flavus* sintetizirale aflatoksin B₁, plesni vrste *P. verrucosum* pa ohratoksin A. Pri plesnih vrste *A. niger* in *P. nordicum* sinteze mikotoksinov nismo zaznali. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo prisotnost mikotoksinov ovrednotili še kvantitativno. Večina olj je sintezo mikotoksinov delno inhibirala, nekatera med njimi, npr. ¼ MIK timola pri plesni vrste *A. flavus* in ½ MIK karvakrola pri plesni vrste *P. verrucosum*, pa so le-to pospešila tudi za več kot 90 %. Primerjava rezultatov inhibicije rasti in inhibicije tvorbe mikotoksinov je pokazala, da neposredna povezava med tema dvema parametroma ne obstaja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 579.24:582.123:615.9:547.913(043)=163.6
- CX mycotoxigenic molds/genus *Aspergillus*/genus *Penicillium*/mycotoxins/ aflatoxins/ ochratoxins/antimicrobials/minimal inhibitory concentration/essential oils/thyme/ fennel/silver fir/oregano/peppermint/anisaldehyde/thymol/carvacrol/ menthol
- AU HOSTNIK, Nina
- AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ RASPOR, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- BY 2012
- TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS AND THEIR COMPONENTS AGAINST MYCOTOXIGENIC MOLDS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 64 p., 20 tab., 20 fig., 4 ann., 83 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of the present study was to determine the influence of several essential oils (peppermint, oregano, fennel, thyme and silver fir) and their components (thymol, carvacrol, menthol and anisaldehyde) on growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* and their mycotoxin production. Minimal inhibitory concentration (MIC) was estimated with broth dilution method in multiwell microdilution plates. According to our results thymol, menthol and carvacrol showed the best inhibitory potential (MIC<0,4 µL/mL), followed by essential oils of oregano and thyme (MIC<2,4 µL/mL). Using colony size measurement on the solid substrate and defining dry weight of the biomass in broth it was shown that the great majority of 10 oils, that were used in our study, had a partial inhibitory effect on growth of molds that were included in the study. Thin layer chromatography (TLC) was used for qualitative analysis of mycotoxigenic potential of molds. While *A. niger* and *P. nordicum* failed to produce mycotoxins, *A. flavus* and *P. verrucosum* sintetized aflatoxin B₁ and ochratoxin A, respectively. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for quantitative analysis of mycotoxins. Even though the majority of oils partly inhibited the production of mycotoxins, ¼ MIC of thymol and ½ MIC of carvacrol had the opposite effect on *A. flavus* and *P. verrucosum*, respectively, and stimulated their biosynthesis for more than 90 %. No direct connection was established between the growth inhibition and mycotoxin biosynthesis inhibition.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOTOKSIGENE PLESNI IN MIKOTOKSINI.....	3
2.1.1 Rod <i>Aspergillus</i>	3
2.1.2 Rod <i>Penicillium</i>	4
2.1.3 Odkritje mikotoksinov.....	4
2.1.4 Skupine mikotoksinov	5
2.1.4.1 Aflatoksini	6
2.1.4.2 Ohratoksini	6
2.1.5 Metode ugotavljanja prisotnosti mikotoksinov <i>in vitro</i>	7
2.1.6 Mikotoksini v živilih	8
2.2 ETERIČNA OLJA.....	11
2.2.1 Sestava in biološka aktivnost	11
2.2.1.1 Anisaldehyd.....	12
2.2.1.2 Jelka	13
2.2.1.3 Koromač	13
2.2.1.4 Meta in mentol.....	14
2.2.1.5 Origano in karvakrol.....	14
2.2.1.6 Timijan in timol	15
2.2.2 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti eteričnih olj <i>in vitro</i>	15

2.2.3	Uporabnost eteričnih olj kot protimikrobnih snovi v prehrabeni industriji.....	18
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	MATERIALI	20
3.1.1	Mikroorganizmi	20
3.1.2	Eterična olja in njihove sestavine	20
3.1.3	Gojišča.....	21
3.1.3.1	Tekoče gojišče Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)	21
3.1.3.2	Agar s sladnim ekstraktom (MEA).....	21
3.1.3.3	Tekoče gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES).....	21
3.1.3.4	Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA)	22
3.1.4	Kemikalije in raztopine	22
3.1.4.1	Fiziološka raztopina.....	22
3.1.4.2	Topilo za ekstrakcijo aflatoksina B ₁	23
3.1.4.3	Ostale kemikalije in raztopine	23
3.1.5	Laboratorijski pribor in oprema.....	23
3.2	METODE	25
3.2.1	Gojenje in vzdrževanje sevov.....	25
3.2.2	Primerjava hitrosti rasti pri različnih temperaturah.....	25
3.2.3	Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici (Rex in sod., 2008).....	25
3.2.3.1	Priprava eteričnih olj in njihovih sestavin	25
3.2.3.2	Priprava suspenzije spor	26
3.2.3.3	Priprava mikrotitrške ploščice	26
3.2.4	Spremljanje rasti in tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču	28
3.2.4.1	Spremljanje rasti	29
3.2.4.2	Spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986).....	29
3.2.4.3	Spremljanje tvorbe mikotoksinov s HPLC (Bragulat in sod., 2001; Frisvad, 1987; Frisvad in Thrane, 1987; Frisvad and Thrane, 1993) ..	30
3.2.5	Spremljanje rasti in tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču.....	31

3.2.5.1	Spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986) in HPLC (Bragulat in sod., 2001; Frisvad, 1987; Frisvad in Thrane, 1987; Frisvad and Thrane, 1993).....	32
3.2.5.2	Spremljanje rasti	33
4	REZULTATI.....	34
4.1	PRIMERJAVA HITROSTI RASTI PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH ...	34
4.2	OCENA MINIMALNE INHIBITORNE KONCETRACIJE.....	34
4.3	INHIBICIJA RASTI IN TVORBE MIKOTOKSINOV NA TRDNEM GOJIŠČU.....	36
4.3.1	Inhibicija rasti na trdnem gojišču	36
4.3.2	Inhibicija tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču.....	39
4.3.2.1	Kvalitativno spremljanje mikotoksinov s TLC	39
4.3.2.2	Kvantitativno spremljanje mikotoksinov s HPLC.....	41
4.4	INHIBICIJA RASTI IN TVORBE MIKOTOKSINOV V TEKOČEM GOJIŠČU.....	44
4.4.1	Inhibicija rasti v tekočem gojišču	45
4.4.2	Inhibicija tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču	46
4.4.2.1	Kvalitativno spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC	46
4.4.2.2	Kvantitativno spremljanje tvorbe mikotoksinov s HPLC	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1	RAZPRAVA.....	48
5.1.1	Primerjava hitrosti rasti pri različnih temperaturah.....	48
5.1.2	Ocena minimalne inhibitorne koncentracije v gojišču RPMI	48
5.1.3	Inhibicija rasti in tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču.....	50
5.1.4	Inhibicija rasti in tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču	52
5.2	SKLEPI.....	54
6	POVZETEK.....	56
7	VIRI	57

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mejne vrednosti aflatoksinov in ohratoksinov v živilih (Uredba komisije..., 2006).	10
Preglednica 2: Sestava gojišča Roswell Park Memorial Institute-1640 (Rex in sod., 2008).	21
Preglednica 3: Sestava agarja s sladnim ekstraktom (Samson in sod., 2000).	21
Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča s kvasnim ekstraktom in saharozo (Samson in sod., 2000).	21
Preglednica 5: Sestava Czapek agarja s kvasnim ekstraktom (Pitt in Hocking, 1997).	22
Preglednica 6: Sestava Czapek koncentrata z mikroelementi (Pitt in Hocking, 1997).	22
Preglednica 7: Sestava založne raztopine za pripravo fiziološke raztopine.	22
Preglednica 8: Sestava topila za ekstrakcijo aflatoksina B ₁ (Aflaprep®, 2011).	23
Preglednica 9: Ostale uporabljene kemikalije in raztopine.	23
Preglednica 10: Uporabljen laboratorijski pribor in oprema.	23
Preglednica 11: Primerjava hitrosti rasti delovnih sevov glede na inkubacijski čas in temperaturo.	34
Preglednica 12: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije posameznih eteričnih olj oz. njihovih sestavin pri plesnih vrst <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> in <i>Penicillium nordicum</i> v tekočem gojišču RPMI-1640.	35
Preglednica 13: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst <i>Aspergillus flavus</i> in <i>Aspergillus niger</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.	40
Preglednica 14: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst <i>Penicillium verrucosum</i> in <i>Penicillium nordicum</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.	40
Preglednica 15: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste <i>Aspergillus flavus</i> in inhibicije tvorbe aflatoksina B ₁ (AFB ₁) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 in 21 dneh inkubacije.	42
Preglednica 16: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste <i>Penicillium verrucosum</i> in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 in 21 dneh inkubacije.	43

Preglednica 17: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije eteričnih olj in njihovih sestavin pri plesnih vrst <i>Aspergillus flavus</i> in <i>Penicillium verrucosum</i> v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES).	44
Preglednica 18: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na rast plesni vrst <i>Penicillium nordicum</i> in <i>Aspergillus flavus</i> v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) pri temperaturi 28 °C.	45
Preglednica 19: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst <i>Penicillium verrucosum</i> in <i>Aspergillus flavus</i> v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) pri temperaturi 28 °C.	46
Preglednica 20: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste <i>Penicillium verrucosum</i> in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 21 dneh inkubacije. .	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula aflatoksina B ₁ (Richard, 2007)	6
Slika 2: Strukturna formula ohratoksina A (Richard, 2007)	7
Slika 3: Shematski prikaz poteka dela.....	19
Slika 4: Prikaz odčitavanja rezultatov z mikrotitrne ploščice po dodatku jodo-nitro-tetrazolium klorida.....	27
Slika 5: Shema nanosa vzorcev na ploščico s silikatnim gelom za tankoplastno tekočinsko kromatografijo.	30
Slika 6: Prikaz vzorčenja za tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).....	30
Slika 7: Prikaz polnjenja kolone za afinitetno kromatografijo (A), fotografija napolnjenih kolon (B).....	33
Slika 8: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezna eterična olja in njihove sestavine.....	35
Slika 9: Vpliv timola in timijana (A) ter karvakrola in origana (B) na rast plesni vrste <i>Aspergillus flavus</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.....	36
Slika 10: Vpliv mentola na rast plesni vrste <i>Aspergillus flavus</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.	37
Slika 11: Vpliv timola in timijana (A), karvakrola in origana (B) ter mentola (C) na rast plesni vrste <i>Aspergillus niger</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.....	37
Slika 12: Vpliv timola in timijana (A), karvakrola in origana (B) ter mentola (C) na rast plesni vrste <i>Penicillium verrucosum</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.	38
Slika 13: Vpliv timola in timijana (A) ter karvakrola in origana (B) na rast plesni vrste <i>Penicillium nordicum</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.....	38
Slika 14: Vpliv mentola na rast plesni vrste <i>Penicillium nordicum</i> na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.....	39

- Slika 15: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo aflatoksina B₁ (AFB₁) pri plesni vrste *Aspergillus flavus* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B).. 41
- Slika 16: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Aspergillus flavus* in inhibicije tvorbe aflatoksina B₁ (AFB₁) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B). 42
- Slika 17: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo ohratoksina A (OTA) pri plesni vrste *Penicillium verrucosum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B). 43
- Slika 18: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B). 44
- Slika 19: Primerjava ocenjenih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) posameznih eteričnih olj in njihovih sestavin pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus niger* v tekočem gojišču RPMI-1640 in tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES). 45
- Slika 20: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 21 dneh inkubacije. . 47

KAZALO PRILOG

Priloga A:

Povprečni premer kolonij seva *Penicillium verrucosum* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

Priloga B:

Povprečni premer kolonij seva *Aspergillus flavus* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

Priloga C:

Povprečni premer kolonij seva *Aspergillus niger* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj. Kontrola* je gojišča brez DMSO, ki je bila izvedena vzporedno z izvedbo kontrole z DMSO.

Priloga D:

Povprečni premer kolonij seva *Penicillium nordicum* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFB ₁	Aflatoksin B ₁
CYA	Czapek agar s kvasnim ekstraktom (angl. Czapek yeast extract agar)
dH ₂ O	Destilirana voda
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
FDA	Vladni urad Združenih držav Amerike za zdravila in prehrano (angl. United States Food and Drug Administration)
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture organization of the United Nations)
GRAS	Splošno priznано kot varno (angl. Generally recognise as safe)
HACCP	Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis Critical Control Point)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high-performance liquid chromatography)
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (angl. International Agency for Research on Cancer)
INT	Jodo-nitro-tetrazolium klorid
MEA	Agar s sladnim ekstraktom (angl. Malt extract agar)
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MOPS	3-[N-morfolin] propansulfonska kislina
n. a.	ni analize
n. p.	ni podatka
OTA	Ohratoksin A
RPMI	Angl. Roswell Park Memorial Institute
TLC	Tankoplastna kromatografija (angl. thin layer chromatography)
YES	Gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (angl. yeast extract sucrose)
ŽMJ	Oznaka sevov iz zbirke laboratorija za živilsko mikrobiologijo (Katedra za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil, Biotehniška fakulteta)

1 UVOD

Okužba hrane in kmetijskih proizvodov z različnimi tipi mikotoksigenih plesni predstavlja resen in nezanemarljiv problem, saj je po ocenah Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) z mikotoksini okuženih kar 25 % svetovnih kmetijskih kapacitet, ekonomske izgube, povezane z njimi, pa se merijo v milijardah dolarjev (Bhat in sod., 2010). Glivne vrste, ki povzročajo tovrsten kvar živil in živalske krme, se najpogosteje uvrščajo v rodove *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium* (Nguefack in sod., 2009). Posledica izpostavljenosti njihovim mikotoksinom so različna obolenja ljudi in živali, zaradi česar se med potrošniki pojavljajo vedno večje zahteve po zdravju neoporečnih in visoko kvalitetnih živilih (Bhat in sod., 2010).

Z namenom zaščite proizvodov pred temi nevarnimi kontaminacijami so danes večinoma v uporabi kemična zaščitna sredstva, vendar v zadnjem času ugotavljajo, da so nekatera, ki se redno uporabljajo kot konzervansi, zelo strupena za uživalce. Glavna prioriteta znanstvenikov na tem področju je tako najti zadovoljivo alternativo, ki bi uspešno nadomestila uporabo teh zdravju nevarnih kemikalij (Bhat in sod., 2010). Ena izmed možnosti je uporaba rastlinskih ekstraktov, med katere sodijo tudi eterična olja. Gre za naravne snovi, ki se v različne namene uporabljajo že vse od antičnih časov, raziskave pa so pokazale, da nekatere med njimi izkazujejo zadovoljivo protimikrobno aktivnost in s tem uporabno vrednost na področju zagotavljanja varnosti živil (Burt, 2004). Standardna metoda za ugotavljanje njihove protimikrobne aktivnosti ne obstaja, temveč je v uporabi več različnih metod (Klančnik in sod., 2010). Njihova izvedba je zaradi hlapljivosti in hidrofobnosti eteričnih olj zelo zahtevna, zato jih raziskovalci pogosto prilagodijo testiranemu vzorcu (Lang in Buchbauer, 2012). Posledično je primerjava rezultatov različnih metod otežena, vendar analize, izvedene *in vitro*, kljub temu predstavljajo pomembno izhodišče mnogim dražjim in zahtevnejšim metodam *in vivo*, ki podajo realno sliko o dejanski uporabni vrednosti določenega eteričnega olja kot protimikrobne snovi (Burt, 2004; Cos in sod., 2006; Combrick in sod., 2011).

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

- ~ Ugotoviti minimalne inhibitorne koncentracije izbranih eteričnih olj (olje jelkinih iglic in storžev, koromača, mete, origana in timijana) in njihovih sestavin (anisaldehyd, karvakrol, mentol in timol) za delovne seve plesni vrst *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nordicum* in *Penicillium verrucosum*;
- ~ Ugotoviti vpliv eteričnega olja ali njegove sestavine na rast delovnih sevov v trdnih in tekočih gojiščih;
- ~ Ugotoviti vpliv eteričnega olja ali njegove sestavine na tvorbo mikotoksinov pri delovnih sevih v trdnih in tekočih gojiščih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- ~ Minimalne inhibitorne koncentracije različnih eteričnih olj so odvisne od vrste eteričnega olja in testnih organizmov (sevov gliv);
- ~ Izbrane bioaktivne sestavine izkazujejo boljšo protimikrobno aktivnost kot celokupna eterična olja;
- ~ Inhibicija mikrobne rasti in inhibicija tvorbe mikotoksinov sta medsebojno povezani.

2 PREGLED OBJAV

Preučevanje patogeneze mikotoksigenih plesni in iskanje učinkovitih protimikrobnih snovi za inhibicijo njihovega delovanja sta predvsem v zadnjem času vse pogostejša. Poglavje 2 zajema pregled objav s tega področja v obsegu, potrebnem za učinkovito razumevanje našega raziskovalnega dela.

2.1 MIKOTOKSIGENE PLESNI IN MIKOTOKSINI

Mikotoksigeno plesni sodijo med filamentozne glive in so ubikvitarni organizmi, saj uspevajo tako na trdnih kot v tekočih substratih v vseh podnebnih razmerah širom sveta. Sintetizirajo zdravju škodljive mikotoksine in lahko med drugim kolonizirajo tudi rastlinje, namenjeno prehrani in živalski krmi (Bhat in sod., 2010; Pitt, 2000). Večina pripada rodovom *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* in *Penicillium*. Rodovoma *Fusarium* in *Alternaria* ustreza vlažno okolje, zato je nevarnost okužb verjetnejša med samo kultivacijo poljščin in skladiščenjem svežih, še ne posušenih rastlin. Rodova *Aspergillus* in *Penicillium* pa bolje uspevata pri nižji vlažnosti, zato predstavljata večje tveganje za okužbo produktov med skladiščenjem in kasneje med uporabo za prehrano ljudi ali krmo živali (Logrieco in sod., 2003). Temperaturno območje za rast mikotoksigenih plesni se običajno giblje med 10 °C in 40 °C, optimalna temperatura za sintezo večine mikotoksinov pa je med 20 °C in 30 °C (Bennet in Klich, 2003; Sweeney in Dobson, 1998).

2.1.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* sodi v red *Eurotiales*, deblo *Ascomycota*, in obsega več kot 185 poznanih vrst (NCBI, 2011; Yu in sod., 2005). Gre za enega najbolj vsesplošno prisotnih rodov, poznanega kot kvarljivca rastlinskih pridelkov. Vključuje večinoma saprofitske vrste, ki kolonizirajo odpadni rastlinski material, in nekaj sevov, ki lahko kolonizirajo žive rastline. Nekatere vrste so mikotoksigene (Logrieco in sod., 2003). Aflatoksini so produkti nekaterih sevov vrst *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* in *Aspergillus nomius*, ki kolonizirajo vrsto rastlin, vključujoč koruzo in druge žitarice, arašide, stročnice, bombaž, oljna semena, korenike, gomoljnice, oreščke, sveže in suho sadje, začimbe, zelišča in

večino zelenjave (Logrieco in sod., 2003; Sweeney in Dobson, 1998). Ohratoksine med drugim sintetizirajo nekateri sevi vrst *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus niger*, ki kot substrat za rast večinoma izrabljajo žitarice. Tri vrste tega rodu sintetizirajo tudi mikotoksine citridine (Logrieco in sod., 2003).

2.1.2 Rod *Penicillium*

Rod *Penicillium* sodi v red *Eurotiales*, deblo *Ascomycota* (NCBI, 2011). Glede na število vrst in njihovo razširjenost je najkompleksnejši glivni rod, ki med drugim vključuje kvarljivce hrane in živalske krme rastlinskega izvora, predvsem zelenjave, sadja, žitaric in stročnic, določne vrste povzročajo tudi gnitje sena. Redkeje lahko kolonizirajo meso, sire in začimbe (Logrieco in sod., 2003). Več kot sto vrst tega rodu je mikotoksigenih in sintetizira vsaj sedemindvajset različnih mikotoksinov, ki jih lahko delimo v dve skupini: nevrotoksine in tiste, ki vplivajo na delovanje ledvic in jeter. Med pomembnejše sodijo ohratoksini, patulin in citridin. Ohratoksini so sekundarni metaboliti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in sorodnih vrst, patulin je običajno produkt plesni vrste *Penicillium expansum*, obe omenjeni vrsti pa lahko sintetizirata tudi citridin, katerega glavni proizvajalec je plesen vrste *Penicillium citrinum* (Sweeney in Dobson, 1998). Glavni proizvajalec ohratoksina A (OTA), najdenega v mesnih izdelkih, kot so salame in šunka, je plesen vrste *Penicillium nordicum* (el Khoury in Atoui, 2010).

2.1.3 Odkritje mikotoksinov

Ergot alkaloidi so se, ne vedoč da gre za mikotoksine, že pred več kot petsto leti uporabljali v kitajski medicini, v srednjem veku so ljudje zaradi zaužitja kontaminiranega žita bolehal in umirali za različnimi boleznimi, zaradi svojih halucinogenih lastnosti so bili vpleteni tudi v čarovništvo. Ko so na prelomu 19. v 20. stoletje glive začeli uporabljati v fermentacijskih procesih, so ugotovili, da le-te med procesom sintetizirajo tudi različne sekundarne metabolite, ki jih človek nato zaužije skupaj s fermentacijskimi produkti. To je pripeljalo do povečanega zanimanja o njihovi toksičnosti in kmalu so ugotovili, da lahko prehranjevanje z okuženimi živili vodi v različna bolezenska stanja (Richard, 2007).

Skozi zgodovino so bili mikotoksini odgovorni za kar nekaj epidemij, vključujoč ergotizem, ki je v prejšnjem tisočletju pobil na tisoče Evropejcev, alimentarno toksično alevkijo, ki je med letoma 1942 in 1948 pomorila vsaj sto tisoč Rusov, v 30. letih 19. stoletja pa je za posledicami stahibotriotoksikoze v Sovjetski zvezi poginilo na deset tisoče konj (Pitt, 2000). Začetki moderne mikotoksikologije segajo v leto 1961, ko je bolezen X v Angliji pomorila okoli sto tisoč puranov. Bolezen je takrat kot posledica zaužitja arašidov, kontaminiranih s plesnimi vrste *Aspergillus flavus*, pripeljala do odkritja aflatoksinov. Z ugotovitvijo, da do kontaminacije s temi rakotvornimi in imunosupresivnimi toksini ne pride samo med skladiščenjem, ampak tudi že med samo kultivacijo žit, so mikotoksini postali multidisciplinarni problem, vključujoč kemijo, mikrobiologijo, agronomijo, genetiko, medicino, veterino, kmetijstvo in številne druge panoge. Njihovo sodelovanje je omogočilo odkritje številnih drugih skupin mikotoksinov in njihove vloge pri različnih bolezenskih stanjih ljudi in živali (Bennett in sod., 2007; Richard, 2007).

2.1.4 Skupine mikotoksinov

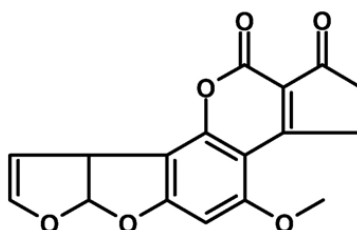
Glive proizvajajo številne sekundarne metabolite, ki se, glede na njihovo delovanje in koncentracijo, uvrščajo v različne skupine. Tako poznamo antibiotike, ki so v glavnem toksični za bakterije, fitotoksini so patogeni rastlin, v skupino mikotoksinov pa sodijo nizkomolekularne molekule, ki so že v nizkih koncentracijah toksične za vretenčarje in druge živalske skupine. Med slednje ne sodijo metaboliti gob, čeprav ravno tako povzročajo obolenja in smrt človeka in živali. Velja namreč, da filamentozne glive proizvajajo mikotoksine, gobe in druge makroskopske glive pa strupe. Med mikotoksine se ne uvrščajo še nekateri drugi nizkomolekularni sekundarni metaboliti gliv, kot je na primer etanol, ki so toksični le pri visokih koncentracijah (Bennett in Klich, 2003).

Znanih je več kot petsto vrst mikotoksinov, ki so kemijsko in temperaturno stabilne spojine. Glede na strukturne podobnosti in toksičnost jih razvrščamo v več skupin (Koppen in sod., 2010). Poznamo aflatoksine, citridine, ergot alkaloidne, fumonizine, ohratoksine, patuline, trihotecene, zearalenole, T-2 toksine in druge (Bennett in Klich, 2003; Richard, 2007). Posamezna glivna vrsta lahko proizvaja enega ali več različnih mikotoksinov, prav tako je lahko enak mikotoksin proizvod različnih glivnih vrst (Hussein in Brasel, 2001).

2.1.4.1 Aflatoksini

Aflatoksini so difuranokumarinski derivati, ki jih po poliketidni poti sintetizirajo številni sevi vrst rodu *Aspergillus*, najpogosteje *A. flavus* in *A. parasiticus*, redkeje *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nominus* in *A. pseudotamari*. Ne sintetizirajo jih vsi sevi znotraj posamezne aflatoksigene vrste, temveč le nekateri. Tako je na primer aflatoksigenih le polovica sevov *A. flavus* (Bennet in Klich, 2003; Turner in sod., 2009). Do sedaj je bilo identificiranih osemnajst različnih vrst aflatoksinov (Bhat in sod., 2010). Glede na UV fluorescenco in kromatografsko mobilnost ločimo štiri glavne aflatoksine: B₁, B₂, G₁ in G₂. Ostali aflatoksini so večinoma sesalski biotransformacijski produkti glavnih metabolitov (Bennet in Klich, 2003). V hrani in živalski krmi se izmed vseh aflatoksinov v najvišjih koncentracijah pojavlja aflatoksin B₁ (AFB₁). Njegov derivat, aflatoksin M₁, je biotransformacijski produkt, ki se izloča v mleko sesalcev (Sweeney in Dobson, 1998).

Aflatoksini so po klasifikaciji Mednarodne agencije za raziskave raka IARC (angl. International Agency for Research on Cancer) edini mikotoksini, ki so dokazano rakotvorni za človeka (Paterson in Lima, 2010). Poleg rakotvornega učinka lahko na ljudi in živali delujejo tudi imunosupresivno, teratogeno in mutageno, primarni tarčni organ so običajno jetra. Občutljivost nanje se med vrstami razlikuje in je odvisna od pasme, starosti, doze in dolžine izpostavljenosti. Bolezni, ki so posledica njihovega zaužitja, imenujemo aflatoksikoze in so lahko akutne ali kronične. (Bennet in Klich, 2003; Richard, 2007).

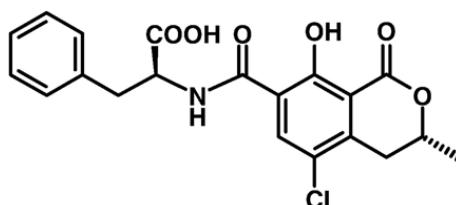


Slika 1: Strukturna formula aflatoksina B₁ (Richard, 2007)

2.1.4.2 Ohratoksini

Ohratoksini so sekundarni metaboliti številnih vrst rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. Sestojijo iz izokumarinske podenote in fenilalanina, ki sta medsebojno povezana z amidno

vezjo (Bayman in Baker, 2006). Njihova biosinteza poteka s kombinacijo različnih metabolnih poti (Sweeney in Dobson, 1998). Najpogostejši mikotoksin iz te skupine je ohratoksin A (OTA). Na fiziologijo tarčne celice lahko vpliva na različne načine, vendar dosedanje raziskave kažejo, da najpogosteje inhibira encim, vpleten v metabolizem fenilalanina, inhibira mitohondrijsko sintezo ATP in stimulira lipidno peroksidazo. Tarčni organ so najpogosteje ledvice, pri višjih koncentracijah tudi jetra. Je imunosupresiven in potencialno teratogen, po klasifikaciji IARC pa tudi potencialno rakotvoren za človeka (Bennet in Klich, 2003; Magnoli in sod., 2007; Richard, 2007). Bolezni, ki jih povzročajo ohratoksini, imenujemo ohratoksikoze (Paterson in Lima, 2010).



Slika 2: Strukturna formula ohratoksina A (Richard, 2007)

2.1.5 Metode ugotavljanja prisotnosti mikotoksinov *in vitro*

Standardna metoda, ki bi omogočala detekcijo vseh vrst mikotoksinov, ne obstaja, saj so te molekule medsebojno zelo raznolike in zahtevajo različne obravnave. V splošnem velja, da mora biti metoda robustna, občutljiva, zelo prilagodljiva in kadar je to potrebno, tudi specifična (Turner in sod., 2009). Pred izvedbo same metode za dokazovanje mikotoksinov se običajno izvedejo naslednji koraki: vzorčenje, homogenizacija, ekstrakcija in čiščenje z morebitnim koncentriranjem (Rahmani in sod., 2009). Za reprezentativen rezultat je zelo pomembno pravilno vzorčenje, saj so mikotoksini v substratu razporejeni heterogeno, ter čim večja čistost vzorca, saj lahko morebitne nečistoče pomembno vplivajo na rezultate in občutljivost metode (Stroka in sod., 2004; Turner in sod., 2009).

Detekciji mikotoksinov služijo različne metode, vključujoč tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC), tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), plinsko kromatografijo, kapilarno elektroforezo, masno spektroskopijo, imunske teste (npr. ELISA) in biosenzorje (Bennet in sod., 2007; Bhat in sod., 2010, Turner in sod., 2009).

Ena izmed popularnejših je TLC, ki je hitra in enostavna metoda za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje mikotoksinov v vzorcu (Lin in sod., 1998). Na voljo so različne izvedbe, osnovni princip metode pa je, da se vzorec v obliki točke nanese na stacionarno fazo, ki je lahko silikagel, aluminijev oksid ali celuloza, imobilizirana na stekleno ali plastično ploščo, le-ta pa se nato z enim robom plošče potopi v mobilno fazo. Vzorec nato skupaj s topilom potuje po stacionarni fazi in ko topilo doseže drugi rob plošče, se le-ta odstrani iz topila in pregleda s pomočjo UV svetlobe, fluorescence ali kakšne druge metode. Identifikacija posameznih sestavin nanešenega vzorca je možna s pomočjo standardov, ki sočasno z vzorcem potujejo po stacionarni fazi (Rahmani in sod., 2009). Filtenborg in Frisvad (1980) sta razvila zelo enostavno metodo za ugotavljanje prisotnosti mikotoksinov pri toksigenih plesnih. Košček agarja, preraščenega s plesnijo, se, dokler je micelij še moker, nanese neposredno na TLC ploščico, da se morebitni mikotoksini iz agarja prenesejo na stacionarno fazo. Po njegovi odstranitvi s ploščice se izvede standardni postopek TLC. Metoda je primerna za detekcijo različnih vrst mikotoksinov, vključujoč aflatoksine in ohratoksine (Filtenborg in sod., 1983).

Še ena izmed nepogrešljivih metod v moderni analitiki je metoda HPLC, ki omogoča kvantitativno vrednotenje prisotnosti iskanih snovi v vzorcu (Turner in sod., 2009). Gre za eno izmed izvedenk tekočinske kromatografije, pri kateri se preiskovani vzorec injicira v tekočo mobilno fazo in nato skupaj z njo potuje po koloni, napolnjeni s stacionarno fazo. Posamezne sestavine preiskovanega vzorca s stacionarno fazo reagirajo z različno afiniteto, zaradi česar po koloni potujejo z različno hitrostjo in se posledično ločijo med seboj. Sestavine zaznava detektor, ki na osnovi prejetih signalov izriše kromatogram (Bakalyar, 1981). V uporabi so različnimi detektorji, med katerimi sta za detekcijo mikotoksinov najpogostejši UV in fluorescenčna tehnika (Rahmani in sod., 2009).

2.1.6 Mikotoksini v živilih

Ker lahko uspevajo na ogromno različnih substratih in v skoraj vseh vremenskih razmerah, so mikotoksigene plesni in posledično mikotoksini v proizvodnji hrane zelo pogosti (Bennet in Klich, 2003). Do kontaminacije lahko pride na katerikoli stopnji proizvodne verige živil. Njihovo prisotnost so dokazali v različnih vrstah hrane širom po svetu, zaradi

česar so danes obravnavani kot ena izmed najnevarnejših okužb hrane in krme. Produkcija mikotoksinov ni sorazmerna z rastjo plesni, ampak nanjo vplivajo različni dejavniki tekom celotne proizvodne verige (Bhat in sod., 2010). Le-te lahko razdelimo v štiri skupine: (a) intrinzični prehranski parametri, kamor sodijo vodna aktivnost, hranilna sestava substrata, mineralna hranila, vsebnost vlage in drugo; (b) ekstrinzični parametri, ki med drugim zajemajo temperaturo, podnebne razmere, dostopnost kisika; (c) procesni parametri, ki obsegajo kmetijsko prakso, stopnjo sušenja, ponovno navlažitev, mešanje, mehanske poškodbe substrata, higienske razmere in podobno; ter (d) implicitni mikrobní parametri, kamor sodijo interakcije z insekti in pršicami, obilje sevov in spor, mikrobní ekosistem in ostalo (Magan in Aldred, 2007).

Aflatoksini so najpogosteje prisotni v žitaricah, začimbah, oljnih semenih, oreščkih, maslu in mleku. V slednjem je prisoten biotransformacijski produkt aflatoksina B₁, aflatoksin M₁, kar predstavlja resen problem, saj je mleko osnovni vir hranil človeka in nekaterih drugih živali v prvih mesecih življenja. Aflatoksine so dokazali tudi že v tradicionalnih naravnih zdravilih, ki temeljijo na rastlinski osnovi, in jajcih kokoši, ki so bile hranjene s kontaminiranim žitom. Do okužbe z ohratoksini običajno pride med skladiščenjem svežih produktov, kot so žitarice, kava, kakav, suho sadje, začimbe in tudi svinjina. Občasno se lahko pojavijo tudi že med samo kultivacijo na polju, posledica česar je njihova prisotnost v raznih sadnih sokovih, vinu ter v nekaterih notranjih organih in mleku živali, hranjenih z kontaminirano krmo (Bhat in sod., 2010). Evropska zakonodaja, ki velja tudi na območju Slovenije, predpisuje mejne vrednosti aflatoksinov in ohratoksinov v živilih, povzete v preglednici 1 (Uredba komisije..., 2006).

Za preprečevanje škodljivih posledic kontaminacije z mikotoksini so na voljo tri osnovne možnosti: preprečevanje kontaminacije, dekontaminacija z mikotoksini okuženih živil in krme ter inhibicija absorpcije mikotoksinov iz zaužite hrane v prebavnem traktu (Bata in Lasztity, 1999). Preventivni ukrepi za nadzor izpostavljenosti mikotoksinom temeljijo na sistemu HACCP (Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk, angl. Hazard Analysis Chritical Control Point), torej na identifikaciji kritičnih kontrolnih točk tekom celotne proizvodne verige (Magan in Aldred, 2007). Metode vključujejo dobro kmetijsko prakso, ustrezno sušenje pridelka po žetvi in izogibanje vlagi med skladiščenjem (Bennet

in sod., 2007). Kadar se ugotovi prisotnost mikotoksinov, so na voljo različni postopki za njihovo inaktivacijo ali odstranitev: razgradnja mikotoksinov z različnimi kemičnimi agensi (amoniak, ozon, vodikov peroksid, bisulfiti, formaldehid,...), obsevanje z gama žarki, ki povzročijo razpad mikotoksinov in zavirajo rast gliv, dodatek naravnih produktov (zelišč, začimb, eteričnih olj), ki zavirajo rast plesni in sintezo mikotoksinov, odstranitev mikotoksinov z organskimi vezavnimi delci oz. glukomanani, temperaturna obdelava (praženje, pasterizacija) in drugi (Bhat in sod., 2010). Ne glede na to, kateri izmed postopkov za dekontaminacijo je izbran, mora slediti osnovnim načelom: mikotoksin mora biti odstranjen ali uničen s pretvorbo v nestrupene sestavine, uničene morajo biti tudi spore in micelij, da ne pride do tvorbe novih mikotoksinov, živilo oz. krma mora ohraniti svojo hranilno vrednost in okusnost, fizične značilnosti substrata se ne smejo bistveno spremeniti, sam postopek pa mora biti tudi ekonomičen (Bata in Lasztity, 1999).

Preglednica 1: Mejne vrednosti aflatoksinov in ohratoksinov v živilih (Uredba komisije..., 2006).

Mikotoksin	Živilo	Mejna vrednost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Aflatoksin				
	Zemeljski oreščki (ki se pred zaužitjem sortirajo ali drugače mehansko obdelajo)	8	15	□
	Lupinarji, suho sadje, koruza (ki se pred zaužitjem sortirajo ali drugače mehansko obdelajo), začimbe	5	10	□
	Zemeljski oreščki, lupinarji, suho sadje in iz njih predelana živila, namenjena neposredni prehrani ljudi ali kot sestavina živil, žita in žitni proizvodi	2	4	□
	Mleko	□	□	0,050
	Otroška hrana, formule za dojenčke, živila za posebne zdravstvene namene	0,10	□	0,025
Ohratoksin A				
	Nepredelana žita, pražena kava (zrna in mleta)		5	
	Proizvodi iz nepredelanih žit		3	
	Suho grozdje, instant kava		10	
	Vino, sadno vino, aromatizirane pijače na osnovi vina, grozdni sok,		2	
	Otroška hrana, živila za posebne zdravstvene namene		0,50	
	surova kava, suho sadje, pivo, kakav, likerska vina, mesni izdelki, začimbe in sladki koren		□	

2.2 ETERIČNA OLJA

Eterična olja so sekundarni metaboliti aromatičnih rastlin, ki zaradi svojih aseptičnih lastnosti rastlini služijo kot zaščita pred bakterijskimi, virusnimi in glivnimi okužbami, hkrati pa tudi zmanjšujejo apetit rastlinojedcem. Sintetizirajo jih lahko vsi rastlinski organi, npr. cvetovi, listi, stebela, semena, korenine, sadeži, lubje, les in ostali. Poznamo približno tri tisoč različnih eteričnih olj, od tega jih je tristo komercialno pomembnih, predvsem v farmaciji, agronomiji, prehrabeni in kozmetični industriji ter proizvodnji parfumov. Običajno so ekstrahirana iz rastlin, katerih rastišča se nahajajo v zmerno toplih in vročih podnebjih, vse od Mediterana do tropov, kjer igrajo pomembno vlogo v tradicionalni farmakopeji (Bakkali in sod., 2008).

Uporablja se več načinov ekstrakcije, odvisno od tega, čemu so eterična olja namenjena, saj so od tipa ekstrakcije odvisne stereokemične lastnosti ekstrakta. Za uporabo v farmaciji in prehrabeni industriji se običajno uporablja destilacija s paro in ožemanje, za pripravo dišav oz. parfumov je bolj priljubljena ekstrakcija z lipofilnimi topili ali superkritičnim ogljikovim dioksidom. Poleg ekstrakcije na količino, kvaliteto in sestavo ekstrakta vplivajo še podnebne razmere, sestava prsti, starost rastline in vrsta rastlinskega organa, iz katerega je olje ekstrahirano, zato je za konstantno kvaliteto olja potrebno le-tega vedno ekstrahirati iz enakih rastlinskih organov, v istem letnem času in iz rastlin, ki rastejo v čim bolj podobnih pogojih. Kvaliteto komercialnih eteričnih olj vzdržujejo s kemotipizacijo s plinsko kromatografijo in masno spektroskopijo (Angioni in sod., 2006; Bakkali in sod., 2008; Masotti in sod., 2003).

2.2.1 Sestava in biološka aktivnost

Eterična olja so hlapljive, bistre, občasno obarvane spojine izrazitega vonja z nižjo gostoto od vode, ki so topne v maščobah in organskih topilih. Običajno gre za kompleksno naravno mešanico dvajsetih do šestdesetih sestavin, katerih koncentracije so različne. Običajno prevladujejo dve ali tri sestavine, ki so v olju zastopane v 20–70 % in se glede na biosintetski izvor uvrščajo v dve različni skupini. Prvo skupino sestavljajo sestavine iz

terpenov in terpenoidov, drugo pa sestavine iz aromatskih in alifatskih sestavin (Bakkali in sod., 2008).

Protimikrobno delovanje na tarčne celice se izraža na različne načine (Bakkali in sod., 2008). Lahko delujejo citotoksično, saj kot tipični lipofili prehajajo skozi celično steno in membrano ter pri tem spremenijo strukturo in permeabilnost membrane, kar povzroči izgubo ionov in redukcijskega membranskega potenciala, v notranjosti celice pa povzročajo koagulacijo citoplazme in poškodbe lipidov in proteinov (Gustafson in sod., 1998; Ultee in sod., 2002). Nekatera eterična olja so tudi fototoksična in vsebujejo fotoaktivne molekule, ki ob prehodu v celico sicer ne poškodujejo membran, proteinov in DNK, ko pa je celica izpostavljena svetlobi, se sprožijo radikalske reakcije, ki lahko poškodujejo celične makromolekule in v nekaterih primerih sprožijo kovalentne povezave med DNK, proteini in membranskimi lipidi (Dijoux in sod., 2006, Bakkali in sod., 2008). Izzovejo lahko tudi jedrno in citoplazemsko mutagenozo, predvsem sestavine eteričnih olj pa lahko po metabolni aktivaciji postanejo tudi rakotvorne in izzovejo sintezo rakotvornih metabolitov ter posledično nastanek različnih oblik rakavih obolenj (Bakkali in sod., 2008; Guba, 2001). Rezultat vseh teh učinkov je običajno viden kot inhibicija rasti plesni, nesposobnost tvorbe micelija, mikotoksinov ali spor (Lang in Buchbauer, 2012).

2.2.1.1 Anisaldehyd

Anisaldehyd ali 4-metoksibenzaldehid je sestavina eteričnega olja, ekstrahiranega iz semen janeža (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae), katerega rastišče obsega širše območje Mediterana in južne Azije. Strukturno je soroden vanilinu, ki je izkazal izrazito protimikrobno aktivnost proti številnim kvasovkam in plesnim, zaradi česar predvidevajo, da bi lahko imel anisaldehyd veliko uporabno vrednost kot naravni fungicid in konzervans v živilski industriji (Fitzgerald in sod., 2004; Shreaz in sod., 2011).

Shreaz in sod. (2011) so ugotovili, da ima anisaldehyd izrazit inhibitorni učinek na rast in biosintezo ergosterolov vrst rodu *Candida*. Testirali so proti flukonazolu odporne seve in seve, ki so za ta fungicid občutljivi. Obseg inhibicije je bil pri obeh skupinah podoben, kar je spodbudno za nadaljnje raziskave o njegovi uporabnosti v medicinske namene.

2.2.1.2 Jelka

Jelka (lat. *Abies alba* Mill., Pinaceae) je ena izmed najpogostejših drevesnih vrst goratih predelov Evrope. Raste predvsem na območju srednje Evrope, najdemo pa jo tudi v drugih predelih, npr. v Pirenejih in na Balkanu (Ficko in sod., 2011).

Njeno eterično olje ima dokazano blagodejne učinke na respiratorni sistem in mišice, o sami bioaktivnosti tega olja pa je znanega zelo malo. Sestoji iz vsaj svajsetih različnih sestavin, med katerimi so najbolj zastopane boril acetat (30,3 %), kampen (19,8 %), 3-karen (13,9 %), triciklen (12,9 %), dilimonen (7,5 %) in α -pinen (2,9 %). Nekatere izmed teh sestavin delujejo protimikrobno, vendar so protimikrobni vpliv eteričnega olja odkrili le proti bakteriji vrste *Staphylococcus aureus*. Na rast drugih testiranih bakterijskih sevov ni imelo posebnega vpliva (Yang in sod., 2009).

2.2.1.3 Koromač

Koromač (lat. *Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae) je aromatična trajnica, ki izvira iz južne Evrope in Mediterana, danes pa je razširjena v zmernotoplilih in tropskih regijah širom sveta. Rastlina se kot začimba pogosto uporablja v kulinarične namene, zahvaljujoč svojim zdravilnim učinkovinam je tudi stalnica v tradicionalni medicini. Eterično olje in njegove sestavine se zaradi protimikrobnega, protibakterijskega in protiglivnega delovanja že vrsto let uporabljajo kot konzervans surovih in procesiranih živil, v farmaciji, alternativni medicini in v terapevtske namene, zaradi izrazitega inhibitornega delovanja proti rastlinskim patogenom pa ima koromač tudi velik uporabni potencial kot nov naravni fungicid in baktericid v agronomiji (Gulfraz in sod., 2008; He in sod., 2011). Med drugim so olje in njegove sestavine izkazali protimikrobno delovanje proti plesnim vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus niger* (Singh in sod., 2006)

Napoli in sod. (2010a) so na podlagi analize šestinpetdesetih vzorcev semen sicilijanskega koromača ugotovili sestavo njegovega eteričnega olja. Identificirali so osemindemdeset sestavin, ki predstavljajo več kot 98 % olja. Najbolj zastopane sestavine so fenilpropanoidi (42–90 %), kamor med drugim sodita estragol (34–89 %) in (E)-anetol (0,1–36 %). Sledijo

oksisgenirani monoterpeni (3–56 %) s fenčonom (2–27 %). Iz skupine monoterpen ogljikovodikov (3–52 %) pa so najbolj zastopani α -pinen (1–21 %), limonen (1–17 %) in γ -terpinen (do 4 %). Vsebnost ostalih sestavin je bistveno nižja od omenjenih.

2.2.1.4 Meta in mentol

Meta je ena izmed najpogostejših zelišč, saj uspeva v različnih podnebnih pogojih po vsem svetu. Komercialno najpomembnejša vrsta je poprova meta (*Mentha x piperita* L. Lamiaceae), ki je sterilni hibrid med vodno (*Mentha aquatica* L.) in klasasto meto (*Mentha spicata* L.). Njene medicinske in aromaterapevtske lastnosti so poznali že v antičnih časih, danes pa se metino eterično olje in njegove sestavine uporabljajo na različnih področjih, od prehranske industrije, medicine, farmacije in kozmetične industrije do insekticidov in fungicidov v agronomiji (Abbaszadeh in sod., 2009; Iscan in sod., 2002; Kumar in sod., 2011).

Glavni sestavini eteričnega olja poprove mete sta mentol (49 %) in menton (23 %), poleg njiju so v večjem obsegu zastopani še izomenton in neomentol (17 %), izometil acetat (3 %), α -pinen (2 %) in β -pinen (2 %) (Golebiowski in sod., 2008). Samo olje je izkazalo izrazito protimikrobno aktivnost proti številnim mikrobnim vrstam, med drugim tudi proti nekaterim vrstam iz rodu *Penicillium* (Combrinck in sod., 2011; Iscan in sod., 2002). Sandasi in sod. (2011) so ugotovili, da lahko meta v *in vitro* pogojih inhibira tudi nastanek mikrobnih biofilmov.

2.2.1.5 Origano in karvakrol

Naravno rastišče origana (lat. *Origanum vulgare* L. Lamiaceae) je območje južne Evrope, vendar ga lahko danes najdemo povsod po svetu. Gre za eno izmed najpopularnejših začimb mediteranske kuhinje, zaradi njegovih aktivnih sestavin, predvsem karvakrola, pa se uporablja tudi kot konzervans. Poleg svoje vloge v kulinariki ima uporabno vrednost tudi v medicini, saj so številne raziskave pokazale njegovo protimikrobno, protiglivno in insekticidno delovanje (Mechergui in sod., 2010; Saeed in Tariq, 2009).

V največji meri origanovo eterično olje sestavljata karvakrol (61,3 %) in timol (13,9 %), ki sodita med oksigenirane fenolne monoterpe (Bozin in sod., 2006). Prav ti dve sestavini naj bi bili tudi odgovorni za izrazit protimikrobni učinek tega eteričnega olja. Raziskave so namreč pokazale, da origanovo olje oziroma njegove sestavine izrazito zavirajo rast številnih po Gramu pozitivnih in negativnih bakterijskih vrst, poleg protibakterijske pa imajo tudi protiglivično aktivnost, med drugim uspešno zavirajo rast plesni vrste *Aspergillus niger* (Bozin in sod., 2006; Guarda in sod., 2011). Kot poročajo Santoro in sod. (2007), eterično olje origana onemogoča tudi rast in razvoj praživali vrste *Trypanosoma cruzi*, povzročiteljice endemičnih tropskih bolezni.

2.2.1.6 Timijan in timol

Timijan (lat. *Thymus vulgaris* L. Lamiaceae) je aromatična mediteranska trajnica, ki se kot začimba pogosto uporablja v tradicionalni kuhinji. Poznali so ga že stari Egipčani, ki so ga uporabljali kot sestavino mazil za balzamiranje, in vse od takrat se timijan uporablja tudi v medicinske namene, zahvaljujoč svoji protimikrobni aktivnosti. Pravzaprav bioaktivne učinkovine vsebuje njegovo eterično olje, zaradi česar se pogosto uporablja kot konzervans in antioksidant v prehrabeni industriji, prav tako je nepogrešljiv v proizvodnji parfumov in kozmetike (Napoli in sod., 2010b).

Prevladujoča sestavina eteričnega olja je timol (57–70 %), v precej nižjih odstotkih mu sledijo α -terpinen, boril acetat, p-cimen, karvakrol in ostali. Olje je izkazalo protimikrobni učinek proti številnim bakterijskim in glivnim vrstam, med drugim tudi proti vrstam iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Nguefack in sod., 2009; Razzaghi-Abyaneh in sod., 2009; Rota in sod., 2008).

2.2.2 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti eteričnih olj *in vitro*

Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti eteričnih olj *in vitro* so na voljo različne metode, vendar standardna metoda za tovrstne analize še ne obstaja. V splošnem velja, da mora biti metoda enostavna, hitra, ponovljiva, poceni ter da omogoča čim večje število analiz različnih vzorcev (Klančnik in sod., 2010). Zaradi hlapljivosti in hidrofobnosti eteričnih olj

je izvedba metod zelo zahtevna, zato jih raziskovalne skupine običajno prilagodijo posameznemu vzorcu. Že majhne spremembe pa občutno vplivajo na končni rezultat, zaradi česar neposredna medsebojna primerjava rezultatov različnih metod ni mogoča (Cos in sod., 2006). Primerjavo rezultatov onemogoča tudi dejstvo, da se definicija minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), ki se običajno navaja kot merilo protimikrobne aktivnosti, med publikacijami razlikuje. Najpogosteje uporabljane definicije so: (a) najnižja koncentracija, ki zniža preživelost inokuluma; (b) najnižja koncentracija, ki je potrebna za popolno inhibicijo testiranega organizma med 48-urno inkubacijo; (c) najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast testiranega organizma; (d) najnižja koncentracija, ki zniža preživelost inokuluma za več kot 90 %. Rezultati, ki jih dobimo z analizami *in vitro*, še ne podajo ustrezne uporabne vrednosti *in vivo*, saj so številne raziskave pokazale, da je za doseg enakega inhibitornega učinka v živilih potrebna višja koncentracija eteričnega olja (Burt, 2004).

Najpogosteje uporabljane metode *in vitro* so:

- ~ Difuzijska metoda v agarju: Testirano eterično olje se na površino agarja nanese v za to pripravljene luknjice, ali pa nanos poteka s pomočjo prepojenih papirnatih diskov. Eterično olje nato iz rezervoarja prehaja v gojišče, ki je nacepljeno z izbrano mikrobno kulturo, in od njegove protimikrobne aktivnosti je odvisna velikost cone inhibicije okoli rezervoarja. Cona se običajno privzame kot merilo protimikrobne aktivnosti eteričnega olja, vendar velja poudariti, da njena velikost včasih ne odraža dejanskega protimikrobnega potenciala, saj v vodi slabo topne snovi težje prehajajo v gojišče, zaradi česar je posledično manjša tudi cona inhibicije. Poleg tega na difuzivnost vplivajo tudi hlapljivost testiranega olja, vrsta gojišča, količina nanesenega olja, pH in drugo (Pauli in Schilcher, 2010).
- ~ Redčitvena metoda: Eterično olje se v različnih koncentracijah v obliki redčitvene vrste vmeša v trdno ali tekoče gojišče, nacepljeno z mikrobno kulturo. Na trdnih gojiščih se opazuje prisotnost vidne rasti mikroorganizmov, v tekočih gojiščih se rast spremlja z redoks indikatorji ali s pomočjo motnosti (s prostim očesom ali z merjenjem optične gostote). Rezultat je podan kot MIK in je enak najnižji koncentraciji eteričnega olja v

gojišču, kjer je še prišlo do popolne inhibicije vidne mikrobne rasti. Težavo pri tej metodi predstavljajo različni dejavniki, kot so slaba topnost olj v vodi, dodatek topil (npr. dimetilsulfoksid, etanol) in detergentov (npr. Tween 20), hlapljivost eteričnih olj, izbira gojišča, pH in čas inkubacije, ki vplivajo na rast mikrobne kulture in posledično na ugotavljanje MIK (Cos in sod., 2006; Pauli in Schilcher, 2010).

Ena izmed izvedenk redčitvene metode je referenčna metoda razredčevanja v tekočem gojišču s pomočjo mikrotitrne ploščice, namenjena ugotavljanju občutljivosti filamentoznih gliv za protiglivne snovi, ki jo je razvil inštitut CLSI. Privzeta definicija vrednosti MIK po tej metodi je najnižja koncentracija protimikrobne snovi, ki popolnoma inhibira vidno rast mikroorganizma (Rex in sod., 2008).

- ~ Metoda s hlapno fazo: Standardiziran postopek za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti eteričnih olj pri tej metodi ne obstaja. Običajno je petrijeva plošča z nacepljenim agarjem obrnjena na glavo in postavljena tako, da prekriva rezervoar (papirnati disk, skodelica ali steklo), ki vsebuje vzorec eteričnega olja. Rezultat je lahko podan kot cona inhibicije, minimalna inhibitorna koncentracija v zraku (MIK_{zrak}) ali opisno – normalna rast, zmanjšana rast, vidna rast, ni rasti (Pauli in Schilcher, 2010).

- ~ Bioavtografske metode: Gre za kvalitativno metodo, ki temelji na tankoplastni kromatografiji. Postopek je podoben difuzijski metodi v agarju, vendar s to razliko, da protimikrobne snovi v nacepljen agar prehajajo s kromatografske ploščice. V uporabi je več izvedb te metode. Najpogosteje uporabljena je direktna bioavtografija, pri kateri je TLC ploščica z naneseno protimikrobno snovjo potopljena v mikrobno suspenzijo in inkubirana v vlažni atmosferi. Površina ploščice omogoča rast mikroorganizmov in na mestih, kamor je bila nanesena protimikrobna snov, se pojavijo cone inhibicije. Pri kontaktni bioavtografiji se TLC ploščica s protimikrobno snovjo nanese na površino inokuliranega agarja, nato pa po določenem času odstrani in inkubacija nadalje poteka brez nje. Po preteku inkubacijskega časa se na mestih, kjer je agar prišel v stik s protimikrobno snovjo, pojavijo cone inhibicije. Kombinacija obeh omenjenih metod je inverzna bioavtografija, kjer je TLC ploščica najprej prekrita z agarjem, ko se le-ta strdi, pa se njegova površina inokulira z mikrobno kulturo (Choma in Grzelak, 2011).

2.2.3 Uporabnost eteričnih olj kot protimikrobnih snovi v prehrambeni industriji

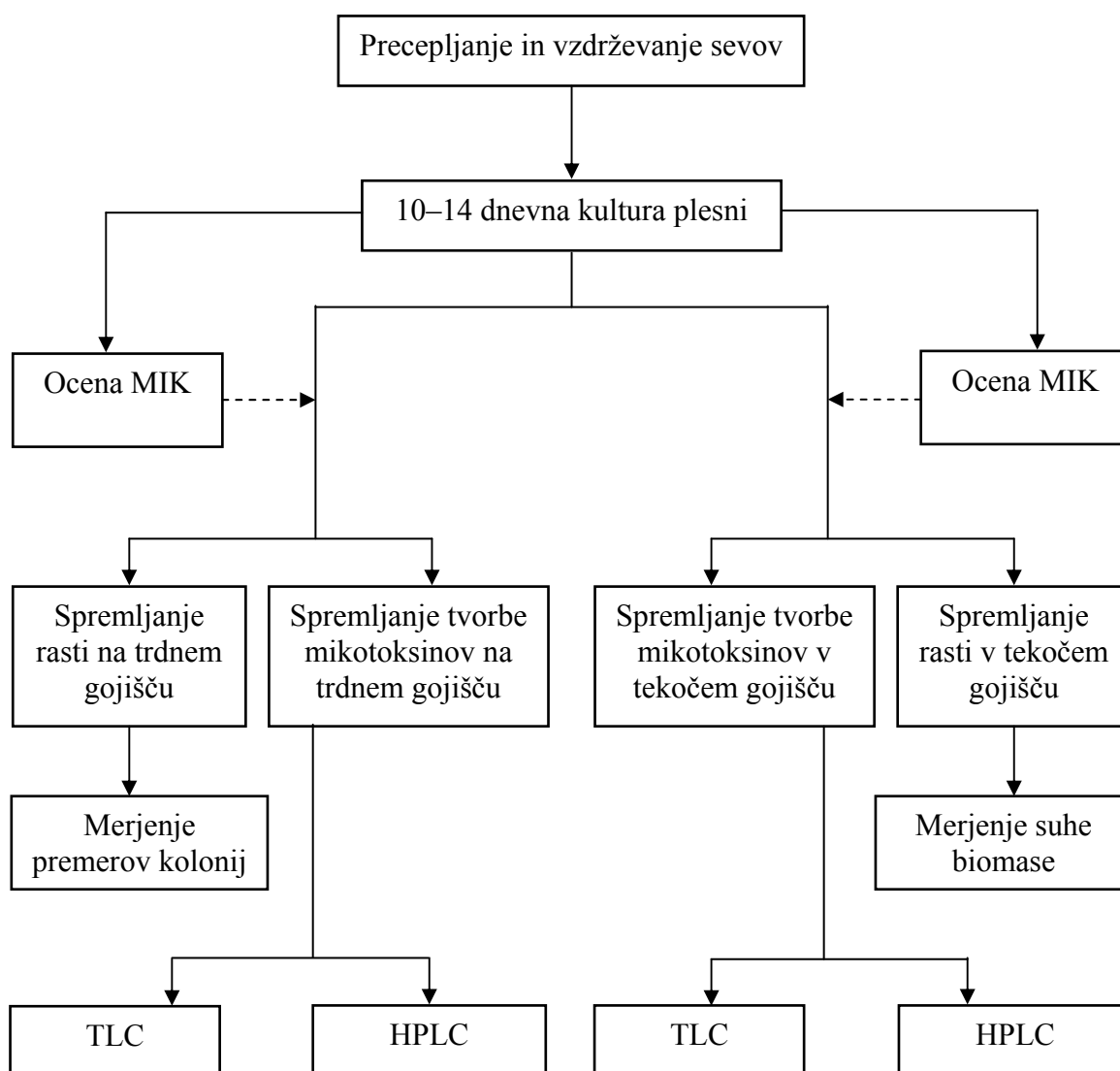
Rastlinski ekstrakti se kot živilski konzervansi uporabljajo že stoletja, še posebej pa na veljavi pridobivajo v zadnjem času, ko človeštvo vse bolj stremi k nadomestitvi umetnih konzervansov s protimikrobnimi snovmi naravnega izvora. Glavni cilj uporabe je podaljšati obstojnost živil in zagotoviti varnost njihovega uživanja s preprečevanjem razvoja kvarljivcev in patogenih mikroorganizmov (Tajkarimi in sod., 2010).

Eden pomembnejših omejujočih dejavnikov, ki vplivajo na izbiro eteričnega olja kot protimikrobne snovi, so organoleptične lastnosti, saj lahko že majhen dodatek olja vpliva na okus in vonj živila. V tem primeru so v prednosti živila, kot so meso in ribe, ki se dobro ujemajo z različnimi začimbami. Pomembna je tudi varnost uporabe eteričnih olj kot dodatkov k živilom. Eterična olja in njihove sestavine, med njimi tudi karvakrol, mentol in timol, ki so s strani Evropske komisije registrirani kot začimbe k živilom, se smatrajo kot zdravju neoporečni. Hkrati so tudi uvrščeni na seznam odobrenih dodatkov k živilom, ki ga pripravlja Vladni urad Združenih držav Amerike za zdravila in prehrano FDA (United States Food and Drug Administration) in nosijo oznako GRAS, kar pomeni splošno priznano kot varno (angl. generally recognise as safe). Kljub temu v zadnjem času nekatere raziskave nasprotujejo njihovi neoporečnosti in nakazujejo na njihovo vlogo pri nastanku različnih alergij in razdraženosti, zato bodo potrebne še številne raziskave, preden se bodo eterična olja v živilstvu začela pojavljati v večjem obsegu kot do sedaj (Burt, 2004).

Pomembna lastnost, ki ravno tako vpliva na izbor olja kot konzervansa, je tudi sinergistično ali antagonistično delovanje njegovih sestavin. Kadar ima mešanica večih sestavin boljši protimikrobni učinek od posamičnih sestavin, pravimo, da gre za sinergistično delovanje. Tako so številne raziskave že dokazale, da lahko eterično olje v celoti izkaže boljše protimikrobno delovanje kot njegove posamezne sestavine. V nasprotnem primeru, torej kadar je posamezna sestavina aktivnejša od celokupnega olja, pa govorimo o antagonističnem delovanju. Enaki učinki se pojavljajo tudi glede na lastnosti živila – nizek pH, nizka vodna aktivnost, kelatorji, nizka vsebnost kisika, povišan tlak in podobno na eterična olja delujejo sinergistično, medtem ko lahko na primer dodatek soli na olje deluje sinergistično ali antagonistično, odvisno od okoliščin (Burt, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalno delo je vključevalo več različnih metod in je bilo v grobem razdeljeno na dva sklopa – preučevanje protimikrobnega vpliva eteričnih olj in njihovih sestavin na mikotoksigene plesni v trdnih gojiščih ter ponovna izvedba analiz še v tekočih gojiščih. Potek dela prikazuje slika 3.



Slika 3: Shematski prikaz poteka dela.

Legenda: MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; TLC- tankoplastna tekočinska kromatografija; HPLC- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.

3.1 MATERIALI

Za potrebe izvajanja analiz smo uporabljali številne materiale, vključujoč mikrobne seve, eterična olja in njihove sestavine, različna gojišča, kemikalije in raztopine, navedene v poglavju 3.1.

3.1.1 Mikroorganizmi

Vse delovne seve plesni smo pridobili iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Katedre za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Uporabljeni so bili naslednji sevi:

- ~ *Aspergillus flavus* ŽMJ 25 (izolat)
- ~ *Aspergillus niger* ŽMJ 27 (izolat)
- ~ *Penicillium nordicum* ŽMJ 29 (izolat)
- ~ *Penicillium verrucosum* ŽMJ 23 (tipski sev)

3.1.2 Eterična olja in njihove sestavine

Raziskovali smo protimikrobno delovanje desetih različnih eteričnih olj in njihovih sestavin. Uporabljeni anisaldehyd je komercialni proizvod podjetja ChromaDex, ZDA. Eterični olji iglic in storžev srebrne jelke smo pridobili iz Laboratorija za splošno mikrobiologijo in mikrobiologijo živil Zavoda za biokemijsko inženirstvo Prehrambeno-biotehnološke fakultete Univerze v Zagrebu, ostala eterična olja in sestavine pa so proizvod Katedre za farmacijo Medicinske fakultete Univerze v Novem Sadu.

Eterična olja:

- ~ Srebrna jelka (iglice in storži)
- ~ Koromač
- ~ Poprova meta
- ~ Origano
- ~ Timijan

Sestavine eteričnih olj:

- ~ Anisaldehyd
- ~ Karvakrol
- ~ Mentol
- ~ Timol

3.1.3 Gojišča

Izvedba metod je vključevala uporabo trdnih in tekočih gojišč, zajetih v poglavju 3.1.3.

3.1.3.1 Tekoče gojišče Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)

Preglednica 2: Sestava gojišča Roswell Park Memorial Institute-1640 (Rex in sod., 2008).

Sestavina	Količina
Medij RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Nemčija)	10,4 g
dH ₂ O	1000 mL

Gojišču smo med mešanjem na magnetnem mešalu z MOPS pufrom (končna koncentracija 0,165 mol/L) uravnali pH do končne vrednosti pH=7 in ga nato sterilizirali s filtracijo.

3.1.3.2 Agar s sladnim ekstraktom (MEA)

Preglednica 3: Sestava agarja s sladnim ekstraktom (Samson in sod., 2000).

Sestavina	Količina
Agar s sladnim ekstraktom (Merck, Nemčija)	48 g
dH ₂ O	1000 mL

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo ga ohladili na 45 °C in razlili v petrijeve plošče.

3.1.3.3 Tekoče gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES)

Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča s kvasnim ekstraktom in saharozo (Samson in sod., 2000).

Sestavina	Količina
Kvasni ekstrakt	20 g
Saharosa	200 g
dH ₂ O	1000 mL

Količino saharoze smo glede na osnovno sestavo povečali za 50 g. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.1.3.4 Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA)

Preglednica 5: Sestava Czapek agarja s kvasnim ekstraktom (Pitt in Hocking, 1997).

Sestavina	Količina
K ₂ HPO ₄ (Kemika, Hrvaška)	0,5 g
Kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)	2,5 g
Saharoza (Kemika, Zagreb)	15 g
Agar (Biolife, Italija)	7,5 g
Czapek koncentrat	5 mL
dH ₂ O	500 mL

Preglednica 6: Sestava Czapek koncentrata z mikroelementi (Pitt in Hocking, 1997).

Sestavina	Količina
NaNO ₃ (Alkaloid, Makedonija)	30 g
KCl (Zorka Šabac, Srbija)	5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Nemčija)	5 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O (Kemika, Hrvaška)	0,1 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Nemčija)	0,1 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O (Zorka Šabac, Srbija)	0,05 g
dH ₂ O	100 mL

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo ohlajenega na 45 °C razlili v petrijeve plošče.

3.1.4 Kemikalije in raztopine

Poglavje 3.1.4 navaja raztopine in kemikalije, uporabljene tekom raziskovalnega dela.

3.1.4.1 Fiziološka raztopina

Preglednica 7: Sestava založne raztopine za pripravo fiziološke raztopine.

Sestavina	Količina
K ₂ HPO ₄ (Kemika, Zagreb)	3,4 g
dH ₂ O	100 mL

1,25 mL založne raztopine (pH= 7,2) smo razredčili s 1000 mL dH₂O in sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.1.4.2 Topilo za ekstrakcijo aflatoksina B₁

Preglednica 8: Sestava topila za ekstrakcijo aflatoksina B₁ (Aflaprep®, 2011).

Sestavina	Količina
NaCl (Kemika, Zagreb)	1,6 g
100 % Acetonitril (Merck, Nemčija)	60 mL
dH ₂ O	40 mL

3.1.4.3 Ostale kemikalije in raztopine

Preglednica 9: Ostale uporabljene kemikalije in raztopine.

Standard aflatoksina B ₁ (Sigma-Aldrich, Nemčija)	Standard ohratoksina A (Sigma-Aldrich, Nemčija)
Aceton (Merck, Nemčija)	Dimetil sulfoksid (Merck, Nemčija)
Etanol (Merck, Nemčija)	Etilacetat (Merck, Nemčija)
Jodo-nitro-tetrazolium klorid (Sigma, Švica)	Kloroform (Merck, Nemčija in Carlo Erba, Italija)
MOPS pufer	Mravljična kislina (Merck, Nemčija)
Natrijev hipoklorid (Kemika, Hrvaška)	TLC silica gel plošče (Merck, Nemčija)
Toluen (Merck, Nemčija)	Petroleter (Carlo Erba, Italija)
Na ₂ SO ₄ (GRAM-MOL, Hrvaška)	Silikagel 60 (Merck, Nemčija)

3.1.5 Laboratorijski pribor in oprema

Preglednica 10: Uporabljen laboratorijski pribor in oprema.

Cepilne igle	Plinski gorilnik
Cepilne zanke	Mikrobiološka komora (Iskra PIO, SMBC 122AV)
Petrijeve plošče (Labortechnika, Golias)	Digestorij (Elektromedicina, TIP382)
Steklene epruvete	Avtoklav (Sutjeska, SU30)
Avtomatske pipete (Eppendorf, Gilson)	Mikroskop (Olympus)
Nastavki za pipete (Eppendorf, Gilson)	Tehtnica (Mettler Toledo, PB1502-S)
Mikrotitrne ploščice (NUNC, Danska)	Vrtinčni mešalnik (Yellowline, TTS2)
Krovna stekelca	Vodna kopel (Kambič, WB-30)

Se nadaljuje...

...Nadaljevanje

Preglednica 10: Uporabljen laboratorijski pribor in oprema.

Merilni valji (Plastibrand)	Inkubatorji (Kambič)
Mikrocentrifugirke 1,5 mL (Gilson)	Analitska tehnica (GMBH)
Izrezovalnik čepkov	Stresalnik za mikrotitrne ploščice (Eppendorf)
Steklene banjice	Hladilnik (Gorenje, Bosch, Zanussi)
Inzulinske brizgalke (Plastipack)	Zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, LTH)
Filtri 0,45µm (Phenex)	Zamrzovalnik -80 °C (Heto Ultra Freeze)
Filter papir (S&S)	Mikrovalovna pečica (Sanyo)
Lij ločnik	pH meter (Hanna Instruments, HI 221)
Erlenmajerice	Sušilnik (Elektromedicina)
Falkonke	Vakuumska črpalka
Pinceta	UV luč
Bürker-Türk števna komora	Stresalnik
Laboratorijske steklenice	Vrečke za avtoklaviranje (Plastibrand)
Parafilm (Pechiney plastic packaging)	Rokavice (Shield Scientific)

3.2 METODE

Protimikrobni vpliv izbranih snovi na delovne seve smo preučevali z izvedbo metod, predstavljenih v poglavju 3.2.

3.2.1 Gojenje in vzdrževanje sevov

Za precepljanje in vzdrževanje sevov smo uporabljali trdno gojišče MEA. S sterilno bakteriološko zanko smo postrgali površino micelija in spore, ki so se ujele na zanko, prenesli v 1 mL fiziološke raztopine. V suspenzijo spor smo nato pomočili bakteriološko iglo in z njo naredili tri vbode v trdno gojišče MEA, razlito v petrijeve plošče. Nacepljeno kulturo smo inkubirali pri temperaturi 25 °C.

3.2.2 Primerjava hitrosti rasti pri različnih temperaturah

Ker smo želeli ugotoviti, ali delovni sevi bolje rastejo pri 25 °C ali pri 35 °C, smo jih vzporedno nacepili na trdno gojišče MEA, nato pa eno paralelko sedem dni inkubirali pri temperaturi 25 °C, drugo paralelko pa pri temperaturi 35 °C. Hitrost rasti smo spremljali z merjenjem premerov kolonij.

3.2.3 Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici (Rex in sod., 2008)

Z metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici (Rex in sod., 2008) smo želeli oceniti minimalno koncentracijo eteričnega olja oz. njegove sestavine, ki je potrebna, da popolnoma inhibira rast izbranega seva. Uporabili smo tekoče gojišče RPMI, v katerem smo ob prisotnosti različnih koncentracij protimikrobne snovi spremljali rast kulture.

3.2.3.1 Priprava eteričnih olj in njihovih sestavin

Pri pripravi založnih raztopin eteričnih olj oz. njihovih sestavin smo kot topilo uporabljali dimetil sulfoksid (DMSO). Timol in mentol, ki sta se kot čisti sestavini nahajala v

kristalizirani obliki, smo raztopili do koncentracije 32 mg/mL. Ostala olja oz. sestavine, ki so bila v osnovi v tekoči obliki, smo raztopili do koncentracije 100 µL/mL. Založne raztopine smo nato dalje redčili s tekočim gojiščem RPMI v razmerju 1 : 4. Končna koncentracija raztopin timola in mentola je tako znašala 8 mg/mL, končna koncentracija olj jelke (iglic in storžev), koromača, mete, origana, timijana ter sestavin anisaldehida in karvakrola pa 25 µL/mL. Za potrebe negativne kontrole, s katero smo preverjali vpliv DMSO na rast sevov, smo z gojiščem RPMI v razmerju 1 : 4 redčili tudi sam DMSO brez dodatka olja.

3.2.3.2 Priprava suspenzije spor

S sterilno bakteriološko zanko smo postrgali površino micelija kulture, stare deset do štirinajst dni, in spore prenesli v 1 mL fiziološke raztopine. Kapljico suspenzije smo nanegli na Bürker-Türkovo števno komoro, s pomočjo mikroskopa prešteli spore in z enačbo 1 izračunali koncentracijo spor v suspenziji.

$$c [\text{št. celic/mL}] = (N / 4) * 16 * 10^4 \quad \dots(1)$$

(c... koncentracija spor; N... št. prešteti spor v štirih kvadratih po diagonali)

Na ta način smo pripravili suspenzijo spor s koncentracijo 10^5 do 10^6 spor/mL. Suspenzijo smo dalje redčili z gojiščem PRMI in sicer v takšnem razmerju, da je bila koncentracija spor v končni suspenziji 10^4 spor/mL.

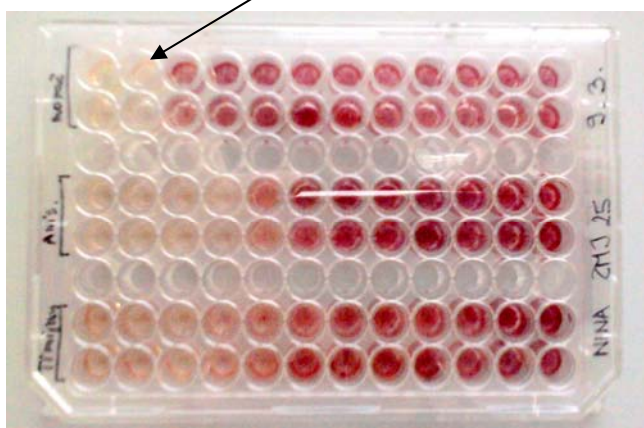
3.2.3.3 Priprava mikrotitrne ploščice

Uporabljali smo sterilne mikrotitrne ploščice z 96 luknjicami. V prvo luknjico v posamezni vrstici smo odpipetirali 100 µL raztopine eteričnega olja v začetni koncentraciji 8 mg/mL oz. 25 µL/mL, v preostalih enajst luknjic v tej vrstici pa v vsako posamezno luknjico po 50 µL tekočega gojišča RPMI. Nato smo iz prve luknjice odpipetirali 50 µL raztopine eteričnega olja, jih prenesli v naslednjo luknjico vzdolž vrstice in premešali z gojiščem, zopet odpipetirali 50 µL vsebine, jo prenesli v tretjo luknjico in ponovno premešali. Ta postopek smo ponavljali vzdolž celotne vrstice. 50 µL vsebine zadnje

luknjice smo zavrgli, da je bil volumen v vseh luknjicah enak. Na ta način smo dobili redčitveno vrsto, v kateri je koncentracija olja ali sestavine padala vzdolž vrstice za faktor dva. Na primer, če je bila koncentracija timola v prvi luknjici 8 mg/mL, je bila v drugi luknjici 4 mg/mL, v tretji 2 mg/mL in tako naprej do zadnje luknjice. V vsako luknjico vzdolž vrstice smo nato odpipetirali še 50 μ L suspenzije spor, tako da je bil končni volumen vsebine v vsaki luknjici 100 μ L. Zaradi tega se je koncentracija olja oz. sestavine v vsaki luknjici še prepolovila. Tako je bila končna koncentracija timola ali mentola v prvi luknjici na mikrotitrski ploščici enaka 4 mg/mL, v zadnji luknjici pa 0,002 mg/mL. Za ostala olja je bila končna koncentracija v prvi luknjici 12,5 μ L/mL, v zadnji luknjici pa 0,0061 μ L/mL.

Za pozitivno kontrolo smo v luknjico s 50 μ L RPMI dodali 50 μ L suspenzije spor. Za negativno kontrolo gojišča smo v luknjico odpipetirali 100 μ L RPMI, za preverjanje sterilnosti olj pa smo v luknjico s 50 μ L RPMI dodali 50 μ L raztopine posameznega olja. Preverili smo tudi vpliv DMSO na rast sevov. Postopek je bil enak kot pri pripravi redčitvene vrste z raztopinami olj, le da smo v prvo luknjico v vrstici namesto raztopine olja odpipetirali 100 μ L raztopine DMSO.

Ocena minimalne inhibitorne koncentracije



Slika 4: Prikaz odčitavanja rezultatov z mikrotitrski ploščice po dodatku jodo-nitro-tetrazolium klorida. Puščica označuje zadnjo luknjico, kjer še ni prišlo do barvne reakcije- koncentracija eteričnega olja v tej luknjici je privzeta kot ocena minimalne inhibitorne koncentracije.

Pripravljene ploščice smo premešali na stresalniku. Ploščice, kjer sta bili kot kultura uporabljeni plesni vrst *A. flavus* ali *A. niger*, smo 24 ur inkubirali pri temperaturi 35 °C. Ploščice s plesnima vrst *P. verrucosum* ali *P. nordicum* pa 48 ur pri temperaturi 25 °C.

Po preteku inkubacijskega časa smo v vsako luknjico dodali 10 µL jodo-nitro-tetrazolium klorida (INT) v koncentraciji 2 mg/mL in ploščice v temi inkubirali nadaljnjih 24 ur na ustrezni temperaturi. Kromogeno barvilo INT je v metabolno aktivnih celicah povzročilo rdeče obarvanje (slika 4). Ocena MIK za posamezno olje ali oljno sestavino je bila tako enaka koncentraciji olja v zadnji luknjici, kjer še ni prišlo do spremembe barve.

3.2.4 Spremljanje rasti in tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču

Za ugotavljanje vpliva eteričnih olj na rast mikotoksigenih sevov in tvorbo mikotoksinov na trdnih gojiščih smo uporabljali gojišče CYA. Vse štiri seve smo gojili v prisotnosti timola, karvakrola, mentola, origana oz. timijana. Vpliv izbranih olj smo testirali v dveh različnih koncentracijah, ki sta ustrezali ½ MIK in ¼ MIK.

Kot topilo za pripravo založnih raztopin eteričnih olj smo uporabljali DMSO. Timol in mentol smo raztopili do koncentracije 32 mg/mL, karvakrol, origano in timijan pa do koncentracije 100 µL/mL. 220 mL gojišča smo po avtoklaviranju ohladili na 45 °C in vanj vmešali tolikšno količino založne raztopine eteričnega olja, da je končna koncentracija olja v gojišču ustrezala ½ ali ¼ MIK. Agar smo nato razlili v deset petrijevih plošč, v vsako približno 20 mL gojišča. Postopek smo ponovili za vsako izmed petih olj v obeh omenjenih koncentracijah. Za kontrolo rastnosti smo v deset petrijevih plošč razlili 220 mL gojišča brez dodatkov, za kontrolo vpliva topila na rast sevov in tvorbo mikotoksinov pa 220 mL gojišča z dodatkom DMSO v najvišjih dveh uporabljenih koncentracijah.

Za pripravo suspenzije spor smo s sterilno bakteriološko zanko postrgali površino micelija kulture, stare deset do štirinajst dni, in spore prenesli v 1 mL fiziološke raztopine. V suspenzijo s koncentracijo 10⁶ spor/mL smo pomočili sterilno bakteriološko iglo in kulturo nacepili na pripravljene petrijeve plošče z vbodom igle na sredino gojišča. Plošče smo nato inkubirali sedem, štirinajst, sedemnajst ali enaindvajset dni pri temperaturi 25 °C.

3.2.4.1 Spremljanje rasti

Dve izmed desetih nacepljenih plošč vsake kombinacije seva in olja ter kontrole sta bili namenjeni spremljanju rasti. Rast smo spremljali z merjenjem premera kolonij vsakih nekaj dni tekom tritedenske inkubacije in kot rezultat podali povprečno vrednost dnevnih meritev. Na podlagi dobljenih rezultatov smo s pomočjo enačbe 2 izračunali odstotek inhibicije rasti:

$$I [\%] = ((O - K) / K) * 100 \quad \dots(2)$$

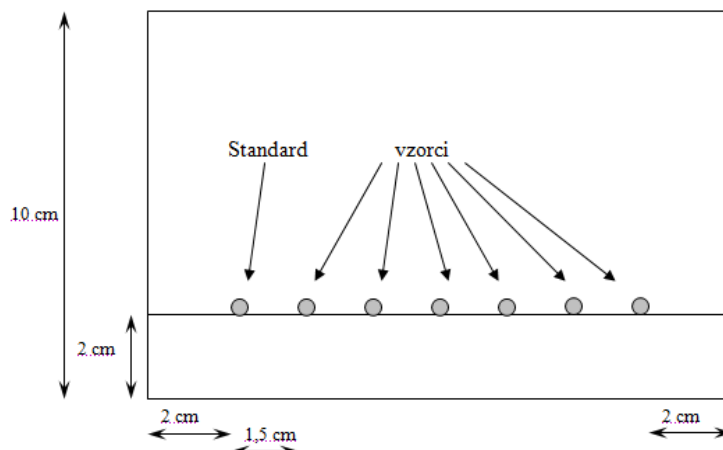
(I... odstotek inhibicije; K... vrednost kontrolnega vzorca; O... vrednost vzorca z dodatkom olja)

3.2.4.2 Spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986)

Osem plošč je bilo namenjenih spremljanju tvorbe mikotoksinov. Kvalitativno smo prisotnost mikotoksinov spremljali s TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986). Analize so potekale sedmi, štirinajsti, sedemnajsti in enaindvajseti dan inkubacije, za vsako analizo sta bili namenjeni po dve paralelki vsake kombinacije. Pri plesni vrste *A. flavus* smo spremljali tvorbo aflatoksina B₁, pri ostalih treh sevih pa tvorbo ohratoksina A.

Za izvedbo TLC smo uporabljali aluminijaste ploščice, prevlečene s silikatnim gelom. Najprej smo na ploščo nanесли standardno raztopino mikotoksina v koncentraciji 10 µg/mL. Nato smo iz prve paralelke izrezali tri koščke gojišča, preraščenega s kolonijo plesni, ter se z njihovo spodnjo ploskvijo dotaknili iste točke na TLC ploščici, ki je bila od standarda oddaljena 1,5 cm. S koščki, izrezanimi iz druge paralelke smo se dotaknili nove točke, ki je bila od prve oddaljena 1,5 cm. Postopek smo ponovili še z vsemi ostalimi paralelkami drugih kombinacij sevov in olj ter kontrol. Spodnji del pripravljene ploščice smo potopili v mešanico topil v stekleni kadi. Za ohratoksin A smo uporabili mešanico toluen : etilacetat : mravljična kislina v razmerju 5 : 4 : 1, za aflatoksin B₁ pa mešanico kloroform : aceton v razmerju 9 : 1. Ko je topilo pripotovalo 1 cm pod zgornji rob, smo ploščico odstranili iz

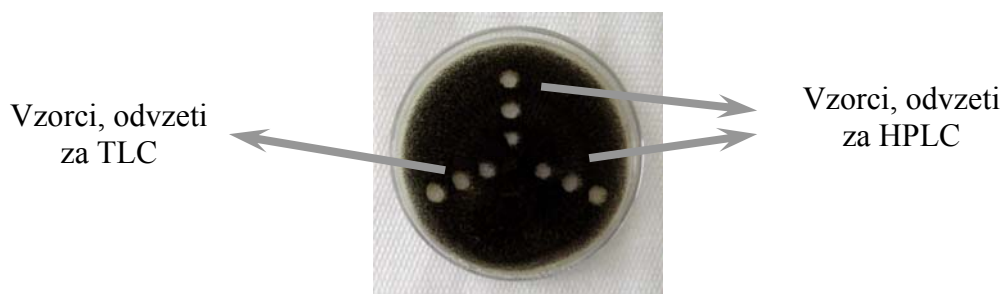
kadi in jo pustili v digestoriju, da je topilo izhlapelo. Suho ploščico smo nato pogledali pod UV lučjo. Pozitiven rezultat je predstavljala linija vzorca v višini standarda.



Slika 5: Shema nanosa vzorcev na ploščico s silikatnim gelom za tankoplastno tekočinsko kromatografijo.

3.2.4.3 Spremljanje tvorbe mikotoksinov s HPLC (Bragulat in sod., 2001; Frisvad, 1987; Frisvad in Thrane, 1987; Frisvad and Thrane, 1993)

Frisvad (1987), Frisvad in Thrane (1987) in Frisvad and Thrane (1993) so razvili metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za kvantitativno vrednotenje večine sekundarnih glivnih metabolitov. Vzorce za to analizo smo odvzeli v dveh ponovitvah iz vsake paralelke. Iz petrijeve plošče izrezali šest koščkov agarja, preraščenega s kolonijo plesni. Tri koščke smo nato s pinceto prenesli v prvo sterilno epico, ki smo jo predhodno stehali, ostale tri koščke pa v drugo sterilno epico. Po končanem vzorčenju smo epice ponovno stehali in iz podatkov o masi prazne in polne epice izračunali maso vzorca.



Slika 6: Prikaz vzorčenja za tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Na sliki je plesen vrste *A. niger*, iz katere so bili odvzeti vzorci za obe analizi.

Iz odvzetih vzorcev smo nato ekstrahirali mikotoksine. Za ekstrakcijo ohratoksina A smo v vsako epico dodali 0,5 mL absolutnega etalona, ki je bil sicer kasneje, tik pred izvedbo HPLC, zamenjan z metanolom. Kot topilo za ekstrakcijo aflatoksina B₁ pa smo uporabili 1 mL 60 % acetonitrila, saj je bil le-ta tudi sestavni del mobilne faze pri HPLC (Separation..., 1998). Vzorce smo v ustreznem topilu eno uro inkubirali na stresalniku pri 270 tresljajih/min in nato iz vsake epice z inzulinsko brizgalko odvzeli supernatant ter ga preko filtra z velikostjo por 0,45 μm prefiltrirali v vialo. Ekstrakte smo do HPLC hranili pri temperaturi -80 °C. Po končani analizi smo dobljene rezultate primerjali s kontrolnimi vrednostmi in s pomočjo enačbe 2 izračunali odstotek inhibicije tvorbe mikotoksinov.

3.2.5 Spremljanje rasti in tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču

Za ugotavljanje vpliva eteričnih olj na rast mikotoksigenih sevov in tvorbo mikotoksinov v tekočih gojiščih smo uporabljali tekoče gojišče YES. Najprej smo ponovno ocenili MIK izbranih olj. Postopek je bil enak kot pri predhodni analizi (glej poglavje 3.2.3), le da smo tokrat nekatere parametre prilagodili nadaljnji analizi sledenja mikotoksinov v tekočem gojišču. Tako smo namesto gojišča RPMI uporabili gojišče YES, topilo DMSO smo zamenjali z absolutnim etanolom, koncentracija spor v inokulumu je znašala 10⁶ spor/mL, inkubacijska temperatura je bila 28 °C, inkubacijski čas pa 24 ur. Preostali parametri so ostali nespremenjeni.

Sledila je analiza s spremljanjem količine biomase in tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču. Z bakteriološko zanko smo v fiziološko raztopino prenesli spore s kolonije na trdnem gojišču MEA in s pomočjo Thoma števne komore in mikroskopa pripravili suspenzijo spor v koncentraciji vsaj 5 x 10⁷ spor/mL. Založne raztopine eteričnih olj smo pripravili z absolutnim etanolom do koncentracije 32 mg/mL za trdne sestavine in 100 μL/mL za tekoče sestavine. V erlenmajerico s 50 mL ohlajenega sterilnega gojišča YES smo najprej odpipetirali tolikšno količino založne raztopine olja, da je končna koncentracija olja v gojišču ustrezala polovični koncentraciji na novo ocenjene vrednosti MIK. V gojišče smo nato dodali še 0,5 mL suspenzije spor, tako da je bila končna koncentracija spor v gojišču 10⁶ spor/mL. Za pozitivno kontrolo smo v 50 mL gojišča brez dodatka olja odpipetirali 0,5 mL suspenzije spor. Vse skupaj smo dobro premešali in

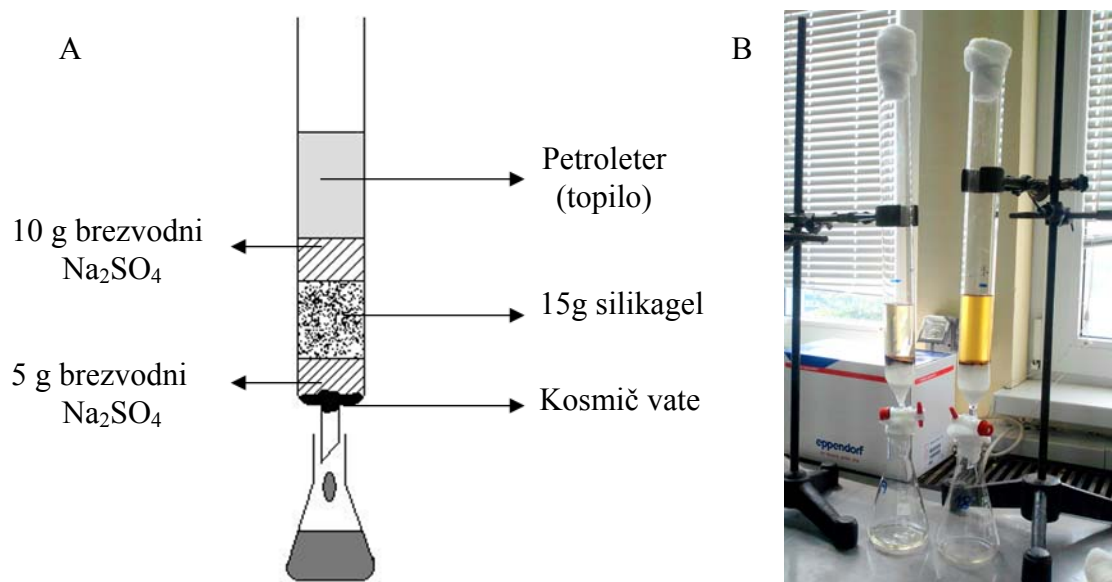
pripravljene erlenmajerice inkubirali sedem, štirinajst ali enaindvajset dni pri temperaturi 28 °C.

3.2.5.1 Spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986) in HPLC (Bragulat in sod., 2001; Frisvad, 1987; Frisvad in Thrane, 1987; Frisvad and Thrane, 1993)

Po preteku inkubacijskega časa smo v erlenmajerico dodali 50 mL kloroforma, premešali in en dan inkubirali na sobni temperaturi. Naslednji dan smo vsebino erlenmajerice prefiltrirali z vakuumsko črpalko in s tem odstranili micelij, ki smo ga potrebovali za spremljanje količine biomase, filtrat pa prelili v lij ločnik. Spodnjo fazo, kjer so bili v kloroformu raztopljeni mikotoksini, smo ulovili v čisto erlenmajerico, zgornjo fazo z gojiščem smo zavrgli. S pomočjo rotavaporja smo začetnih 50 mL kloroforma odparili do suhega, nato pa dodali 5 mL kloroforma in dobili koncentrirano raztopino mikotoksina. Sledilo je odstranjevanje nečistoč z afinitetno kromatografijo (Čvek, 2012). Kolono smo napolnili s topilom petroleter, vato, 5 g brezvodnega Na₂SO₄, 15 g silikagela in zopet 10 g brezvodnega Na₂SO₄ (slika 7). V pripravljeno kolono smo dodali vzorec kloroforma z mikotoksini in pustili, da topilo odteče v skozi kolono s pretokom 20–30 kapljic/min. Nečistoče so tako odtekale iz kolone skupaj s topilom, mikotoksini pa so se vezali na silikagel. Ko je bila gladina topila od zgornjega sloja Na₂SO₄ oddaljena le še približno 2 cm, smo pretok ustavili. Petroleter z nečistočami, ki smo ga zbrali v erlenmajerico, smo zavrgli in pod kolono podstavili čisto erlenmajerico. V kolono smo dolili 100 mL kloroforma in zoper sprostili pretok z enako hitrostjo kot prej ter pustili, da kloroform izteče do konca. V erlenmajerici so se sedaj zbrali v kloroformu raztopljeni mikotoksini. Ta ekstrakt smo nato ponovno koncentrirali do končnega volumna 5 mL in ga shranili v temnih stekleničkah.

TLC (Filtenborg in Frisvad, 1980; Filtenborg in sod., 1983; Samson in sod., 2000; Thrane 1986) smo izvedli podobno kot pri trdnih gojiščih (glej poglavje 3.2.4.2), le da smo na ploščico s silikatnim gelom namesto koščkov agarja nanесли nekaj kapljic pripravljenega ekstrakta. Za potrebe HPLC (Bragulat in sod., 2001; Frisvad, 1987; Frisvad in Thrane, 1987; Frisvad and Thrane, 1993) smo topilo kloroform zamenjali z 0,5 mL absolutnega

etalona za ohratoksin A oz. 1 mL topila s 60 % acetonitrilom za aflatoksin B₁ ter vzorce do analize hranili v vialah pri –80 °C. Po končani analizi smo dobljene rezultate primerjali s kontrolnimi vrednostmi in s pomočjo enačbe 2 izračunali odstotek inhibicije tvorbe mikotoksinov.



Slika 7: Prikaz polnjenja kolone za afinitetno kromatografijo (A), fotografija napolnjenih kolon (B).

3.2.5.2 Spremljanje rasti

Micelij, ki je ostal na filter papirju po filtraciji z vakuumsko črpalko, smo skupaj s filter papirjem stehali in od skupne mase odšteli maso filter papirja, ki smo jo izmerili pred filtracijo. Na ta način smo dobili težo mokre biomase. Micelij smo nato skupaj s filter papirjem v stekleni petrijevki položili v sušilnik pri 105 °C in ga posušili, nato pa ponovno stehali. Razlika med dobljeno maso in težo filter papirja pred filtracijo je predstavljala težo suhe biomase. S pomočjo enačbe 2 smo nato izračunali še odstotek inhibicije tvorbe biomase.

4 REZULTATI

Z namenom ugotavljanja protimikrobne aktivnosti eteričnih olj in njihovih sestavin smo med marcem 2011 in marcem 2012 v laboratorijih Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, z vmesnim gostovanjem v Laboratoriju za splošno mikrobiologijo in mikrobiologijo živil Prehrabeno-biotehnoške fakultete Univerze v Zagrebu v maju in juniju 2011, izvedli številne analize, katerih rezultati so zbrani v poglavju 4 in predstavljajo osnovo za potrditev ali ovržbo postavljenih delovnih hipotez.

4.1 PRIMERJAVA HITROSTI RASTI PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH

Preglednica 11: Primerjava hitrosti rasti delovnih sevov glede na inkubacijski čas in temperaturo.

Inkubacijski čas	4 dni		11 dni	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
<i>P. verrucosum</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>A. flavus</i>	25 mm	35 mm	50 mm	90 mm
<i>A. niger</i>	30 mm	54 mm	60 mm	90 mm
<i>P. nordicum</i>	4 mm	0 mm	20 mm	0 mm

Rast vrst iz rodu *Penicillium* je bila bistveno počasnejša od rasti vrst iz rodu *Aspergillus*. Plesen vrste *P. nordicum* je rastla le pri temperaturi 25 °C, pri plesni vrste *P. verrucosum* pa ni bilo rasti pri nobeni temperaturi. Vrsti iz rodu *Aspergillus* rasteta hitreje pri 35 °C.

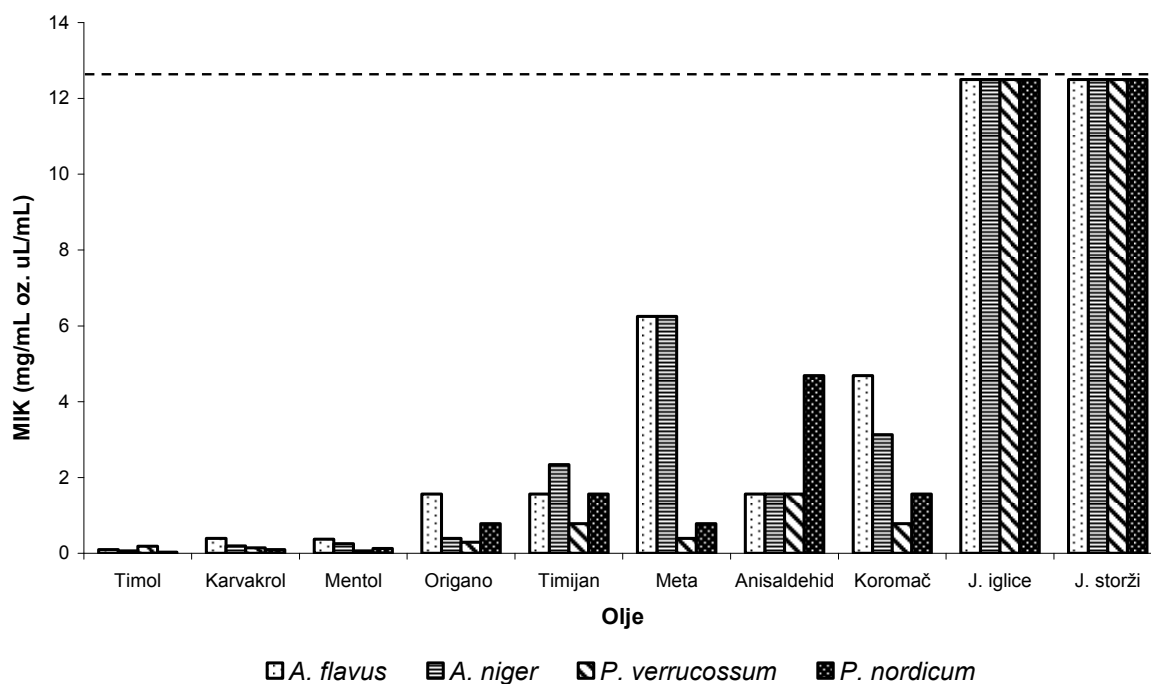
4.2 OCENA MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE

Delovne seve plesni vrst *A. flavus*, *A. niger*, *P. nordicum* in *P. verrucosum* smo inkubirali v prisotnosti desetih eteričnih olj oz. njihovih bioaktivnih sestavin, skupno torej štirideset različnih kombinacij sev-olja. Za večjo zanesljivost rezultatov smo vsako kombinacijo izvedli v štirih ponovitvah. Zadnjo koncentracijo eteričnega olja vzdolž redčitvene vrste, kjer se je še pojavila inhibicija rasti testiranega seva, smo privzeli kot oceno MIK. Če se je ocena le-te ujemala pri treh ponovitvah, četrta pa je kazala odstopanje za eno redčitveno stopnjo, smo slednjo zanemarili kot napako metode. Če sta se ujemali vrednosti MIK dveh

ponovitev, vrednosti drugih dveh ponovitev pa sta bil za eno redčitveno stopnjo nižje oz. višje, smo kot oceno MIK upoštevali srednjo vrednost. Rezultati so prikazani v preglednici 12 in na sliki 8.

Preglednica 12: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije posameznih eteričnih olj oz. njihovih sestavin pri plesnih vrst *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* in *Penicillium nordicum* v tekočem gojišču RPMI-1640.

Olje/ sev	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. nordicum</i>
Timol	0,094 mg/mL	0,063 mg/mL	0,188 mg/mL	0,031 mg/mL
Karvakrol	0,391 μ L/mL	0,195 μ L/mL	0,147 μ L/mL	0,098 μ L/mL
Mentol	0,375 mg/mL	0,250 mg/mL	0,063 mg/mL	0,125 mg/mL
Origano	1,563 μ L/mL	0,391 μ L/mL	0,293 μ L/mL	0,781 μ L/mL
Timijan	1,563 μ L/mL	2,344 μ L/mL	0,781 μ L/mL	1,563 μ L/mL
Meta	6,250 μ L/mL	6,250 μ L/mL	0,391 μ L/mL	0,781 μ L/mL
Anisaldehyd	1,563 μ L/mL	1,563 μ L/mL	1,563 μ L/mL	4,688 μ L/mL
Koromač	4,688 μ L/mL	3,125 μ L/mL	0,781 μ L/mL	1,563 μ L/mL
Jelkine iglice	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL
Jelkini storži	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL	12,500 μ L/mL



Slika 8: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za posamezna eterična olja in njihove sestavine. Črtnana črta označuje koncentracijo dimetil sulfoksida, pri kateri le-ta inhibira rast izbranih sevov.

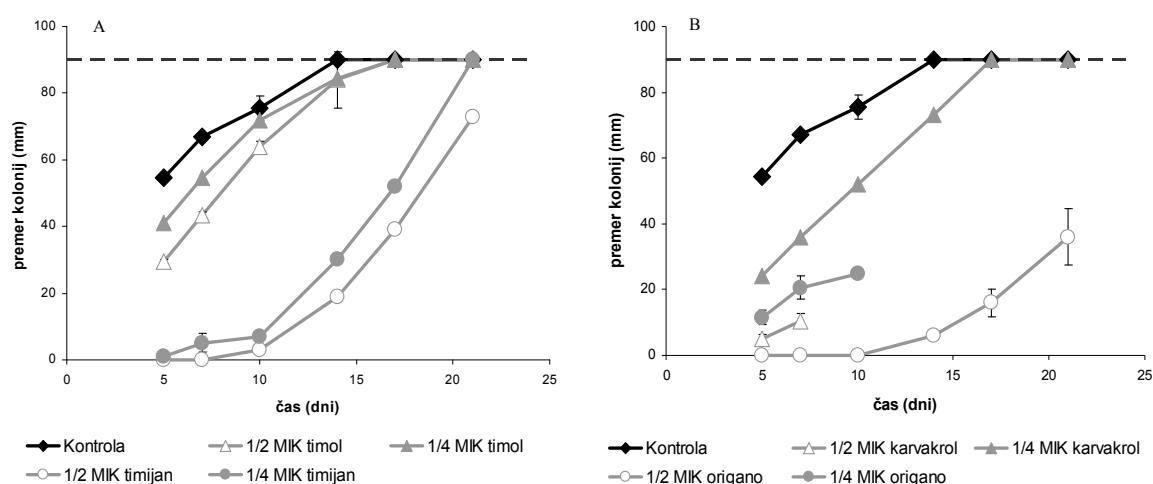
Kot najboljši inhibitorji rasti so se pri vseh testiranih sevih izkazali timol, karvakrol, mentol, origano in timijan. Koncentracija mete, koromača in anisaldehida, ki doseže popoln inhibitorni učinek, mora biti v večini primerov precej višja. Najslabšo inhibitorno aktivnost sta izkazali olji jelkinih iglic in storžev.

4.3 INHIBICIJA RASTI IN TVORBE MIKOTOKSINOV NA TRDNEM GOJIŠČU

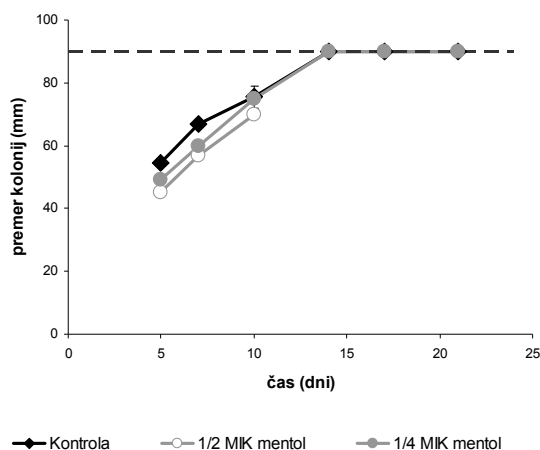
Rezultati prvega sklopa raziskovalnega dela se nanašajo na analize, pri katerih so osnovo za rast delovnih sevov predstavljala trdna gojišča.

4.3.1 Inhibicija rasti na trdnem gojišču

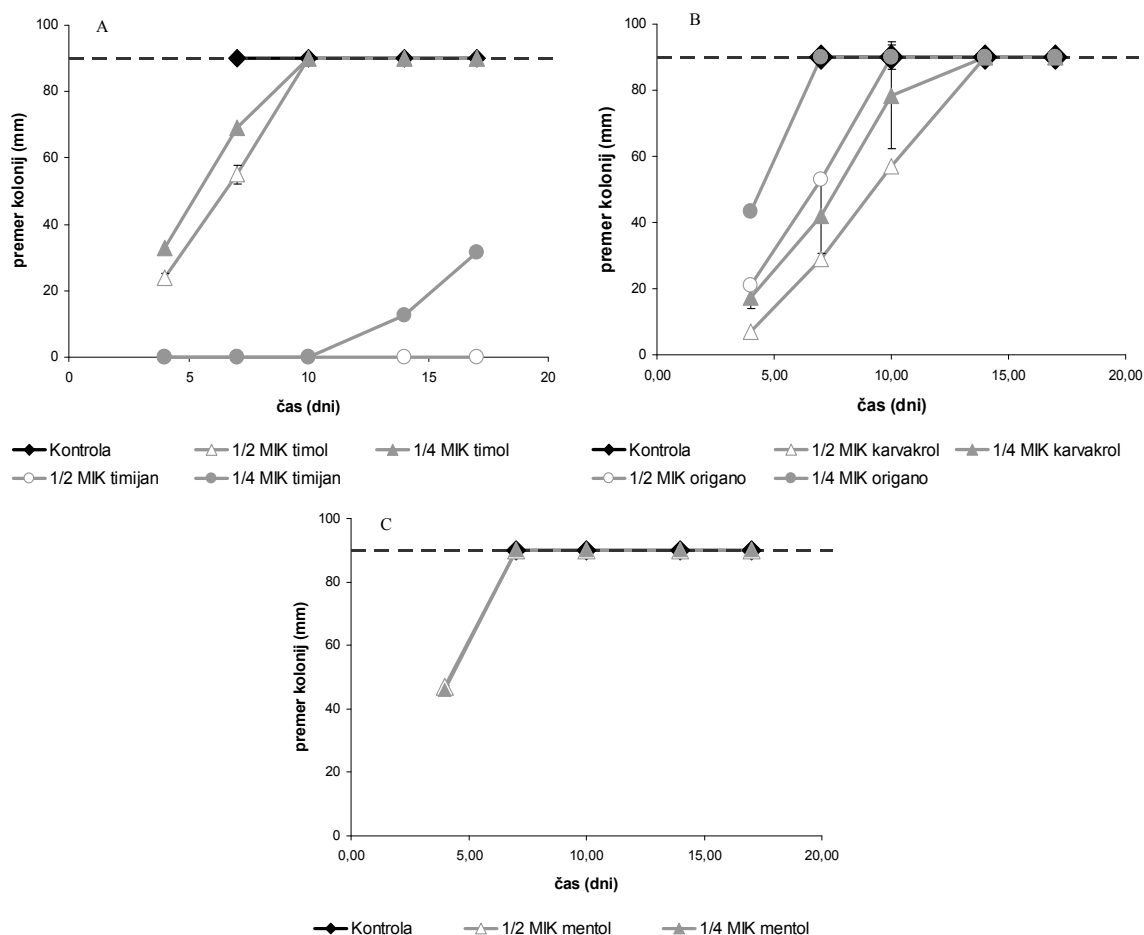
Delovne seve plesni vrst *A. flavus*, *A. niger*, *P. nordicum* in *P. verrucosum* smo inkubirali v prisotnosti timola, karvakrola, mentola, origana in timijana v dveh različnih koncentracijah, ki so ustrezale $\frac{1}{2}$ ali $\frac{1}{4}$ njihove vrednosti MIK. Za večjo zanesljivost rezultatov smo vsako kombinacijo izvedli v dveh paralelkah. Rast smo spremljali z merjenjem premerov kolonij vsakih nekaj dni tekom inkubacije in kot rezultat podali povprečje izmerjenih premerov kolonij. Rezultati so prikazali v prilogah A, B, C in D in na slikah 9–14.



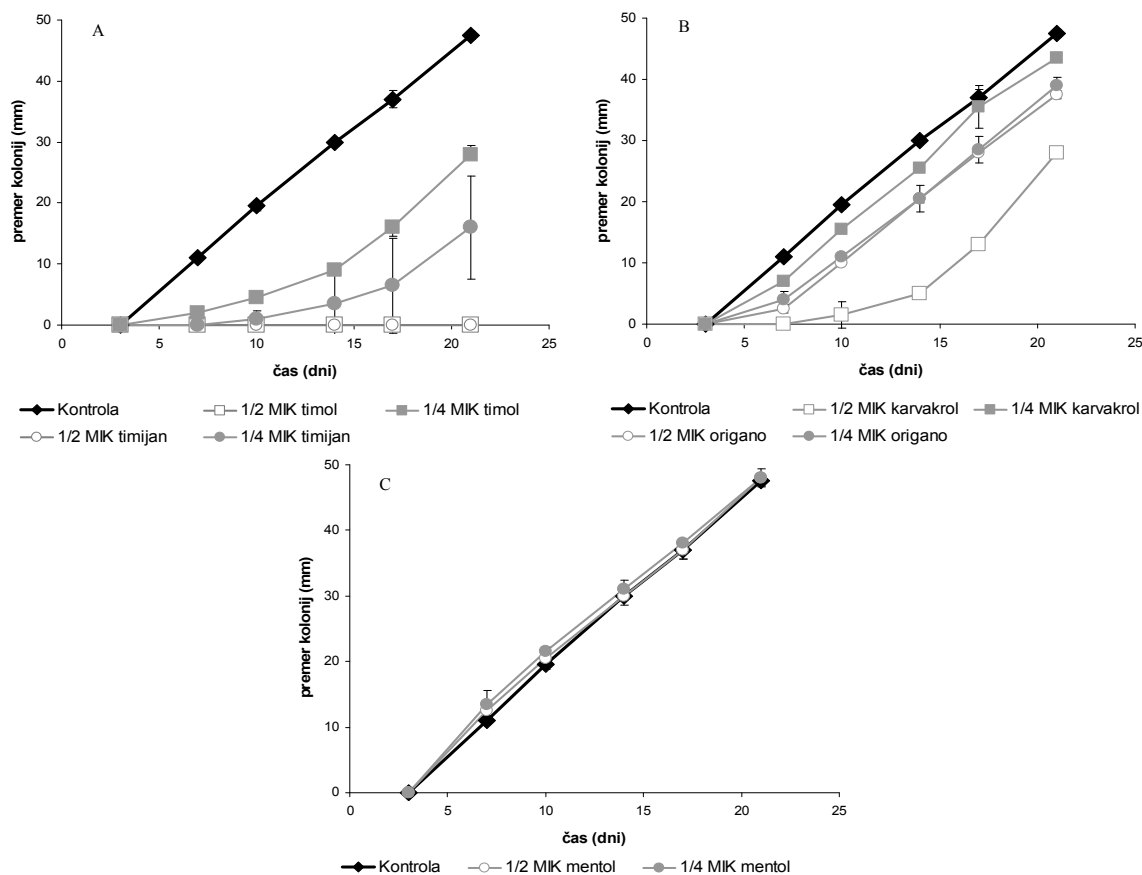
Slika 9: Vpliv timola in timijana (A) ter karvakrola in origana (B) na rast plesni vrste *Aspergillus flavus* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Črtkana črta označuje premer petrijeve plošče. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.



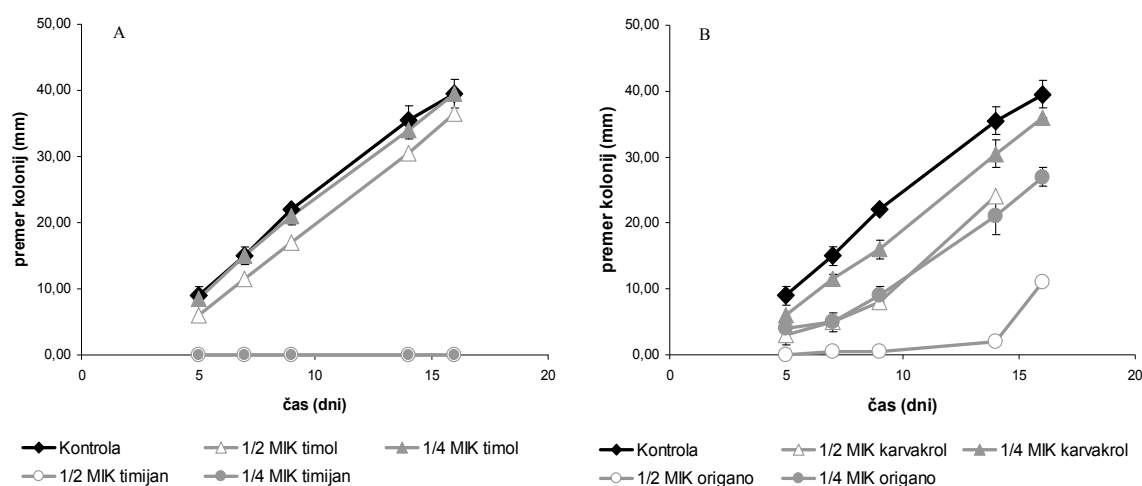
Slika 10: Vpliv mentola na rast plesni vrste *Aspergillus flavus* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Črtkana črta označuje premer petrijeve plošče. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.



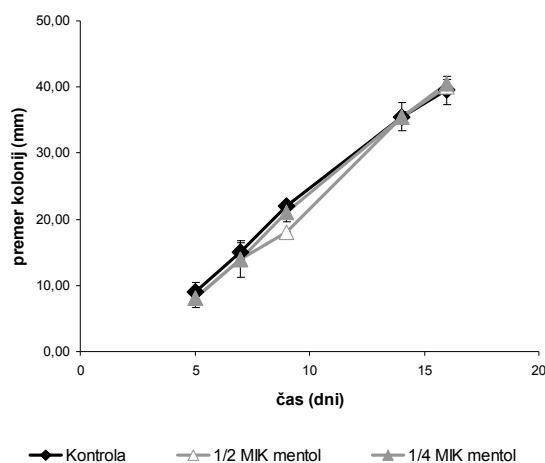
Slika 11: Vpliv timola in timijana (A), karvakrola in origana (B) ter mentola (C) na rast plesni vrste *Aspergillus niger* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Črtkana črta označuje premer petrijeve plošče. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.



Slika 12: Vpliv timola in timijana (A), karvakrola in origana (B) ter mentola (C) na rast plesni vrste *Penicillium verrucosum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.



Slika 13: Vpliv timola in timijana (A) ter karvakrola in origana (B) na rast plesni vrste *Penicillium nordicum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.



Slika 14: Vpliv mentola na rast plesni vrste *Penicillium nordicum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C. Kontrola prikazuje rast plesni na gojišču CYA brez dodatkov olj.

Testirana olja so izkazala različne učinke na rast. Tako je npr. timijan v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK je popolnoma inhibiral rast plesni vrste *A. niger* (slika 11A), med tem ko mentol pri isti vrsti plesni ni izkazal nikakršnega inhibitornega vpliva na rast (slika 11C). Spremljanje rasti je bilo zaradi velikosti petrijevih plošč mogoče samo do premera kolonij, manjšega od 90 mm, kar na grafih označuje črtkana črta. V nekaterih primerih je na plošči zraslo več kolonij in ko so se le-te začele stikati, meritev ni bila mogoča, kar je označeno z n. p. (npr. plesen vrste *A. flavus* na gojišču CYA s karvakrolom v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK na sliki 9B).

4.3.2 Inhibicija tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču

Kvalitativno smo prisotnost mikotoksinov določili na podlagi rezultatov TLC, HPLC pa je omogočil še kvantitativno vrednotenje prisotnosti mikotoksinov v trdnem gojišču.

4.3.2.1 Kvalitativno spremljanje mikotoksinov s TLC

Rezultati TLC za rod *Aspergillus* so prikazani v preglednici 13, preglednica 14 prikazuje rezultate testiranj za rod *Penicillium*. Vzorčenje je bilo mogoče, če so bile kolonije dovolj velike, v nasprotnem primeru analize nismo izvedli in je to označeno z n. a. Kot je razvidno iz rezultatov, sta mikotoksine tvorila samo plesni vrst *A. flavus* in *P. verrucosum*.

Preglednica 13: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus niger* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.

Sev (mikotoksin)	<i>A. flavus</i> (aflatoksin B ₁)				<i>A. niger</i> (ohratoksin A)			
	Olje/čas	7 dni	14 dni	17 dni	21dni	7 dni	14 dni	17 dni
Kontrola		+	+	+	+	-	-	-
Kontrola DMSO		n. a.	n. a.	+	+	n. a.	n. a.	n. a.
½ MIK timol		+	+	+	+	-	-	-
¼ MIK timol		+	+	+	+	-	-	-
½ MIK karvakrol		n. a.	+	+	+	n. a.	-	-
¼ MIK karvakrol		+	+	+	+	-	-	-
½ MIK mentol		+	+	+	+	-	-	-
¼ MIK mentol		+	+	+	+	-	-	-
½ MIK origano		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-	-	-
¼ MIK origano		+	+	+	+	-	-	-
½ MIK timijan		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
¼ MIK timijan		n. a.	n. a.	+	+	n. a.	n. a.	-

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; DMSO- dimetil sulfoksid.

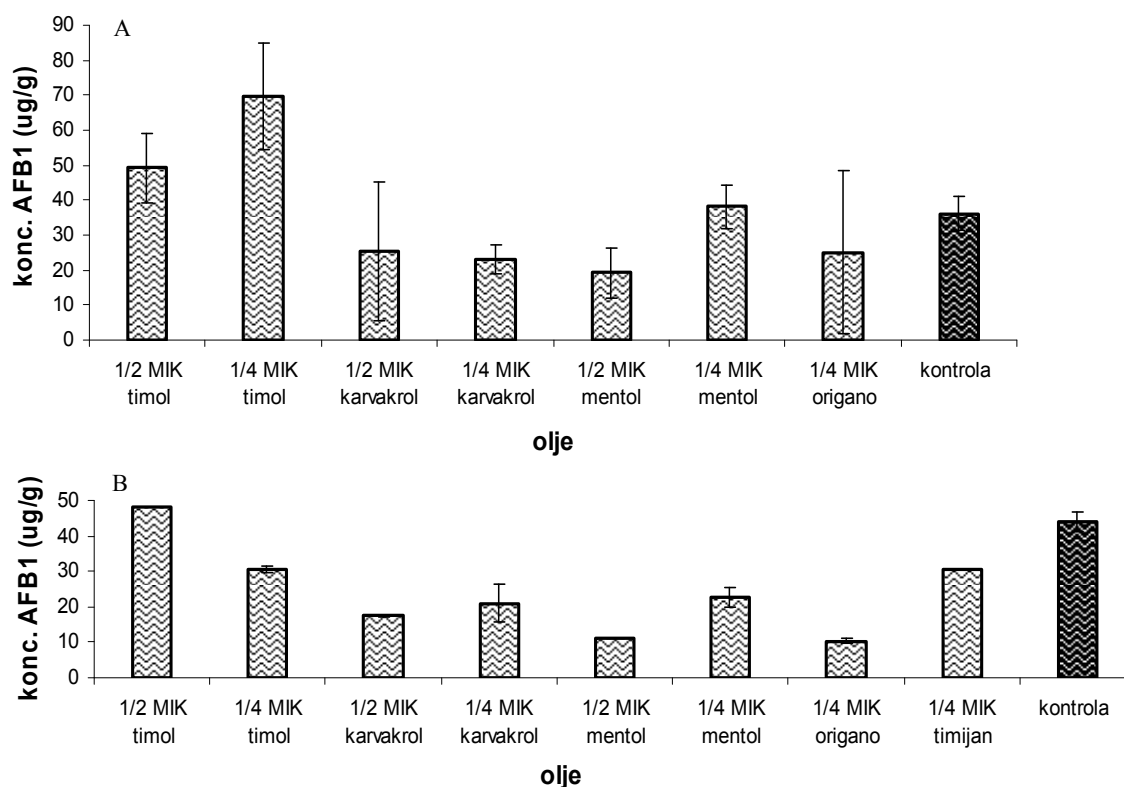
Preglednica 14: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst *Penicillium verrucosum* in *Penicillium nordicum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C.

Sev (mikotoksin)	<i>P. verrucosum</i> (ohratoksin A)			<i>P. nordicum</i> (ohratoksin A)		
	Olje/čas	14 dni	17 dni	21dni	14 dni	16 dni
Kontrola		-	+	+	-	-
Kontrola DMSO		n. a.	+	+	n. a.	n. a.
½ MIK timol		n. a.	n. a.	n. a.	-	-
¼ MIK timol		n. a.	n. a.	+	-	-
½ MIK karvakrol		n. a.	n. a.	+	-	-
¼ MIK karvakrol		-	+	+	-	-
½ MIK mentol		-	+	+	-	-
¼ MIK mentol		-	+	+	-	-
½ MIK origano		n. a.	+	+	n. a.	n. a.
¼ MIK origano		-	+	+	n. a.	-
½ MIK timijan		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
¼ MIK timijan		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija; DMSO- dimetil sulfoksid.

4.3.2.2 Kvantitativno spremljanje mikotoksinov s HPLC

HPLC je omogočil kvantitativno vrednotenje prisotnosti mikotoksinov v gojišču. Rezultati so prikazani v preglednicah 15–16 in na slikah 15–18. Nekatera olja niso imela nikakršnega inhibitornega učinka ali so celo pospeševala rast in tvorbo toksinov (npr. mentol v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK štirinajsti dan inkubacije ni inhibiral rasti plesni vrste *P. verrucosum*, hkrati pa je pospešil tvorbo OTA- slika 18A), druga so inhibirala tako rast kot tvorbo toksinov (npr. karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIK je štirinajsti dan inkubacije inhibiral tako rast plesni vrste *A. flavus* kakor tudi tvorbo AFB₁- slika 16A), spet tretja pa so rast zavirala in hkrati pospeševala tvorbo toksinov ali obratno (npr. karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK je enaindvajseti dan inkubacije inhibiral rast plesni vrste *P. verrucosum* in hkrati pospeševal tvorbo OTA- slika 18B). Če je na petrijevi plošči prišlo do stika več kolonij, meritev premera ni bila mogoča, kar je označeno z n.p.

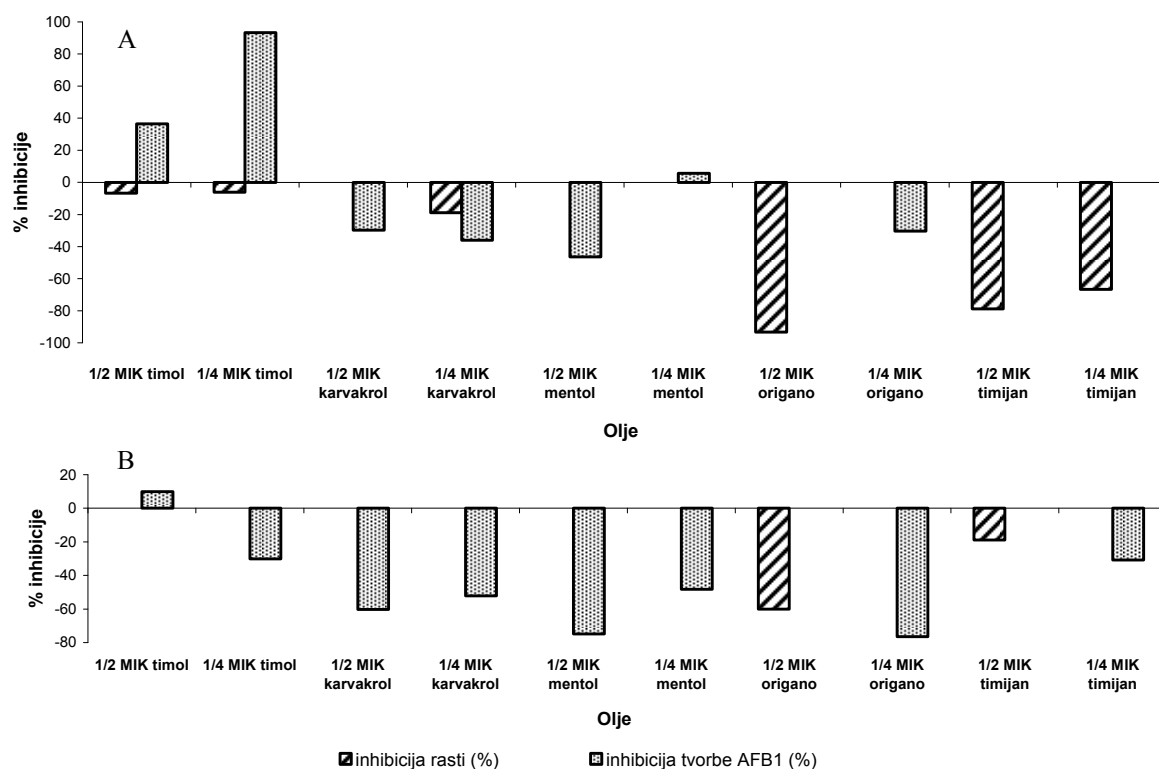


Slika 15: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo aflatoksina B₁ (AFB₁) pri plesni vrste *Aspergillus flavus* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B). Kontrola prikazuje koncentracijo AFB₁ v gojišču CYA brez dodatkov.

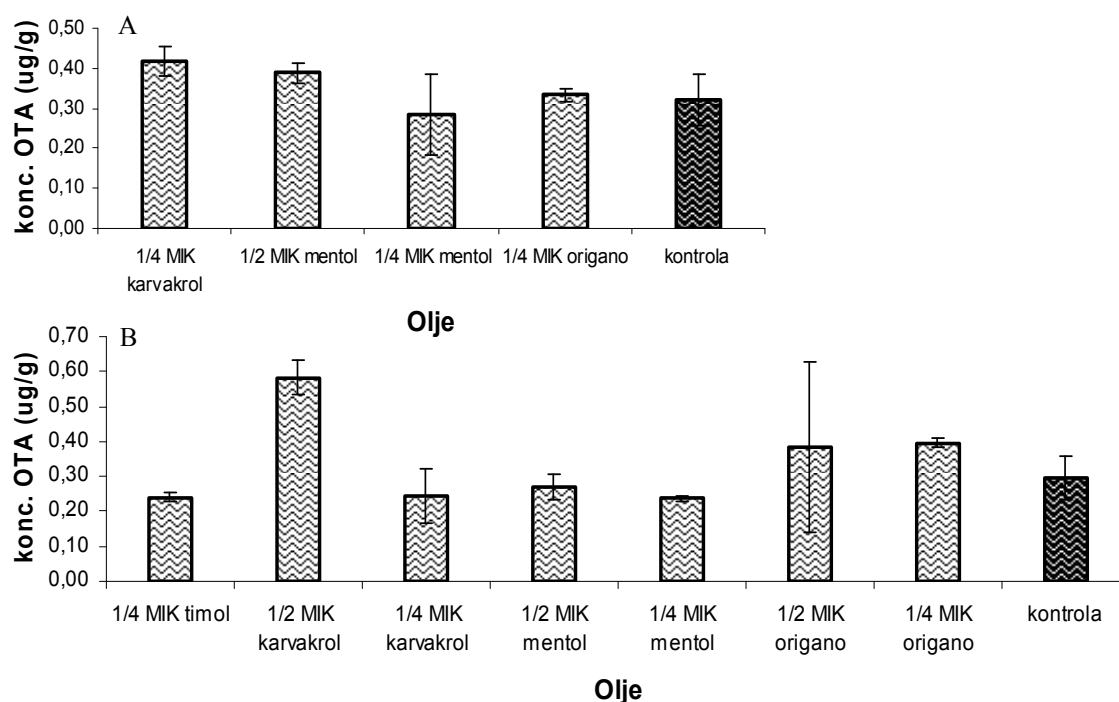
Preglednica 15: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Aspergillus flavus* in inhibicije tvorbe aflatoksina B₁ (AFB₁) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 in 21 dneh inkubacije. Kot kontrola je služilo gojišče CYA brez dodatka olj.

Olje / čas	Premer kolonij (mm)		inhibicija rasti (%)		konc. AFB ₁ (ug/g čepka)		inhibicija tvorbe AFB ₁ (%)	
	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni
Kontrola	90,0	90,0			36,02	43,97		
½ MIK timol	84,0	90,0	-6,7	0,0	49,17	48,33	36,53	9,91
¼ MIK timol	85,0	90,0	-6,1	0,0	69,64	30,70	93,35	-30,17
½ MIK karvakrol	n. p.	n. p.			25,30	17,49	-29,77	-60,22
¼ MIK karvakrol	73,0	90,0	-18,9	0,0	23,05	21,03	-36,01	-52,18
½ MIK mentol	n. p.	n. p.			19,30	11,07	-46,41	-74,82
¼ MIK mentol	90,0	90,0	0,0	0,0	38,08	22,74	5,74	-48,29
½ MIK origano	6,0	36,0	-93,3	-60,0	n. a.	n. a.		
¼ MIK origano	n. p.	n. p.			25,07	10,36	-30,40	-76,44
½ MIK timijan	19,0	73,0	-78,9	-18,9	n. a.	n. a.		
¼ MIK timijan	30,0	90,0	-66,7	0,0	n. a.	30,42		-30,83

Legenda: n.a.- ni analize; n.p.- ni podatka; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.



Slika 16: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Aspergillus flavus* in inhibicije tvorbe aflatoksina B₁ (AFB₁) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B).

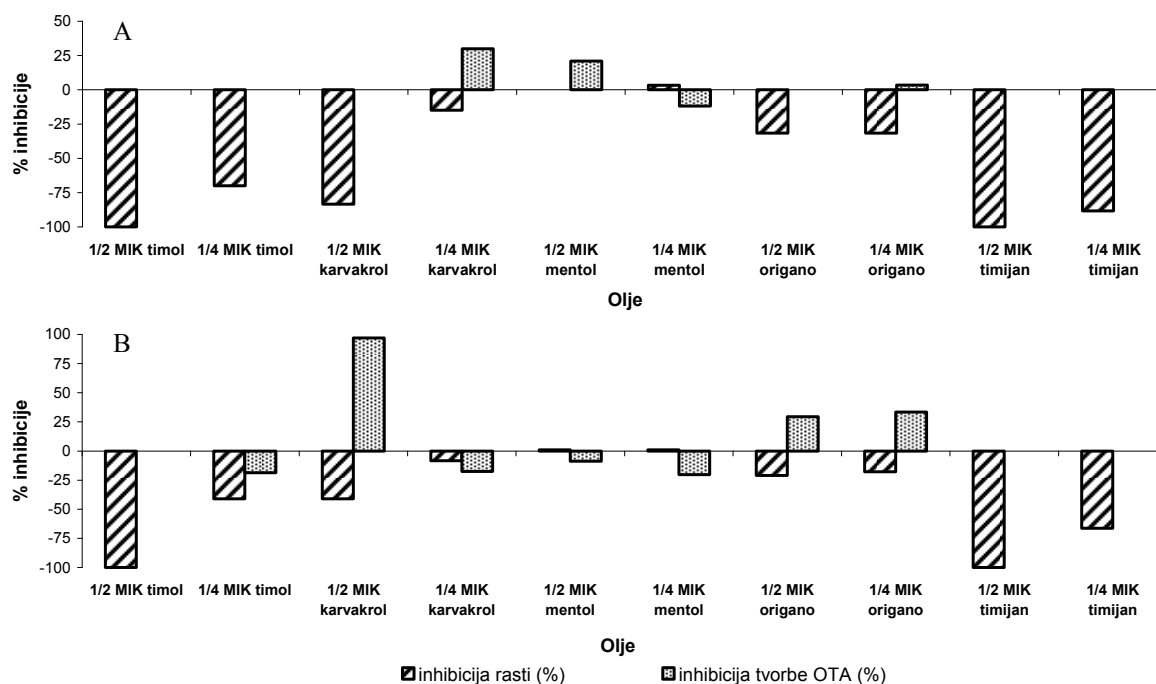


Slika 17: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo ohratoksina A (OTA) pri plesni vrste *Penicillium verrucosum* na Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B). Kontrola prikazuje koncentracijo OTA v gojišču CYA brez dodatkov.

Preglednica 16: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 in 21 dneh inkubacije. Kot kontrola je služilo gojišče CYA brez dodatka olj.

Olje / čas	Premer kolonij (mm)		inhibicija rasti (%)		konc. OTA (ug/g čepka)		inhibicija tvorbe OTA (%)	
	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni	14 dni	21 dni
Kontrola	30,0	47,5			0,32	0,30		
½ MIK timol	0,0	0,0	-100,0	-100,0	n. a.	n. a.		
¼ MIK timol	9,0	28,0	-70,0	-41,1	n. a.	0,24		-18,58
½ MIK karvakrol	5,0	28,0	-83,3	-41,1	n. a.	0,58		96,96
¼ MIK karvakrol	25,5	43,5	-15,0	-8,4	0,42	0,24	29,81	-17,57
½ MIK mentol	30,0	48,0	0,0	1,1	0,39	0,27	20,81	-8,78
¼ MIK mentol	31,0	48,0	3,3	1,1	0,28	0,24	-11,80	-20,27
½ MIK origano	20,5	37,5	-31,7	-21,1	n. a.	0,38		29,39
¼ MIK origano	20,5	39,0	-31,7	-17,9	0,33	0,40	3,42	33,45
½ MIK timijan	0,0	0,0	-100,0	-100,0	n. a.	n. a.		
¼ MIK timijan	3,5	16,0	-88,3	-66,3	n. a.	n. a.		

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.



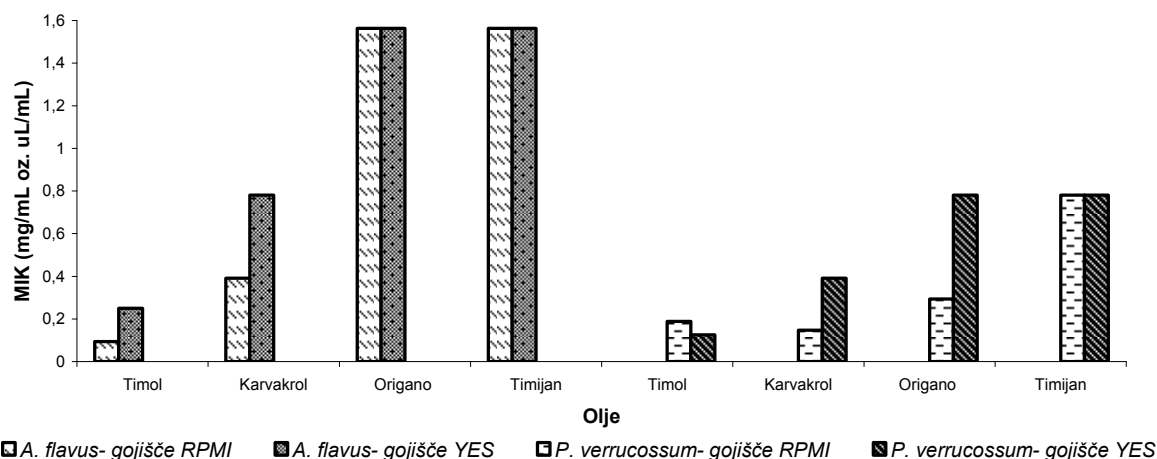
Slika 18: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v Czapek agarju s kvasnim ekstraktom (CYA) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 14 dneh (A) in 21 dneh inkubacije (B).

4.4 INHIBICIJA RASTI IN TVORBE MIKOTOKSINOV V TEKOČEM GOJIŠČU

Na podlagi rezultatov, pridobljenih s spremljanjem rasti in tvorbe mikotoksinov na trdnih gojiščih smo se odločili, da v tekočih gojiščih testiramo samo tiste seve, ki so v trdnih gojiščih tvorili mikotoksine, torej plesni vrst *A. flavus* in *P. verrucosum*. Spremljali smo inhibitorni učinek timola, karvakrola, origana in timijana, za katere smo najprej ponovno ocenili MIK v gojišču YES. Rezultate prikazujeta preglednica 17 in slika 19.

Preglednica 17: Ocena minimalne inhibitorne koncentracije eteričnih olj in njihovih sestavin pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *Penicillium verrucosum* v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES).

Olje/sev	<i>A. flavus</i>	<i>P. verrucosum</i>
Timol	0,250 mg/mL	0,125 mg/mL
Karvakrol	0,781 μ L/mL	0,391 μ L/mL
Origano	1,563 μ L/mL	0,781 μ L/mL
Timijan	1,563 μ L/mL	0,781 μ L/mL



Slika 19: Primerjava ocenjenih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) posameznih eteričnih olj in njihovih sestavin pri plesnih vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus niger* v tekočem gojišču RPMI-1640 in tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES).

4.4.1 Inhibicija rasti v tekočem gojišču

Preglednica 18: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na rast plesni vrst *Penicillium nordicum* in *Aspergillus flavus* v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) pri temperaturi 28 °C. Kontrola prestavlja rast plesni v gojišču YES brez dodatka olj.

Sev	Olje/čas	Teža suhe biomase (g)		
		7 dni	14 dni	21 dni
<i>P. verrucosum</i>	Kontrola	2,65	2,76	2,31
	½ MIK timol	0	0	0
	½ MIK karvakrol	0	0	0
	½ MIK origano	0	0	3,44
	½ MIK timijan	0	0	0,99
<i>A. flavus</i>	Kontrola	2,74	2,85	2,42
	½ MIK timol	0	3,18	2,72
	½ MIK karvakrol	0	0	0
	½ MIK origano	0	0,14	2,85
	½ MIK timijan	0	0	0

Legenda: MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.

Plesni vrst *A. flavus* in *P. verrucosum* smo inkubirali v prisotnosti timola, karvakrola, origana in timijana v koncentraciji, ki je ustrezala ½ MIK. Rast smo spremljali z

merjenjem suhe biomase vsakih 7 dni inkubacije. Rezultati so prikazali v preglednici 18. Po sedmih dneh inkubacije je plesen vrste *P. verrucosum* rastla samo v kontrolni erlenmajerici. Po štirinajstih dneh inkubacije je bila rast zaznana tudi v gojišču z dodatkom origana, vendar je bilo biomase premalo, da bi lahko določili suho težo. Po treh tednih je isti sev rasel še v gojišču z dodatkom timijana, drugod ni bilo rasti. Plesen vrste *A. flavus* je po sedmih dneh inkubacije rastla v kontrolnem gojišču ter v gojišču z dodatkom timola, le da je bila v slednjem količina biomase premajhna za določitev suhe teže. Po štirinajstih in enaindvajsetih dneh je bila rast prisotna še v gojišču z dodatkom origana.

4.4.2 Inhibicija tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču

Enako kot v trdnih gojiščih smo tudi v tekočih gojiščih prisotnost mikotoksinov kvalitativno določili na podlagi rezultatov TLC, rezultati HPLC pa so omogočili še njihovo kvantitativno vrednotenje.

4.4.2.1 Kvalitativno spremljanje tvorbe mikotoksinov s TLC

Preglednica 19: Vpliv eteričnih olj in njihovih sestavin na tvorbo mikotoksinov pri plesnih vrst *Penicillium verrucosum* in *Aspergillus flavus* v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) pri temperaturi 28 °C. Kot kontrolno gojišče je bilo uporabljeno gojišče YES brez dodatka olj.

Sev (mikotoksin)	Olje/ čas	7 dni	14 dni	21 dni
<i>P. verrucosum</i> (ohratoksin A)	Kontrola	+	+	+
	½ MIK timol	n. a.	n. a.	n. a.
	½ MIK karvakrol	n. a.	n. a.	n. a.
	½ MIK origano	n. a.	n. a.	+
	½ MIK timijan	n. a.	n. a.	+
<i>A. flavus</i> (aflatoksin B ₁)	Kontrola	+	+	+
	½ MIK timol	n. a.	+	+
	½ MIK karvakrol	n. a.	n. a.	n. a.
	½ MIK origano	n. a.	+	+
	½ MIK timijan	n. a.	n. a.	n. a.

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.

Rezultati testiranja, prikazani v preglednici 19, so potrdili prisotnost mikotoksinov v vseh testiranih vzorcih. Analizirali smo samo tiste vzorce, kjer ni prišlo do inhibicije rasti.

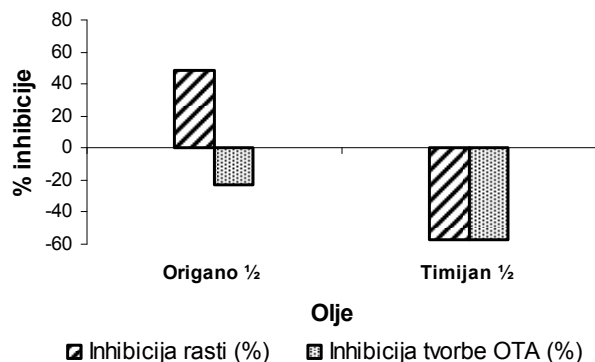
4.4.2.2 Kvantitativno spremljanje tvorbe mikotoksinov s HPLC

Na podlagi rezultatov HPLC smo z enačbo 2 (poglavje 4.3.2.2) izračunali odstotek inhibicije tvorbe mikotoksinov in ga primerjali z odstotkom inhibicije rasti.

Preglednica 20: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 21 dneh inkubacije. Kot kontrola je bilo uporabljeno gojišče YES brez dodatka olj.

Olje	Biomasa (g)	Inhibicija rasti (%)	Tvorba OTA (ug/g micelija)	Inhibicija tvorbe OTA (%)
Kontrola	2,31		0,41	
½ MIK timol	0	-100,00	n. a.	
½ MIK karvakrol	0	-100,00	n. a.	
½ MIK origano	3,44	48,92	0,32	-22,93
½ MIK timijan	0,99	-57,14	0,17	-57,56

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.



Slika 20: Primerjava inhibicije rasti plesni vrste *Penicillium verrucosum* in inhibicije tvorbe ohratoksina A (OTA) v tekočem gojišču s kvasnim ekstraktom in saharozo (YES) glede na dodatek eteričnih olj in njihovih sestavin po 21 dneh inkubacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V skladu z rezultati raziskovalnega dela, predstavljenimi v poglavju 4, lahko sprejmemo številne zaključke o protimikrobni učinkovitosti testiranih snovi ter na podlagi teh ugotovitev potrdimo ali ovržemo predhodno postavljene delovne hipoteze.

5.1 RAZPRAVA

Raziskovanje novih protimikrobnih učinkovin običajno temelji na predhodnem testiranju večjega števila različnih vzorcev z enostavnimi, hitrimi in poceni metodami. Na osnovi rezultatov se naredi izbor in za nadaljnja testiranja se uporabijo le tiste substance, ki so izkazale zadovoljivo protimikrobno delovanje (Cos in sod., 2006). Tudi mi smo tekom dela sledili temu vzorcu ter glede na rezultate ožili izbor testiranih snovi za nadaljnje analize.

5.1.1 Primerjava hitrosti rasti pri različnih temperaturah

Iz preglednice 11 je razvidno, da je med testiranima rodovoma prišlo do velikih razlik v hitrosti rasti, saj sta seva iz rodu *Aspergillus* pri isti temperaturi rasla bistveno hitreje od sevov rodu *Penicillium*. Seva rodu *Aspergillus* sta bolje rastla pri temperaturi 35 °C, medtem ko rasti sevov rodu *Penicillium* pri tej temperaturi ni bilo. Plesen vrste *P. verrucosum* po enajstih dneh inkubacije ni zrastle pri nobeni od testiranih temperatur, kar je mogoče pripisati zelo počasni rasti, saj se je v nadaljevanju izkazalo, da je bila tudi na drugih gojiščih njena rast najpočasnejša izmed vseh štirih delovnih sevov.

5.1.2 Ocena minimalne inhibitorne koncentracije v gojišču RPMI

Glede na rezultate v preglednici 12 in na sliki 8 so najboljšo protimikrobno aktivnost proti vsem štirim sevom so izkazali timol, mentol in karvakrol, kar ni presenetljivo, saj so že nekatere druge raziskave dokazale njihovo dobro protimikrobno delovanje proti nekaterim vrstam rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Guarda in sod., 2011; Lopez-Malo in sod., 2005; Pillai in Ramaswamy, 2012; Šegvić Klarić in sod., 2007; Soković in sod., 2009). MIK timola je le pri plesni vrste *P. verrucosum* presegel 100 mg/mL, mentol je pri

koncentracijah, nižjih od 400 mg/mL, inhibiral rast vseh štirih testiranih sevov, ravno tako MIK karvakrola pri nobenem sevu ni presegel 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Dobro protimikrobno učinkovitost je imelo tudi eterično olje origana, katerega prevladujoči sestavini sta ravno karvakrol in timol. Edina plesen, pri kateri je MIK tega olja presegel 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, je bila vrsta *A. flavus*. Celokupno gledano je bilo dober inhibitor še olje timijana s prevladujočo sestavino timolom, saj njegove vrednosti MIK niso presegle 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Dobljeni rezultati se tako skladajo s številnimi objavami, ki navajajo izrazito protimikrobno delovanje teh dveh olj proti mnogim mikotoksigenim vrstam rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Angelini in sod., 2006; Omidbeygi in sod., 2007; Tullio in sod., 2007; Viuda-Martos in sod., 2007).

Če v preglednici 12 primerjamo MIK timola in karvakrola z MIK origana in timijana, ugotovimo, da je bil le-ta pri sestavinah nekoliko nižji kot pri pripadajočih oljih. Tako sta imeli olji, katerih prevladujoče sestavine so pokazale dobro protimikrobno učinkovitost, tudi kot celota zelo učinkovito inhibitorno delovanje. Da slednjemu ni vedno tako, je dokazalo eterično olje mete, katerega prevladujoča sestavina je mentol. To olje je sicer imelo zelo nizek MIK pri vrstah rodu *Penicillium* ($<1 \mu\text{L}/\text{mL}$), vendar je bil njegov inhibitorni učinek na rast vrst rodu *Aspergillus* občutno slabši (6,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Ker se je mentol izkazal kot učinkovit inhibitor, lahko sklepamo, da protimikrobno učinkovite sestavine še ne zagotavljajo dobre inhibitorne učinkovitosti celokupnega olja. Poleg tega pa se je v tem primeru izkazalo tudi, da lahko prihaja do velikih razlik v aktivnosti posameznega olja proti različnim rodovom, morda celo vrstam in sevom. V prid slednjemu govori tudi dejstvo, da sta Tyagi in Malik (2011), ki sta ravno tako raziskovala protimikrobno učinkovitost metinega eteričnega olja proti plesnim vrst *A. flavus* in *A. niger*, dobila občutno nižji MIK od naših (1,13 mg/mL).

Rast delovnih sevov sta učinkovito inhibirala še anisaldehyd in eterično olje koromača, vendar je bil njun MIK v večini primerov nekoliko višji (0,781–4,688 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Le olje jelkinih iglic in storžev v testiranih koncentracijah ni izkazalo nikakršne protimikrobne aktivnosti. Njegov MIK je bil sicer ocenjen na 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, vendar je pri tej koncentraciji rast vseh štirih sevov inhibiralo že samo topilo DMSO (slika 8). Rezultat tako ni relevanten, saj ne vemo, ali je do inhibicije rasti prišlo zaradi prisotnosti olja ali topila.

5.1.3 Inhibicija rasti in tvorbe mikotoksinov na trdnem gojišču

Za nadaljnje analize smo uporabili timol, karvakrol, mentol ter olji origana in timijana, ki so v predhodnih analizah izkazali najboljšo inhibitorno aktivnost. Da bi lahko poleg inhibicije rasti spremljali tudi inhibicijo tvorbe mikotoksinov, smo uporabili dve različni koncentraciji olj ($\frac{1}{2}$ in $\frac{1}{4}$ MIK), saj smo predvidevali, da bi prisotnost olj v koncentraciji celotnega MIK popolnoma zavrla rast sevov in spremljanje tvorbe mikotoksinov ne bi bilo mogoče. Zaradi uporabe petrijevih plošč s premerom 90 mm je bilo spremljanje rasti mogoče samo do premera kolonij, manjšega od omenjene vrednosti. Velikost plošče se je kot omejujoč dejavnik izkazala predvsem pri sevih rodu *Aspergillus*, katerih rast je bila bistveno hitrejša od vrst rodu *Penicillium*. Tako so bile plošče s plesnijo vrste *A. niger* v nekaterih primerih popolnoma preraščene že sedmi dan (slika 11), s plesnijo vrste *A. flavus* pa štirinajsti dan inkubacije (sliki 9 in 10). Spremljanje rasti je omejevala tudi močno sporogena narava samih sevov, saj je v nekaterih primerih na plošči zrasla več kot ena kolonija, npr. pri plesni vrste *A. flavus* na gojišču z dodatkom $\frac{1}{2}$ MIK karvakrola in $\frac{1}{4}$ MIK origana (slika 9B) ter $\frac{1}{2}$ MIK mentola (slika 10). Stik večih kolonij je omejeval razrast posamezne kolonije, zaradi česar meritve premerov niso bile več zanesljive.

Iz rezultatov v poglavju 4.3.1 je razvidno, da je bila inhibicija rasti delovnih sevov pričakovano boljša ob prisotnosti olja v višji koncentraciji ($\frac{1}{2}$ MIK), saj se ni nikoli zgodilo, da bi nižja koncentracija olja rast zavirala bolje od višje. Edini, ki v nobeni koncentraciji ni pokazal skorajda nikakršne inhibicije rasti pri katerem koli izmed štirih sevov, je bil mentol. Razpon med koncentracijo, ki popolnoma inhibira rast izbranega seva in koncentracijo, ki nima nikakršnega inhibitornega vpliva, je pri tej sestavini očitno zelo ozek. Po drugi strani pa je v nekaterih primerih kljub dodatku olj v koncentracijah, nižjih od MIK, vseeno prišlo do popolne inhibicije rasti tekom celotne inkubacije. Rast plesni vrste *A. niger* je bila tako popolnoma zavrla ob dodatku $\frac{1}{2}$ MIK timijana (slika 11A), plesen vrste *P. nordicum* sta popolnoma zavrli obe koncentraciji timijana (slika 13A), plesen vrste *P. verrucosum* pa timol in timijan v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK (slika 12A). Eden izmed možnih razlogov je ta, da sta bili za oceno MIK in za spremljanje inhibicije rasti uporabljeni različni metodi, znano pa je, da rezultati različnih metod niso popolnoma primerljivi (Cos in sod., 2006).

Analiza TLC je pokazala, da je plesen vrste *A. flavus* aflatoksin B₁ tvorila že sedmi dan inkubacije (preglednica 13), pri plesnih vrst *A. niger* in *P. nordicum* prisotnosti ohratoksina A nismo ugotovili (preglednici 13 in 14), pri plesni vrste *P. verrucosum* pa smo ohratoksin A zaznali šele sedemnajsti dan inkubacije (preglednica 14). Pri plesnih vrst *A. flavus* in *P. verrucosum* smo nato izvedli še kvantitativno analizo prisotnosti mikotoksinov (slika 15 in slika 17) z metodo HPLC in ugotovili, da je bil časovno gledano odstotek inhibicije sinteze mikotoksinov z redkimi izjemami višji po enaindvajsetih dneh inkubacije. Takrat so se kot najboljši inhibitorji pri plesni vrste *A. flavus* izkazali karvakrol, ½ MIK mentola in ¼ MIK origana, ki so sintezo aflatoksina B₁ inhibirali v več kot 50 % (preglednica 15). Pri plesni vrste *P. verrucosum* tega odstotka ni doseglo nobeno olje (preglednica 16). Če primerjamo odstotek inhibicije sinteze mikotoksinov za posamezno olje v obeh testiranih koncentracijah pri istem sevu, za razliko od inhibicije mikrobne rasti tukaj ne moremo potegniti zaključka o boljšem protimikrobnem delovanju olja v višji koncentraciji, saj je v nekaterih primerih ¼ MIK bolje inhibiral sintezo mikotoksina kot ½ MIK. Tako je mentol sintezo ohratoksina A pri plesni vrste *P. verrucosum* bolje inhibiral v ¼ MIK (preglednica 16), sintezo aflatoksina B₁ pri plesni vrste *A. flavus* pa v ½ MIK (preglednica 15). Ali pa karvakrol, ki je po 14 dneh inkubacije sintezo aflatoksina B₁ pri plesni vrste *A. flavus* bolje inhibiral v nižji, po 21 dneh inkubacije pa v višji koncentraciji (preglednica 15).

Že Magan in sod. (2002), ki so preučevali vpliv različnih fungicidov na tvorbo mikotoksinov pri vrstah rodu *Fusarium*, so ugotovili, da lahko kombinacija različnih dejavnikov, kot so stresni pogoji okolja, tip fungicida in njegova koncentracija, vodi do stimulacije sinteze mikotoksinov. Tudi v našem primeru so izbira eteričnega olja, njegova koncentracija, čas inkubacije in morda celo prostorska omejitev pri sevih, ki so popolnoma prerasli petrijevo ploščo, močno vplivali na sam potek biosinteze mikotoksinov. Čeprav je večina olj sintezo delno inhibirala, so nekatera med njimi pokazala tudi nasprotni učinek in sintezo pospešila. Zanimivo je, da so ta olja, ki so sintezo pospešila, hkrati inhibirala rast sevov. Tako je prisotnost ¼ MIK timola pri plesni vrste *A. flavus* štirinajsti dan inkubacije (slika 16A) in ½ MIK karvakrola pri plesni vrste *P. verrucosum* enaindvajseti dan inkubacije (slika 18B) rast sevov delno inhibirala in hkrati pospešila sintezo mikotoksinov za več kot 90 %. Delna inhibicija rasti sevov torej še ne zagotavlja tudi zmanjšane sinteze mikotoksinov, temveč je lahko učinek celo obraten. Upoštevajoč vse zgoraj navedene

ugotovitve tako ne moremo trditi, da obstaja neposredna povezava med inhibicijo rasti in inhibicijo tvorbe mikotoksinov z eteričnimi olji.

5.1.4 Inhibicija rasti in tvorbe mikotoksinov v tekočem gojišču

Za raziskave v tekočih gojiščih smo uporabili plesni vrst *A. flavus* in *P. verrucosum*, ki sta mikotoksine tvorili že na trdnem gojišču, ter timol, karvakrol, origano in timijan, ki so v predhodnih raziskavah izkazali najboljšo protimikrobno aktivnost. Vse analize, razen TLC in HPLC, so potekale v laboratoriju Prehrambeno-biotehnoške fakultete v Zagrebu in zaradi menjave okolja je prišlo do prilagoditev nekaterih parametrov posameznih metod. Nadomestitev topila DMSO z etanolom, dvig inkubacijske temperature s 25 °C na 28 °C in uporaba tekočega gojišča YES so dejavniki, ki bi lahko po naši oceni pomembno vplivali na inhibitorno delovanje eteričnih olj, zato smo pod spremenjenimi pogoji najprej ponovno ocenili MIK. Rezultate prikazujeta preglednica 17 in slika 19. V primerjavi z rezultati z gojišča RPMI, je ocenjen MIK timijana in origana pri plesni vrste *A. flavus* ter timijana pri plesni vrste *P. verrucosum* v gojišču YES ostal nespremenjen. MIK ostalih olj je bil nekoliko višji od predhodne ocene, z izjemo timola pri plesni vrste *P. verrucosum*, ki je izkazal nekoliko boljšo protimikrobno aktivnost.

Rast izbranih sevov smo spremljali z merjenjem suhe biomase vsakih sedem dni inkubacije. Rezultate prikazuje preglednica 18. Čeprav smo izbrana olja v gojišče dodali v koncentraciji, ki je ustrezala $\frac{1}{2}$ MIK, je v večini primerov vseeno prišlo do popolne inhibicije vidne rasti sevov. Tako sta timol in karvakrol rast plesni vrste *P. verrucosum* inhibirala tekom celotne inkubacije, suho biomaso seva, ki je rasel v prisotnosti origana oz. timijana, pa smo lahko izmerili šele ob koncu tritedenske inkubacije. V gojišču z dodatkom origana je bila rast sicer zaznana že štirinajsti dan inkubacije, vendar je bilo biomase premalo za merjenje njene suhe teže. Plesen vrste *A. flavus* je po sedmih dneh inkubacije poleg kontrolnega gojišča že rastle tudi v gojišču z dodatkom timola, vendar je bila količina biomase premajhna za merjenje suhe teže. Po štirinajstih in enaindvajsetih dneh je bila rast prisotna še v gojišču z dodatkom origana, dodatek karvakrola in timijana pa je popolnoma inhibiral rast seva tekom celotne tritedenske inkubacije.

Rast mikrobne kulture v zaprtem bioprocesu omejujejo številni dejavniki, zaradi česar se količina biomase tekom inkubacije ne povečuje linearno, temveč je odvisna od življenjskega cikla mikroorganizmov, ki v grobem zajema štiri faze rasti: fazo prilagajanja, logaritemsko fazo rasti, stacionarno fazo rasti in fazo odmiranja (Madigan in sod., 2009). Glede na podatke o teži suhe biomase kontrolnih vzorcev obeh sevov (preglednica 18), sta oba micelija največjo težo dosegla štirinajsti dan inkubacije. Če bi podatke predstavili v obliki rastne krivulje, bi bili obe kulturi ob koncu inkubacije v fazi odmiranja. Ker pa smo težo micelija spremljali le vsakih sedem dni, natančen izris krivulje ni mogoč, prav tako ne vemo, kolikšna je bila dejanska največja teža suhe biomase in kateri dan jo je posamezni sev dosegel. Če upoštevamo samo podatke o teži suhe biomase plesni vrste *P. verrucosum* ob koncu inkubacije, lahko sklepamo, da je eterično olje origana rast pospeševalo, saj je bila teža micelija 3,44 g in je tako za skoraj 50 % presegala težo kontrolnega seva, ki je znašala 2,31 g. Vendar, ker prvih štirinajst dni v gojišču z dodatkom origana rasti ni bilo, je povsem verjetno, da je dodatek tega olja podaljšal fazo prilagajanja in se je sev ob koncu inkubacije nahajal šele v logaritemski ali stacionarni fazi rasti. Možno je, da je tudi micelij v kontrolnem gojišču na določeni točki tekom inkubacije dosegel ali celo presegel težo 3,44 g, saj podatka o njegovi dejanski največji teži suhe biomase nimamo. Tako torej ne moremo trditi, ali je eterično olje origana rast seva dejansko pospeševalo ali pa je prišlo le do zamika v rasti in sta se seva ob koncu inkubacije nahajala v različnih fazah rasti, zaradi česar primerjava teže suhe biomase ne bi bila relevantna. Do podobnih zaključkov lahko pridemo tudi pri preostalih oljih, v prisotnosti katerih je prišlo do rasti enega oz. drugega seva. Za natančnejšo analizo vpliva dodanih eteričnih olj na rast plesni vrst *P. verrucosum* in *A. flavus* bi očitno morali težo suhe biomase meriti pogosteje, saj bi z izrisom rastne krivulje dobili realnejšo sliko o dejanskem poteku rasti tekom inkubacije.

Kot je potrdila analiza TLC, sta plesni vrst *A. flavus* in *P. verrucosum* kljub prehodu s trdnega v tekoče gojišče ohranili svoj mikotoksigeni potencial (preglednica 19). Glede na podatke iz preglednice 20 je olje timijana pri plesni vrste *P. verrucosum* zelo uspešno inhibiralo sintezo ohratoksina A, saj je bila njegova koncentracija skoraj 60 % nižja od kontrolnega vzorca, poleg tega je bila v skoraj enakem odstotku inhibirana tudi njegova rast. V gojišču z dodatkom origana je bila koncentracija ohratoksina A prav tako nižja od kontrolne vrednosti, čeprav je bilo ob koncu tritedenske inkubacije v tem vzorcu skoraj

50 % več biomase kot v kontrolni erlenmajerici. Ta podatek bi lahko le še dodatno potrjeval naša predvidevanja, da so se kulture ob izteku inkubacijskega časa nahajale v različnih fazah rasti. Kontrolni micelij je bil po treh tednih verjetno že v fazi odmiranja in je posledično izgubljal na teži, medtem ko so mikotoksini v gojišču ostali. V gojišču z dodatkom origana pa se je sev predvidoma nahajal v logaritemski ali stacionarni fazi rasti, zaradi česar je njegov micelij še vedno pridobival na teži oz. je le-ta stagnirala. Prav tako je možno, da je še vedno tekla tudi sinteza ohratoksina A in njegova koncentracija še ni dosegla maksimalne vrednosti. Vse to bi lahko razjasnilo vzroke za nižjo koncentracijo mikotoksina in večjo količino biomase v testnem vzorcu glede na kontrolo, seveda pa je povsem možno tudi, da je olje origana dejansko inhibiralo sintezo mikotoksina in hkrati pospeševalo rast seva, kar se je že izkazalo tudi v nekaterih primerih na trdnem gojišču.

Glede na to, da nobeno izmed testiranih olj ni popolnoma inhibiralo sinteze mikotoksinov in hkrati dopuščalo rast plesni, ter da so nekatera olja sintezo mikotoksinov celo pospeševala, lahko zaključimo, da imajo testirana olja uporabno vrednost le v tistih koncentracijah, ki popolnoma inhibirajo rast plesni, saj bi le tako lahko zagotovo preprečili pojavnost mikotoksinov v izbranem substratu. Ker pa so že naše analize pokazale, da na aktivnost olja vplivajo različni dejavniki, bi bilo za določitev koncentracije olja, ki bi rast plesni inhibirala tudi v praksi, poleg raziskav *in vitro* potrebno izvesti še analize *in vivo*.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo sledeče:

~ MIK različnih eteričnih olj in njihovih sestavin za isti delovni sev se je razlikoval. Pri plesni vrste *A. flavus* je MIK karvakrola znašal 0,391 $\mu\text{L}/\text{mL}$, MIK timijana je bil enak 1,563 $\mu\text{L}/\text{mL}$, MIK mete 6,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ itd. Ravno tako se je razlikoval MIK istega eteričnega olja ali njegove sestavine za različne seve. MIK timola pri plesni vrste *A. flavus* je tako znašal 0,094 mg/mL, pri plesni vrste *A. niger* je bil MIK 0,063 mg/ml, pri plesni vrste *P. verrucosum* 0,188 mg/mL itd. V skladu z rezultati lahko tako potrdimo hipotezo, da je MIK različnih eteričnih olj odvisen od vrste olja in testnih organizmov;

- ~ Timol, karvakrol in mentol so boljše inhibirali rast sevov kot olja timijana, origana in mete, kar potrjuje hipotezo, da sestavine eteričnih olj izkazujejo boljšo protimikrobno aktivnost za določen sev kot celokupna eterična olja, katerih sestavni del so (npr. MIK mentola pri plesni vrste *A. flavus* je znašal 0,375 $\mu\text{L}/\text{mL}$, MIK mete pa 6,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$);

- ~ Rezultati testiranja protimikrobne aktivnosti eteričnih olj na trdnih in tekočih gojiščih so se bolj ali manj razlikovali. $\frac{1}{2}$ MIK timijana je npr. po enaindvajsetih dneh inkubacije popolnoma inhibiral rast plesni vrste *P. verrucosum* na trdnem gojišču, v tekočem gojišču pa je bila rast inhibirana le delno in sicer v nekaj več kot 57 %. Tako lahko sklepamo, da izbira metode in gojišča, pogoji inkubacije, itd. pomembno vplivajo na končne rezultate analiz;

- ~ Karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIK je pri plesni vrste *A. flavus* štirinajsti dan inkubacije na trdnem gojišču inhibiral tako rast seva (-19 %) kot tudi tvorbo mikotoksinov (-36 %), timijan v koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIK pri plesni vrste *A. flavus* enaindvajseti dan inkubacije na trdnem gojišču ni imel vpliva na rast seva, je pa inhibiral tvorbo mikotoksinov (-31 %), karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK je pri plesni vrste *P. verrucosum* enaindvajseti dan inkubacije na trdnem gojišču rast seva delno inhibiral (-41 %) in hkrati pospešil sintezo mikotoksinov (97 %), itd. Kot se je izkazalo, v nasprotju z našo hipotezo neposredna medsebojna povezava med inhibicijo rasti in inhibicijo tvorbe mikotoksinov ne obstaja.

6 POVZETEK

Zaradi sposobnosti prilagoditve na različne okoljske razmere in rasti na ogromno različnih substratih so mikotoksigene plesni razširjene po vsem svetu in danes predstavljajo eno najnevarnejših okužb živil in živalske krme. Do okužbe z njihovimi sekundarni metaboliti, mikotoksini, lahko pride na katerikoli stopnji proizvodne verige živil, posledice njihovega zaužitja pa se lahko izrazijo v različnih obolenjih ljudi in živali. Najzanesljivejša pot zagotavljanja neoporečnosti živil je izvajanje preventivnih ukrepov. Eden takšnih je uporaba različnih fungicidov kemijskega izvora, vendar se v zadnjem času vse bolj pojavlja potreba po nadomestitvi teh zdravju škodljivih kemikalij z alternativnimi snovmi naravnega izvora, kamor sodijo tudi eterična olja. Tekom našega dela smo analizirali protimikrobno aktivnost desetih različnih eteričnih olj in njihovih sestavin proti štirim potencialno mikotoksigenim sevom. Z metodo razredčevanja na mikrotitrski ploščici smo ugotovili, da so rast vseh štirih sevov najbolje zavirali timol, mentol in karvakrol ter olji origana in timijana, saj MIK nobenega izmed njih ni presegal 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Olji jelkinih iglic in storžev sta bili edini, ki rasti sevov nista inhibirali. Tankoplastna kromatografija je pokazala, da sta mikotoksine v trdnih gojiščih tvorila le dva izmed štirih sevov. Plesen vrste *A. flavus* je sintetizirala aflatoksin B₁, plesen vrste *P. verrucosum* pa ohratoksin A. Kvantitativno smo prisotnost mikotoksinov na trdnih gojiščih ovrednotili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ter s primerjavo inhibicije rasti in inhibicije tvorbe mikotoksinov ugotovili, da medsebojna povezava med njima ne ostaja, saj se je protimikrobni vpliv različnih olj močno razlikoval. Tako je npr. karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIK je pri plesni vrste *A. flavus* štirinajsti dan inkubacije inhibiral rast seva in tvorbo mikotoksinov, timijan v koncentraciji $\frac{1}{4}$ MIK pri plesni vrste *A. flavus* je enaindvajseti dan inkubacije inhibiral tvorbo mikotoksinov ne pa tudi rasti, karvakrol v koncentraciji $\frac{1}{2}$ MIK pa je pri plesni vrste *P. verrucosum* enaindvajseti dan inkubacije rast seva delno inhibiral in hkrati pospešil sintezo mikotoksinov za več kot 90 %, itd. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri analizah v tekočem gojišču, vendar zaradi domneve, da je metabolizem mikotoksigenih plesni močno odvisen tudi od zunanjih dejavnikov in spremenjenih pogojev inkubacije, neposredna medsebojna primerjava rezultatov s tekočih in trdnih gojišč ni mogoča.

7 VIRI

- Abbaszadeh B., Valadabadi S. A., Farahani H. A., Darvishi H. H. 2009. Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *African Journal of Plant Science*, 3, 10: 217-221
- Aflaprep®. Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins. Instructions for use. 2011. Glasgow, R-Biopharm Rhone LTD: 6 str.
- Angelini P., Pafiotti R., Menghini A., Vianello B. 2006. Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Annals of Microbiology*, 56, 1: 65-69
- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4364-4370
- Bakalyar S. R. 1981. Principles of liquid chromatography. V: Liquid chromatography in clinical analysis. Kabra P. M., Marton L. J. (eds.). Clifton, Humana Press Inc.: 3-19
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475
- Bata A., Kasztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 223-228
- Bayman P., Baker J. L. 2006. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia*, 162: 215-223
- Bennett J. W., Kale S., Yu J. 2007. Aflatoxins: Background, toxicology, and molecular biology. V: Foodborne diseases. Simjee S. (ed.). Totowa, Humana Press Inc.: 355-373
- Bennett J. W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 497-516
- Bhat R., Rai R. V., Karim A. A. 2010. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 57-81
- Bozin B., Dukic N. M., Simin N., Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and

- antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1822-1828
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253
- Bragulat M. R., Abarca M. L., Cababes F. J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139-144
- Choma I. M., Grzelak E. M. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2684-2691
- Combrinck S., Regnier T., Kamatou G. P. P. 2011. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33: 344-349
- Cos P., Vlietinck A. J., Berghe D. V., Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302
- Čvek D. 2012. Mikrobiologija namirnica. Vježbe. 2012. Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 41 str. (interno gradivo)
- Dijoux N., Yannick G., Bourgeois C., Sandrine D., Fromageot C., Combe C., Ferret P. J. 2006. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro*, 20: 480-489
- el Khoury A., Atoui A. 2010. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2: 461-493
- Ficko A., Poljanec A., Boncina A. 2011. Do changes in spatial distribution, structure and abundance of silver fir (*Abies Alba* Mill.) indicate its decline? *Forest Ecology and Management*, 261: 844-854
- Filtenborg O., Frisvad J. C. 1980. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure culture. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 13: 128-130
- Filtenborg O., Frisvad J. C., Svendsen J. A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 2: 581-585

- Fitzgerald D. J., Stanford M., Gasson M. J., Narbad A. 2004. The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. *Journal of Food Protection*, 67: 391-395
- Frisvad J. C. 1987. High pressure liquid chromatographic determination of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography*, 392: 333-347
- Frisvad J. C., Thrane U. 1987. Standardized High-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone indices nad UVVIS spectra (diodearray detection). *Journal of Chromatography*, 404: 195-214
- Frisvad J. C., Thrane U. 1993. Liquid column chromatography of mycotoxins. V: *Chromatography of mycotoxins: techniques and applications*. Betina V. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 253-372
- Golebiowski M., Ostrowski B., Paszkiewicz M., Czerwicka M., Kumirska J., Halinski L., Malinski E., Stepnowski P. 2008. Chemical composition of commercially available essential oils from blackcurrant, ginger and peppermint. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 6: 794-796
- Guarda A., Rubilar J. F., Miltz J., Galotto M. J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 144-150
- Guba R. 2001. Toxicity myths—essential oils and their carcinogenic potencial. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 2: 76-83
- Gulfraz M., Mehmood S., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K., Arshad G. 2008. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African Journal of Biotechnonology*, 7, 24: 4364-4368
- Gustafson J. E., Liew Y. C., Chew S., Markham J., Bell H. C., Wyllie S. G., Warmington J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 194-198
- He W., Huang B. 2011. A review of chemistry and bioactivites of medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 16: 3595-3600
- Hussein H. S., Brasel J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134

- Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K. H. C., Demirci F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3943-3946
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121-126
- Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya S. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34: 802-817
- Lang G., Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27,1: 13-29
- Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y., Chen J. 1998. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815: 3-20
- Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667
- Lopez-Malo A., Alzamora S. M., Palou E. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 119-128
- Madigan M. T., Martinko J. H., Dunlap P. V., Clark D. P. 2009. *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. San Francisco, Pearson Education, Inc.: 1168 str.
- Magan N., Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 131-139
- Magan N., Hope R., Colleate A., Bacter E. S. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 685-690
- Magnoli C. E., Astoreca A. L., Chiacchiera S. M., Dalcero A. M. 2007. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163: 249-260

- Masotti V., Juteau F., Bessie`re J. M., Viano J. 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7115-7121
- Mechergui K., Coelho J. A., Serra M. C., Lamine S. B., Boukhchina S., Khouja M. L. 2010. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glanulosum* (Desf.) letsvaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1745-1749
- Napoli E. M., Curcuruto G., Ruberto G. 2010a. Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 213-133
- Napoli E. M., Curcuruto G., Ruberto G. 2010b. Screening the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 816-822
- NCBI. 2011. Taxonomy browser. Bethesda MD, National Center for Biotechnology Information: database
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> (26. 12. 2011)
- Nguefack J., Dongmo J. B. L., Dakole C. D., Leth V., Vismer H. F., Torp J., Guemdjom E. F. N., Mbeffo M., Tamgue O., Fotio D., Zollo P. H. A., Nkengfack A. E. 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 131:151-156
- Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H. 2007. Antifungal acitivity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518-1523
- Paterson R. R. M., Lima N. 2010. Toxicology of mycotoxins. V: Molecular, clinical and environmental toxicology. Vol. 2: Clinical toxicology. Luch A. (ed.). Berlin, Birkhauser Verlag AG: 31-63
- Pauli A., Schilcher H. 2010. *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European pharmacopoeia 6th ed. V: Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Baser K. H. C., Buchbauer G. (eds.). Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 353-547
- Pillai P., Ramaswamy K. 2012. Effect of naturally occurring antimicrobials and chemical preservatives on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science and Technology– Mysore*, 49, 2: 228-233

- Pitt J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56, 1: 184-192
- Pitt J. I., Hocking A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. London, Blackie Academic & Professional: 593 str.
- Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 202-251
- Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Rezaee M. B., Jaimand K., Alinezhad S., Saberi R., Yoshinari T. 2009. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20: 1018-1024
- Rex J. H., Alexander B. D., Andes D., Arthington-Skaggs B., Brown S. D., Chaturveli V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M. A., Knapp C. C., Motyl M. R., Ostrosky-Zeichner L., Pfaller M., Sheehan D. J., Walsh T. J. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. M38-A2. Approved Standard. 2nd ed. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute: 33 str.
- Richard J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10
- Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A., Jordan M. J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681-687
- Saeed S., Tariq P. 2009. Antibacterial activity of oregano (*Origanum Vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 4: 421-424
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Foltenborg O. (eds.). 2000. Introduction to food- and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 389 str.
- Sandasi M., Leonard C. M., Van Vuuren S. F., Viljoen A. M. 2011. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *South African Journal of Botany*, 77: 80-85
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimaraes, L. G. L., Salgado, A. P. S. P., Menna-Barreto, R. F. S., Soares M. J. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100, 4: 783-790
- Separation and quantification of aflatoxins B and G using HPLC: Bulletin 800D 1998. Bellefonte, Supelco, Sigma-Aldrich: 4 str.

- Shreaz S., Bhatia R., Khan N., Muralidhar S., Basir S. F., Manzoor N., Khan L. A. 2001. Exposure of *Candida* to p-anisaldehyde inhibits its growth and ergosterol biosynthesis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 57: 129-136
- Singh G., Maurya S., de Lampasona M. P., Catalan C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17: 745-752
- Soković M. D., Vukojević J., Marin P. D., Brkić D. D., Vajs V., van Griensven L. J. L. D. 2009. Chemical composition and essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14: 238-249
- Stroka J., Spanjer M., Buecher S., Barel S., Kos G., Anklam E. 2004. Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of ochratoxin A contamination. *Toxicology Letters*, 153: 99-107
- Sweeney M. J., Dobson A. D. W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158
- Šegvič Klarič M., Kosalec I., Mastelić J., Pieckova E., Pepelnjak S. 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 36-42
- Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218
- Thrane U. 1986. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thinlayer chromatography. *Letters in Applied Microbiology*, 3: 93-96
- Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M. A., Cuffini A. M., Alonzo V., Carlone N. A. 2007. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 6: 1544-1550
- Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180
- Tyagi A. K., Malik A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22, 11: 1707-1714

- Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1561-1568
- Uredba komisije (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi nekaterih onesnaževal v živilih. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L364: 5-24
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J. A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27, 1: 91-101
- Yang S. A., Jeon S. K., Lee E. J., Im N. K., Jhee K. H., Lee S. P., Lee I. S. 2009. Radical scavenging activity of the essential oil of silver fir (*Abies alba*). *Journal of Clinical Biochemistry*, 44: 253-259
- Yu J., Cleveland T. E., Nierman C., Bennet J. W. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 22: 194-202

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za vso strokovno pomoč, nasvete in čas, ki ga je namenila nastajanju te diplomske naloge.

Hvala doc. dr. Barbari Jeršek za pomoč pri izvedbi praktičnega dela naloge in interpretaciji rezultatov, g. Mateju Šerganu in dr. Mihaeli Skrt za izvedbo HPLC ter ostalim zaposlenim na katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil za pomoč pri delu v njihovih laboratorijih.

Hvala doc. dr. Kseniji Markov za mentorstvo in strokovno vodenje tekom mojega dela v Laboratoriju za splošno mikrobiologijo in mikrobiologijo živil na Prehrambeno-biotehnoški fakulteti v Zagrebu ter asistentu dr. Domagoju Čveku in ostalim zaposlenim, ki so pomagali pri izvedbi analiz.

Hvala prof. dr. Petru Rasporju za recenzijo diplomske naloge.

Hvala kolegici Marijani Anđić za sodelovanje pri izvedbi analiz za najini diplomski nalogi ter za ves čas, ki sva ga preživeli v laboratorijih in izven njih v Ljubljani in Zagrebu.

In nenazadnje, hvala moji družini za vzpodbudo in podporo tekom celotnega študija. Ter kolegom in prijateljem za nepozabne študentske dni.

PRILOGE

Priloga A:

Povprečni premer kolonij seva *Penicillium verrucosum* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

Sev	Olje / čas	3 dni	7 dni	10 dni	14 dni	17 dni	21 dni
	Kontrola	0 mm	11 mm	19,5 mm	30 mm	37 mm	47,5 mm
	Kontrola DMSO	n. a.	11,5 mm	n. a.	30,5 mm	38 mm	48 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK timol	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK imol	0 mm	2 mm	4,5 mm	9 mm	16 mm	28 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK karvakrol	0 mm	0 mm	1,5 mm	5 mm	13 mm	28 mm
<i>Penicillium</i>	$\frac{1}{4}$ MIK karvakrol	0 mm	7 mm	15,5 mm	25,5 mm	35,5 mm	43,5 mm
<i>verrucosum</i>	$\frac{1}{2}$ MIK mentol	0 mm	12,5 mm	20,5 mm	30 mm	37 mm	48 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK mentol	0 mm	13,5 mm	21,5 mm	31 mm	38 mm	48 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK origano	0 mm	2,5 mm	10 mm	20,5 mm	28 mm	37,5 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK origano	0 mm	4 mm	11 mm	20,5 mm	28,5 mm	39 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK timijan	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK timijan	0 mm	0 mm	1 mm	3,5 mm	6,5 mm	16 mm

Legenda: n.a.- ni analize; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.

Priloga B:

Povprečni premer kolonij seva *Aspergillus flavus* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja ($\frac{1}{2}$ MIK ali $\frac{1}{4}$ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

Sev	Olje / čas	5 dni	7 dni	10 dni	14 dni	17 dni	21 dni
	Kontrola	54,5 mm	67 mm	75,5 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	Kontrola DMSO	n. a.	65 mm	n. a.	90 mm	90 mm	90 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK timol	29,5 mm	43,4 mm	64 mm	84 mm	90 mm	90 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK imol	41 mm	54,5 mm	72 mm	84,4 mm	90 mm	90 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK karvakrol	5 mm	10,5 mm	n. p.	n. p.	n. p.	n. p.
<i>Aspergillus</i>	$\frac{1}{4}$ MIK karvakrol	24 mm	36 mm	52 mm	73 mm	90 mm	90 mm
<i>flavus</i>	$\frac{1}{2}$ MIK mentol	45 mm	57 mm	70 mm	n. p.	n. p.	n. p.
	$\frac{1}{4}$ MIK mentol	49 mm	60 mm	75 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	$\frac{1}{2}$ MIK origano	0 mm	0 mm	0 mm	6 mm	16 mm	36 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK origano	11,5 mm	20,5 mm	25 mm	n. p.	n. p.	n. p.
	$\frac{1}{2}$ MIK timijan	0 mm	0 mm	3 mm	19 mm	39 mm	73 mm
	$\frac{1}{4}$ MIK timijan	1 mm	5 mm	7 mm	30 mm	52 mm	90 mm

Legenda: n.a.- ni analize; n.p.- ni podatka; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.

Priloga C:

Povprečni premer kolonij seva *Aspergillus niger* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja (½ MIK ali ¼ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj. Kontrola* je gojišča brez DMSO, ki je bila izvedena vzporedno z izvedbo kontrole z DMSO.

Sev	Olje / čas	4 dni	7 dni	10 dni	14 dni	17 dni
<i>Aspergillus niger</i>	Kontrola	n. p.	90 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	Kontrola DMSO	n. a.	47,5 mm	n. a.	72 mm	n. a.
	<i>Kontrola*</i>	<i>n. a.</i>	<i>47 mm</i>	<i>n. a.</i>	<i>71,5 mm</i>	<i>n. a.</i>
	½ MIK timol	24 mm	55 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	¼ MIK imol	33 mm	69 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	½ MIK karvakrol	7 mm	29 mm	57 mm	90 mm	90 mm
	¼ MIK karvakrol	17,5 mm	42 mm	78,5 mm	90 mm	90 mm
	½ MIK mentol	47 mm	90 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	¼ MIK mentol	46 mm	90 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	½ MIK origano	21 mm	53 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	¼ MIK origano	43,5 mm	90 mm	90 mm	90 mm	90 mm
	½ MIK timijan	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	¼ MIK timijan	0 mm	0 mm	0 mm	12,5 mm	31,5 mm

Legenda: n.a.- ni analize; n.p.- ni podatka; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.

Priloga D:

Povprečni premer kolonij seva *Penicillium nordicum* v odvisnosti od količine dodanega izbranega eteričnega olja (½ MIK ali ¼ MIK) in inkubacijskega časa. Kot kontrolno gojišče je bil za rast plesni uporabljen Czapek agar s kvasnim ekstraktom (CYA) brez dodatka eteričnih olj. Pri kontroli DMSO je plesen rastla na gojišču CYA z dodatkom dimetil sulfoksida (DMSO) v najvišji uporabljeni koncentraciji in brez dodatka eteričnih olj.

Sev	Olje / čas	4 dni	7 dni	9 dni	14 dni	16 dni
	Kontrola	9 mm	15 mm	22 mm	35,5 mm	39,5 mm
	Kontrola DMSO	n. a.	16 mm	n. a.	38,5 mm	n. a.
	½ MIK timol	6 mm	11,5 mm	17 mm	30,5 mm	36,5 mm
	¼ MIK imol	8,5 mm	15 mm	21 mm	34 mm	39,5 mm
	½ MIK karvakrol	3 mm	5 mm	8 mm	24 mm	n. p.
<i>Penicillium</i>	¼ MIK karvakrol	6 mm	11,5 mm	16 mm	30,5 mm	36 mm
<i>nordicum</i>	½ MIK mentol	8 mm	14 mm	18 mm	35,5 mm	40 mm
	¼ MIK mentol	8 mm	14 mm	21 mm	35,5 mm	40,5 mm
	½ MIK origano	0 mm	0,5 mm	0,5 mm	2 mm	11 mm
	¼ MIK origano	4 mm	5 mm	9 mm	26 m	27 mm
	½ MIK timijan	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	¼ MIK timijan	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Legenda: n.a.- ni analize; n.p.- ni podatka; MIK- minimalna inhibitorna koncentracija.