

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Darja KRZNAR

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE ENOSTAVNIH FENOLNIH SPOJIN  
TER EKSTRAKTOV ROŽMARINA IN ŽAJBLJA NA RAZLIČNE  
VRSTE BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SIMPLE PHENOLIC COMPOUNDS  
AND EXTRACTS OF ROSEMARY AND SAGE AGAINST DIFFERENT  
BACTERIA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju živilske mikrobiologije na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Darja Krznar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.24+579.26:547.56 (043) = 163.6  
KG protimikrobne snovi/rastlinski ekstrakti/ekstrakt rožmarina/ekstrakt žajblja/epigalokatehin galat/galna kislina/klorogenska kislina/metode razredčevanja/minimalna inhibitorna koncentracija/razdeto meso/odpornost bakterij/*Staphylococcus aureus*/*Escherichia coli*/*Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium  
AV KRZNAR, Darja  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE ENOSTAVNIH FENOLNIH SPOJIN TER EKSTRAKTOV ROŽMARINA IN ŽAJBLJA NA RAZLIČNE VRSTE BAKTERIJ  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 70 str., 8 pregl., 33 sl., 12 pril., 43 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V nalogi smo ugotavljali, kakšna je protimikrobna učinkovitost galne kisline, klorogenske kisline, epigalokatehin galata (EGKG) in ekstraktov rožmarina (Vivox 40 in Vivox 70) ter žajblja na izbrane grampozitivne in gramnegativne bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium). Proučevali smo učinkovitost protimikrobnih snovi pri nižjem in višjem številu bakterij ( $10^3$  CFU/ml in  $10^7$  CFU/ml) in pri različnih sevih iste vrste bakterij. Ugotoviti smo želeli tudi, kakšen je vpliv živila na delovanje izbranih snovi. Protimikrobno učinkovitost testiranih spojin smo določali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB (triptični soja bujon) v mikrotiterski ploščici in z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB. Kot merilo za protimikrobno aktivnost smo izbrali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). Ugotovili smo, da so bile grampozitivne bakterije vrste *Staphylococcus aureus* bolj občutljive na enostavne fenolne spojine in ekstrakte od gramnegativnih bakterij vrst *E. coli* in *S. enterica*. Občutljivost bakterij je bila večja pri nižji koncentraciji celic kot pri višji. Vrednosti MIC za testirane protimikrobne snovi določene za različne seve iste vrste bakterij so si bile zelo podobne (trije sevi bakterij vrste *Staphylococcus aureus* in seva *Salmonella* Enteritidis in *Salmonella* Typhimurium). Glede na dobljene rezultate smo ugotovili tudi, da so imeli ekstrakti rožmarina in žajblja boljše protimikrobno delovanje kot enostavne fenolne spojine. Izjema je bil le EGKG, ki se je izkazal kot protimikrobno zelo učinkovit. Ekstrakta rožmarina in EGKG smo testirali v razdetem mešanem mesu. V živilu so bile protimikrobne snovi manj učinkovite, saj so bile vrednosti MIC v mletem mesu višje, kot v gojišču TSB.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24+579.26:547.56 (043) = 163.6  
CX antimicrobial compounds/plant extracts/rosemary extract/sage extract/epigallocatechin gallate/gallic acid/chlorogenic acid/dilution methods/minimal inhibitory concentration/minced meat/bacterial resistance/*Staphylococcus aureus*/*Escherichia coli*/*Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium  
AU KRZNAR, Darja  
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2010  
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SIMPLE PHENOLIC COMPOUNDS AND EXTRACTS OF ROSEMARY AND SAGE AGAINST DIFFERENT BACTERIA  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XI, 70 p., 8 tab., 33 fig., 12 ann., 43 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the diploma work we have investigated antimicrobial efficacy of gallic acid, chlorogenic acid, epigallocatechin gallate (EGCG) and extracts of rosemary (Vivox 40 and Vivox 70) and sage on the selected Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium). We studied the effectiveness of antimicrobial substances in the lower and higher numbers of bacteria ( $10^3$  CFU/ml and  $10^7$  CFU/ml) and with different strains of the same species of bacteria. We also wanted to determine the influence of food on antibacterial activity of selected substances. Antimicrobial effectiveness of the tested compounds was determined by microdilution method in liquid medium TSB (Tryptic Soy Broth) in a microtiter plate and dilution method in the liquid medium TSB. As a measure of antimicrobial activity, we chose the minimum inhibitory concentration (MIC). We found that Gram-positive bacteria of *Staphylococcus aureus* were more sensitive to simple phenolic compounds and plant extracts than Gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. The sensitivity of bacteria was higher at lower concentrations of cells than at higher. MIC values for certain antimicrobials tested on different strains of the same species of bacteria were very similar (three strains of *Staphylococcus aureus* and two strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium). According to the results, we also found out that the extracts of rosemary and sage had better antimicrobial activity than simple pure phenolic compounds. The exception was only EGCG, which has proved to be very effective. Rosemary extracts and EGCG were also tested in a mixed minced meat. Antimicrobial substances were less effective in food, because the MIC values were higher in minced meat than in TSB medium.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b> .....	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b> .....	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	VII
<b>KAZALO SLIK</b> .....	VIII
<b>KAZALO PRILOG</b> .....	X
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	XI
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	3
2.1 ZGODOVINA UPORABE ZDRAVILNIH RASTLIN IN ZELIŠČ .....	3
2.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE SNOVI RASTLINSKEGA IZVORA.....	4
2.2.1 Protimikrobno delovanje rožmarina ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	5
2.2.2 Protimikrobno delovanje žajblja ( <i>Salvia officinalis</i> ).....	7
2.2.3 Protimikrobno delovanje epigalokatehin galata .....	8
2.2.4 Protimikrobno delovanje galne kisline.....	9
2.2.5 Protimikrobno delovanje klorogenske kisline .....	10
2.3 BAKTERIJE VRSTE <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.4 BAKTERIJE RODU <i>Salmonella</i> .....	12
2.5 BAKTERIJE VRSTE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.5.1 Proti meticilinu odporni sevi <i>S. aureus</i> - MRSA .....	13
2.6 <i>IN VITRO</i> METODE ZA DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI.....	14
2.6.1 Razredčevalne metode .....	15
2.6.1.1 Metoda razredčevanja v trdem gojišču.....	16
2.6.1.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču .....	16
2.6.2 Metoda difuzije v trdem gojišču z diski .....	17
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	17
3.1 MATERIAL .....	18
3.1.1 Mikroorganizmi.....	18
3.1.2 Mikrobiološka gojišča .....	18
3.1.2.1 Gojišče TSA (triptično soja gojišče) .....	18
3.1.2.2 Tekoče gojišče TSB (triptični soja bujon).....	18
3.1.2.3 Tekoče gojišče BHI (angl. Brain Heart Infusion) .....	18
3.1.2.4 Selektivno gojišče BP (angl. Baird-Parker base) .....	19
3.1.2.5 Selektivno gojišče XLD (angl. Xylose Lysine Desoxycholate).....	19
3.1.2.6 Selektivno gojišče EMB (angl. Eosin Methylene Blue) .....	19
3.1.2.7 Fiziološka raztopina .....	20
3.1.3 Živilo - mešano razdeto meso .....	20
3.1.4 Snovi s protimikrobnim delovanjem .....	20
3.1.4 Druge kemikalije in dodatki.....	20
3.1.5 Laboratorijska oprema.....	21
3.2 METODE DELA.....	22
3.2.1 Priprava osnovnih raztopin ekstraktov in enostavnih fenolnih spojin za določitev njihovega protimikrobnega učinka .....	23

<b>3.2.2 Revitalizacija bakterij</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.3 Priprava inokuluma</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.4 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici</b> .....	<b>25</b>
3.2.4.1 Uporabljeni material.....	26
3.2.4.2 Izvedba metode .....	26
<b>3.2.5 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB</b> .....	<b>28</b>
3.2.5.1 Uporabljeni material.....	29
3.2.5.2 Izvedba metode .....	29
<b>3.2.6 Spremljanje rasti bakterij v razdetem mesu z dodanimi protimikrobnimi snovmi</b> .....	<b>30</b>
3.2.6.1 Uporabljeni material.....	30
3.2.6.2 Izvedba metode .....	30
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>31</b>
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB V MIKROTITERSKI PLOŠČICI.....	31
4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB.....	34
4.2.1 Protimikrobni učinek galne kisline.....	35
4.2.2 Protimikrobni učinek klorogenske kisline .....	36
4.2.3 Protimikrobni učinek epigalokatehin galata .....	37
4.2.4 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40.....	39
4.2.5 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70.....	43
4.2.6 Protimikrobni učinek ekstrakta žajblja .....	46
4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV V RAZDETEM MESU .....	48
4.3.1 Protimikrobni učinek epigalokatehin galata v razdetem mesu .....	49
4.3.2 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 v razdetem mesu.....	50
4.3.3 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 v razdetem mesu.....	50
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>52</b>
5.1 RAZPRAVA .....	52
5.1.1 Primerjava metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB.....	52
5.1.2 Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin in ekstraktov rožmarina ter žajblja na grampozitivne in gramnegativne bakterije.....	53
5.1.3 Vpliv začetnega števila bakterij na protimikrobno učinkovitost fenolnih spojin in ekstraktov .....	54
5.1.4 Protimikrobna aktivnost rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin .....	54
5.1.5 Vpliv živila na protimikrobno aktivnost fenolnih spojin in ekstraktov .....	55
5.2 SKLEPI .....	56
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>57</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>59</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla z opisom mehanizmov protimikrobnega delovanja (Cowan, 1999).....	4
Preglednica 2: Protimikrobne spojine v rožmarinu (Moghtader in Afzali, 2009; Po-Jung in sod., 2007).....	6
Preglednica 3: Protimikrobne spojine v žajblju (Bouaziz in sod., 2009).....	8
Preglednica 4: Metode za določanje protimikrobnega delovanja snovi (Burt, 2004).....	15
Preglednica 5: Delovne kulture bakterij.....	18
Preglednica 6: Shema mikrotiterske ploščice za določitev protimikrobnega učinka EGKG na bakterije vrst <i>E. coli</i> ŽM370, <i>S. Enteritidis</i> ŽM351 in <i>S. Typhimurium</i> ŽM352 .....	28
Preglednica 7: Vrednosti MIC fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov (mg/ml TSB) za gramnegativne bakterije dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici.....	32
Preglednica 8: Vrednosti MIC fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov (mg/ml TSB) za grampozitivne bakterije dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici.....	34

## KAZALO SLIK

Slika 1: Rožmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) (Rosemary, 2010) .....	5
Slika 2: Kemijske strukture najpomembnejših fenolnih spojin v ekstraktu rožmarina (Perez-Fons in sod., 2006) .....	6
Slika 3: Žajbelj ( <i>Salvia officinalis</i> ) (Kadulja, 2009) .....	7
Slika 4: Kemijska struktura epigalokatehin galata izoliranega iz listov zelenega čaja (Yen-Sun in sod., 2009) .....	8
Slika 5: Kemijska struktura galne kisline (Madlener in sod., 2007) .....	9
Slika 6: Kemijska struktura klorogenske kisline (Kang in sod., 2004) .....	10
Slika 7: <i>Escherichia coli</i> serotip O157:H7 (Kunkel D., 2009) .....	11
Slika 8: Celice bakterij sevov <i>Salmonella</i> Typhimurium (levo) in <i>Salmonella</i> Enteritidis (desno) (Kunkel D., 2009) .....	12
Slika 9: Celice bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i> (Kunkel D., 2009) .....	13
Slika 10: Shema eksperimentalnega dela .....	23
Slika 11: Delovna shema metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici .....	26
Slika 12: Shema določanja protimikrobnega učinka enostavnih fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov na različne bakterije z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB .....	29
Slika 13: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline .....	36
Slika 14: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline .....	37
Slika 15: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata .....	38
Slika 16: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata .....	39
Slika 17: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata .....	40
Slika 18: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata .....	41
Slika 19: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40 .....	42
Slika 20: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40 .....	43
Slika 21: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40 .....	43
Slika 22: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40 .....	44
Slika 23: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70 .....	45
Slika 24: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70 .....	46
Slika 25: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70 .....	47



Slika 26: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70 .....	47
Slika 27: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	48
Slika 28: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	49
Slika 29: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	49
Slika 30: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	50
Slika 31: Rast bakterij vrst <i>S. aureus</i> ŽMJ345 in <i>E. coli</i> ŽM370 v razdetem mesu z epigalokatehin galatom .....	51
Slika 32: Rast bakterij vrst <i>S. aureus</i> ŽMJ345 in <i>E. coli</i> ŽM370 v razdetem mesu z ekstraktom Vivox 40 .....	52
Slika 33: Rast bakterij vrst <i>S. aureus</i> ŽMJ345 in <i>E. coli</i> ŽM370 v razdetem mesu z ekstraktom Vivox 70 .....	53

## KAZALO PRILOG

Priloga A 1: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline.....	63
Priloga A 2: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline.....	63
Priloga A 3: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline.....	64
Priloga A 4: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline.....	64
Priloga A 5: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata.....	65
Priloga A 6: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata.....	65
Priloga A 7: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40.....	66
Priloga A 8: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40.....	66
Priloga A 9: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70.....	67
Priloga A 10: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70.....	67
Priloga A 11: Rast bakterij seva <i>S. aureus</i> ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	68
Priloga A 12: Rast bakterij seva <i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.....	68

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
ATTC	tipski sev zbirke American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	(angl. brain heart infusion)
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
BP	(angl. Baird-Parker base)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CFU	kolonijska enota (angl. colony forming unit)
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
DAEC	difuzno - adherentna <i>E. coli</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EAEC	enteroagregativna <i>E. coli</i>
EGKG	epigalokatehin galat
EHEC	enterohemoragična <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivna <i>E. coli</i>
EMB	(angl. Eosin Methylene Blue gojišče)
EPEC	enteropatogena <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoksigena <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FR	fiziološka raztopina
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LT	toplotno labilni enteritoksin <i>E. coli</i>
MHA	trdo gojišče Mueller - Hinton
MHB	tekoče gojišče Mueller - Hinton
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	meticilin rezistentne bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	Nacionalna komisija za klinične laboratorijske standarde (angl. National Committee on Clinical Laboratory Standards)
NCTC	Nacionalna zbirka tipskih kultur (angl. National Collection of Type Cultures)
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ST	toplotno stabilni enterotoksin <i>E. coli</i>
TSA	gojišče triptični soja agar
TSB	gojišče triptični soja bujon
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
XLD	(angl. Xylose Lysine Desoxycholate gojišče)
ŽMJ	mikrobiološka zbirka laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

## 1 UVOD

Metabolično delovanje mikroorganizmov povzroča kvarjenje živil in je pogost vzrok za izgubo kakovosti živil, zato se v živilih in živilski proizvodnji uporabljajo številne protimikrobne snovi oz. konzervansi (Smole Možina in sod., 2009). Zaradi povečevanja odpornosti mikroorganizmov in zahtev potrošnikov po bolj naravni, manj obdelani hrani z manj dodanimi konzervansi, se je zelo okreplil razvoj novih naravnih protimikrobnih učinkovin, ki se kombinirajo z novimi fizikalnimi postopki konzerviranja (Gould, 2004). Naravne protimikrobne učinkovine morajo delovati na širok spekter kvarljivcev in hkrati tudi sinergistično učinkovati skupaj z milimi načini konzerviranja (Smole Možina in sod., 2009).

Protimikrobno aktivne snovi v živilih so lahko endogenega izvora, torej izhajajo iz surovine, lahko pa so rastlinskega, živalskega ali mikrobnegega porekla. Najbolj znano je protimikrobno delovanje alkaloidov in fenolnih spojin rastlinskega porekla. Med fenolne spojine spadajo: enostavni fenoli, fenolne spojine in njihovi estri, kinoni, flavonoidi, flavoni, tanini, kumarini, terpeni in eterična olja. Med alkaloidne spadata: berberin in piperin (Nychas, 2005).

Protimikrobno delovanje snovi je odvisno od sposobnosti povezovanja le-teh s celičnimi stenami mikroorganizmov. Zaradi razlik v sestavi celičnih sten med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami, so med njimi tudi razlike v občutljivosti na protimikrobne snovi. Grampozitivne bakterije so bolj občutljive od gramnegativnih bakterij, ker se na njihove celične stene lahko veže večja količina protimikrobne snovi, saj za razliko od gramnegativnih bakterij, grampozitivne bakterije nimajo zunanje membrane, ki ščiti bakterijsko celično steno pred vezavo protimikrobnih snovi (Yoda in Zhao, 2004).

Mikrobioloških kvarljivcev živil je veliko, vendar pa obstaja malo kvarljivcev, ki so hkrati tudi povzročitelji alimentarnih okužb ter zastrupitev. In ti organizmi so najbolj na udaru, ko gre za izboljšanje varnosti hrane. Med najpomembnejše povzročitelje bolezni, ki se prenašajo s hrano, spadajo bakterije vrst *S. aureus*, *Salmonella* spp, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Yersinia enterocolitica*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Campylobacter* spp, *A. hydrophila* in *V. parahaemolyticus* (Gould, 2004).

V diplomski nalogi smo izvedli poizkuse z bakterijami vrst *S. aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium in *E. coli*. Z izbranimi bakterijami smo testirali protimikrobno učinkovitost enostavnih fenolnih spojin (galne in klorogenske kisline ter epigalokatehin galata) ter rastlinskih ekstraktov (Vivox 40 in Vivox 70) ter ekstrakta žajblja.

## 1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Namen oziroma cilji diplomskega dela so bili:

- Določiti protimikrobno učinkovitost galne kisline, klorogenske kisline, epigalokatehin galata, ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 ter ekstrakta žajblja.
- Preveriti ali obstajajo razlike v občutljivosti med gramnegativnimi in grampozitivnimi bakterijami na izbrane protimikrobne snovi.
- Dokazati, da je protimikrobna učinkovitost izbranih snovi odvisna od števila bakterij.
- Ugotoviti ali obstajajo razlike med različnimi sevi iste bakterijske vrste.
- Preveriti vpliv živila na delovanje antimikrobnih snovi na bakterije.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Ekstrakti rožmarina (Vivox 40, Vivox 70) in žajblja so protimikrobno bolj učinkoviti kot enostavne fenolne spojine (galna kislina, klorogenska kislina, epigalokatehin galat).
- Grampozitivne bakterije vrste *S. aureus* so bolj občutljive na izbrane protimikrobne snovi galna kislina, klorogenska kislina, epigalokatehin galat, Vivox 40, Vivox 70 in ekstrakt žajblja od gramnegativnih bakterij sevov *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* ter vrste *E. coli*.
- Delovanje protimikrobnih snovi je boljše pri nižjem številu bakterij kot pri višjem številu bakterij.
- Med različnimi sevi iste bakterijske vrste ni razlik v občutljivosti na protimikrobne snovi.
- Učinkovitost protimikrobnih snovi je manjša v živilih kot v gojiščih.
- Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici omogoča hitro in enostavno določitev protimikrobnega delovanja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA UPORABE ZDRAVILNIH RASTLIN IN ZELIŠČ

Uporaba zdravilnih rastlin je stara toliko kot človeštvo. Nekateri znanstveniki predvidevajo, da so praljudje z opazovanjem obnašanja živali spoznali, da imajo nekatere rastline zdravilne učinke in so uporabo rastlin za zdravljenje še izpopolnili. Prvi zapisi o načinih zdravljenja so nastali okoli 2200 let pr. n. št. v Mezopotamiji, v današnjem Iraku. Gre za najstarejši medicinski priročnik. V Egiptu so bili najdeni prvi zapisi na medicinskih papirusih iz okoli 1900 let pr. n. št.. Pri Izraelcih so se ohranili medicinski zapisi samo v Talmudu in Bibliji. V zgodovini indijske medicine so nastali prvi medicinski zapisi v Vedah. V grško-rimski zgodovini medicine ima pomembno vlogo Hipokrat, ki je napisal med 60 in 70 del, imenovanih *Corpus Hippocraticum*. Teofrast je opisal 500 rastlinskih vrst in ga zato imenujejo oče botanike. Dioskorid je v svojem delu *De Materia Medica* opisal vsa domača in tuja zdravila rastlinskega, živalskega in mineralnega porekla. Zadnji veliki grško-rimski zdravnik je bil Galen. Napisal je 83 različnih del, ki so bila v uporabi še v srednjem veku. V 17. stoletju se začne uporaba kemijskih zdravil, ki so jih kemiki izdelovali z uporabo alkimističnih metod (Kuštrak, 2005). Razvoj organske kemije in začetek industrijske revolucije sta pospešila uporabo sintetično izdelanih zdravil. Kljub temu pa danes okoli 25 % zdravil še vedno izdelujejo iz rastlin (Rates, 2001).

Ljudje so rastline uporabljali ne samo v zdravstvene namene, ampak tudi kot začimbe in za konzerviranje hrane. Arheologi so odkrili, da so ljudje že 50 000 let pr. n. št. uporabljali rastlinske liste za začinjanje mesa. Že Grki in Rimljani so zelišča uporabljali za konzerviranje hrane. Zelišča in začimbe so nato v srednjem veku uporabljali za zdravljenje, izboljševanje okusa in za konzerviranje (Kaefer in Milner, 2008).

Zelišča in začimbe, ki delujejo protimikrobno, vsebujejo kemijske spojine kot so enostavni fenoli in fenolne spojine, kumarini, terpenoidi in alkaloidi. Leta 1990 sta Billing in Sherman naredila raziskavo s katero sta želela dokazati, da so ljudje začeli uporabljati zelišča zaradi njihovega protimikrobnega delovanja in ne samo zaradi organoleptičnega učinka. Ugotovila sta, da so prebivalci toplejših krajev v večini receptov vsakodnevno uporabljali več različnih začimb, medtem ko so v hladnejših območjih uporabljali veliko manj različnih začimb. Poleg tega sta ugotovila, da so prebivalci toplih krajev uporabljali veliko več začimb, ki delujejo mikrobiocidno, prebivalci hladnih krajev pa manj. Iz tega sta sklepala, da so ljudje že v davni preteklosti opazili protimikrobno delovanje zelišč (Kaefer in Milner, 2008).

## 2.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE SNOVI RASTLINSKEGA IZVORA

Mehanizmi protimikrobnega delovanja rastlin še vedno niso natančno raziskani. Znanstveniki domnevajo, da protimikrobne komponente učinkujejo na bakterijsko membrano in tako povzročijo, da ta postane bolj propustna. Poleg tega lahko povzročijo izgubo celičnih komponent, vplivajo na delovanje encimov in povzročajo poškodbe DNA (Kaefer in Milner, 2008). Med pomembne protimikrobne snovi rastlinskega izvora spadajo fenolne spojine (Alberto in sod., 2001). Fenolne spojine so vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več -OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. Pri poimenovanju fenolnih spojin je v literaturi dokajšnja zmeda in se zato priporoča uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli (Abram, 2000).

V preglednici 1 so zbrane glavne Protimikrobne snovi rastlinskega porekla, njihovi znani primeri in načini delovanja na bakterijske celice.

Preglednica 1: Glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla (Cowan, 1999)

Skupina	Podskupina	Znani primeri	Mehanizem delovanja
fenolne spojine	enostavni fenoli	katehol	motnje v transportu hranil in s tem sinteze ATP
		epikatehin	poškodbe membrane, antiadhezijsko delovanje <i>in vivo</i> (v črevesju)
	fenolne kisline in njihovi estri	kavna in rožmarinska kislina	vezava na lipide in proteine celične membrane, sprememba prepustnosti, izguba protonskega gradienta na membrani
	kinoni	hipericin	reakcije s proteini - vezava na adhezine, celično steno, inaktivacija encimov
	flavonoidi	krizin	vezava na adhezine, tvorba proteinskih kompleksov
	flavoni	abisinon	kompleks s celično steno, inaktivacija encimov, inhibicija reverzne transkriptaze HIV
	tanini	elagitanin	vezava na adhezine, polisaharide, inaktivacija encimov, motnje transporta hranil in s tem sinteze ATP, tvorba kompleksa s celično steno, poškodbe membrane, keliranje ionov
	kumarini	varfarin	interakcija z evkarionsko DNA, protivirusno delovanje, stimulacija makrofagov
	terpeni, eterična olja	karnozol in karnozolna kislina, timol, evgenol	poškodbe lipidov membrane, spremembe fluidnosti in s tem funkcionalnih lastnosti membrane, poškodbe membrane in izgubljanje celične vsebine
alkaloidi		berberin, piperin	interkalacija v celično steno in/ali v DNA
lektini in polipeptidi		manoza-specifični aglutinin	preprečevanje fuzije ali adsorbcije virusov
		fabatin	tvorba disulfidnih mostičkov

### 2.2.1 Protimikrobno delovanje rožmarina (*Rosmarinus officinalis*)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je trajni, zimzeleni grm visok do 2 metra. Starejša stebila so olesenela. Listi so usnjati in čvrsti ter iglaste oblike. Zgornja stran listov je gola in temno zelene barve, spodnja pa srebrno bele barve in prekrita z žleznimi trihomi. Listi imajo na sredini izrazito vglobljeno žilo. Na stebelu si rastejo nasproti v parih. Cvetovi so svetlo modre do modro vijolične barve (Slika 1). Najbolj intenzivno cveti spomladi. Eterično olje pridobivajo iz listov in cvetov rožmarina. Količina in sestava eteričnega olja je odvisna od vrste rastlinskega materiala, razvojne stopnje rastline in meseca nabiranja. Eterično olje vsebuje: 1,8-cineol, kamfor,  $\alpha$ -pinen, kamfen, borneol, bornilacetat, limonen in druge monoterpene (Kuštrak, 2005).



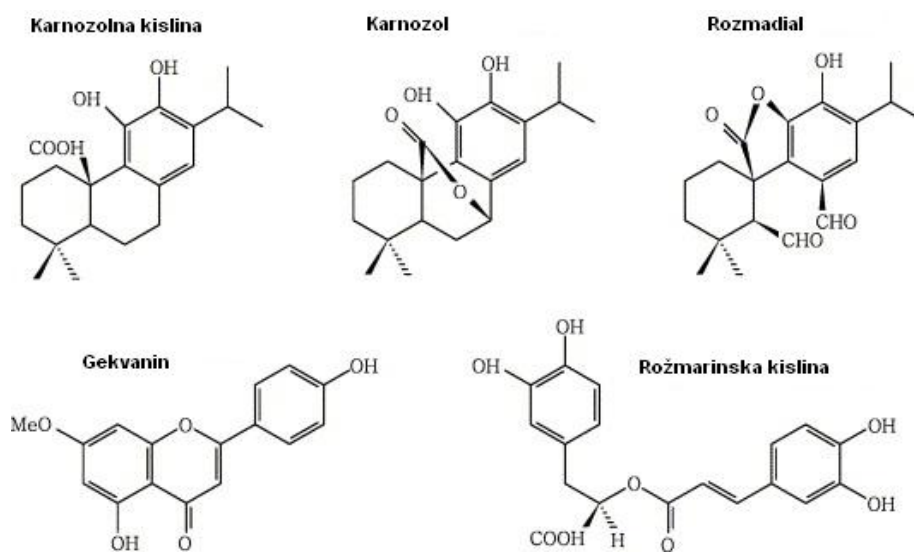
Slika 1: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) (Rosemary, 2010)

Rožmarin je poznan po svojem raznovrstnem fiziološkem delovanju: antioksidativno, protimikrobno, antikancerogeno in antihipertenzijsko (Herrero in sod., 2009). Zaradi teh lastnosti ga množično uporabljajo v prehrani, medicini, kozmetični industriji, ter za izdelovanje parfumov (Santos-Gomes, 2002).

V ekstraktu rožmarina je največ karnozolne kisline, karnozola, rožmarinske kisline in gekvanina. Te spojine imajo tudi najmočnejše protimikrobno delovanje. Naštete spojine so dobro topne v fosfolipidnem dvosloju celičnih membran, kjer tvorijo šibke vezi s fosfolipidnimi acilnimi verigami. Nastanek teh vezi poruši zgradbo van der Waalsovih vezi v fosfolipidnem sloju, kar naj bi povečalo fluidnost membrane (Perez-Fons in sod., 2006).

Slika 2 prikazuje kemijske strukture najpomembnejših protimikrobnih spojin izoliranih iz listov rožmarina.





Slika 2: Kemijske strukture najpomembnejših fenolnih spojin v ekstraktu rožmarina (Perez-Fons in sod., 2006)

V preglednici 2 so zbrane vse pomembne Protimikrobne spojine izolirane iz listov rožmarina.

Preglednica 2: Protimikrobne spojine v rožmarinu (Moghtader in Afzali, 2009; Po-Jung in sod., 2007)

skupina	Podskupina
polifenoli	Rožmarinska kislina
	Klorogenska kislina
	Kavna kislina
	Rozmanol
	Metilkarnozat
flavonoidi	Gekvanin
	Cirsimaritin
	Apigenin
eterično olje	$\alpha$ -pinen
	Kamfor
	Verbenon
	1,8-cineol
fenolni diterpeni	Karnozolna kislina
	Karnozol

### 2.2.2 Protimikrobno delovanje žajblja (*Salvia officinalis*)

Žajbelj (*Salvia officinalis*) je večletni polgrm visok 30 do 70 cm. Rastlina je malo ali nerazvejana. Spodnji deli stebela so olesneli, medtem ko so mlajše vrhnje vejice zeljaste. Listi so ozki in elipsaste oblike, na dolgih steblih. Cela rastlina je prekrita z gostimi dlakami, zato je sivozelena do srebrno obarvana. Cvetovi so vijolične barve (Slika 3). Cveti v aprilu in maju. Iz listov in stebelnih vršičkov pridobivajo eterično olje. Na količino in sestavo eteričnega olja vpliva razvojna stopnja rastline, geografsko poreklo, mesec nabiranja, dolžina dneva, svetloba in temperatura (Kuštrak, 2005).



Slika 3: Žajbelj (*Salvia officinalis*) (Kadulja, 2009)

Žajbelj zaradi antioksidativnih lastnosti in cenenosti uporabljajo v živilski industriji, medicini in kozmetiki. V živilski industriji se uporablja za zaščito olj in živil, ki vsebujejo veliko maščob, pred peroksidacijo. V medicini se uporablja zaradi protivnetnega delovanja in tudi zaradi antioksidativnega potenciala. Žajbelj in rožmarin imata med vsemi zelišči najmočnejše antioksidativno delovanje (Santos-Gomes, 2002).

V eteričnem olju žajblja prevladujejo monoterpeni in seskviterpeni (Kuštrak, 2005). Med monoterpeni prevladujejo:  $\beta$ -tujon, 1,8-cineol, kamfor, borneol,  $\alpha$ -tujon, kamfen in  $\beta$ -pinen. Med seskviterpeni prevladujejo: transkariofilen, viridiflorol in humulen (Glisic in sod., 2010). Poleg eteričnega olja se v žajblju nahajajo še tri skupine fenolnih spojin (Santos-Gomes in sod., 2002):

- fenolne kisline: galna kislina, rožmarinska kislina in kavna kislina
- flavonoidi: hesperetin, apigenin, hispidulin in gekvanin
- fenolni diterpeni: karnozolna kislina, karnozol, epirozmanol, rozmadial in metil karnozat

V preglednici 3 so zbrane vse pomembne Protimikrobne spojine izolirane iz listov žajblja. V ekstraktu žajblja prevladujejo monoterpeni, ki zaradi tega dajejo največji protimikrobni potencial. Vendar pa so pri antimikrobni aktivnosti pomembne tudi spojine prisotne v majhnih količinah. Te z monoterpeni delujejo sinergistično in tako povečujejo protimikrobno aktivnost ekstrakta (Bouaziz in sod., 2009).

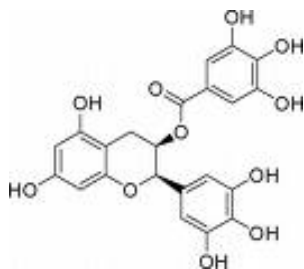
Preglednica 3: Protimikrobne spojine v žajblju (Bouaziz in sod., 2009)

skupina	podskupina
monoterpeni	$\beta$ -pinen
	1,8-cineol
	Kamfor
	$\beta$ -tujon
fenolne kisline	Galna kislina
	Rožmarinska kislina
	Kavna kislina
flavonoidi	Apigenin
	Gekvanin
fenolni diterpeni	Karnozol
	Karnozolna kislina

### 2.2.3 Protimikrobno delovanje epigalokatehin galata

Epigalokatehin galat (EGKG) spada med katehine, po kemijski sestavi je polifenol, in je glavna komponenta ekstrakta iz listov zelenega čaja. V čisti obliki se hitro oksidira, zaradi česar je izredno nestabilen. Oksidacija intenzivno poteka tudi v skoraj nevtralni raztopini s pH 6,5, saj je po 5 h oksidirana približno polovica EGKG. Dokazano je bilo, da prisotnost antioksidantov in nekaterih komponent, ki z njim tvorijo komplekse, zavira oksidacijo in tako izboljša njegovo stabilnost. Med take komponente spada cistein, ki z EGKG tvori kompleks in zavira prooksidativno delovanje kovinskih ionov. Med najmočnejše antioksidante spada askorbinska kislina (Hatano in sod., 2008).

Slika 4 prikazuje kemijsko strukturo epigalokatehin galata izoliranega iz listov zelenega čaja.



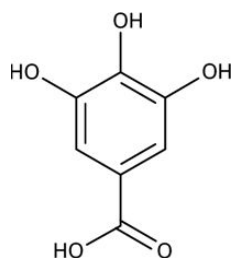
Slika 4: Kemijska struktura epigalokatehin galata izoliranega iz listov zelenega čaja (Yen-Sun in sod., 2009)

Epigalokatehin galat deluje inhibitorno na rast mikroorganizmov. Hatano in sodelavci (2008) so dokazali, da je oksidirana oblika EGKG protimikrobno manj učinkovita od reducirane. Potem, ko so epigalokatehin galatu dodali askorbinsko kislino, ki je močan antioksidant, se je njegova protimikrobna aktivnost precej zvečala (Hatano in sod., 2008). Princip protimikrobnega delovanja EGKG je v njegovem povezovanju z bakterijsko membrano. Posledica vezave je sprememba oblike celice, stanjšanje membrane na mestu vezave in na koncu nastanek razpoke na membrani. Razpoke nastanejo samo pri višjih koncentracijah EGKG. Zaradi luknje v membrani vsebina celice izteče. Tudi če celična membrana ne počí, vezava EGKG nanjo povzroči moteno delovanje funkcij, ki so odvisne od membrane. Te funkcije so: sporazumevanje med celicami, celični ciklus, metabolizem arahidonske kisline, transport snovi skozi membrano in delovanje mitohondrijev (Yen Sun in sod., 2009).

Epigalokatehin galat in druge protimikrobne snovi različno učinkujejo na grampozitivne in na gramnegativne bakterije. Razlog temu je različna struktura celične stene pri eni in pri drugi bakterijski skupini. Yoda in Zhao (2004) sta dokazala, da se na celično steno grampozitivnih bakterij veže 38,2 % epigalokatehin galata, medtem ko se na steno gramnegativnih bakterij veže samo 18,8 % EGKG. Ugotovila sta tudi, da je protimikrobna učinkovitost premo sorazmerna s količino vezanega EGKG.

#### 2.2.4 Protimikrobno delovanje galne kisline

Galna kislina je enostavna fenolna kislina z enim aromatskim obročem (Slika 5) (Chanwitheesuk in sod., 2007). Kemijsko je galna kislina derivat benzojske kisline (Alberto in sod., 2001). V velikih količinah se nahaja v rastlinskih semenih, grozdju in nekaterih zelenih algah. Gre za bioaktivno molekulo, saj so raziskave pokazale, da galna kislina deluje antioksidativno, protivnetno, antikancerogeno in protimikrobno. Za ekstrakcijo galne kisline iz rastlinskega materiala se uporablja etanol, saj v drugih topilih ni dobro topna (Chanwitheesuk in sod., 2007).

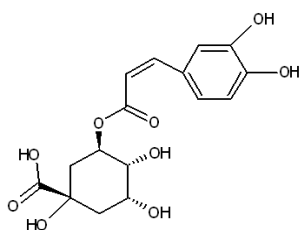


Slika 5: Kemijska struktura galne kisline (Madlener in sod., 2007)

Majhne količine galne kisline v vinu pospešijo rast laktobacilov in s tem pospešijo kvar vina. V večjih količina pa galna kislina na laktobacile deluje zaviralno. Laktobacili so sposobni metabolizirati majhne količine galne kisline, medtem, ko velike količine nanje delujejo toksično. Aktivacijski oz. zaviralni učinek galne kisline je odvisen od vrste bakterije in koncentracije galne kisline (Alberto in sod., 2001).

### 2.2.5 Protimikrobno delovanje klorogenske kisline

Klorogenska kislina je ester kavne s kina kislino, je dobro topna v vodnih raztopinah, v maščobi se ne topi, kar lahko ovira njeno protimikrobno delovanje v gojiščih z veliko maščobe (Slika 6) (Xiang in Ning, 2008). Naravno je prisotna v večini sadja, kot so jabolka in slive. V listih tobaka predstavlja glavno komponento. Deluje antioksidativno, anksiolitično, hipoglikemično, protivirusno, imunoprotektivno in hepatoprotektivno. Klorogenska kislina je v prosti obliki zelo nestabilna, še posebno, ko je izpostavljena zraku. Zato se kislino stabilizira tako, da jo vključijo v komplekse npr. s ciklodekstrini. Klorogenski kislini, ki je vključena v komplekse se poveča stabilnost, hkrati pa se njena protimikrobna aktivnost s tem ne zmanjša (Zhao in sod., 2010).



Slika 6: Kemijska struktura klorogenske kisline (Kang in sod., 2004)

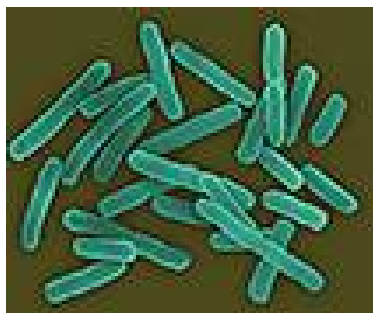
Klorogenska kislina se veliko uporablja v farmaciji za izboljšanje topnosti zdravil, v kozmetični industriji za stabilizacijo nestabilnih komponent, ter v živilski industriji za preprečevanje neprijetnega vonja (Zhao in sod., 2010).

Kislina v bakterijsko celico vstopi skozi pore v celični steni. V grampozitivne celice lahko vstopajo večje količine klorogenske kisline, saj celična stena ni obdana z zunanjo membrano, kot je pri gramnegativnih bakterijah. Kislina po vstopu v celice upočasni sintezo nukleinskih kislin, zmanjša zaščitno funkcijo celične membrane in vpliva na energijski metabolizem celice (Zhao in sod., 2010).

### 2.3 BAKTERIJE VRSTE *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je fakultativno anaerobna, gibljiva, gramnegativna palčka (Slika 7). Spada v družino Enterobacteriaceae. Od preostalih rodov te družine jo lahko najbolj zanesljivo ločimo s testom tvorbe indola, ki da značilno pozitivno reakcijo. Za določanje bakterij vrste *E. coli* lahko uporabimo še selektivno gojišče EMB (angl. Eosin Methylene Blue gojišče), na katerem imajo kolonije značilen kovinsko zeleni lesk (Nataro in Kaper, 1998). Bakterije se uporabljajo kot indikator fekalne kontaminacije vode in hrane (Gubina in Ihan, 2002).

Pri bakterijah vrste *E. coli* obstaja več različnih sevov oz. serotipov, ki jih ločimo s pomočjo O- (somatski), H- (flagelarni) in K-antigenov (kapsularni). Specifična kombinacija O- in H-antigenov določa posamezni serotip. Poznamo 170 različnih O antigenov (Nataro in Kaper, 1998). Bakterije vrste *E. coli* so indikatorski organizem fekalne kontaminacije v živilu (Gubina in Ihan, 2002).



Slika 7: Celice bakterij vrste *Escherichia coli* serotip O157:H7 (Kunkel D., 2009)

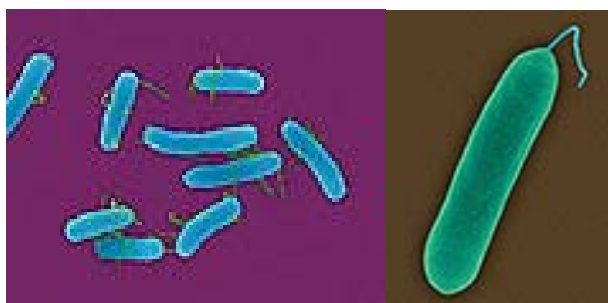
Bakterije vrste *E. coli* naseljujejo prebavni trakt človeka, kjer predstavljajo glavnino mikrobiološke flore. Večina sevov ni patogenih, vendar lahko postanejo patogeni takrat, ko človeku pade imunska odpornost. Poleg nepatogenih poznamo še patogene seve. Obstaja več vrst patogenih sevov (Nataro in Kaper, 1998):

- enteroinvazivna *E. coli* ali EIEC: mehanizem patogeneze še ni dobro poznan, domnevajo, da ti sevi izločajo enega ali več endotoksinov.
- enterohemoragična *E. coli* ali EHEC: proizvaja šiga toksin.
- enteroagregativna *E. coli* ali EAEC: proizvaja enterotoksin, ki poškoduje površino mikrovilov, bakterijske celice se v skupkih vežejo na črevesno steno in se obdajo z mukusom.
- enteropatogena *E. coli* ali EPEC: potem ko se bakterija veže na mikrovile, povzroči fiziološke spremembe le teh.
- enterotoksigena *E. coli* ali ETEC: proizvaja enterotoksine, ki so toplotno stabilni (ST) in toplotno labilni (LT).
- difuzno - adherentna *E. coli* ali DAEC: patogeneza še ni poznana.

Vsi patogeni sevi povzročajo drisko, le redki med njimi poleg driske tudi bruhanje. Najpomembnejša dejavnika patogenosti sta sposobnost bakterij, da izločajo endotoksine in dobra sposobnost pritrjevanja na črevesno steno. Ravno dobra sposobnost pritrjevanja omogoča kolonizacijo tankega črevesa, ki v normalnih razmerah nikoli ni poseljeno z mikroorganizmi (Nataro in Kaper, 1998). Viri okužbe z živali so najpogosteje voda in mleto goveje meso (Gubina in Ihan, 2002).

## 2.4 BAKTERIJE RODU *Salmonella*

*Salmonella* spp. so gramnegativne, gibljive, fakultativno anaerobne palčke (Slika 8). Spadajo v družino Enterobacteriaceae. Ne fermentirajo laktoze in saharoze, fermentirajo pa glukozo, izdelujejo H<sub>2</sub>S in razgrajujejo nitrate. Nimajo encima ureaze in ne izdelujejo indola (Gubina in Ihan, 2002).



Slika 8: Celice bakterij sevov *Salmonella* Typhimurium (levo) in *Salmonella* Enteritidis (desno) (Kunkel D., 2009)

Do danes poznamo več kot 2000 različnih serotipov, ki jih določamo na podlagi kombinacije O- (somatski) in H-antigenov (flagelarni). Glede na serotip razdelimo salmonele v skupine A, B, C1, C2, D in E. Različni sevi salmonel so prilagojeni na različne gostitelje. Tako sta seva *S. Typhi* in *S. Paratyphi* prilagojena samo na ljudi, sev *S. Dublin* pa samo na govedo. Salmonele povzročajo gastroenteritise, enterično vročino in zunaj-črevesna vnetja različnih organov. Najpogostejši patogeni sevi pri ljudeh so: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, in *S. Typhi* (Chiu in sod., 2004). Infektivna doza je pri 100 000 in več celic na gram živila, pri *S. Typhi* pa je celo nižja od 1000 celic na gram živila (Gubina in Ihan, 2002).

Najpomembnejši dejavniki patogeneze pri salmonelah so: sposobnost preživetja nizkega pH v želodcu, sposobnost preživetja visokega pH v dvanajstniku, sposobnost kolonizacije tankega črevesa in izločanje toksinov. Salmonele lahko pri otrocih, starejših in bolnikih s slabim imunskim sistemom, preidejo skozi črevesno steno v kri in nato po krvi potujejo v organe, kjer povzročijo vnetja (Mastroeni in Sheppard, 2004).

Najpogostejši viri okužbe s salmonelami so jajca, jajčni izdelki, svinjsko meso in izdelki iz svinjine (Chiu in sod., 2004).

## 2.5 BAKTERIJE VRSTE *Staphylococcus aureus*

Bakterije vrste *S. aureus* so grampozitivni koki, ki se povezujejo v značilne grozdaste skupke (Slika 9). So negibljivi, fakultativni anaerobi, imajo encim katalazo in koagulazo, ter ne sporulirajo. Bakterije so zelo odporne na sušenje, zamrzovanje do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in tajanje (Gubina in Ihan, 2002).

Bolniki in zdravi klicenosci so vir bakterij vrste *S. aureus*. Približno 20 do 30 % odraslih oseb je zdravih nosilcev teh bakterij, največkrat v nosni votlini. Pri večini nosilcev je prisotna le prehodno, nekaj tednov. Bakterija je patogena, ker ima dobro sposobnost pritrjevanja, proizvaja eksotoksine in termostabilne enterotoksine, ki jih ne moremo uničiti s kuhanjem. Nekateri sevi bakterij vrste *S. aureus* se lahko obdajo s posebno polisaharidno kapsulo, ki jih varuje pred fagocitozo, hkrati jim omogoča boljše pritrnitev na površine tkiv in vsadkov (Gubina in Ihan, 2002).



Slika 9: Celice bakterij vrste *Staphylococcus aureus* (Kunkel D., 2009)

Bakterije vrste *S. aureus* povzročajo lokalne okužbe kože in mehkih tkiv, bakterimijo, okužbo osrednjega živčnega sistema, okužbe zgornjih dihal, okužbe spodnjih dihal, okužbe lokomotornega aparata, okužbe sečil in okužbe, ki so posledica delovanja toksinov (Gubina in Ihan, 2002).

Stafilokokni enterotoksini zaužiti z okuženim živilom pri ljudeh povzročijo drisko, želodčne krče, slabost in bruhanje. Pri težjih oblikah zastrupitve nastopijo mišični krči, glavobol, sprememba krvnega tlaka in spremembe srčnega ritma. Infektivna doza, ki povzroči bolezen je 100 000 in več celic na gram živila (Gubina in Ihan, 2002).

Najpogostejši viri okužbe z živilom so meso in mesni izdelki, jajca in jajčni izdelki, kremne sladice, razne solate, sladoled, surovo mleko in mlečni izdelki. V večini primerov živila okužijo klicenosci, ki jih pripravljajo (Gubina in Ihan, 2002).

### 2.5.1 Proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* - MRSA



Posledica mutacij nekaterih genov pri bakterijah vrste *S. aureus* je pojav odpornosti stafilokokov proti meticilinu, oksacilinu, kloksacilinu in vsem drugim betalaktamskim antibiotikom. Taki bakterijski sevi, ki jih imenujemo MRSA, so velikokrat odporni tudi proti drugim proti-stafilokoknim antibiotikom, vključno z eritromicinom in gentamicinom. Za zdravljenje okužb z MRSA ostajata učinkovita samo glikopeptidna antibiotika vankomicin in teikoplanin (Gubina in Ihan, 2002).

MRSA se prenaša večinoma preko rok bolnikov, zdravstvenega osebja in svojcev. Redkeje se prenaša preko okuženih površin in predmetov. Leta 1995 se je pojavila prva okužba z MRSA preko živila. Najpogosteje se MRSA preko živil prenaša z mesom, surovim mlekom in sirom (Normanno in sod., 2007).

V prihodnosti je pričakovati širjenje odpornosti tudi proti vankomicinu, saj so leta 1996 na Japonskem že odkrili prvi sev MRSA z zmanjšano občutljivostjo na vankomicin. Odkrivanje, zdravljenje in preprečevanje širjenja okužb z MRSA je danes eden ključnih problemov na področju infekcijskih bolezni in mikrobiologije (Gubina in Ihan, 2002).

## 2.6 *IN VITRO* METODE ZA DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Metode za določanje protimikrobne aktivnosti so lahko difuzijske, razredčevalne in bioavtografske. Izbira najustreznejše metode za določanje protimikrobne aktivnosti je odvisna od enostavnosti metode, fleksibilnosti, možnosti avtomatizacije in od namena preiskave (Woods in Washington, 1999). Do sedaj nobena od metod ni bila standardizirana za eterična olja in rastlinske ekstrakte, čeprav bi bilo to potrebno, saj je primerjava rezultatov dobljenih z različnimi metodami zelo težka. Poleg različnih metod, pa obstajajo tudi različni načini vrednotenja protimikrobnega delovanja in tudi različne definicije za minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC), kar dodatno onemogoča oziroma otežuje primerjanje različnih raziskav.

Nekatere definicije MIC ekstrakta ali eteričnega olja (Burt, 2004):

- MIC je najnižja koncentracija, pri kateri se ohrani ali pa zmanjša število živih celic
- MIC je najnižja koncentracija, pri kateri se ohrani enako število živih celic vsaj 48 ur
- MIC je najnižja koncentracija, pri kateri se zavre vizualna rast testnega organizma
- MIC je najnižja koncentracija, pri kateri se zelo zmanjša število živih celic (za več kot 90 %).

Preglednica 4 prikazuje metode za določanje protimikrobne učinkovitosti različnih spojin.

Preglednica 4: Metode za določanje protimikrobnega delovanja snovi (Burt, 2004)

Metoda	Namen metode
--------	--------------

Metoda difuzije v trdem gojišču z diski	Presejalni testi protimikrobne aktivnosti
Metoda difuzije v trdem gojišču z luknjicami	
Metoda razredčevanja v tekočem gojišču	Določanje protimikrobne aktivnosti
Metoda razredčevanja v trdem gojišču	
Elektronska mikroskopija	Opazovanje fizičnih učinkov protimikrobne snovi
Krivulja preživetja/odmiranja	Določanje kinetike protimikrobne aktivnosti

Do leta 1990 so pri vseh metodah, s katerimi so določali protimikrobno učinkovitost, uporabljali različna tekoča in trdna gojišča. Nato so pričeli testirati protimikrobno učinkovitost spojin tudi na živilih in razredčenih živilih. Raziskave so pokazale, da je potrebno v živilih uporabiti večje količine npr. eteričnih olj, da dosežemo enak protimikrobni učinek, kot je v tekočem ali trdnem gojišču. V pol-posnetem mleku je za enak učinek eteričnih olj potrebna 2-krat večja koncentracija, kot je v tekočem gojišču. V svinjski jetrni pašteti je potrebna 10-krat večja koncentracija eteričnega olja, kot v tekočem gojišču za enak zaviralni učinek. V juhi so koncentracije 50-krat višje, v mehkem siru pa 25- do 100-krat višje. Med bakterijami so izjema le bakterije vrste *Aeromonas hydrophila*, pri katerih niso določili razlik v koncentracijah eteričnih olj uporabljenih v živilu in tekočem gojišču za enak protimikrobni učinek (Burt, 2004).

Natančni mehanizmi, ki vplivajo na slabšo učinkovitost ekstraktov v živilih, še niso poznani. Raziskovalci na podlagi poizkusov domnevajo, da na slabši protimikrobni učinek v živilih vpliva večja dostopnost hranil, ki jih v laboratorijskih gojiščih ni. Več hranil bakterijskim celicam omogoči hitrejše sprotno popraviljanje poškodb, ki nastanejo zaradi delovanja protimikrobnih snovi. Splošno je znano, da velika količina maščob in/ali beljakovin v živilu ščiti bakterije pred delovanjem eteričnih olj. Npr.: če eterično olje raztopimo v maščobni fazi živila, bo njegovo protimikrobno delovanje na bakterije, ki so v vodni fazi živila, slabše (Burt, 2004).

Za razliko od maščob in beljakovin pa ogljikovi hidrati v manjši meri ščitijo bakterije pred delovanjem eteričnih olj. Poleg hranil, je lahko tudi sama fizična struktura živila omejujoč dejavnik za delovanje protimikrobnih snovi (Burt, 2004).

### 2.6.1 Razredčevalne metode

Razredčevalne metode se uporabljajo za določanje MIC protimikrobnih snovi. Razredčevalne metode delimo glede na vrsto gojišča na metode v trdem gojišču in metode v tekočem gojišču. Protimikrobne snovi so vedno testirane vsaj v dveh paralelnih preizkusih. V preizkusih se lahko spreminjajo koncentracije testirane snovi, začetno število bakterijskih celic, vrste testiranih protimikrobnih snovi in vrste bakterij (Woods in Washington, 1999).

#### 2.6.1.1 Metoda razredčevanja v trdem gojišču

Gojišče, ki se uporablja za to metodo je gojišče Mueller-Hinton (MHA). Med pripravo gojišča vanj vmešamo protimikrobno snov, ki jo želimo testirati. Predhodno pripravljeno bakterijsko kulturo v tekočem gojišču BHI (angl. Brain Heart Infusion) razredčimo do koncentracije  $10^7$  CFU/ml. V roku 30 minut iz te koncentracije odvzamemo med 0,001 do 0,002 ml raztopine in jo prenesemo na gojišče MHA. Na gojišču tako dobimo končno koncentracijo celic  $10^4$  CFU/ml. Na eno petrijevo ploščico gojišča MHA lahko hkrati prenesemo več različnih bakterijskih vrst. Gojišča inkubiramo 24 ur pri 35 °C. Po končani inkubaciji preštujemo kolonije, ki so zrasle na gojišču. Kot MIC upoštevamo tisto koncentracijo protimikrobne snovi, ki opazno zmanjša (za 80 do 90 %) število zraslih kolonij na gojišču v primerjavi z gojiščem, ki mu nismo dodali protimikrobne snovi (Woods in Washington, 1999).

Prednost metode je ta, da je dobro standardizirana za antibiotike, je zanesljiva in se lahko uporablja kot referenčna metoda za določanje natančnosti drugih metod. Pri tej metodi razredčevanja v trdem gojišču je lažje odkriti kontaminirane vzorce, kot pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču. Slabost metode pa je, da ni standardizirana za eterična olja in rastlinske ekstrakte in še, da je za pripravo potrebno veliko časa in dela, zlasti kadar se testira več protimikrobnih snovi hkrati (Woods in Washington, 1999).

#### 2.6.1.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču obstajata dva glavna postopka in sicer metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici in metoda razredčevanja v tekočem gojišču. Največja razlika pri obeh postopkih je v volumnu vzorcev. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču uporabljamo epruvete in delovne volumne do 10 ml. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici uporabljamo posebne mikrotiterske ploščice in delovne volumne do 100  $\mu$ l (Woods in Washington, 1999).

Gojišče, ki se največ uporablja pri metodi razredčevanja, ne glede na postopek, je MHB (angl. Mueller-Hinton broth). V to gojišče dodamo protimikrobno snov in predhodno pripravljen testni mikroorganizem. Testirane bakterije predhodno namnožimo v gojišču BHI in nato razredčimo do zelenega števila, ki je navadno okoli  $10^5$  CFU/ml. Volumen z zelenim številom bakterij prenesemo v gojišče MHB, dodamo protimikrobno snov določene koncentracije in inkubiramo 24 h pri 35°C. Po inkubaciji se rezultati lahko odčitajo vizualno, turbidimetrično ali pa z določitvijo števila preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču (Woods in Washington, 1999).

Prednost metode razredčevanja v tekočem gojišču je v tem, da je dobro standardizirana za antibiotike in da je uporabna za raziskovalne namene. Slabost metode pa, da ni standardizirana

za eterična olja in rastlinske ekstrakte ter, da zaradi velike količine pripravljalnega dela ni primerna za rutinske preiskave (Woods in Washington, 1999).

Prednost metode razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici je, da zagotavlja zanesljive rezultate, da je dobro standardizirana za antibiotike, da se porabi manj materiala in da se hkrati lahko testira velike količine vzorcev. Slabost pa, da ni standardizirana za eterična olja in ekstrakte, ter, da metoda ni tako fleksibilna, kot je npr. metoda difuzije v trdem gojišču z diski (Woods in Washington, 1999).

### **2.6.2 Metoda difuzije v trdem gojišču z diski**

Pri tej metodi z dobljenimi rezultati bakterije razvrščamo kot občutljive, odporne ali pa srednje občutljive na Protimikrobne snovi. Princip metode je, da na gojišče nacepimo testirano bakterijsko kulturo, nato pa na gojišče položimo sterilne papirnate filter papirčke - diske, ki so prepojeni s testirano protimikrobno snovjo. Snov iz diskov zaradi koncentracijskega gradienta prodre v gojišče, vendar koncentracija snovi z oddaljenostjo od diska sorazmerno pada. Potem, ko diske položimo na gojišče, počakamo 15 minut in gojišča nato inkubiramo 24 ur pri 35 °C. Bakterijska kultura zaradi zaviralnega vpliva protimikrobne snovi ne zraste v coni okoli diskov. Z merjenjem velikosti cone okoli diskov lahko ugotovimo koliko je testirana bakterija občutljiva na zaviralno snov (Woods in Washington, 1999).

Pri tej metodi se najpogosteje uporablja gojišče MHA in standardizirani diski. Idealne koncentracije protimikrobne snovi, ki jih nanese na diske, so tiste, pri katerih je inhibicijska cona vsaj 10 mm pri odpornih bakterijah in največ 30 mm pri občutljivih bakterijah (Woods in Washington, 1999).

V primeru, da okoli diskov nastane jasno vidno inhibicijsko območje, vendar pa se znotraj njega pojavi kakšna posamezna rastoča kolonija, moramo to kolonijo še enkrat testirati in identificirati (Woods in Washington, 1999).

Prednosti metode so, da je enostavna, dobro ponovljiva, cenovno ugodna, za izvajanje ne potrebujemo dodatne opreme, rezultati se enostavno interpretirajo in je primerna za testiranje veliko vrst protimikrobnih snovi. Slabosti metode so, da je standardizirana samo za mikroorganizme, ki so na seznamu NCCLS in da z njo ne dobimo natančnih rezultatov (Woods in Washington, 1999).

## **3 MATERIAL IN METODE**

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Mikroorganizmi

V preglednici 5 so navedene bakterijske kulture, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu.

Preglednica 5: Delovne kulture bakterij

Oznaka seva	Vir seva
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ345	NCTC 10656
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ346	Humani sev, MRSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ348	Humani sev, MRSA
<i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351	Jajčni melanž
<i>Salmonella</i> Typhimurium ŽM352	Površina puranjega mesa
<i>Escherichia coli</i> ŽM370	ATTC 11229

#### 3.1.2 Mikrobiološka gojišča

##### 3.1.2.1 Gojišče TSA (triptično soja gojišče)

Sestavine:

- 20 g gojišča TSA (triptično soja gojišče, Oxoid, CM0131, Anglija)
- 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija)
- 1,25 g dikalijev hidrogenfosfat  $K_2HPO_4$  (Kemika, 1116108, Hrvaška)
- 1,25 g D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška)

Priprava:

Zgoraj navedene sestavine smo natehtali v 1000 ml steklenico in raztopili v 500 ml destilirane vode. Nato smo gojišče 20 min sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C in ga aseptično razlili v petrijevke ali pa ga shranili pri 45 °C do uporabe. Ohlajene petrijevke z gojiščem smo shranili v hladilniku.

##### 3.1.2.2 Tekoče gojišče TSB (triptični soja bujon)

Sestavine:

- 15 g TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid, CM0129, Anglija)

Priprava:

V 500 ml steklenico smo natehtali 15 g gojišča TSB in ga raztopili v 500 ml destilirane vode. Dobro raztopljeno gojišče smo pred sterilizacijo odpipetirali po 9 ml v epruvete in nato sterilizirali 20 min na 121 °C. Ohlajene epruvete smo shranili v hladilniku do uporabe.

##### 3.1.2.3 Tekoče gojišče BHI (angl. Brain Heart Infusion)

Sestavine:

- 18,5 g BHI (Brain Heart Infusion, Merck, VM859493734, Nemčija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo raztopili 18,5 g gojišča in dobro premešali. Da se je medij čim boljše raztopil, smo ga v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, napolnili po 4 ml medija v epruvete in sterilizirali 20 min na 121 °C. Po sterilizaciji smo ohlajene epruvete shranili v hladilniku do uporabe.

#### 3.1.2.4 Selektivno gojišče BP (angl. Baird-Parker base)

Sestavine:

- 29 g BP (Baird-Parker base, Biolife, 4011162, Italija)
- jajčni dodatek, egg yolk tellurite emulsion, 50 % (Biolife, 4011162, Italija)

Priprava:

V 475 ml destilirane vode smo raztopili 29 g gojišča, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 15 min pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in nato dodali 25 ml jajčnega dodatka. Tako pripravljeno gojišče smo aseptično razlili v petrijevke, kjer se je gojišče strdilo. Petrijevke smo nato shranili v hladilniku.

#### 3.1.2.5 Selektivno gojišče XLD (angl. Xylose Lysine Desoxycholate)

Sestavine:

- 28 g gojišča XLD (Xylose Lysine Desoxycholate, Biolife, 4022062, Italija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo raztopili 28 g gojišča XLD, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 15 min pri 100 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v petrijevke, kjer se je gojišče ohladilo in strdilo. Ohlajene petrijevke smo shranili v hladilniku.

#### 3.1.2.6 Selektivno gojišče EMB (angl. Eosin Methylene Blue)

Sestavine:

- 21,25 g gojišča EMB (Eosin Methylene Blue, Biolife, 40145012, Italija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo raztopili 21,25 g gojišča, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 15 min pri 100 °C. Po sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v petrijevke, kjer se je gojišče ohladilo in strdilo. Ohlajene petrijevke smo shranili v hladilniku.

### 3.1.2.7 Fiziološka raztopina

Sestavine:

- osnovna raztopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,034 g/ml (Kemika, 11161, Hrvaška)

Priprava:

V 1000 ml bučko smo nalili 1,25 ml fiziološke raztopine s koncentracijo 0,034 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / ml destilirane vode in dopolnili bučko z destilirano vodo do oznake. Nato smo dobro premešali in vsebino prelili v pipetor. Z njegovo pomočjo smo napolnili epruvete z 9 ml fiziološke raztopine in jih sterilizirali 20 min na 121 °C. Po sterilizaciji smo ohlajene epruvete shranili v hladilniku.

### 3.1.3 Živilo - mešano razdeto meso

Mešano razdeto meso (svinjsko meso : goveje meso = 1:1) smo uporabili v eksperimentih, v katerih smo preverjali ali živilo vpliva na učinkovitost protimikrobne snovi. Kupili smo sveže mešano razdeto meso in ga takoj zamrznili, da smo preprečili nadaljnje spremembe v sestavi že prisotne naravne mikroflore.

Sestavine:

- mešano razdeto meso (svinjsko meso : goveje meso = 1:1) (Mercator, Slovenija)

Priprava:

V čiste 100 ml stekleničke smo natehtali 40 g še zamrznjenega mešanega razdetega mesa. Meso v stekleničkah smo nato 20 min sterilizirali pri 105 °C. Po sterilizaciji smo meso ohladili in shranili v hladilnik.

### 3.1.4 Snovi s protimikrobnim delovanjem

- galna kislina (Sigma, G7384-100G, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, C5913-5G, Nemčija)
- epigalokatehin galat (Sigma, E4143-50MG, Nemčija)
- Vivox 40 (Vitiva d.o.o., Slovenija)
- Vivox 70 (Vitiva d.o.o., Slovenija)
- ekstrakt žajblja (Vitiva d.o.o., Slovenija)

### 3.1.4 Druge kemikalije in dodatki

- TTC (10 mg/ml) (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid) (Biolife, T8877-50G, Italija)
- absolutni etanol (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)

### 3.1.5 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo potrebovali sledeče aparate:

- Avtoklav (tip 500x700, Sutjeska, Jugoslavija)
- Avtoklav (tip 1-61-137, Sutjeska, Jugoslavija)
- Omara za sušenje steklovine (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- Mikrovalovna pečica (Sanyo, Japonska)
- Hladilnik (LAE, Slovenija)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Zamrzovalnik (LTH, Slovenija)
- Digitalna tehtnica (PB1502-S, Mettler-Toledo, Švica)
- Inkubator (I-115C, Kambič, Slovenija)
- Inkubator (SP190, Kambič, Slovenija)
- Zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra, Slovenija)
- Vrtinčnik (Yellowline, TTS2, Slovenija)
- Gnetilnik (Stomacher tip 400 Pbi international, Seward, Anglija)
- Plinski gorilnik
- Stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija)

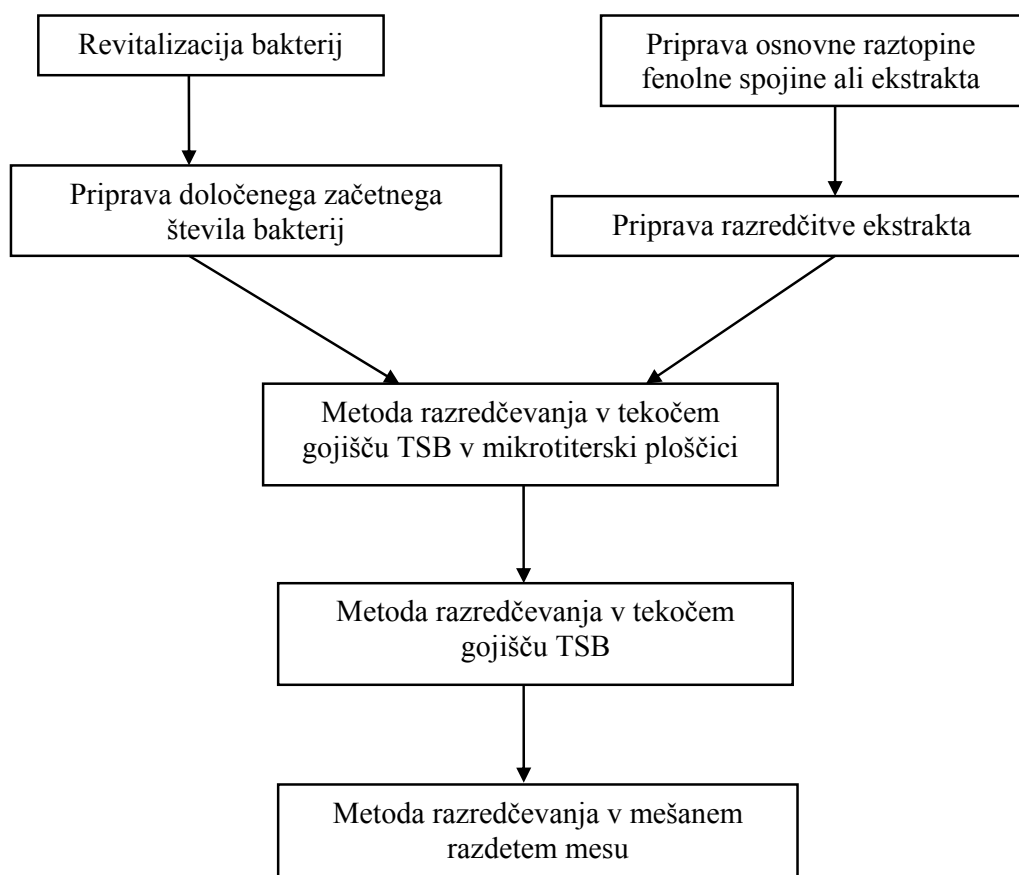
Drobna oprema:

- Cepilne zanke
- Avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija)
- Nastavki za pipete 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l in 1000  $\mu$ l (Eppendorf, Nemčija; Plastibrand, Nemčija)
- Petrijeve plošče (Labor tehnika Golias, Slovenija)
- Steklene epruvete
- Stojala za smeti
- 1,5 in 2,0 ml epruvete (Eppendorf, Nemčija)
- Laboratorijske steklenice (Duran)
- Plastični lončki (Labor tehnika Golias Slovenija)
- Pipetor (Eppendorf easypet, Nemčija)
- Mikrodilucijske ploščice
- Parafilm »M« (PM 992 American National Can)
- Ostala steklovina
- Vrečke za gnetilnik s filtrom (Bag Page, Francija)
- Merilnik časa (Eppendorf, Nemčija)



### 3.2 METODE DE LA

Protimikrobno aktivnost fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici, z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB in z metodo razredčevanja v mešanem razdetem mesu. Na sliki 10 je shema celotnega eksperimentalnega dela.



Slika 10: Shema eksperimentalnega dela

### 3.2.1 Priprava osnovnih raztopin ekstraktov in enostavnih fenolnih spojin za določitev njihovega protimikrobnega učinka

Protimikroben učinek ekstraktov in enostavnih fenolnih spojin v gojišču TSB smo določali z dvema metodama in zato smo njihove osnovne raztopine pripravili na dva načina:

a) Za metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo osnovno raztopino ekstrakta pripravili tako, da smo v epruveto natehtali 0,05 g ekstrakta oz. fenolne spojine in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola (50 mg/ml). Za boljše raztapljanje smo si pomagali z mešanjem na vrtinčniku.

Iz osnovne raztopine smo nato pripravili razredčitve tako, da smo 1 ml osnovne raztopine dodali 1 ml absolutnega etanola in premešali na vrtinčniku. Tako smo dobili raztopino s koncentracijo 25 mg/ml. Po tem postopku smo razredčevali z etanolom do najnižje zelene koncentracije. Preizkušene koncentracije protimikrobnih snovi so bile v območju od 0,0195 mg/ml do 1,25 mg/ml.

b) Za metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici smo osnovno raztopino ekstrakta pripravili tako, da smo v epruveto natehtali 0,005 g ekstrakta in ga raztopili v 0,5 ml absolutnega etanola ter 1,5 ml gojišča TSB in tako dobili koncentracijo 2,5 mg/ml. Da bi se ekstrakt hitreje raztopil, smo vsebino mešali na vrtinčniku.

Iz osnovne raztopine smo pripravili razredčitve v mikrotiterski ploščici tako, da smo v prvo vrstico ploščice odpipetirali po 100  $\mu$ l osnovne raztopine protimikrobne snovi. V spodnje vrstice pa smo odpipetirali po 50  $\mu$ l gojišča TSB. Nato smo iz prve vrstice odvezli 50  $\mu$ l osnovne raztopine, jo dodali v drugo vrstico ter vsebino premešali. Nato smo iz druge vrstice prenesli 50  $\mu$ l raztopine v tretjo vrstico ter premešali. Ta postopek smo ponavljali, dokler nismo prišli do zadnje vrstice, kjer smo po mešanju vsebine odvečnih 50  $\mu$ l vsebine zavrgli. Preizkušene koncentracije posamezne protimikrobne snovi so bile v območju od 0,0195 mg/ml TSB do 1,25 mg/ml TSB.

### 3.2.2 Revitalizacija bakterij

Ker se sevi bakterij hranijo v krio-epruvetah v zamrzovalniku, je potrebna revitalizacija le-teh. Revitalizacija je potekala tako, da smo vsebino krio-epruvete odtajali na sobni temperaturi. Nato smo vsebino prelili v 4 ml gojišča BHI in inkubirali 24 h na stresalniku pri 37 °C in 100 obr./min. Nato smo s cepilno zanko kulturo precepili na gojišče TSA in na ustrezno selektivno gojišče ter gojišča inkubirali 24 h pri 37 °C. Če je na selektivnem gojišču zrasla čista kultura, smo jo shranili v hladilniku. Drugače pa smo precepili izolirano čisto kolonijo na sveže selektivno gojišče tolikokrat, dokler ni zrasla čista kultura na celem gojišču. Selektivna gojišča, ki smo jih uporabljali so bila gojišče BP za bakterije vrste *Staphylococcus aureus*, gojišče EMB za bakterije vrste *Escherichia coli* in gojišče XLD za seve *Salmonella* Enteritidis in *Salmonella* Typhimurium.

### 3.2.3 Priprava inokuluma

Iz selektivnega gojišča, ki je bilo shranjeno v hladilniku, smo s cepilno zanko prenesli po eno kolonijo bakterij v 4 ml gojišča BHI, premešali na mešalniku, ter inkubirali 24 h na stresalniku (100 obrat./min) pri 37 °C. Tako smo pripravili čiste kulture bakterij v gojišču BHI. Na podlagi izkušenj smo domnevali, da po 24 h v gojišču zraste do približno  $10^8$  CFU/ml bakterij.

Za določanje točnega števila bakterij v inokulumu smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. S to metodo smo določili število za delitev sposobnih celic na trdnem gojišču TSA (SIST EN ISO 4833, 2003).

Pri metodi štetja kolonij na trdnem gojišču smo aseptično odpipetirali 1 ml inokuluma in ga prenesli v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalu. Na ta način smo dobili prvo razredčitev  $10^{-1}$ . Postopek smo ponavljali do razredčitve  $10^{-6}$  ali  $10^{-7}$ . Po homogenizaciji smo iz posamezne razredčitve aseptično odpipetirali po 0,1 ml na gojišče TSA. Potem smo inokulum s sterilno stekleno palčko razmazali po celem gojišču. Nato smo petrijevke inkubirali 24 h pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo celic v inokulumu. Šteli smo samo tiste petrijevke, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij. Koncentracijo celic v inokulumu smo izračunali po enačbi 1.

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

Legenda:

$\sum C$ ...vsota vseh kolonij na vseh števnihih ploščah

$n_1$ ...število gojišč prve upoštevane razredčitve

$n_2$ ...število gojišč druge upoštevane razredčitve

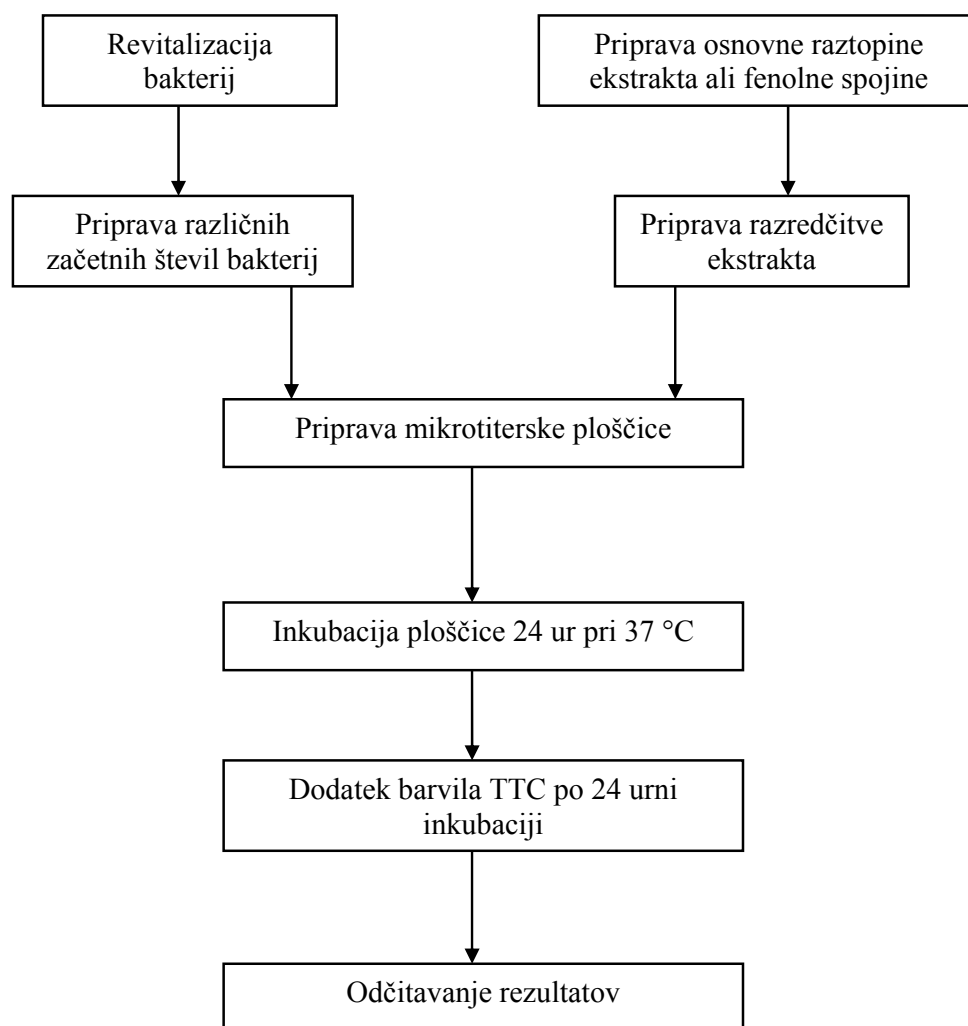
R...faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi

N...koncentracija bakterij (CFU/ml)

Iz 24-h bakterijske kulture v gojišču BHI smo odpipetirali 0,15 ml kulture v 10 ml gojišča TSB in vsebino premešali. Na ta način smo dobili inokulum s predvideno koncentracijo  $10^7$  CFU/ml gojišča. Hkrati smo odpipetirali 0,5 ml 24-urne kulture v 4,5 ml gojišča TSB in premešali. Iz dobljene razredčitve smo zopet odpipetirali 0,5 ml v 4,5 ml gojišča TSB in premešali. Postopek smo ponovili še dvakrat. Iz zadnje razredčitve smo nato odvzeli 0,15 ml kulture in jo prenesli v 10 ml TSB. Na ta način smo pripravili inokulum s predvideno koncentracijo  $10^3$  CFU/ml. Točno koncentracijo bakterij v vsakem inokulumu smo določili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču.

### 3.2.4 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici

Na sliki 11 je shema eksperimentalnega dela metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici.



Slika 11: Delovna shema metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici

#### 3.2.4.1 Uporabljeni material

- Gojišče TSA
- Gojišče TSB
- Gojišče BHI
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- 24-urne bakterijske kulture
- Osnovne raztopine fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov
- TTC

#### 3.2.4.2 Izvedba metode

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici smo določali protimikrobno aktivnost enostavnih fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov. Iskali smo najnižjo koncentracijo, pri kateri imajo enostavne fenolne spojine in ekstrakti še zaviralni učinek na razmnoževanje bakterij vrst *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*.

Za izvedbo metode smo pripravili osnovno raztopino protimikrobne snovi, bakterijsko kulturo z večjim in z manjšim številom celic ter pozitivne in negativne kontrole. Osnovno raztopino protimikrobne snovi smo pripravili v koncentraciji 2,5 mg/ml in jo nato v mikrotiterski ploščici razredčili do koncentracije 0,0195 mg/ml TSB.

V preglednici 6 je primer priprave mikrotiterske ploščice za določitev protimikrobnega učinka EGKG na bakterije vrst *E. coli* ŽM370, *S. Enteritidis* ŽM351 in *S. Typhimurium* ŽM352.

Preglednica 6: Shema mikrotiterske ploščice za določitev protimikrobnega učinka EGKG na bakterije vrst *E. coli* ŽM370, *S. Enteritidis* ŽM351 in *S. Typhimurium* ŽM352

	<i>E.coli</i> ŽM370				<i>S. Enteritidis</i> ŽM351				<i>S. Typhimurium</i> ŽM352			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,25 NI	1,25 NI	1,25 VI	1,25 VI	1,25 NI	1,25 NI	1,25 VI	1,25 VI	1,25 NI	1,25 NI	1,25 VI	1,25 VI
B	0,625 NI	0,625 NI	0,625 VI	0,625 VI	0,625 NI	0,625 NI	0,625 VI	0,625 VI	0,625 NI	0,625 NI	0,625 VI	0,625 VI
C	0,3125 NI	0,3125 NI	0,3125 VI	0,3125 VI	0,3125 NI	0,3125 NI	0,3125 VI	0,3125 VI	0,3125 NI	0,3125 NI	0,3125 VI	0,3125 VI
D	0,1563 NI	0,1563 NI	0,1563 VI	0,1563 VI	0,1563 NI	0,1563 NI	0,1563 VI	0,1563 VI	0,1563 NI	0,1563 NI	0,1563 VI	0,1563 VI
E	0,07813 NI	0,07813 NI	0,07813 VI	0,07813 VI	0,07813 NI	0,07813 NI	0,07813 VI	0,07813 VI	0,07813 NI	0,07813 NI	0,07813 VI	0,07813 VI
F	0,03906 NI	0,03906 NI	0,03906 VI	0,03906 VI	0,03906 NI	0,03906 NI	0,03906 VI	0,03906 VI	0,03906 NI	0,03906 NI	0,03906 VI	0,03906 VI
G	0,01953 NI	0,01953 NI	0,01953 VI	0,01953 VI	0,01953 NI	0,01953 NI	0,01953 VI	0,01953 VI	0,01953 NI	0,01953 NI	0,01953 VI	0,01953 VI
H	1,25 TSB	NI TSB	1,25 TSB	VI TSB	1,25 TSB	NI TSB	1,25 TSB	VI TSB	1,25 TSB	NI TSB	1,25 TSB	VI TSB

Legenda:

NI...nižji inokulum; VI...višji inokulum

vrstica A... EGKG: 1,25 mg/ml TSB; vrstica B... EGKG: 0,625 mg/ml TSB; vrstica C... EGKG: 0,3125 mg/ml TSB; vrstica D...EGKG: 0,1562 mg/ml TSB; vrstica E...EGKG: 0,07813 mg/ml TSB;

vrstica F ... EGKG: 0,03906 mg/ml TSB; vrstica G... EGKG: 0,01953 mg/ml TSB; vrstica H...pozitivna in negativna kontrola; stolpci 1-4... *E. coli* ŽM370; stolpci 5-8... *S. Enteritidis* ŽM351; stolpci 9-12... *S. Typhimurium* ŽM352; TSB...čisto gojišče TSB

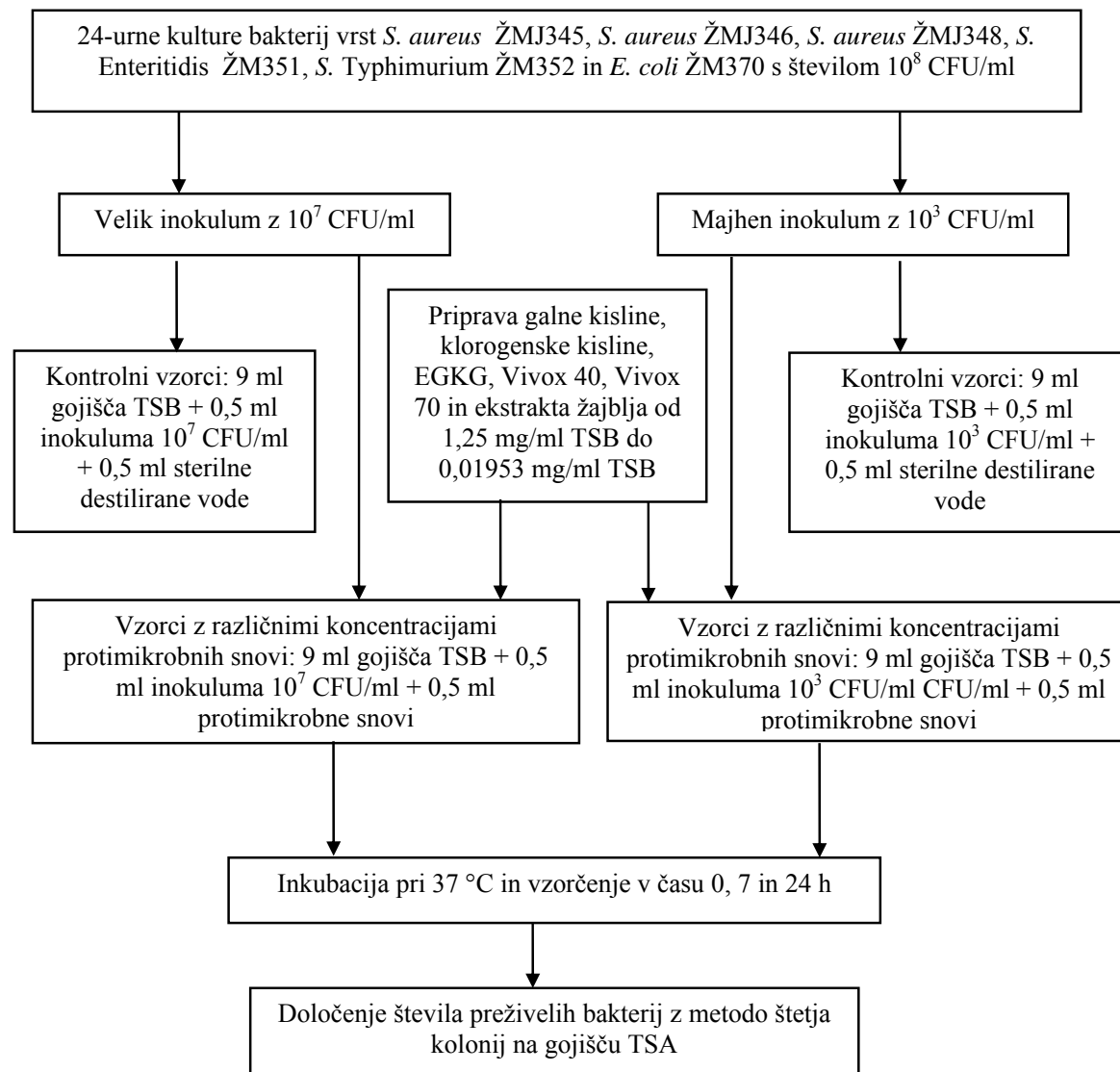
V prva dva stolpca mikrotiterske ploščice smo dodali po 50 µl inokuluma s predvideno koncentracijo  $10^3$  CFU/ml in v druga dva stolpca 50 µl inokuluma s predvideno koncentracijo  $10^7$  CFU/ml. Ker smo vsak ekstrakt oz. fenolno spojino testirali v paralelkah in ker smo hkrati testirali po dva različna inokuluma, smo na eni mikrotiterski ploščici lahko testirali največ tri bakterijske seve.

V zadnji vrstici H smo pripravili pozitivno in negativno kontrolo. Pozitivna kontrola je vsebovala 50 µl gojišča TSB in 50 µl kulture. Negativna kontrola je vsebovala 50 µl gojišča TSB in 50 µl protimikrobne snovi.

Potem, ko smo v ploščico dodali kulturo in naredili kontrolne vzorce, smo ploščico inkubirali 24 h pri 37 °C. Nato smo v vse vdolbinice v ploščici dodali 2 µl raztopine barvila TTC s koncentracijo 10 mg/ml. TTC je indikator biološke aktivnosti. Ploščico smo zavili v alufolijo, ker je TTC občutljiv na svetlobo, in počakali 30 min. V tem času se je razvila rožnata barva v tistih prostorčkih, kjer so bile bakterije biološko aktivne. Za MIC smo določili tisto koncentracijo protimikrobne snovi, pri katerih ni bilo biološke aktivnosti, ki bi se kazala kot rožnato obarvanje (Klančnik in sod., 2009).

### 3.2.5 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB

Na sliki 12 je prikazan potek metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB.



Slika 12: Shema določanja protimikrobnega učinka enostavnih fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov na različne bakterije z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB

### 3.2.5.1 Uporabljeni material

- Gojišče TSA
- Gojišče TSB
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Sterilna destilirana voda
- Fenolne spojine in rastlinski ekstrakti
- Čiste bakterijske kulture

### 3.2.5.2 Izvedba metode

V prvi fazi eksperimenta smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici, ker smo tako lahko naenkrat testirali več različnih ekstraktov in njihovih koncentracij. Slabost metode pa je, da z njo ne moremo natančno določiti MIC. Zato smo v drugi fazi eksperimenta uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB, pri kateri smo določali rastne krivulje bakterij. Iz teh krivulj smo lahko natančneje določili MIC.

Uporabili smo osnovne raztopine protimikrobnih snovi s koncentracijo 50 mg/ml (3.2.1). Nato smo iz osnovnih raztopin pripravili zelene razredčitve tako, da smo odvzeli 1 ml osnovne raztopine in ji dodali 1 ml absolutnega etanola. Postopek smo ponavljali, dokler nismo dobili zelene koncentracije. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo testirali tiste koncentracije protimikrobnih snovi, ki so bile določene kot vrednosti MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici ter po eno višjo in eno nižjo koncentracijo protimikrobne snovi.

Iz 24-urne bakterijske kulture smo pripravili dva inokuluma,  $10^7$  CFU/ml in  $10^3$  CFU/ml, po enakem postopku kot pri metodi razredčevanja v mikrotiterski ploščici (3.2.4.2).

Za določitev rastnih krivulj smo v epruvete z 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml pripravljene čiste kulture in 0,5 ml pripravljene fenolne spojine oz. ekstrakta, ter premešali. Poleg vzorcev smo pripravili kontrole tako, da smo v 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml kulture in 0,5 ml sterilne destilirane vode. Ker smo želeli dobiti podatke o hitrosti rasti bakterij, smo vzorčili v času 0, 7 in 24 ur ter določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA.

Iz dobljenih rezultatov smo narisali rastne krivulje za vse bakterije, za različne koncentracije inokulumov in pri različnih koncentracijah protimikrobnih snovi.



### 3.2.6 Spremljanje rasti bakterij v razdetem mesu z dodanimi protimikrobnimi snovmi

#### 3.2.6.1 Uporabljeni material

- mešano razdeto meso
- gojišče TSB
- selektivno gojišče BP
- selektivno gojišče EMB
- selektivno gojišče XLD
- fiziološka raztopina
- absolutni etanol
- sterilna destilirana voda
- fenolne spojine in rastlinski ekstrakti
- 24-urne bakterijske kulture

#### 3.2.6.2 Izvedba metode

V 100-ml stekleničke smo zatehtali 40 g mešanega razdetega mesa. Meso v stekleničkah smo nato 20 min sterilizirali pri 105 °C, ker je v njem že naravno prisotna mikroflora, ki bi lahko motila eksperiment. V 100-ml stekleničke smo nalili tudi po 90 ml FR in jo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

V 4 ml BHI smo pripravili 24-urno čisto bakterijsko kulturo in jo razredčili do  $10^5$  CFU/ml. V eksperimentu smo uporabili inokulum  $10^5$  CFU/ml, ker pri višjem inokulumu najvišje koncentracije ekstraktov in fenolnih spojin niso učinkovite. 40 g sterilnega razdetega mesa smo prenesli v vrečko za homogenizacijo in mu dodali 1 ml inokuluma s  $10^5$  CFU/ml (kar je pomenilo da smo v razdetem mesu imeli  $2,5 \times 10^3$  CFU/g) in 1,29 ml raztopine ekstrakta s koncentracijo 40 mg/ml, kar je pomenilo da smo imeli 1,29 mg protimikrobne snovi / g razdetega mesa. Vzorec smo nato 4 min homogenizirali v gnetilniku pri normalni hitrosti. Hkrati z vzorcem smo pripravili še kontrolo tako, da smo 40 g sterilnega mletega mesa dodali 1 ml kulture s  $10^5$  CFU/ml in 1,29 ml sterilne destilirane vode. Takoj po pripravi vzorca (to je bil čas 0) smo določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

Ker smo želeli s pomočjo dobljenih podatkov narisati rastne krivulje, smo vzorčili meso v času 0 ter po 5 in 24 urah. Pred vzorčenjem smo razdeto meso 2 min homogenizirali v gnetilniku pri normalni hitrosti. Po homogenizaciji smo od 40 g razdetega mesa prenesli 10 g v drugo vrečko s filtrom ter prilili 90 ml sterilne FR. Vzorec smo homogenizirali 2 min v gnetilniku, pri normalni hitrosti in nato smo preko filtra iz vrečke odvzeli 1 ml vzorca ter ga prenesli v 9 ml FR. Nato smo število bakterij določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Za bakterije vrste *S. aureus* smo uporabili gojišče BP in za bakterije vrste *E. coli* gojišče EMB. Preostanek 30 g mesa smo inkubirali in po 5 in 24 urah postopek ponovili. Z dobljenimi podatki smo narisali rastne krivulje bakterij v razdetem mešanem mesu z dodanimi protimikrobnimi snovmi.

## 4 REZULTATI

Z eksperimenti smo želeli potrditi domnevo, da izbrane fenolne spojine in rastlinski ekstrakti zaviralno vplivajo na rast bakterij, in hkrati preveriti ali obstajajo razlike v protimikrobni učinkovitosti med sevi bakterij. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kakšna je učinkovitost ekstraktov pri različnih začetnih številih bakterij in kakšen vpliv ima živilo na protimikrobno aktivnost rastlinskih ekstraktov. Z eksperimenti smo tudi želeli primerjati rezultate dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici in metodo razredčevanja v tekočem gojišču.

### 4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB V MIKROTITERSKI PLOŠČICI

Z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici ne moremo določiti natančnega števila živih bakterijskih celic, zato smo s to metodo določili le okvirne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij - MIC za fenolne spojine in rastlinske ekstrakte. Določali smo vrednosti MIC za 3 enostavne fenolne spojine: galno kislino, klorogensko kislino in epigalokatehin galat, ter za tri rastlinske ekstrakte: Vivox 40, Vivox 70 in žajbljev ekstrakt. V mikrotiterski ploščici smo testirali 7 različnih koncentracij za vsak ekstrakt in fenolno spojino. Primerjali smo učinkovitost ekstraktov med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami. Grampozitivne bakterije, ki smo jih testirali, so bile trije sevi bakterij vrste *S. aureus*, gramnegativne bakterije pa vrsta *E. coli* in dva seva *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*. V tem delu eksperimenta smo preverjali tudi razlike v protimikrobni aktivnosti med višjim in nižjim začetnim številom bakterij.

MIC smo določili po 24-urni inkubaciji z barvilom TTC. Za to barvilo je značilno, da veže elektrone metabolično aktivnih bakterijskih celic. Pri tej reakciji se sicer brezbarvna raztopina TTC reducira v rožnato obarvan produkt. Večja kot je koncentracija živih celic, bolj je intenzivna barva (Klančnik in sod., 2009). Za MIC smo določili tisto najnižjo koncentracijo protimikrobne snovi, pri kateri ni bilo več rožnato obarvanega produkta s celicami bakterij. Meritve so bile opravljene v dveh paralelnih ponovitvah tako, da podatki v preglednicah predstavljajo povprečne vrednosti. V preglednicah so koncentracije ekstraktov in fenolnih spojin izražene v mg/ml TSB. Razpon testiranih koncentracij je bil od 0,0195 mg/ml TSB do 1,25 mg/ml TSB.

V preglednici 7 so zbrane vrednosti MIC dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici za bakterije vrst *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM352 in *E. coli* ŽM370. Bakterije so bile testirane pri dveh različnih začetnih številih z galno in klorogensko kislino, epigalokatehin galatom, ekstrakti Vivox 40, Vivox 70 in žajbljevim ekstraktom.

Preglednica 7: Vrednosti MIC fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov (mg/ml TSB) za gramnegativne bakterije dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici

Protimikrobna snov (mg/ml TSB)	<i>E. coli</i> ŽM370		<i>S. Enteritidis</i> ŽM351		<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	
	N <sub>0</sub> (CFU/ml)		N <sub>0</sub> (CFU/ml)		N <sub>0</sub> (CFU/ml)	
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>
Galna kislina	> 1,25	> 1,25	> 1,25	> 1,25	> 1,25	> 1,25
Klorogenska kislina	> 1,25	> 1,25	> 1,25	> 1,25	0,625	1,25
EGKG	0,3125	0,625	0,3125	0,625	0,3125	0,625
Vivox 40	1,25	> 1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Vivox 70	0,625	1,25	0,625	1,25	1,25	1,25
Žajbelj	1,25	> 1,25	1,25	> 1,25	0,625	> 1,25

Legenda: N<sub>0</sub>: začetno število bakterij

Pri galni kislini nismo dobili MIC pri nobeni gramnegativni bakteriji ne glede na velikost inokuluma, saj bi morali uporabiti višje koncentracije od 1,25 mg/ml TSB.

Pri klorogenski kislini smo dobili MIC samo pri bakterijah seva *S. Typhimurium* ŽM352, in sicer pri 10<sup>3</sup> CFU/ml je bila MIC 0,625 mg/ml TSB in pri 10<sup>7</sup> CFU/ml 1,25 mg/ml TSB.

EGKG je deloval protimikrobno tako, da smo dobili pri vseh gramnegativnih bakterijah vrednosti MIC 0,3125 mg/ml TSB, če je bilo začetno število bakterij 10<sup>3</sup> CFU/ml in vrednosti MIC 0,625 mg/ml TSB, če je bilo začetno število bakterij 10<sup>7</sup> CFU/ml.

Za ekstrakt Vivox 40 smo pri vseh gramnegativnih bakterijah dobili vrednosti MIC 1,25 mg/ml TSB pri nižjem začetnem številu bakterij. Pri višjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* MIC nismo dobili, medtem, ko smo pri obeh sevih salmonel določili vrednosti MIC 1,25 mg/ml TSB.

Za ekstrakt Vivox 70 smo pri bakterijah vrste *E. coli* in seva *S. Enteritidis* ŽM351 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml določili vrednost MIC 0,625 mg/ml TSB, za bakterije seva *S. Typhimurium* ŽM352 pa je bila vrednost MIC 1,25 mg/ml TSB. Pri 10<sup>7</sup> CFU/ml so imele vse bakterije MIC 1,25 mg/ml TSB.

Za ekstrakt žajblja smo pri bakterijah vrste *E. coli* in seva *S. Enteritidis* ŽM351 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml določili vrednost MIC 1,25 mg/ml TSB, za bakterije seva *S. Typhimurium* ŽM352 pa je bila vrednost MIC 0,625 mg/ml TSB. Pri 10<sup>7</sup> CFU/ml nismo dobili MIC pri nobeni gramnegativni bakteriji.

V preglednici 8 so zbrane vrednosti MIC dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici za tri seve bakterij vrste *S. aureus* ŽMJ345, *S. aureus* ŽMJ346 in *S. aureus* ŽMJ348. Bakterije so bile testirane pri dveh različnih začetnih številih z galno in klorogensko kislino, epigalokatehin galatom, ekstrakti Vivox 40, Vivox 70 in žajbljevim ekstraktom.

Preglednica 8: Vrednosti MIC fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov (mg/ml TSB) za grampozitivne bakterije dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici

Protimikrobna snov (mg/ml TSB)	<i>S. aureus</i> ŽMJ345		<i>S. aureus</i> ŽMJ346		<i>S. aureus</i> ŽMJ348	
	N <sub>0</sub> (CFU/ml)		N <sub>0</sub> (CFU/ml)		N <sub>0</sub> (CFU/ml)	
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>
Galna kislina	0,15625	1,25	1,25	> 1,25	1,25	> 1,25
Klorogenska kislina	> 1,25	> 1,25	1,25	> 1,25	1,25	> 1,25
EGKG	0,01953	0,625	0,078125	0,3125	0,078125	0,3125
Vivox 40	0,03906	0,03906	0,078125	0,15625	0,078125	0,15625
Vivox 70	0,03906	0,15625	0,078125	0,15625	0,078125	0,15625
Žajbelj	0,01953	0,15625	0,15625	0,3125	0,15625	0,3125

Legenda: N<sub>0</sub>: začetno število bakterij

Za galno kislino smo pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml določili MIC 0,1563 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo določili MIC pri 1,25 mg/ml TSB. Bakteriji vrste *S. aureus* ŽMJ345 smo pri 10<sup>7</sup> CFU/ml določili MIC pri 1,25 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa nismo dobili MIC.

Za klorogensko kislino pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml nismo dobili MIC, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo dobili MIC pri 1,25 mg/ml TSB. Vse grampozitivne bakterije vrste *S. aureus* pri 10<sup>7</sup> CFU/ml niso imele MIC niti pri 1,25 mg/ml TSB.

Za EGKG smo pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml določili MIC 0,01953 mg/ml TSB, pri preostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo dobili MIC 0,0781 mg/ml TSB. Pri 10<sup>7</sup> CFU/ml bakterij vrste *S. aureus* ŽMJ345 smo določili MIC 0,625 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterij *S. aureus* pa smo določili MIC pri 0,3125 mg/ml TSB.

Za Vivox 40 smo pri bakteriji vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri 10<sup>3</sup> CFU/ml določili MIC 0,03906 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije vrste *S. aureus* pa smo določili MIC 0,0781 mg/ml TSB. Pri 10<sup>7</sup> CFU/ml bakterij vrste *S. aureus* ŽMJ345 smo dobili MIC pri isti koncentraciji, kot je bila pri 10<sup>3</sup> CFU/ml, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo določili MIC 0,1563 mg/ml TSB.

Za Vivox 70 smo pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri  $10^3$  CFU/ml določili MIC 0,03906 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo določili MIC 0,0781 mg/ml TSB. Pri  $10^7$  CFU/ml bakterij vrste *S. aureus* smo pri vseh sevih določili MIC 0,1563 mg/ml TSB.

Za ekstrakt žajblja smo pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 pri  $10^3$  CFU/ml določili MIC 0,0195 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo določili MIC 0,1563 mg/ml TSB. Pri  $10^7$  CFU/ml smo bakterijam vrste *S. aureus* ŽMJ345 določili MIC 0,1563 mg/ml TSB, pri ostalih dveh sevih bakterije *S. aureus* pa smo določili MIC pri 0,3125 mg/ml TSB.

Iz preglednic 7 in 8 je razvidno, da so grampozitivne bakterije vrste *S. aureus* bolj občutljive na protimikrobne snovi od gramnegativnih bakterij vrst *Salmonella* in *E. coli*, saj so bile MIC pri bakteriji *S. aureus* ŽMJ345 z galno kislino pri  $10^3$  CFU/ml 0,15625 mg/ml TSB in pri ostalih dveh sevih *S. aureus* pri  $10^3$  CFU/ml 1,25 mg/ml TSB, medtem ko pri *E. coli* in obeh sevih salmonel pri galni kislini nismo dobili MIC.

Pri klorogenski kislini smo MIC dobili samo pri  $10^3$  CFU/ml dveh sevov bakterij vrste *S. aureus* in pri bakteriji *S. Typhimurium* ŽM352. Rezultati pri klorogenski kislini niso sledili trendu, saj bi MIC pri grampozitivnih bakterijah morala biti nižja od MIC gramnegativnih bakterij. Eksperimenta s klorogensko kislino nismo ponovili, ker smo dobljene rezultate testirali z bolj natančno metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB.

Pri EGKG, Vivox 40, Vivox 70 in žajblju so bile vrednosti MIC grampozitivnih bakterij, pri  $10^3$  CFU/ml, nižje od vrednosti MIC gramnegativnih bakterij pri nižjem inokulumu. Enaki rezultati so bili pri  $10^7$  CFU/ml.

Tam, kjer nismo določili MIC, bi morali testirati še višje koncentracije od 1,25 mg/ml. Vendar višjih nismo uporabili, saj snovi niso bile več topne v etanolu. Iz preglednic so tudi opazne razlike med začetnimi števili bakterij oz. inokulumi.

Če primerjamo rezultate nižjih in višjih inokulumov, vidimo, da je pri vseh vrstah bakterij nižji inokulum bolj občutljiv na delovanje rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin.

#### 4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB

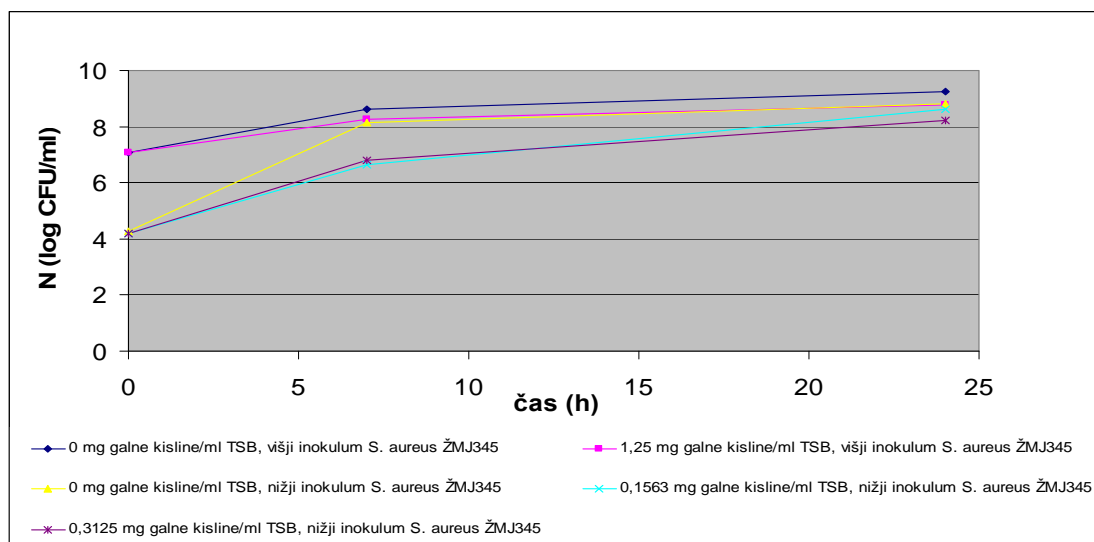
Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je zelo natančna, saj z njo lahko natančno določimo število živih celic v tekočem gojišču. S to metodo smo preverjali vrednosti MIC fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici. Hkrati smo testirali tudi eno višjo in eno nižjo koncentracijo od MIC. Z dobljenimi rezultati smo narisali rastne krivulje, ki so vsebovale meritve ob časih 0, 7 in 24 ur. Iz krivulj smo nato lahko razbrali, katere koncentracije so zavrle razmnoževanje bakterij in katere ne, ter hkrati primerjali ujemanje rezultatov med obema metodama.

Meritve so bile opravljene v dveh paralelnih ponovitvah, tako da podatki v krivuljah predstavljajo povprečne vrednosti. Koncentracije fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov so preračunane v mg protimikrobne snovi /ml TSB, zato, da so rezultati primerljivi med metodama. Merilo po katerem smo določali MIC: MIC je tista koncentracija, pri kateri se število bakterij zmanjša za 1 logaritmsko enoto v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu po 24 urah (Burt, 2004).

Del rastnih krivulj nima podatka po 7 urah, zato ker nismo imeli dostopa do laboratorija in omenjenih meritev nismo mogli opraviti.

#### 4.2.1 Protimikrobni učinek galne kisline

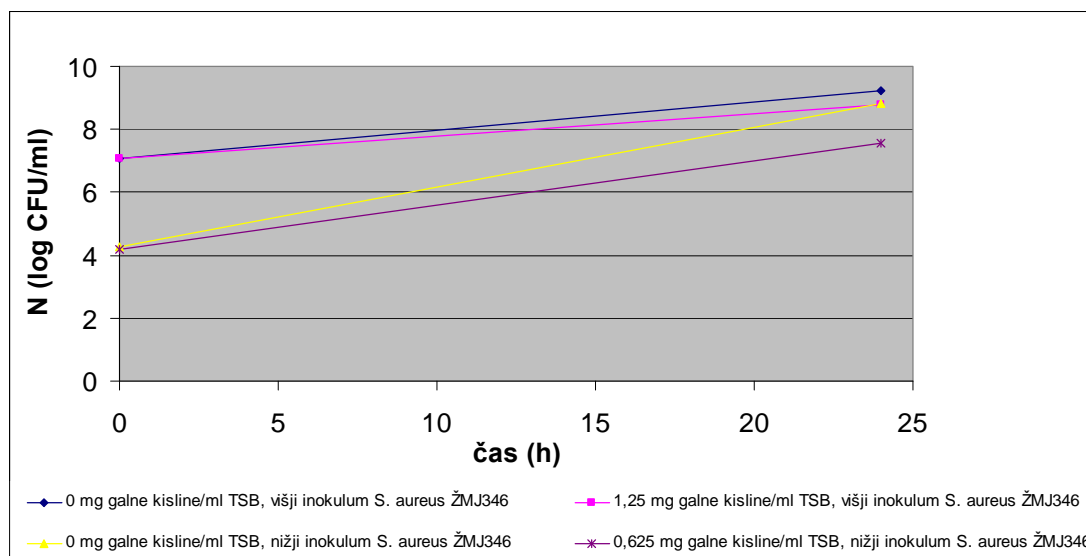
Na slikah 13 in 14 ter v prilogi A 1 so zbrani rezultati rasti različnih sevov bakterij vrste *S. aureus* (ŽMJ 345, ŽMJ 346, ŽMJ 348) v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline.



Slika 13: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline

Pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ345 smo pri  $10^3$  CFU/ml preizkusili koncentraciji 0,15625 mg/ml TSB in 0,3125 mg/ml TSB. Ti dve koncentraciji smo testirali, ker smo pri metodi razredčevanja v mikrotiterski ploščici določili, da je MIC galne kisline 0,15625 mg/ml TSB. Na sliki 13 vidimo, da pri nobeni od testiranih koncentracij število bakterij v primerjavi s kontrolo ni manjše za 1 log enoto. Domnevamo lahko, da bi bil MIC pri koncentraciji 0,625 mg/ml TSB.

Pri višjem začetnem številu bakterij ( $10^7$  CFU/ml) seva *S. aureus* ŽMJ345 smo preizkusili najvišjo koncentracijo (1,25 mg/ml) galne kisline. Na sliki 13 vidimo, da se pri tej koncentraciji število bakterij v primerjavi s kontrolo ni zmanjšalo za 1 log enoto v primerjavi z številom bakterij v kontrolnem vzorcu, kar pomeni, da nismo dobili MIC galne kisline.



Slika 14: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline

Glede na rezultate prikazane na sliki 14 smo se pri nižjem inokulumu ( $10^3$  CFU/ml) bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 odločili testirati koncentracijo 0,625 mg/ml TSB. Na sliki 14 vidimo, da je pri tej koncentraciji število celic v primerjavi s kontrolo padlo za 1 logaritemsko enoto, kar pomeni, da je koncentracija 0,625 mg/ml TSB, MIC galne kisline.

Pri višjem inokulumu bakterij *S. aureus* ŽMJ346 smo preizkusili najvišjo koncentracijo (1,25 mg/ml) galne kisline. Na sliki 14 vidimo, da se pri tej koncentraciji število bakterij v primerjavi s kontrolo ni zmanjšalo za 1 log enoto, kar pomeni, da nismo dobili MIC.

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ346, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ348 (priloga A 1).

Protimikrobnega učinka galne kisline z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB nismo testirali na bakterijah sevov *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* in vrste *E. coli*, ker pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici nismo dobili MIC niti pri najvišji preizkušeni koncentraciji 1,25 mg/ml.

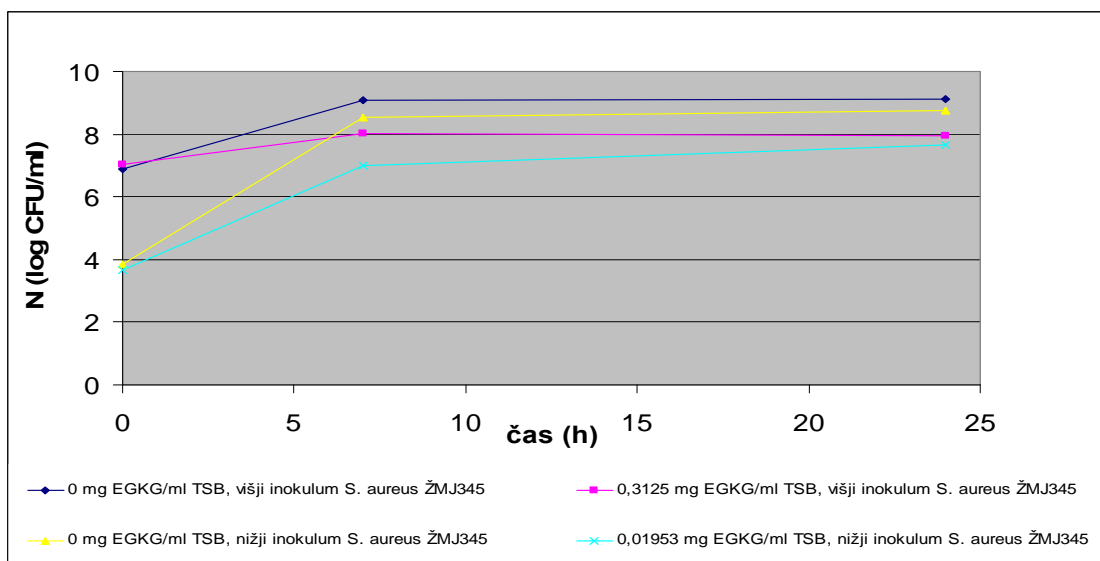
#### 4.2.2 Protimikrobni učinek klorogenske kisline

Protimikrobni učinek klorogenske kisline smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB testirali samo na bolj občutljivih grampozitivnih bakterijah. Ob dodatku klorogenske kisline s koncentracijo 1,25 mg/ml TSB ni bilo opaznih večjih sprememb v rasti kateregakoli seva stafilokokov ne glede na velikost inokuluma. Iz tega lahko sklepamo, da je klorogenska kislina pri preizkušeni koncentraciji protimikrobno neučinkovita.

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici je nakazovala (preglednica 8), da bi lahko dobili MIC za grampozitivne bakterije, vendar po testiranju najvišjih koncentracij klorogenske kisline z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB, MIC nismo dobili. Do različnih rezultatov po eni in po drugi metodi je verjetno prišlo zaradi nenatančnosti metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici oziroma zaradi različne definicije vrednosti MIC. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču sicer smo opazili majhno zmanjšanje števila bakterij, vendar je bilo to premajhno, da bi testirano koncentracijo klorogenske kisline lahko določili kot MIC. Višjih koncentracij pa nismo testirali, ker pri teh klorogenska kislina ni bila več dobro topna v etanolu (od priloga A 2 do priloga A 4).

#### 4.2.3 Protimikrobni učinek epigalokatehin galata

Na slikah od 15 do 18 ter v prilogi A 5 in prilogi A 6 so zbrani rezultati rasti različnih sevov bakterij vrste *S. aureus* (ŽMJ 345, ŽMJ 346, ŽMJ 348), *Salmonella* (ŽM351 in ŽM352) in *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami EGKG.



Slika 15: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata

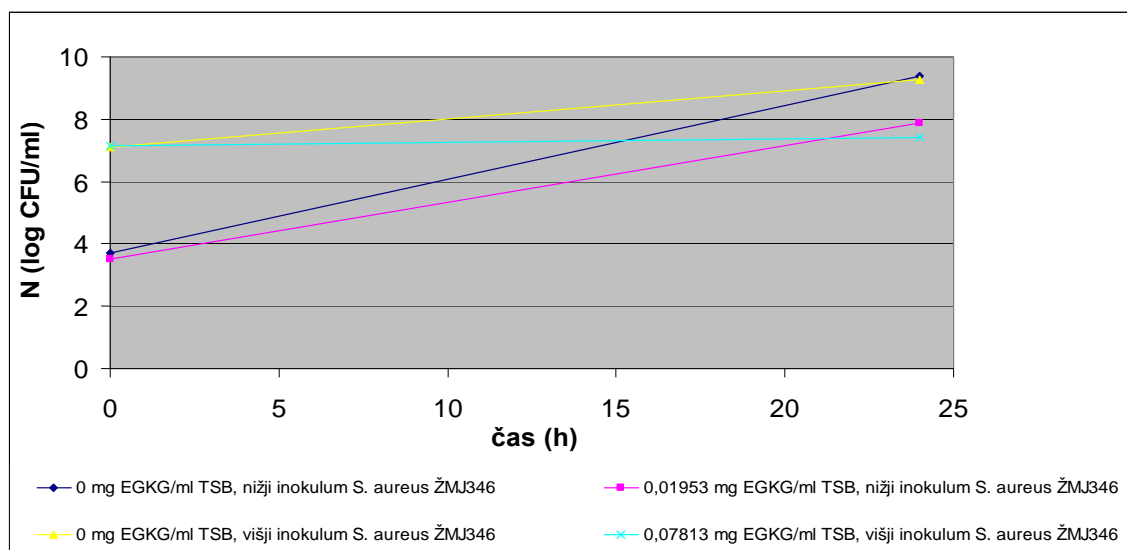
Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo preizkusili EGKG koncentracije 0,01953 mg/ml TSB. Na sliki 15 vidimo, da se je pri tej koncentracij število bakterij v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za 1 log enoto, kar pomeni, da smo dobili MIC. Pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo preizkusili EGKG koncentracije 0,0313 mg/ml TSB. Ta koncentracija se je izkazala kot MIC, saj se je število bakterij po 24 urah v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za 1 logaritmsko enoto (slika 15).

Ko smo pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 preizkusili EGKG koncentracije 0,01953 mg/ml TSB, se je število bakterij v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za 1 log, enoto kar pomeni, da smo dobili enako vrednost MIC z obema metodama (slika 16).



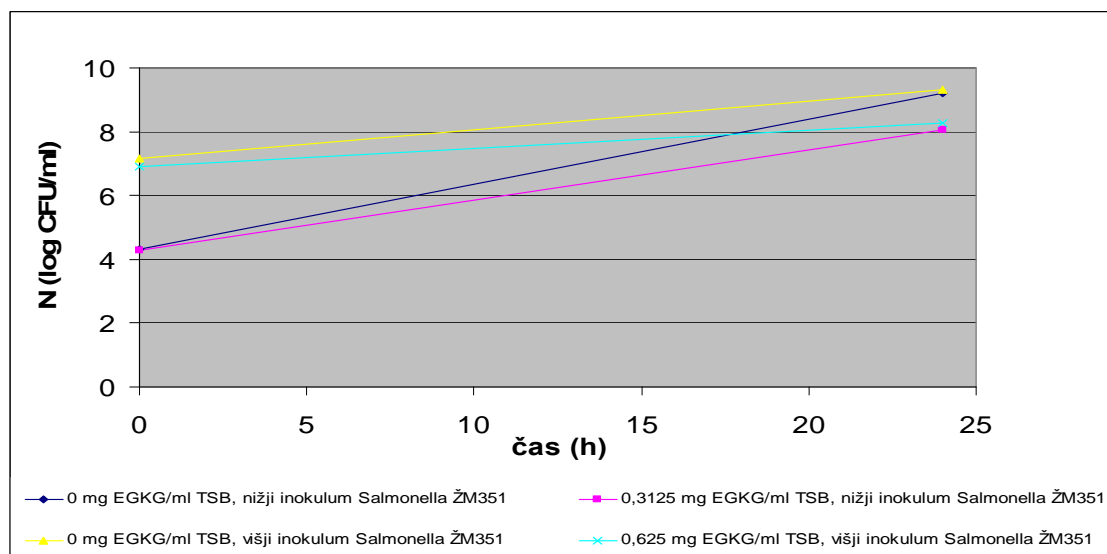
Tudi pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 je bila vrednost MIC EGKG določena z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici. Koncentracija 0,07813 mg/ml TSB je bila določena kot MIC (slika 16).

Enake rezultate, kot pri bakterijah *S. aureus* sev ŽMJ346, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ348 (priloga A 5).



Slika 16: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM351 smo preizkusili EGKG s koncentracijo 0,3125 mg/ml TSB. Na sliki 17 vidimo, da je pri tej koncentraciji število celic v primerjavi s kontrolo padlo za 1 logaritmsko enoto, kar pomeni, da je MIC koncentracija 0,3125 mg/ml TSB.

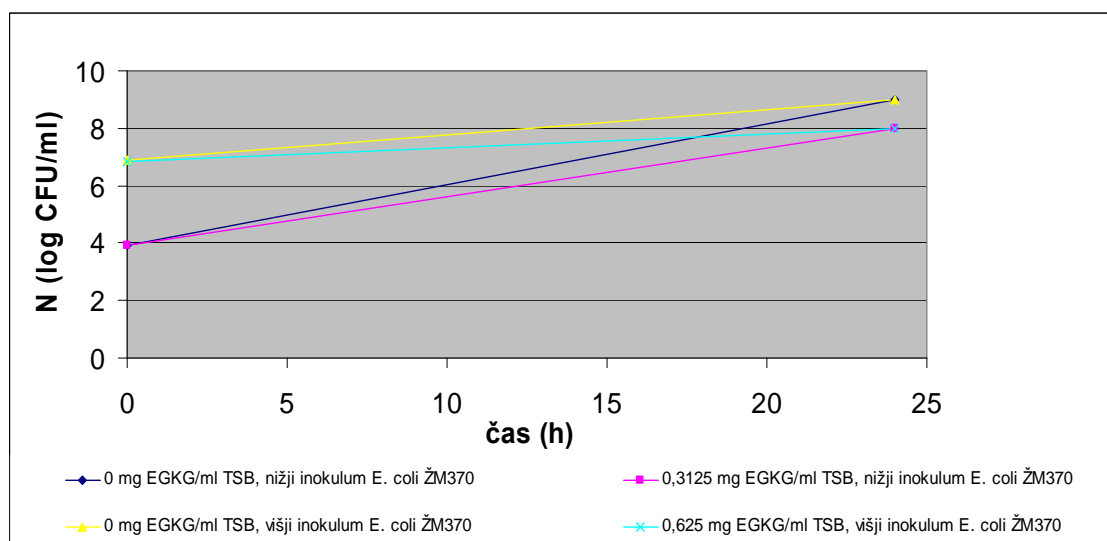


Slika 17: Rast bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata

Enake rezultate smo dobili tudi pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM351 kar pomeni, da je MIC EGKG za bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM351 koncentracija 0,625 mg/ml TSB.

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. Enteritidis* ŽM351 (slika 17), smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. Typhimurium* ŽM352 (priloga A 6).

Na sliki 18 vidimo rezultate protimikrobnega delovanja EGKG na bakterije vrste *E. coli* ŽM370 in smo tako pri nižjem kot pri višjem začetnem številu bakterij potrdili, da sta koncentraciji 0,3125 mg/ml TSB oziroma 0,625 mg/ml TSB vrednosti MIC.



Slika 18: Rast bakterij vrste *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata

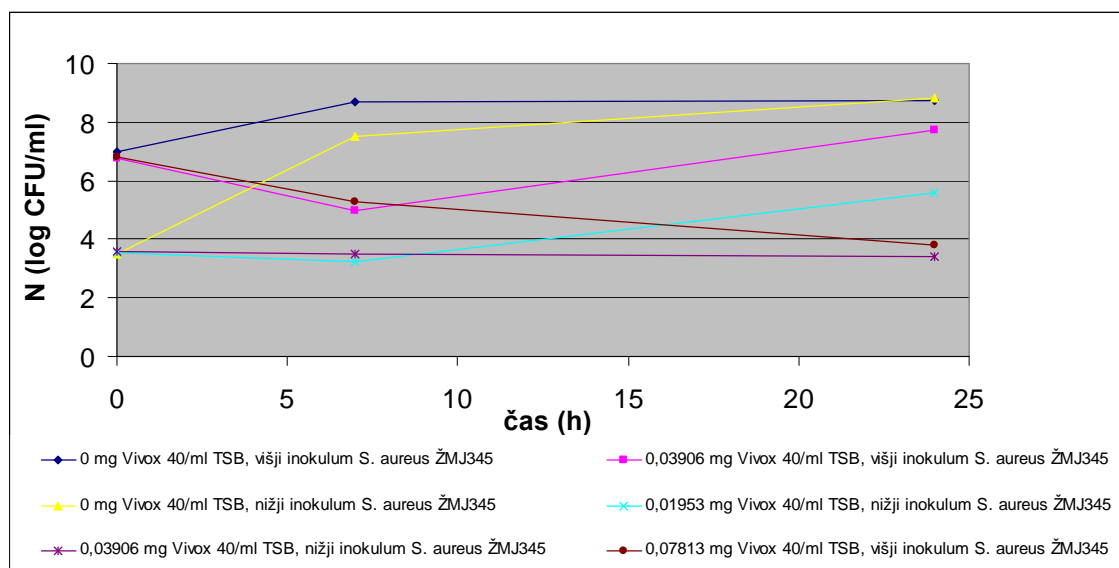
Povzamemo lahko, da je EGKG v primerjavi z drugima fenolnima kislina velika bolj učinkovit, saj zavira rast in razmnoževanje tako grampozitivnih kot tudi gramnegativnih bakterij, da je bolj učinkovit pri nižjem začetnem številu bakterij in da so grampozitivne bakterije nanj bolj občutljive.

Med različnimi sevi bakterij rodu *Salmonella*, ki smo jih testirali, ni večjih razlik v občutljivosti na EGKG. Ravno tako ni večjih razlik v občutljivosti med sevi bakterij *Staphylococcus aureus*.

#### 4.2.4 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40

Na slikah od 19 do 22 ter v prilogi A 7 in prilogi A 8 so zbrani rezultati rasti različnih sevov bakterij vrste *S. aureus* (ŽMJ345, ŽMJ346, ŽMJ348), *Salmonella* (ŽM351 in ŽM352) in *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40.

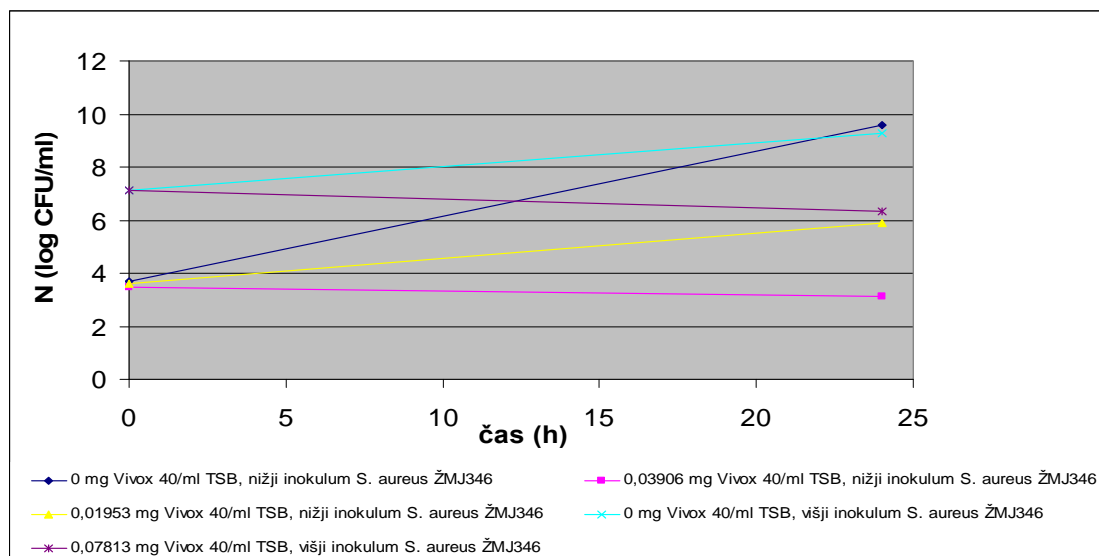
Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo preizkusili protimikrobno delovanje ekstrakta Vivox 40 s koncentracijama 0,01953 mg/ml TSB in 0,03906 mg/ml TSB in na sliki 19 vidimo, da je MIC vrednost 0,01953 mg/ml TSB.



Slika 19: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40

Pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo preizkusili koncentraciji 0,03906 mg/ml TSB in 0,0781 mg/ml TSB (slika 19) in določili, da je koncentracija 0,03906 mg/ml TSB enaka MIC.

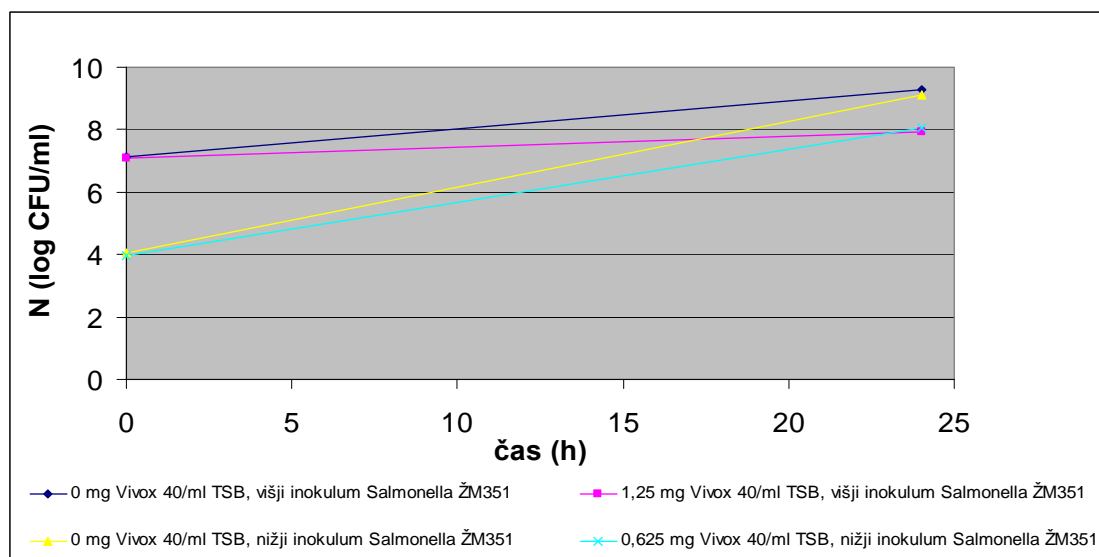
Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 smo preizkusili protimikrobno delovanje ekstrakta Vivox 40 s koncentracijama 0,01953 mg/ml TSB in 0,03906 mg/ml TSB in na sliki 20 vidimo, da je 0,01953 mg/ml TSB enak MIC.



Slika 20: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40

Pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 smo določili, da je koncentracija 0,0781 mg/ml TSB enaka MIC ekstrakta Vivox 40 (slika 20).

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ346, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ348 (priloga A 7).

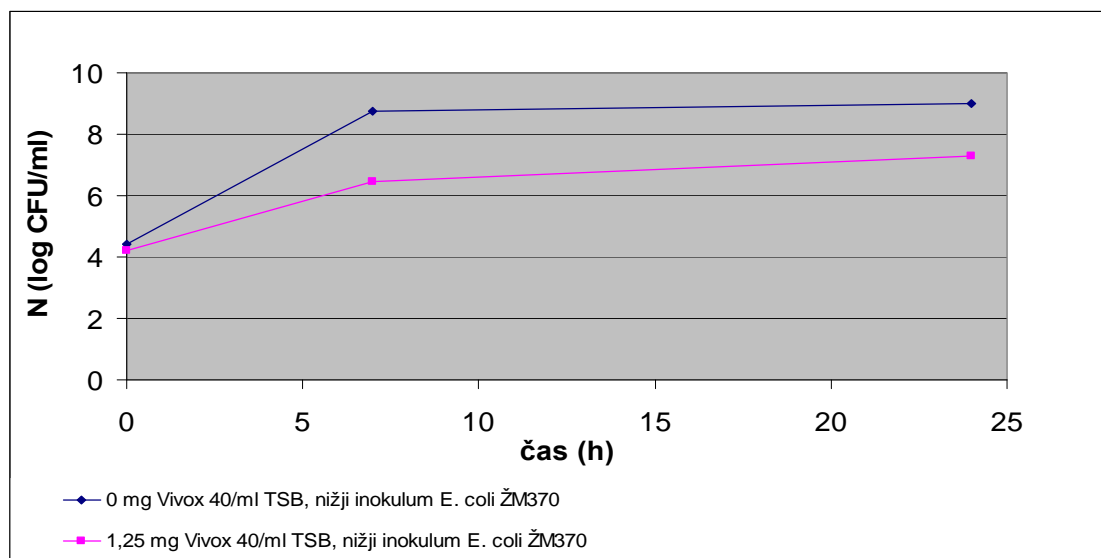


Slika 21: Rast bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM351 smo določili, da je MIC za ekstrakt Vivox 40 koncentracija 0,625 mg/ml TSB (slika 21). Za višje začetno število pa smo določili, da je MIC 1,25 mg/ml TSB.

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. Enteritidis* ŽM351, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. Typhimurium* ŽM352 (priloga A 8).

Pri nižjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* ŽM370 smo preizkusili ekstrakt Vivox 40 s koncentracijo 1,25 mg/ml TSB in potrdili, da je ta koncentracija MIC (slika 22).



Slika 22: Rast bakterij vrste *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40

Pri višjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* ŽM370 nismo preizkusili ekstrakta Vivox 40, ker smo že z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici določili, da je MIC > 1,25 mg/ml TSB.

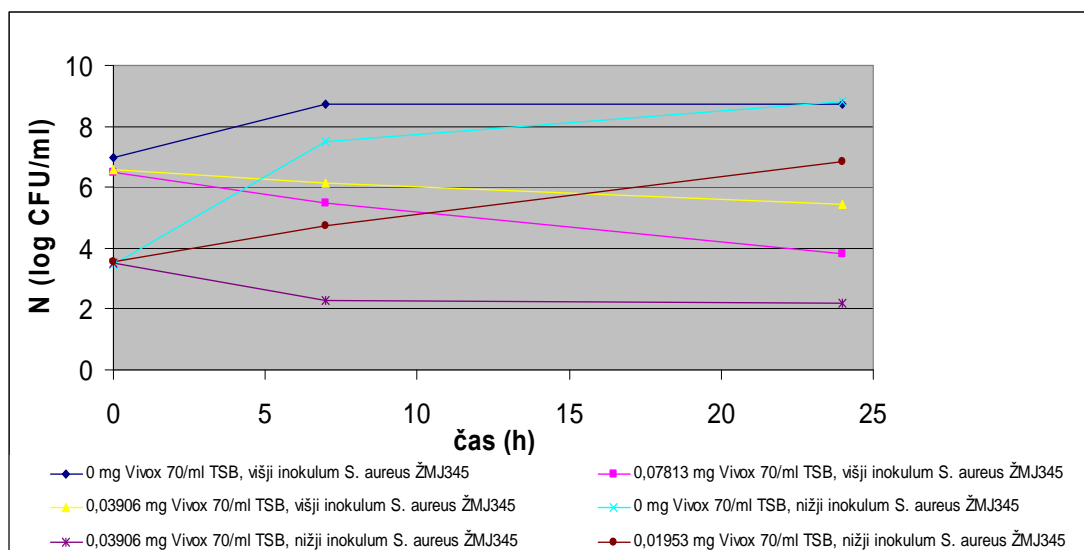
Vivox 40 je ekstrakt rožmarina. Podatki s slik od 19 do 22 in prilog od A 7 do A 8 kažejo, da ekstrakt Vivox 40 zavira rast tako grampozitivnih, kot tudi gramnegativnih bakterij. Vendar pa bolj zavira rast grampozitivnih bakterij, saj so dobljene vrednosti MIC dosti nižje. Potrdili smo tudi hipotezo, da so pri nižjem začetnem številu bakterij vrednosti MIC nižje. Pri različnih

sevih iste bakterijske vrste se je tudi pri ekstraktu Vivox 40 pokazalo, da med njimi ni razlik v občutljivosti na ekstrakt.

V primerjavi z galno kislino in klorogensko kislino je ekstrakt Vivox 40 veliko bolj učinkovit. V primerjavi z EGKG je ekstrakt Vivox 40 enako učinkovit pri grampozitivnih bakterijah. Pri gramnegativnih bakterijah pa je EGKG bolj učinkovit od ekstrakta Vivox 40, saj so pri njem potrebne nižje koncentracije za enak zaviralni učinek.

#### 4.2.5 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70

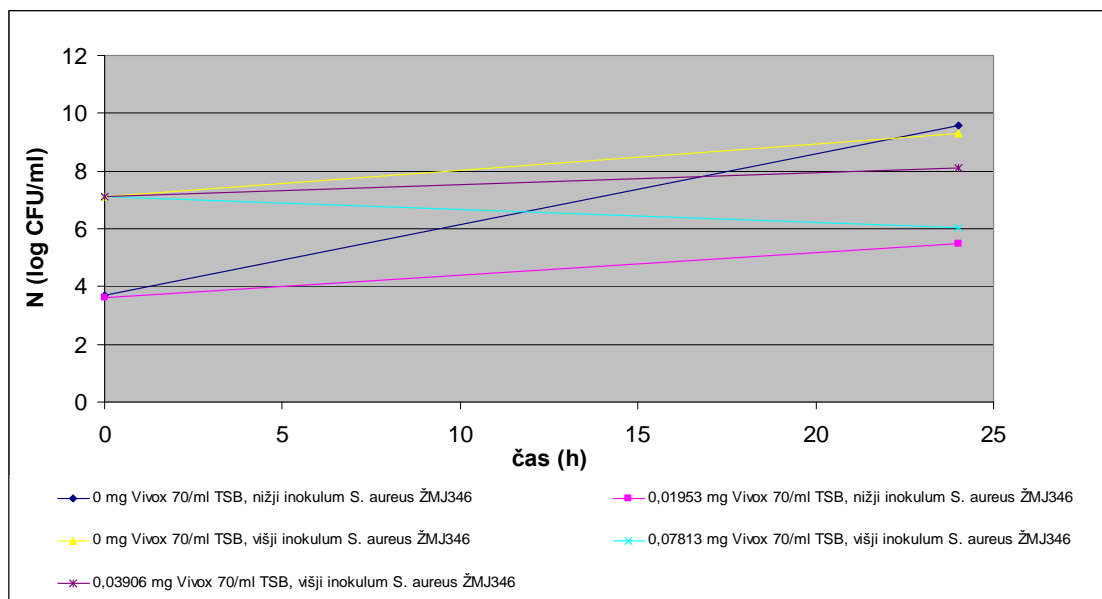
Na slikah od 23 do 26 ter v prilogi A 9 in prilogi A 10 so zbrani rezultati rasti različnih sevov bakterij vrste *S. aureus* (ŽMJ345, ŽMJ346, ŽMJ348), *Salmonella* (ŽM351 in ŽM352) in *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70.



Slika 23: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo ekstrakt Vivox 70 s koncentracijo 0,0195 mg/ml TSB določili kot MIC. S slike 23 vidimo, da se je pri tej koncentraciji število celic v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za 1 logaritmsko enoto.

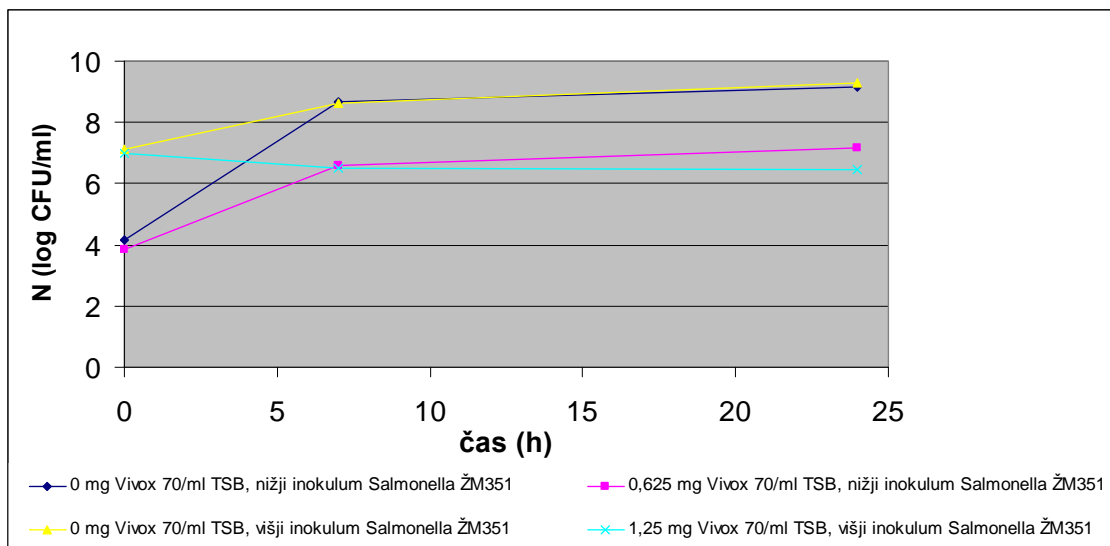
Pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo pri koncentraciji 0,03906 mg/ml TSB določili MIC, saj se je število celic v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za 1 logaritemsko enoto (slika 23).



Slika 24: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 smo določili MIC ekstraktu Vivox 70 s koncentracijo 0,0195 mg/ml TSB (slika 24). Vendar bi lahko testirali tudi eno nižjo koncentracijo. Pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 smo za MIC določili koncentracijo 0,0781 mg/ml TSB (slika 24).

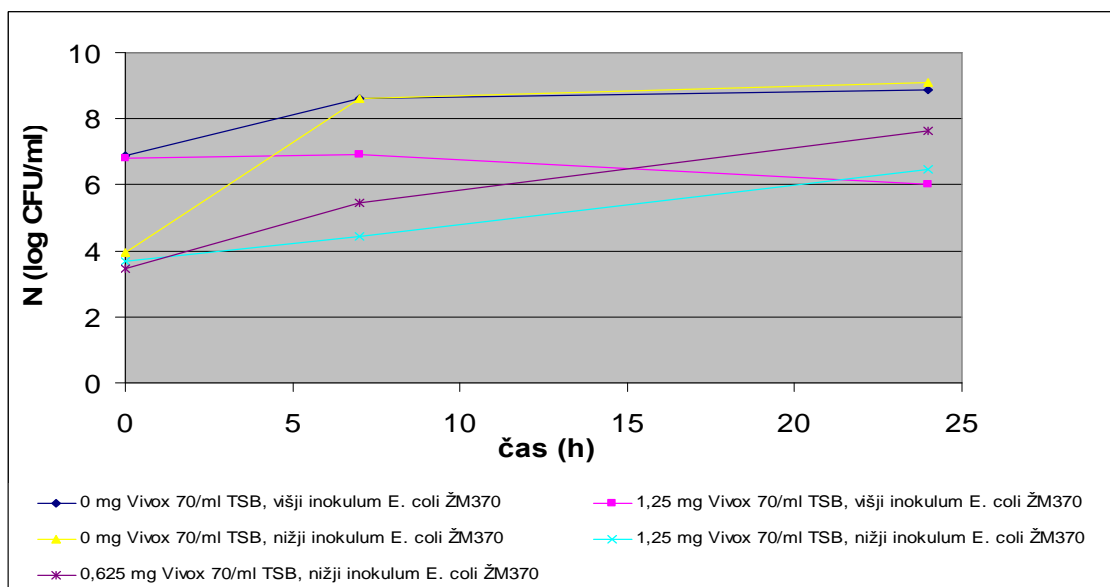
Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ346, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ348 (priloga A 9).



Slika 25: Rast bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 smo dobili MIC pri koncentraciji 0,625 mg/ml TSB, vendar bi lahko testirali tudi eno nižjo koncentracijo (slika 25). Pri višjem začetnem številu bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 je MIC pri koncentraciji 1,25 mg/ml TSB. Ker se je število celic v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za več kot 1 logaritmsko enoto, bi lahko testirali tudi eno nižjo koncentracijo.

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351, smo dobili tudi pri bakteriji *Salmonella* Typhimurium ŽM352 (priloga A 10).



Slika 26: Rast bakterij vrste *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70



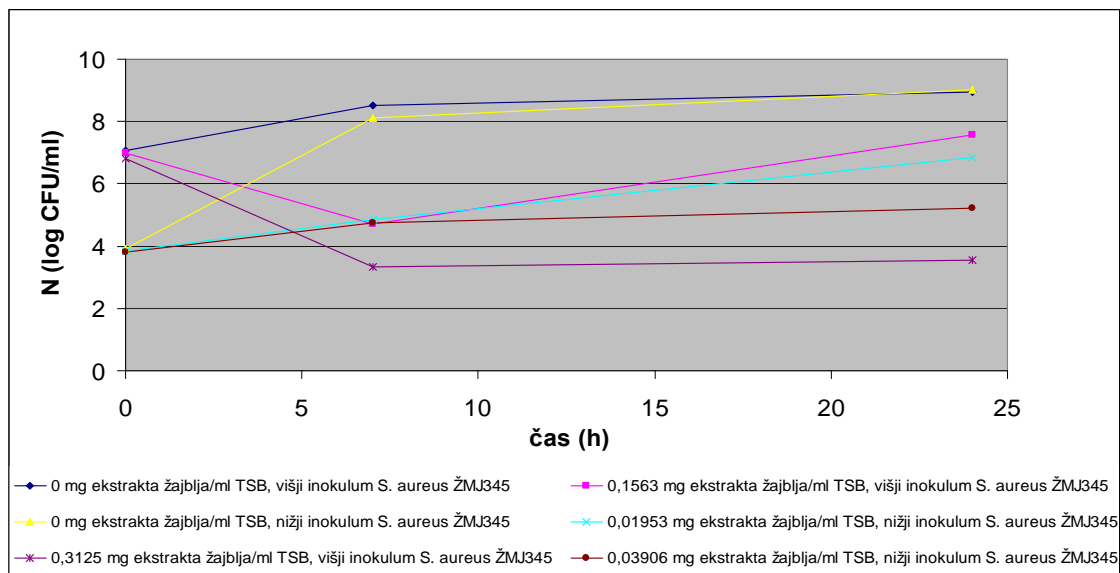
Pri nižjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* ŽM370 smo dobili MIC pri koncentraciji 0,625 mg/ml TSB (slika 26). Pri višjem začetnem številu bakteriji vrste *E. coli* ŽM370 pa smo dobili MIC pri 1,25 mg/ml TSB.

Rezultati na slikah od 23 do 26 in prilogah od A 9 do A 10 kažejo, da je ekstrakt Vivox 70 bolj učinkovit od ekstrakta Vivox 40, saj so vrednosti MIC nižje. Če primerjamo protimikrobno delovanje ekstrakta Vivox 70 z EGKG ugotovimo, da sta enako učinkovita pri gramnegativnih bakterijah, pri grampozitivnih bakterijah pa rezultati kažejo, da je ekstrakt Vivox 70 malo bolj učinkovit.

Rezultati dobljeni z ekstraktom Vivox 70 kažejo, da so grampozitivne bakterije bolj občutljive na protimikrobne snovi, kot gramnegativne bakterije in da je za enak protimikroben učinek pri nižjem začetnem številu bakterij potrebna nižja koncentracija ekstrakta Vivox 70, kot pri višjem začetnem številu. Primerjava protimikrobnega učinka ekstrakta Vivox 70 za seve znotraj iste bakterijske vrste pokaže, da med sevi ni razlik.

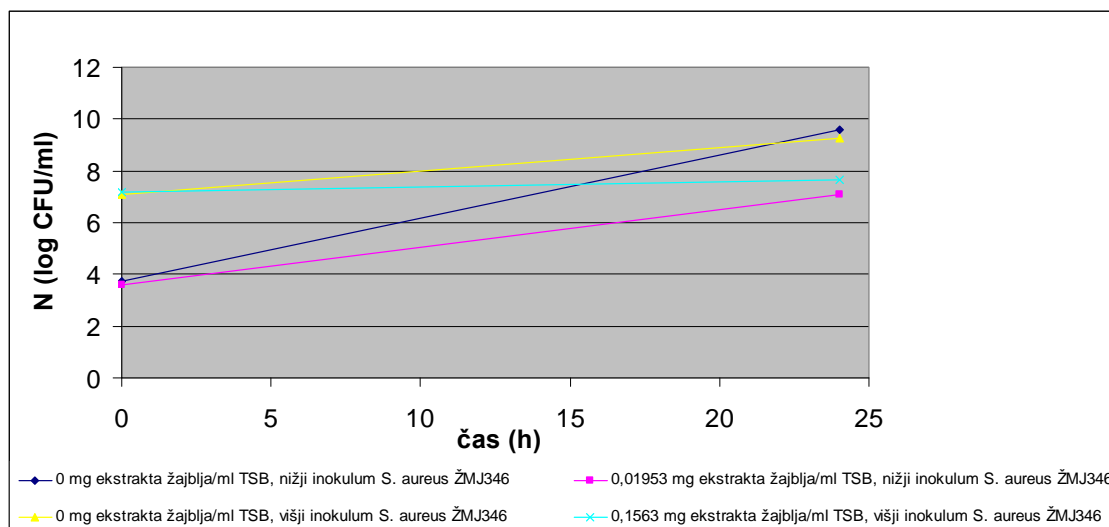
#### 4.2.6 Protimikrobni učinek ekstrakta žajblja

Na slikah od 27 do 30 ter v prilogi A 11 in prilogi A 12 so zbrani rezultati rasti različnih sevov bakterij vrste *S. aureus* (ŽMJ345, ŽMJ346, ŽMJ348), *Salmonella* (ŽM351 in ŽM352) in *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.



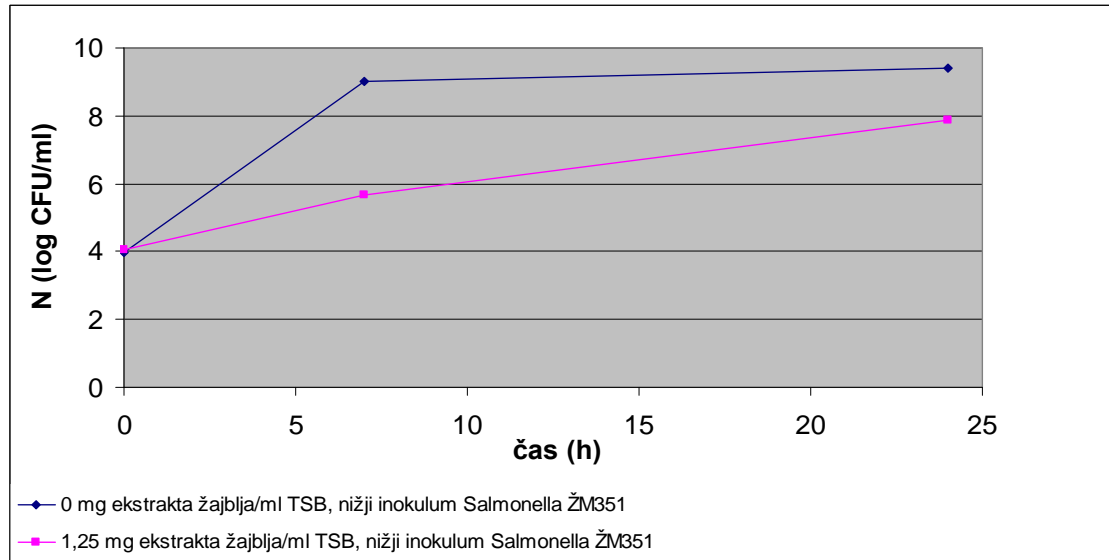
Slika 27: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo določili ekstraktu žajblja, MIC pri koncentraciji 0,0195 mg/ml TSB (slika 27). In pri višjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 smo pri koncentraciji 0,156 mg/ml TSB določili MIC.



Slika 28: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja. Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 smo določili MIC ekstrakta žajblja pri 0,0195 mg/ml TSB, MIC pri višjem začetnem številu bakterij smo določili pri 0,156 mg/ml TSB (slika 28).

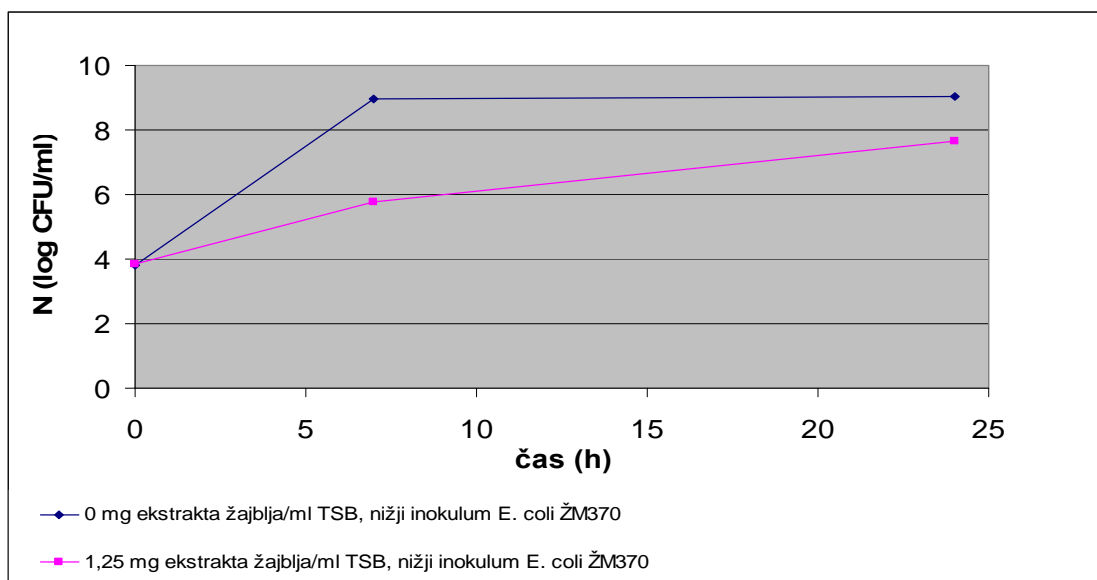
Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ346, smo dobili tudi pri bakterijah seva *S. aureus* ŽMJ348 (priloga A 11).



Slika 29: Rast bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja.

Pri nižjem začetnem številu bakterij seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351 smo določili MIC ekstrakta žajblja pri 1,25 mg/ml TSB (slika 29). Pri višjem začetnem številu nismo testirali protimikrobne učinkovitosti ekstrakta žajblja z višjimi koncentracijami zaradi težav s topnostjo.

Enake rezultate, kot pri bakterijah seva *Salmonella* Enteritidis ŽM351, smo dobili tudi pri bakterijah seva *Salmonella* Typhimurium ŽM352 (priloga A 12).



Slika 30: Rast bakterij vrste *E. coli* ŽM370 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja

Pri nižjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* ŽM370 smo pri ekstraktu žajblja s koncentracijo 1,25 mg/ml TSB določili MIC (slika 30).

Pri višjem začetnem številu bakterij vrste *E. coli* ŽM370 ekstrakta žajblja nismo testirali, ker MIC vrednosti ne bi dobili niti pri najvišji koncentraciji.

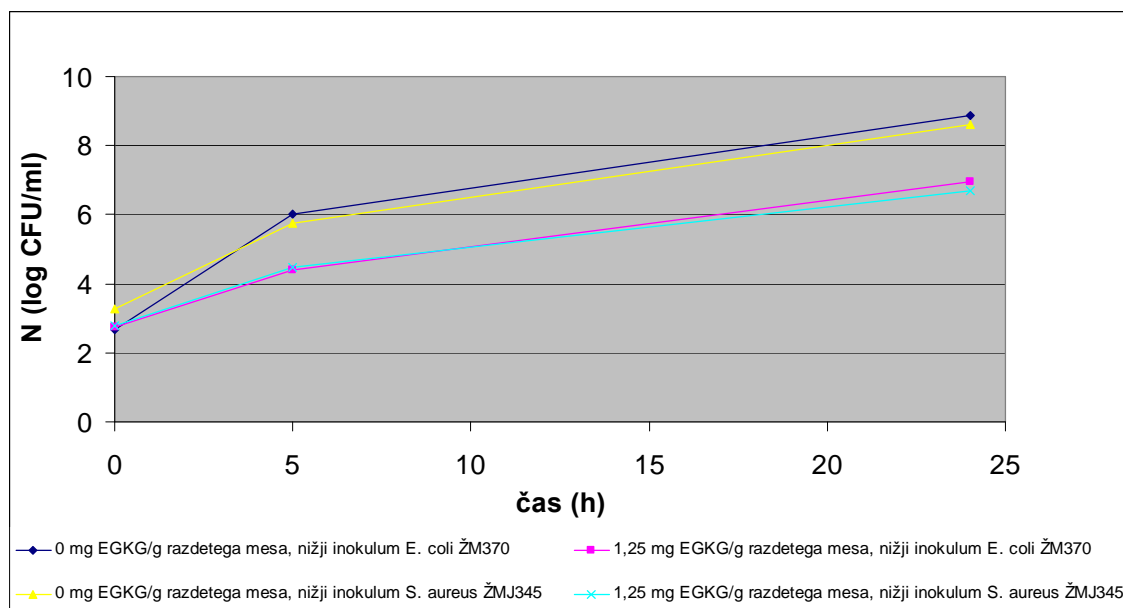
Ekstrakt žajblja je v primerjavi z galno in klorogensko kislino bolj protimikrobno učinkovit, medtem ko je manj učinkovit kot sta EGKG in ekstrakt Vivox 70. Z ekstraktom Vivox 40 sta si po učinkovitosti zelo podobna. Tudi pri ekstraktu žajblja se je pokazalo, da so grampozitivne bakterije bolj občutljive od gramnegativnih, in da je nižji inokulum bolj občutljiv na protimikrobne spojine od višjega. Ravno tako smo pokazali, da med različnimi sevi iste bakterijske vrste ni večjih razlik.

#### 4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK FENOLNIH SPOJIN IN RASTLINSKIH EKSTRAKTOV V RAZDETEM MESU

S spremljanjem rasti bakterij v razdetem mesu smo preizkusili protimikrobno učinkovitost ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70 ter EGKG. Kot gojišče smo namesto TSB uporabili mešano razdeto meso. Zaradi domnevno slabše učinkovitosti ekstraktov v živilu smo uporabili samo najvišje koncentracije le-teh. Poleg tega smo testirali samo nižje začetne koncentracije bakterij, ker so te bolj občutljive na delovanje protimikrobne snovi in je to koncentracijo bolj realno pričakovati v kontaminiranem mesu.

### 4.3.1 Protimikrobni učinek epigalokatehin galata v razdetem mesu

Protimikrobni učinek EGKG v mesu (slika 31) smo določili pri nižjem začetnem številu bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 pri koncentraciji 1,25 mg/g mesa. Število bakterijskih celic se je po 24 urah v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za dva logaritma, po izbrani definiciji za MIC pa je znižanje za 1 logaritmsko enoto že dovolj za določitev vrednosti MIC. To pomeni, da bi lahko testirali tudi koncentracijo 0,625 mg/g mesa.

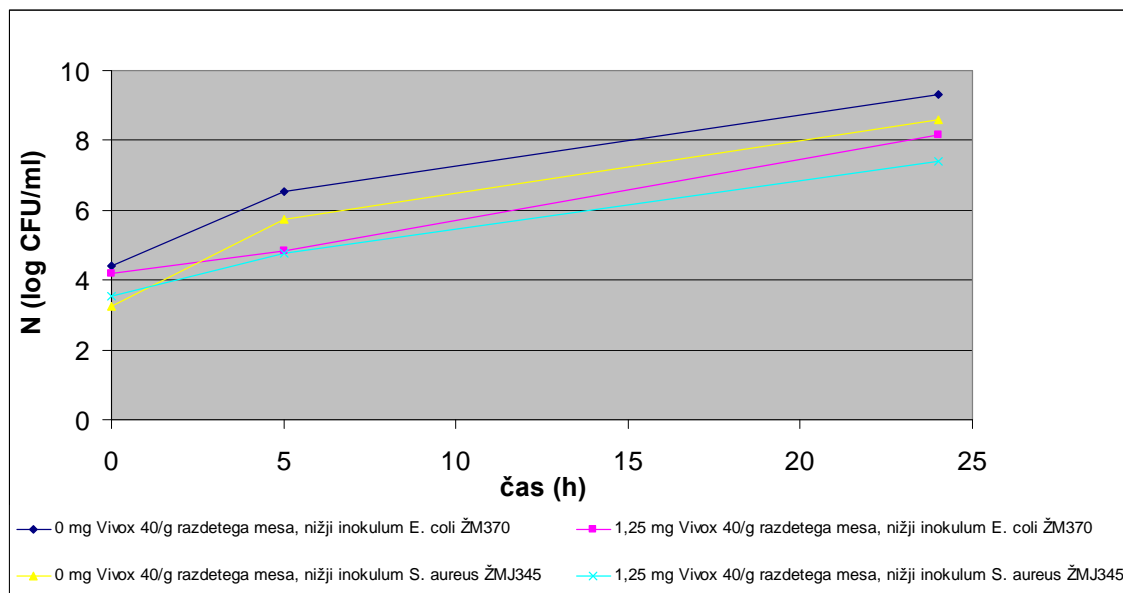


Slika 31: Rast bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 v razdetem mesu z epigalokatehin galatom

Na sliki 31 vidimo, da med grampozitivno in gramnegativno vrsto bakterij ni razlik v protimikrobnem delovanju EGKG, saj je inhibicija rasti enaka. V primerjavi z rezultati dobljenimi v mikrobiološkem gojišču TSB je razvidno, da je za enak protimikroben učinek v živilu pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 in bakterijah vrste *E. coli* ŽM370 potrebna 12-krat višja koncentracija protimikrobne snovi.

#### 4.3.2 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 40 v razdetem mesu

Pri nižjem začetnem številu bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 smo preizkusili ekstrakt Vivox 40 s koncentracijo 1,25 mg/g mesa. Na sliki 32 vidimo, da se je število celic v primerjavi s kontrolo po 24 urah zmanjšalo za 1 logaritemsko enoto pri obeh vrstah bakterij kar pomeni zadovoljivo inhibicijo rasti.

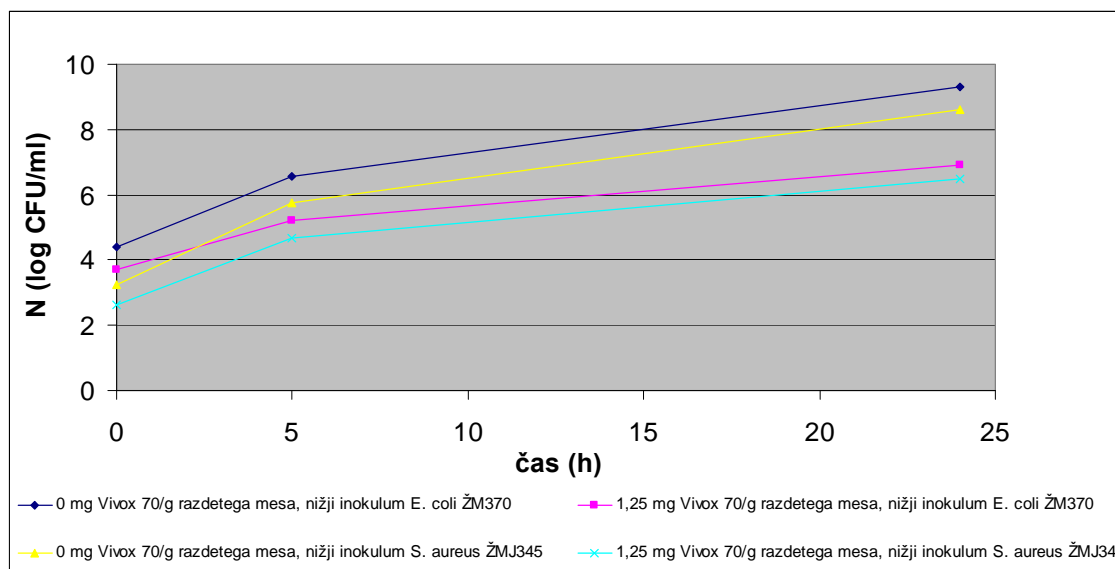


Slika 32: Rast bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 v razdetem mesu z ekstraktom Vivox 40

Na sliki 32 vidimo, da med grampozitivno in gramnegativno vrsto bakterij ni razlik v protimikrobnem delovanju ekstrakta Vivox 40, saj je inhibicija rasti enaka. V primerjavi z rezultati dobljenimi v mikrobiološkem gojišču TSB je razvidno, da je za enak protimikroben učinek v živilu pri bakterijah vrste *S. aureus* ŽMJ345 in bakterijah vrste *E. coli* ŽM370 potrebna 12-krat višja koncentracija protimikrobne snovi.

#### 4.3.3 Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 v razdetem mesu

Protimikrobni učinek ekstrakta Vivox 70 smo v mletem mesu preizkusili pri nižjem začetnem številu bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 s koncentracijo 1,25 mg/g mesa. Na sliki 33 vidimo, da je koncentracija 1,25 mg/g mesa inhibirala rast obeh testiranih vrst bakterij za več kot 1 logaritemsko enoto, kar pomeni MIC.



Slika 33: Rast bakterij vrst *S. aureus* ŽMJ345 in *E. coli* ŽM370 v razdetem mesu z ekstraktom Vivox 70

Na sliki 33 vidimo, da je ekstrakt Vivox 70 učinkovit tudi v razdetem mesu, vendar pa smo testirali le najvišjo koncentracijo. Število bakterijskih celic se je po 24 urah v primerjavi s kontrolo zmanjšalo za dva logaritma, po izbrani definiciji za MIC pa je znižanje za 1 logaritemsko enoto že dovolj za določitev vrednosti MIC. To pomeni, da bi lahko testirali tudi koncentracijo 0,625 mg/g mesa.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je EGKG enako učinkovit kot ekstrakt Vivox 70, ter bolj učinkovit kot ekstrakt Vivox 40. Poleg tega lahko sklepamo, da je Vivox 70 tudi v mesu bolj učinkovit od Vivox 40. Grampozitivne bakterije in gramnegativne bakterije se ne razlikujejo v občutljivosti na ekstrakt.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo na podlagi eksperimentov spoznali, da obstajajo razlike v protimikrobnem delovanju enostavnih fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov na grampozitivne in gramnegativne bakterije. Protimikrobna učinkovitost je odvisna od vrste protimikrobne snovi, vrste bakterij, začetne koncentracije bakterijskih celic in od vrste gojišča. Protimikrobni učinek izbranih snovi smo določali z dvema metodama in v zaključnem delu dobljene rezultate o protimikrobnem delovanju izbranih snovi preizkusili tudi v umetno kontaminiranem živilu.

#### 5.1.1 Primerjava metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB

Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin in ekstraktov rožmarina ter žajblja smo določili z dvema različnima metodama. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici smo lahko v eni mikrotiterski ploščici testirali 3 različne protimikrobne spojine v 7 različnih koncentracijah oz. 1 protimikrobno spojino v 7 različnih koncentracijah in na 3 bakterijske seve. Ta metoda je zelo uporabna, ker lahko naenkrat testiramo veliko vzorcev in hkrati porabimo malo materiala, saj je volumen ene luknjice na ploščici 200  $\mu$ l. Metoda je zato idealna za rutinsko testiranje. Lahko jo uporabljamo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih metod (Klančnik in sod., 2009). Prednost mikrotiterskih plošč je tudi ta, da se lahko pripravijo vnaprej in se do uporabe shranijo na sobni temperaturi (Klančnik in sod., 2009). Metoda je lahko ponovljiva. Rezultati, ki smo jih dobili, so semikvantitativni in zato smo za natančno določanje protimikrobnega učinka uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo glede na rezultate metode v mikrotiterski plošči lahko testirali le 3 različne koncentracije posamezne protimikrobne snovi in tako potek in obseg dela zelo skrajšali. Rezultati, ki smo jih dobili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču so kvantitativni v smislu določitve števila bakterijskih celic. Iz pridobljenih podatkov smo lahko narisali rastne krivulje celic (Burt, 2004).

### 5.1.2 Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin in ekstraktov rožmarina ter žajblja na grampozitivne in gramnegativne bakterije

Preden smo naredili eksperimente z izbranimi vrstami bakterij, smo predvidevali, da med njimi obstajajo razlike v občutljivosti na protimikrobne snovi. In sicer naj bi bile grampozitivne bakterije bolj občutljive na protimikrobne snovi kot gramnegativne. Z našimi eksperimenti smo to domnevo tudi potrdili. Kot merilo za občutljivost bakterij smo si izbrali minimalno inhibitorno koncentracijo protimikrobne snovi - MIC, to je bila tista koncentracija, pri kateri se je število bakterij po 24 urah, v primerjavi s kontrolo, zmanjšalo za 1 logaritemsko enoto (Burt, 2004). Na slikah od 13 do 30 in v prilogah od A 1 do A 12 so krivulje rasti bakterij sevov *S. aureus* ŽMJ345, *S. aureus* ŽMJ346, *S. aureus* ŽMJ348, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM352 in *E. coli* ŽM370, s katerimi smo določili vrednosti MIC posamezne snovi. Vsi rezultati kažejo, da so grampozitivne bakterije dejansko bolj občutljive na protimikrobne snovi, saj smo za vse grampozitivne bakterije določili nižje vrednosti MIC fenolnih spojin in ekstraktov kot za gramnegativne bakterije. Razlog za to naj bi bil v sestavi celične stene, saj je med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami prav v tem velika razlika.

Grampozitivne bakterije imajo celično steno iz ene plasti, ki je sestavljena iz peptidoglikana, dveh vrst tejhonske kisline in polisaharidov. Gramnegativne bakterije imajo celično steno sestavljeno iz treh plasti. Notranja plast je iz peptidoglikana, drugi dve plasti pa jo obdajata navzven. Ti plasti sta zunanja membrana in periplazmatski prostor. Zunanja membrana je sestavljena iz lipopolisaharidov in porinov. Periplazmatski prostor povezuje zunanjo membrano s peptidoglikanskim slojem. Periplazemski prostor vsebuje lipoproteine in vezavne proteine (Gubina in Ihan, 2002). Pri poizkusih z EGKG so znanstveniki ugotovili, da se na grampozitivne bakterije veže več EGKG, na gramnegativne bakterije pa manj. Poleg tega so ugotovili, da se EGKG veže na peptidoglikan. Ker je pri gramnegativnih bakterijah peptidoglikanska plast prekrita z zunanjo membrano, se nanj veže manj EGKG, kot se ga veže na grampozitivne bakterije, ki peptidoglikanske plasti nimajo zaščitene. Z vezavo EGKG na peptidoglikan v bakterijski steni, celica izgubi sposobnost deljenja, postane bolj občutljiva na spremembe osmotskega tlaka in upočasnjuje sintezo celične stene. Zaradi teh razlik so gramnegativne bakterije bolj odporne na delovanje protimikrobne snovi (Yoda in Zhao, 2004).

Glavna sestavina ekstrakta rožmarina je karnozolna kislina, ki je hkrati tudi najmočnejša protimikrobna snov v ekstraktu. Poleg karnozolne kisline imata zelo močen protimikrobni potencial še rozmanol in rožmarinska kislina (Tsai in sod., 2007). Karnozolna kislina na bakterije deluje tako, da se poveže na njihovo membrano oz. fosfolipidni dvosloj, pri tem se membrani spremeni njena rigidnost in posledično se spremeni propustnost membrane za različne snovi (Perez-Fons in sod., 2006).



### 5.1.3 Vpliv začetnega števila bakterij na protimikrobno učinkovitost fenolnih spojin in ekstraktov

Ne glede na vrsto uporabljene metode (metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici ali metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB) in ne glede na vrsto bakterij smo vedno pri nižjem začetnem številu bakterij določili nižje vrednosti MIC kot pri višjem številu. V preglednicah 7 in 8, slikah od 13 do 30, ter prilogah od A 1 do A 12 je razvidno, da so koncentracije rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin, pri katerih smo dobili vrednosti MIC, nižje pri nižjih inokulacijah. Temu pojavu znanstveniki pravijo »inokulum učinek«, saj je protimikrobno delovanje spojin odvisno od velikosti inokuluma (Bidlas in sod., 2008). Začetno število bakterijskih celic, ki je manjše od  $10^5$  CFU/ml ne vpliva na protimikrobno aktivnost ekstraktov, ko pa začetni inokulum preseže  $10^5$  CFU/ml, se protimikrobna aktivnost ekstraktov začne bistveno zmanjševati. Večje kot je število celic v inokulumu, manjši je učinek protimikrobne snovi (Tam in sod., 2009). Do danes ni bilo natančno ugotovljeno, zakaj nastane »inokulum učinek«. Po zdajšnjih razlagah naj bi ta efekt povzročila heterogenost bakterijske populacije in komuniciranje med bakterijami (quorum sensing) (Bidlas in sod., 2008). Vpliv začetnega števila bakterij na protimikrobno delovanje snovi je tudi posledica tega, da se enaka koncentracija protimikrobne snovi pri višjem inokulumu razporedi med več bakterij, kot se mora pri nižjem inokulumu, in zaradi tega na posamezno bakterijo deluje manjši delež te snovi (Lass-Flörl in sod., 2003). Ena od razlag je tudi ničelna teorija, po kateri naj bi bil »inokulum učinek« posledica časa, ki je potreben za rast/odmiranje bakterij v določenih razmerah. To pomeni, da bi bakterije, pri neki koncentraciji protimikrobne snovi, dosegle enako končno koncentracijo oziroma število neodvisno od začetnega inokuluma, le čas za doseg končne koncentracije bi bil pri višjem inokulumu daljši (Bidlas in sod., 2008).

### 5.1.4 Protimikrobna aktivnost rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin

Testirali som tri rastlinske ekstrakte Vivox 40, Vivox 70 in žajbljev ekstrakt. Ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70 sta ekstrakta rožmarina, ki se med sabo razlikujeta po deležu karnozolne kisline. Vivox 40 ima 40 % karnozolne kisline in Vivox 70 ima 70 % karnozolne kisline. Poleg ekstraktov smo testirali tudi tri fenolne spojine galno kislino, klorogensko kislino in epigalokatehin galat. Iz rezultatov lahko sklepamo, da so rastlinski ekstrakti bolj učinkoviti od čistih fenolnih spojin. Izjema je le epigalokatehin galat, ki je enako učinkovit kot ekstrakt Vivox 70.

Znanstveniki so naredili podobne eksperimente, pri katerih so testirali rastlinske ekstrakte in nato še posamezne kemijske spojine izolirane iz ekstraktov. Ugotovili so, da so imeli ekstrakti boljše učinke kot pa posamezne izolirane komponente. Iz tega so sklepali, da kemijske spojine v ekstraktih delujejo sinergistično, zaradi česar je bil protimikrobni učinek večji. Sinergistično delujejo tudi spojine, ki so v ekstraktih prisotne v zelo majhnih količinah (Burt, 2004).

Med ekstraktoma rožmarina smo opazili različno učinkovitost na bakterije pri ekstraktu Vivox 70, ki je vseboval več karnozolne kisline. Vsebnost karnozolne kisline v ekstraktu rožmarina je pomemben protimikrobni dejavnik, saj sta karnozolna kislina in karnozol najmočnejši protimikrobni komponenti (Klančnik in sod., 2009).

### 5.1.5 Vpliv živila na protimikrobno aktivnost fenolnih spojin in ekstraktov

V diplomskem delu smo med drugim želeli ugotoviti ali obstajajo razlike v protimikrobnem delovanju izbranih snovi, če jih uporabimo v gojišču ali v živilu. Kot gojišče smo uporabili TSB, kot živilo pa mešano razdeto meso. Izkazalo se je, da so protimikrobne snovi v živilih protimikrobno manj učinkovite na bakterije, kot pa so v laboratorijskih gojiščih. Protimikrobna učinkovitost se je zmanjšala tako pri grampozitivnih bakterijah kot tudi pri gramnegativnih bakterijah. Na slikah 31 do 33 so rastne krivulje grampozitivnih bakterij vrste *S. aureus* ŽMJ345 in gramnegativnih bakterije vrste *E. coli* ŽM370. Testirali smo le nižji inokulum, ker pri višjem vrednosti MIC nismo dobili že z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici. Uporabili smo le najvišje koncentracije obeh ekstraktov rožmarina in epigalokatehin galata. Izkazalo se je, da je v živilu protimikrobna aktivnost ekstrakta rožmarina in fenolne spojine enaka tako pri grampozitivnih bakterijah, kot tudi pri gramnegativnih bakterijah, medtem ko je bilo v laboratorijskih gojiščih delovanje rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin na grampozitivne bakterije bolj učinkovito, kot na gramnegativne bakterije. Poleg tega smo ugotovili, da je bila tudi v živilu protibakterijska aktivnost ekstraktov različna. In sicer je bil Vivox 40 manj učinkovit kot Vivox 70, saj so bile vrednosti MIC pri Vivox 70 nižje. Epigalokatehin galat pa je bil bolj učinkovit kot Vivox 40 in enako učinkovit kot Vivox 70, ker je imel MIC vrednosti enake kot so bile pri ekstraktu Vivox 70 in manjše od vrednosti MIC pri ekstraktu Vivox 40.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da protimikrobna aktivnost snovi v živilih, v primerjavi z laboratorijskimi gojišči, upade. Protimikrobna aktivnost snovi je v živilu enaka tako za grampozitivne, kot tudi za gramnegativne bakterije. Se pa v živilu še vedno ohranijo razlike v učinkovitosti med ekstrakti in čistimi fenolnimi spojinami.

Po letu 1990 so raziskovalci začeli pri eksperimentih bolj pogosto uporabljati živila namesto laboratorijskih gojišč. Opazili so, da so bakterije v živilih bile bolj odporne na delovanje protimikrobnih snovi. Koncentracije potrebne za doseg MIC v živilu so bile večje od 2- do 100-krat, odvisno od vrste živila. Na podlagi eksperimentov so ugotovili, da na večjo odpornost bakterij v živilu vplivajo dejavniki, kot je večja dostopnost raznolikih hranil, fizična struktura živila, ter vsebnost maščob in beljakovin. Večja dostopnost hranil celicam omogoča hitrejšo popraviljanje poškodb nastalih zaradi delovanja protimikrobnih snovi. Struktura živila lahko onemogoči ali poslabša difuzijo protimikrobnih snovi v živilu. Velika vsebnost maščob in/ali beljakovin v živilu občutno zmanjša delovanje protimikrobne snovi na bakterije. Npr.: če eterično olje raztopimo v maščobni fazi živila, bo njegovo protimikrobno delovanje na bakterije, ki so v vodni fazi živila, slabše. Vsebnost ogljikovih hidratov ne zmanjša protimikrobne učinkovitosti spojin v tolikšni meri kot jo maščobe in beljakovine. V primerjavi z laboratorijskimi gojišči živila vsebujejo manj vode, manj vode pa zmanjša sposobnost prodiranja protimikrobnih snovi v bakterijske celice. Večja vsebnost vode in/ali soli v živilu pa pospeši delovanje protimikrobnih spojin (Burt, 2004).

## 5.2 SKLEPI

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici in metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo določili protimikrobno delovanje izbranih snovi tako, da smo določili vrednosti MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) za 3 fenolne spojine (galna kislina, klorogenska kislina in epigalokatehin galat) in 3 rastlinske ekstrakte (ekstrakt Vivox 40, ekstrakt Vivox 70 in ekstrakt žajblja) za 3 grampozitivne (*S. aureus* ŽMJ345, *S. aureus* ŽMJ346 in *S. aureus* ŽMJ348) in 3 gramnegativne bakterije (*S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM352 in *E. coli* ŽM370). Uporabili smo dva različna inokuluma bakterij ( $10^3$  CFU/ml in  $10^7$  CFU/ml), da bi ugotovili ali med njima obstajajo razlike. Protimikrobno aktivnost smo določali v gojišču TSB in v mešanem razdetem mesu. Iz rezultatov pridobljenih pri našem delu, lahko sklepamo naslednje:

- Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici je manj natančna od metode razredčevanja v tekočem gojišču TSB, vendar zelo skrajša izvedbo eksperimentalnega dela, saj z njo lahko okvirno določimo koncentracijo snovi, ki ima protimikrobni učinek ob majhni porabi materiala in dela.
- Vrednosti MIC določene za grampozitivne bakterije vrst *S. aureus* ŽMJ345, *S. aureus* ŽMJ346 in *S. aureus* ŽMJ348 so nižje od vrednosti MIC določene za gramnegativne bakterije vrst *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM352 in *E. coli* ŽM370 za galno kislino, klorogensko kislino, EGKG, ekstrakt Vivox 40, ekstrakt Vivox 70 in ekstrakt žajblja.
- Pri višjem začetnem številu bakterij so vrednosti MIC višje kot pri nižjem začetnem številu bakterij.
- Vrednosti MIC dobljene za različne seve iste vrste bakterij se bistveno ne razlikujejo.
- Rastlinski ekstrakti so protimikrobno bolj učinkoviti od čistih fenolnih spojin.
- Za inhibicijo bakterijske rasti v mešanem razdetem mesu so potrebne višje koncentracije posamezne protimikrobne snovi, kot so bile vrednosti MIC določene v gojišču TSB.

## 6 POVZETEK

V živilski industriji so zaradi zahtev potrošnikov vedno bolj v uporabi mili načini konzerviranja in naravni konzervansi (Smole-Možina in sod., 2009). Pomembno vlogo pri pridobivanju takih konzervansov imajo rastline, zelišča in začimbe, saj so bogat vir zlasti fenolnih spojin, za katere je poznano, da imajo močno protimikrobno in antioksidativno delovanje. Fenolne spojine se v živilstvu ne uporablja samo kot konzervanse, ampak imajo tudi pomembno vlogo kot barvila, arome, za okus, ter za preprečevanje neprijetnega vonja in okusa živil (Zhao in sod., 2010). Kljub razviti kemijski tehnologiji, se veliko protimikrobnih spojin pridobiva iz rastlin in ne z umetno sintezo, saj za nekatere postopki sintetiziranja še niso poznani, ali pa so predragi (Rates, 2001).

Sestava bakterijske celične stene ima zelo pomembno vlogo pri protimikrobnem delovanju rastlinskih ekstraktov in fenolnih spojin na bakterije. Gramnegativne bakterije imajo peptidoglikansko plast celične stene z zunanje strani zaščiteno z membrano, ki preprečuje, da bi se protimikrobna snov vezala nanjo (Yoda in Zhao, 2004). Grampozitivne bakterije te plasti nimajo, zato so bolj občutljive na delovanje protimikrobnih snovi. Z eksperimentom smo potrdili, da obstajajo velike razlike v protimikrobni učinkovitosti fenolnih spojin in rastlinskih ekstraktov na grampozitivne in gramnegativne bakterije.

Vedno bolj pomembno postaja spoznanje, da kombinacija umetnih konzervansov z naravnimi protimikrobnimi spojinami deluje sinergistično, enako velja tudi za kombinacije več različnih naravnih spojin. Z eksperimentom z rastlinskimi ekstrakti smo pokazali, da ima kombinacija več različnih spojin boljše protimikrobno delovanje od posamezne komponente. Seveda obstajajo tudi kombinacije snovi, pri katerih je delovanje antagonistično, kar pomeni, da je njihovo delovanje boljše, če se jih uporablja ločeno (Burt, 2004). Testirali smo dva ekstrakta rožmarina in en ekstrakt žajblja. Rožmarinova ekstrakta sta se ločila po vsebnosti karnozolne kisline, saj jo je eden vseboval 40 %, drugi 70 %. Ugotovili smo, da ima vsebnost te kisline velik vpliv na učinkovitost ekstrakta. Bolj učinkovit je bil ekstrakt z več karnozolne kisline. V primerjavi s posameznimi fenolnimi spojinami so bili od njih vsi ekstrakti bolj učinkoviti. Izjema je bil le epigalokatehin galat, ki je bil enako učinkovit kot ekstrakti.

Za določanje protimikrobne aktivnosti smo uporabili dve različni metodi. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotiterski ploščici, ki je kvantitativno manj natančna, smo lahko testirali veliko vzorcev naenkrat. Uporabili smo jo za določanje približnih MIC vrednosti. Z drugo metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo testirali dobljene vrednosti MIC ter eno višjo koncentracijo in eno nižjo koncentracijo od MIC. Pokazalo se je, da večina MIC vrednosti dobljenih z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici, ni bilo točnih. S pomočjo metode razredčevanja v tekočem gojišču smo pokazali, da so se sicer nekatere MIC ujemale, večina pa jih je bila dejansko za eno koncentracijo nižja. Razlog za deloma različne rezultate lahko pripišemo težjemu odčitavanju rezultatov pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici, saj je lahko bila v nekaterih vzorcih sprememba barve vizuelno skoraj neopazna.

Ker se bodo potencialni naravni konzervansi uporabljali v živilih, nas je zanimalo, koliko so testirane protimikrobne snovi učinkovite v živilu. Potem, ko smo izvedli eksperimente v laboratorijskih gojiščih, smo protimikrobne snovi testirali še v razdetem mesu, ki je služilo kot gojišče. Ugotovili smo, da se v živilu protimikrobno delovanje spojin na bakterije zmanjša za 12-krat in več. Na poslabšanje protimikrobne aktivnosti vpliva sama kemijska sestava in fizična struktura živila. Raziskovalci so ugotovili, da maščobe in beljakovine v živilu na bakterije delujejo zaščitno. Fizična struktura živila pa lahko zelo poslabša prodiranje protimikrobne snovi v živilo. Delovanje protimikrobne snovi izboljša oz. olajša, če je v živilu prisotne več vode, sol in nižji pH živila (Burt, 2004).

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 23-32
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-45
- Alberto M.R., Farias M.E., Manca de Nadra M.C. 2001. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4359-4363
- Bidlas E., Du T., Lambert R.J.W. 2008. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. International Journal of Food Microbiology, 126: 140-152
- Bouaziz M., Yangui T., Sayadi S., Dhouib A. 2009. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. Food and Chemical Toxicology, 47: 2755-2760
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253
- Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A., Kilburn J.D., Rakariyatham N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides Leguminosae*. Food Chemistry, 100: 1044-1048
- Chiu C.H., Su L.H., Chu C. 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. Clinical Microbiology Reviews, 17, 2: 311-322
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 4: 564-582
- Glisic S., Ivanovic J., Ristic M., Skala D. 2010. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. Journal of Supercritical Fluids, 52: 62-70
- Gould G.W. 2004. Microbiological and other aspects of food safety. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10
- Gubina M., Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana, Medicinski razgledi: 543 str.

- Hatano T., Tsugawa M., Kusuda M., Taniguchi S., Yoshida T., Shiota S., Tsuchiya T. 2008. Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry*, 69: 3111-3116
- Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. 2009. Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and *in vitro* assays. *Journal of Chromatography A*, 10: 1016-1025
- Kadulja. 2009. Zagreb, Priroda liječi / NIKEL.  
[http://www.nikelcosmetics.com/prirodni\\_sastojci.asp?SID=33&lang=hr](http://www.nikelcosmetics.com/prirodni_sastojci.asp?SID=33&lang=hr) (18.3.2010): 1 str.
- Kaefer C.M., Milner J.A. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 347-361
- Kang J., Liu Y., Xie M.X., Li S., Jiang M., Wang Y.D. 2004. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674: 205-214
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 29-30 jan. 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-157
- Kunkel D. 2009. *E. coli* serotype O157:H7. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography.  
<http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3&sort=1a&page=29> (18.3.2010): 1 str.
- Kunkel D. 2009. *Salmonella Enteritidis*. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography.  
<http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3&sort=1a&page=15> (18.3.2010): 1 str.
- Kunkel D. 2009. *Salmonella typhimurium*. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography.  
<http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3&sort=1a&page=55> (18.3.2010): 1 str.
- Kunkel D. 2009. *Staphylococcus aureus*. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography.  
<http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3&sort=1a&page=57> (18.3.2010): 1 str.
- Kuštrak D. 2005. Farmakognozija - fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing - Tehnička knjiga: 615 str.
- Lass-Flörl C., Speth C., Kofler G., Dierch M.P., Gunsilius E., Würzner R. 2003. Effect of increasing inoculum sizes of *Aspergillus hyphae* on MICs and MFCs of antifungal agents by broth microdilution method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21: 229-233

- Madlener S., Illmer C., Horvath Z., Saiko P., Losert A., Herbacek I., Grusch M., Elford H.L., Krupitza G., Bernhaus A., Fritzer-Szekeres M., Szekeres T. 2007. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, 245: 156-162
- Mastroeni P., Sheppard M. 2004. *Salmonella* infections in the mouse model: Host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes and Infection*, 6: 398-405
- Moghtader M., Afzali D. 2009. Study of the antimicrobial properties of the essential oil of rosemary. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 5, 3: 393-397
- Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201
- Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 219-222
- Nychas G.J.E. 2005. Natural antimicrobials from plant. V: New methods of food preservation. Gould G.W. (ur.). London, Blackie Academic & Professional: 59-89
- Perez-Fons L., Aranda F.J., Guillen J., Villalain J., Micol V. 2006. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453: 224-236
- Po-Jung T., Tzung-Hsun T., Su-Chen H. 2007. *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*, 105: 311-316
- Rates S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613
- Rosemary. 2010. Carson, BDS Natural Products.  
<http://www.bdsnatural.com/> (18.3.2010): 1 str.
- Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162: 981-987
- SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krmil - Horizontalna metoda za štetje mikroorganizmov - Štetje kolonij pri 30 °C. 2003: 2 str.



- Smole Možina S., Klančnik A., Raspor P. 2009. Protimikrobne snovi v živilih in živilstvu. V: Protimikrobne snovi. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 29-30 jan. 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 34-46
- Sun Y., Hung W.C., Chen F.Y., Lee C.C., Huang H.W. 2009. Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 96: 1026-1035
- Tam V.H., Ledesma K.R., Chang K.T., Wang T.Y., Quinn J.P. 2009. Killing of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactams at different inocula. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64: 166-171
- Woods G.L., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical microbiology*. Murrey P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenoer F.C., Tenover R.H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341
- Xiang Z., Ning Z. 2008. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1189-1203
- Yoda Y., Hu Z.Q., Zhao W.H. 2004. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10: 55-58
- Zhao M., Wang H., Yang B., Tao H. 2010. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 120: 1138-1142

## **8 ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za odlično vodstvo in strokovno pomoč pri laboratorijskem delu ter pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se za stalno dosegljivost ter natančen in hiter pregled diplomske naloge.

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

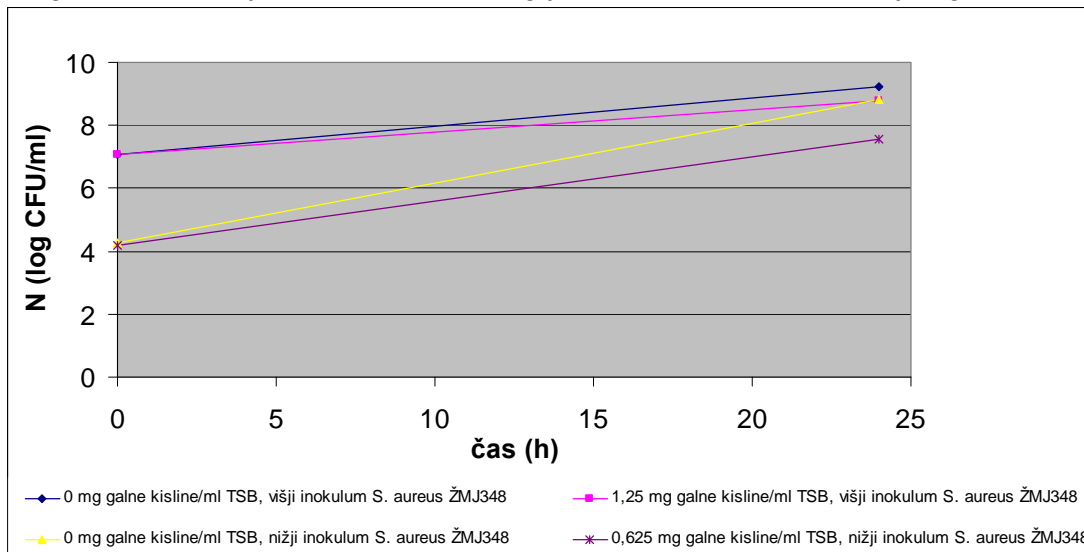
Zahvaljujem se Saši Piskernik in Iztoku Boraku za pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se univ. dipl. ing. Ivici Hočevar za tehnični pregled diplomske naloge.

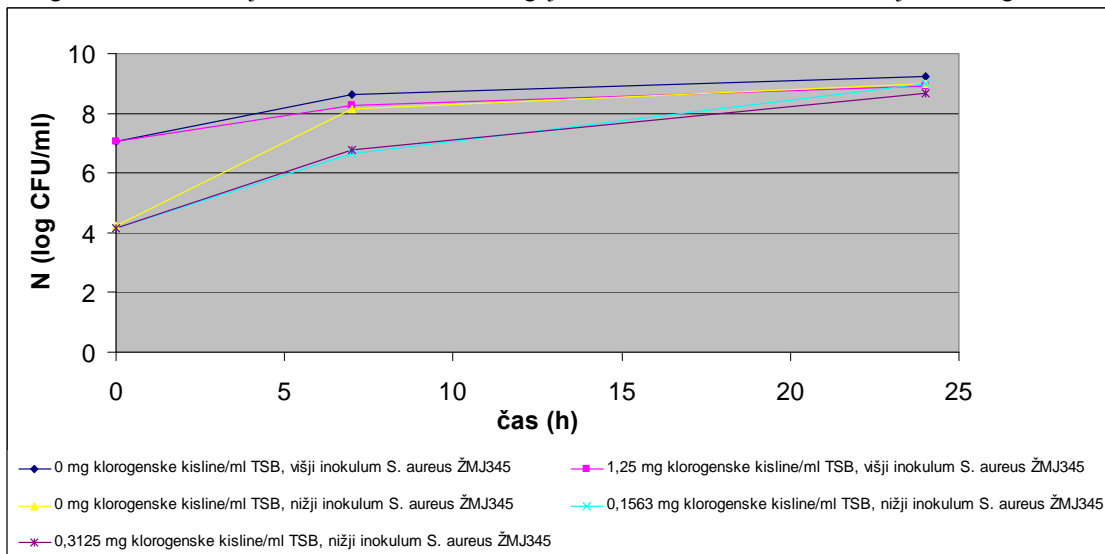
Zahvaljujem se svojemu fantu za vso podporo in razumevanje.

## 9 PRILOGE

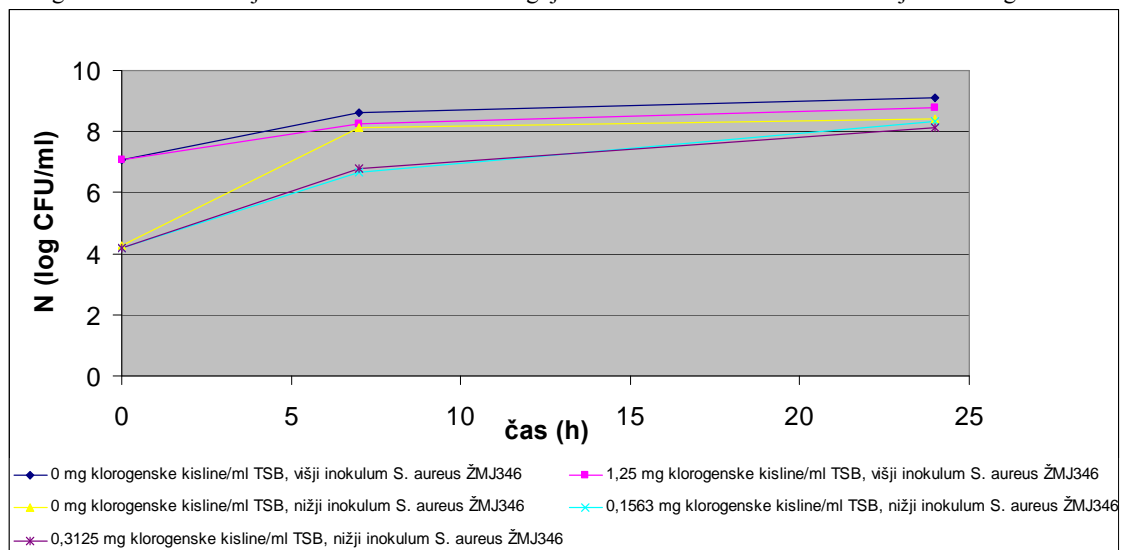
Priloga A 1: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami galne kisline



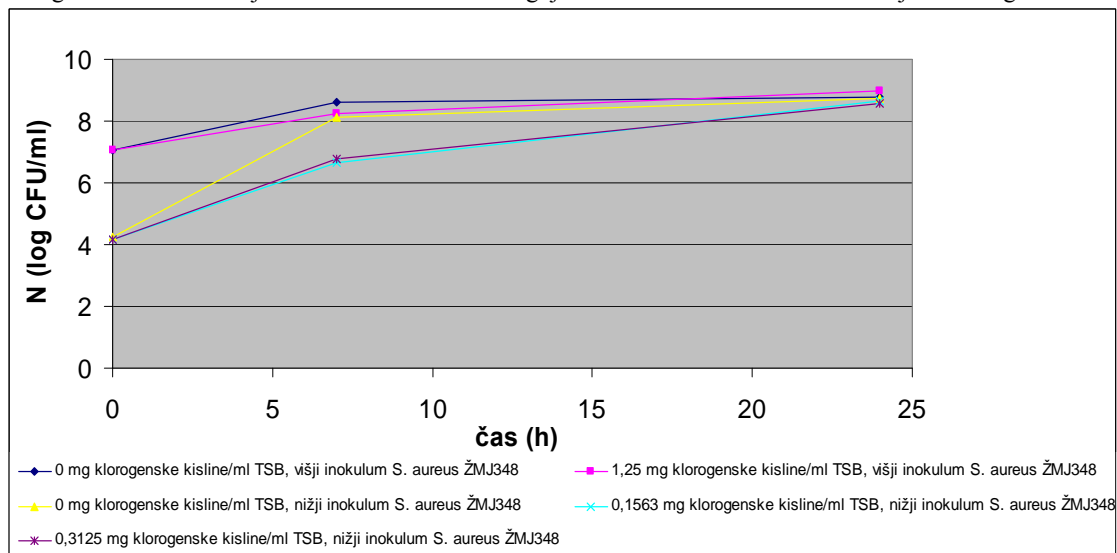
Priloga A 2: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ345 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline



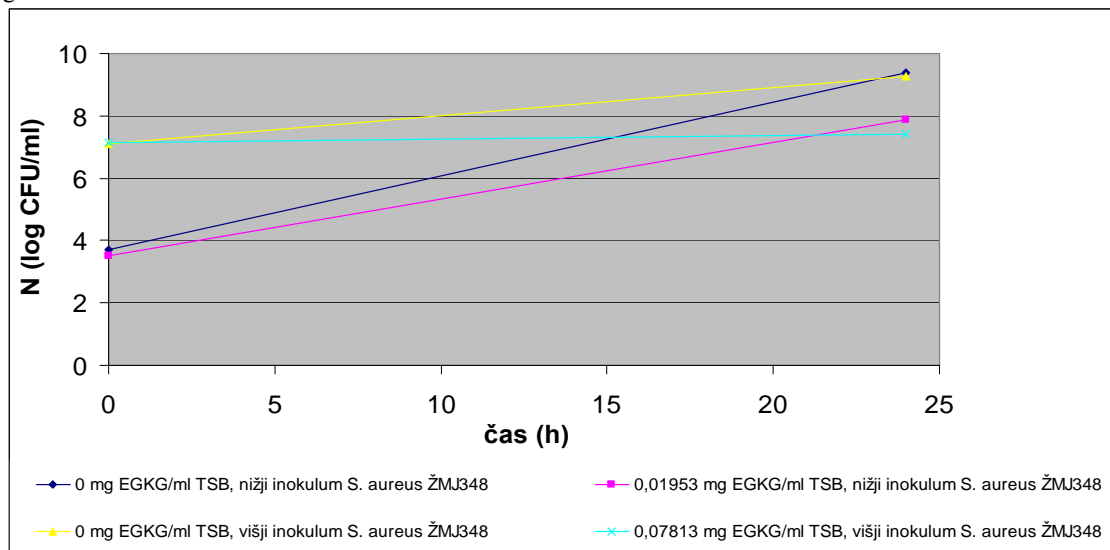
Priloga A 3: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ346 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline



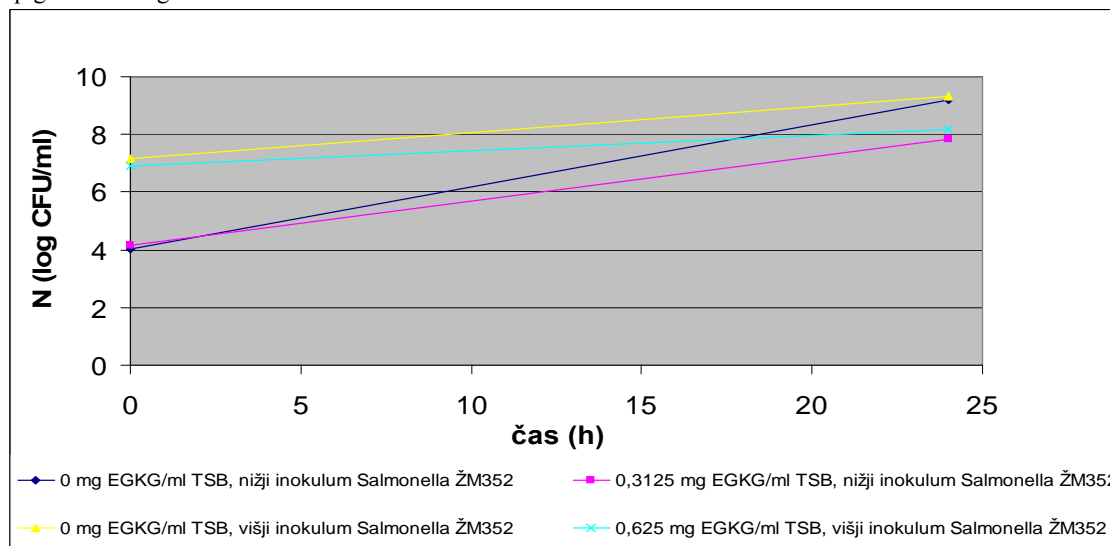
Priloga A 4: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami klorogenske kisline



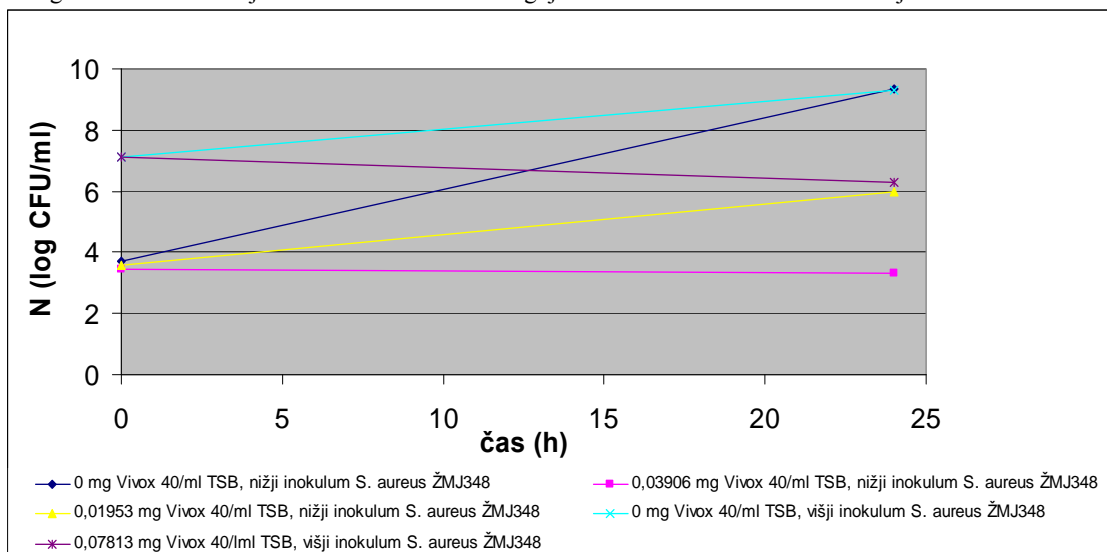
Priloga A 5: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata



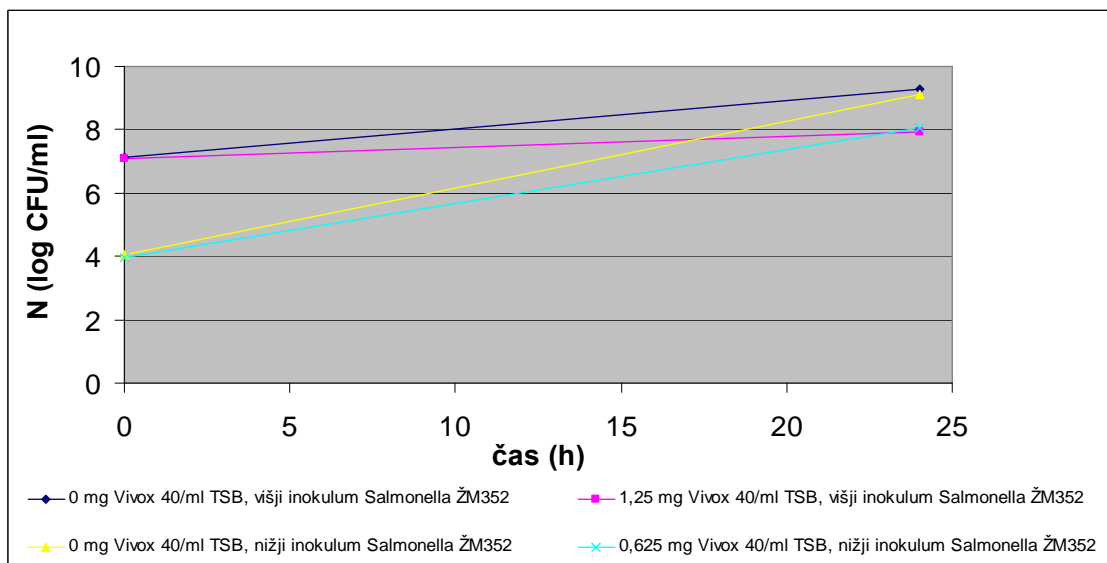
Priloga A 6: Rast bakterij seva *Salmonella* Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami epigalokatehin galata



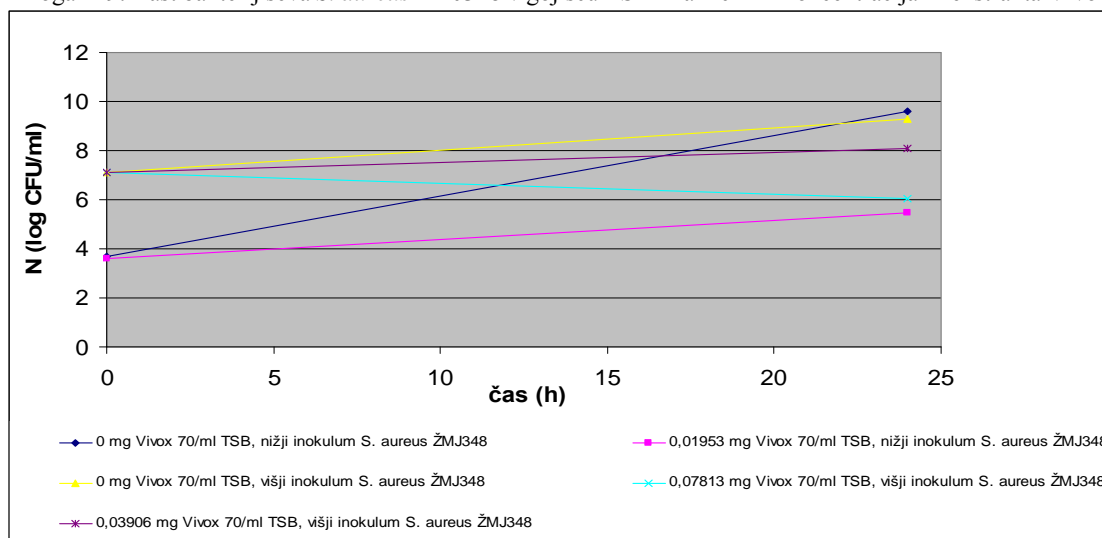
Priloga A 7: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40



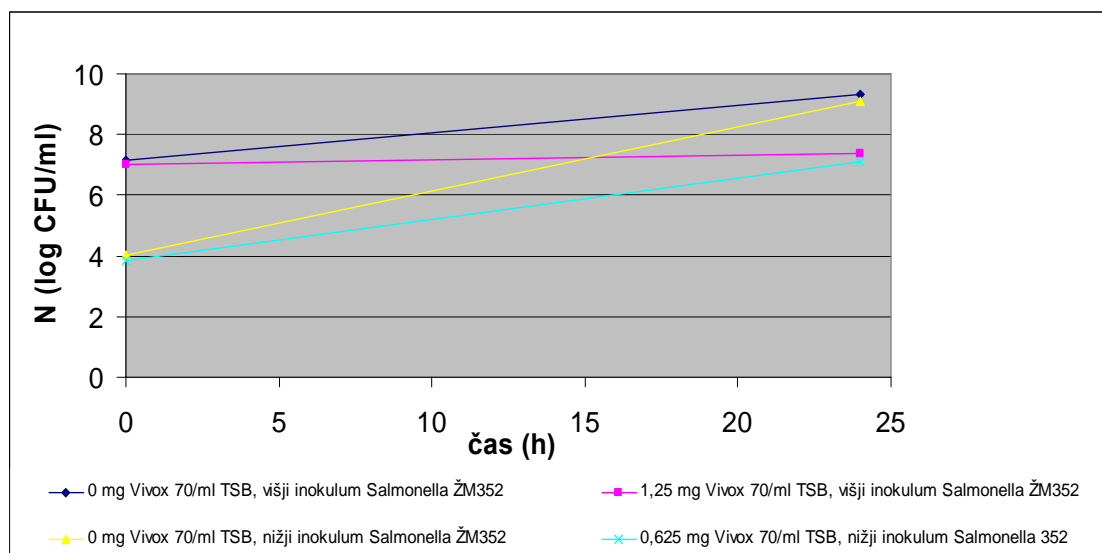
Priloga A 8: Rast bakterij seva *Salmonella* Typhimirium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 40



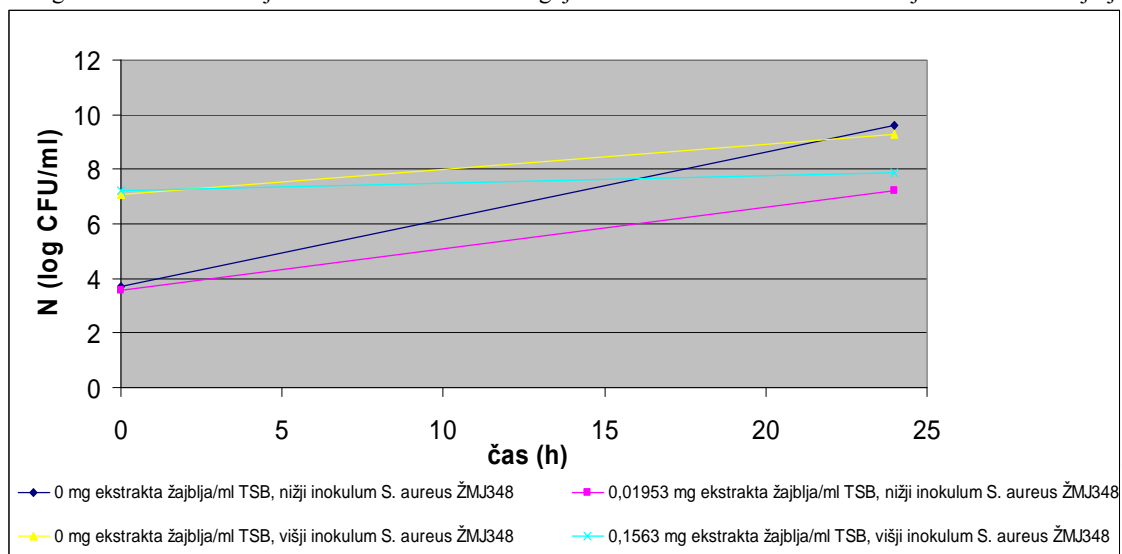
Priloga A 9: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70



Priloga A 10: Rast bakterij seva *Salmonella* Typhimirium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta Vivox 70



Priloga A 11: Rast bakterij seva *S. aureus* ŽMJ348 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja



Priloga A 12: Rast bakterij seva *Salmonella* Typhimurium ŽM352 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami ekstrakta žajblja

