

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tina Kutin

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IZ  
NAVADNEGA RIČKA (*Camelina sativa*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS FROM GOLD OF  
PLEASURE (*Camelina sativa*)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico doc. dr. Heleno Abramovič in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Kutin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.24:547.56(043)=163.6  
KG protimikrobne snovi/ekstrakt semen navadnega rička/ekstrakti rožmarina/fenolne spojine/*Staphylococcus aureus*/*Bacillus cereus*/rast mikroorganizmov/minimalna inhibitorna koncentracija/MIC/metoda dilucije v agarju/metoda difuzije v agarju z diski  
AV KUTIN, Tina  
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAMOVIČ, Helena (somentorica)/  
ABRAM, Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2008  
IN PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST RASTLINSKIH EKSTRAKTOV IZ  
NAVADNEGA RIČKA (*Camelina sativa*)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 56 str., 10 pregl., 24 sl., 63 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen diplomskega dela je bil ugotoviti protimikrobno učinkovitost ekstrakta iz semen navadnega rička v primerjavi s protimikrobno učinkovitostjo čistih fenolnih kislin in rožmarinovitih ekstraktov na bakterije *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*. Uporabili smo metodo difuzije v agarju z diski, metodo dilucije v agarju in spremljali kinetiko odmiranja bakterij po dodatku ekstrakta v tekoče gojišče. Pri metodi dilucije v agarju smo za ekstrakt semen navadnega rička pri bakteriji *B. cereus* določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) 0,63 mg fenolnih spojin/ml gojišča, pri bakteriji *S. aureus* pa 1,25 mg fenolnih spojin/ml gojišča. MIC vrednosti pri metodi difuzije v agarju so bile višje, zato jih nismo mogli določiti. S spremljanjem krivulje rasti/odmiranja smo skušali določiti kinetiko protimikrobnega delovanja izbranih ekstraktov, v koncentracijah MIC, določenih v agarju. Po 24-urni inkubaciji bakterij *Staphylococcus* smo ugotovili, da višja koncentracija dodanega ekstrakta deluje celo baktericidno, nižja pa je zavrla rast bakterij. Pri sporogenih bakterijah *Bacillus* pa sta obe koncentraciji le zavrla rast bakterij. Med čistimi fenolnimi kislinami je bila najbolj učinkovita karnozolna kislina, vrednost MIC je pri obeh vrstah bakterij znašala 0,16 mg fenolnih spojin/ml gojišča. Protimikrobna učinkovitost ekstraktov je v povezavi z njihovo sestavo. Najbolj učinkoviti so rožmarinovit ekstrakti, ki vsebujejo največ karnozolne kisline. Vsi ekstrakti, vključno z ekstraktom semen navadnega rička, so bili bolj učinkoviti od čistih fenolnih kislin, ki jih vsebujejo, kar kaže na sinergistično delovanje različnih fenolnih spojin v rastlinskih ekstraktih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24:547.56(043)=163.6  
CX antimicrobials/extract from gold of pleasure seeds/rosemary extracts/phenolic compounds/*Staphylococcus aureus*/*Bacillus cereus*/growth of microorganisms/minimal inhibitory concentration/MIC/disc diffusion method/agar dilution method  
AU KUTIN, Tina  
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAMOVIČ, Helena (co-advisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2008  
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS FROM GOLD OF PLEASURE (*Camelina sativa*)  
DT Graduation thesis (University studies)  
OP XI, 56 p., 10 tab., 24 fig., 63 ref.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI The aim of this research was to investigate antimicrobial activity of extract from gold of pleasure seeds in comparison with pure phenolics acids and rosemary extracts against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. We have used disk diffusion method, agar dilution method and kinetics of antibacterial activity after adding extracts in liquid media. Minimal inhibitory concentration (MIC) values determined with the dilution method for extract from gold of pleasure seeds for *Bacillus* and *Staphylococcus* were 0,63 mg and 1,25 mg phenolic compounds/ml agar, respectively. MIC values determined with disc diffusion method were higher, therefore they could not be determined. With time-kill analysis we tried to determine kinetics of antibacterial activity of selected extracts, using MIC concentrations, determined in agar. MIC concentration from agar dilution test was even bactericidal during 24-h of incubation for *Staphylococcus*. MICs from dilution and diffusion test were inhibitory for *Bacillus*. Carnosic acid has the highest antimicrobial activity among pure phenolics acids, tested MIC values for both microorganisms were 0,16 mg phenolics compounds/ml. The antimicrobial activity of extracts is in close connection with their composition. The highest antimicrobial activity have extracts which contain the highest concentration of carnosic acid. All plant extracts tested expressed better antimicrobial activity against both tested organisms as pure phenolic compounds they contain. This indicates synergistic antimicrobial activity of different phenolic substances in plant extracts.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b> .....	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA .....	3
<b>2.1.1 Fenolne spojine v rastlinah</b> .....	<b>3</b>
2.1.1.1 Zgradba fenolnih spojin .....	4
2.1.1.2 Protimikrobno delovanje fenolnih spojin .....	8
<b>2.1.2 Navadni riček (<i>Camelina sativa</i>) kot vir protimikrobno aktivnih             fenolnih spojin</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1.3 Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)</b> .....	<b>12</b>
2.2 BAKTERIJE RODU <i>Staphylococcus</i> .....	13
2.3 BAKTERIJE RODU <i>Bacillus</i> .....	13
2.4 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI .....	15
2.5 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI .....	16
2.5.1 Difuzijske metode .....	17
2.5.2 Dilucijske metode .....	18
2.5.3 Kinetika rasti in odmiranja .....	18
2.5.4 Drugi načini .....	18
<b>3 MATERIAL IN METODE DELA</b> .....	<b>20</b>
3.1 POTEK DELA .....	20
3.2 MATERIAL .....	21
<b>3.2.1 Mikroorganizmi</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.2 Mikrobiološka gojišča</b> .....	<b>21</b>
3.2.2.1 Agar TSA (Tryptone Soya Agar) .....	21
3.2.2.2 Agar BCA ( <i>Bacillus cereus</i> Agar) .....	21
3.2.2.3 Tekoče gojišče TSB (Tryptone Soya Broth) .....	22

<b>3.2.3 Raztopine in dodatki</b> .....	<b>22</b>
3.2.3.1 Fiziološka raztopina.....	22
3.2.3.2 Drugo .....	22
<b>3.2.4 Kisline in ekstrakti</b> .....	<b>22</b>
3.2.4.1 Komercialno pripravljene kisline .....	22
3.2.4.2 Ekstrakt semen navadnega rička.....	23
3.2.4.3 Ekstrakti rožmarina .....	23
<b>3.2.5 Laboratorijska oprema</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 METODE DELA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.1 Revitalizacija bakterij</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.2 Priprava inokuluma</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.4 Izvedba difuzijske metode v agarju</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3.5 Izvedba dilucijske metode v agarju</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3.6 Izvedba dilucijske metode v bujonu oz. spremljanje kinetike</b> <b>inhibicije rasti/odmiranja bakterij</b> .....	<b>26</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>27</b>
4.1 DIFUZIJSKA METODA V AGARJU.....	28
4.2 DILUCIJSKA METODA V AGARJU .....	32
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV OBEH METOD .....	36
4.4 KINETIKA INHIBICIJE RASTI/ODMIRANJA V TEKOČEM GOJIŠČU .....	37
<b>4.4.1 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega</b> <b>rička pri bakteriji <i>B. cereus</i></b> .....	<b>37</b>
<b>4.4.2 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri</b> <b>bakterijah <i>B. cereus</i> in <i>S. aureus</i></b> .....	<b>38</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>44</b>
5.1 RAZPRAVA.....	44
<b>5.1.1 Difuzijska metoda v agarju</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1.2 Dilucijska metoda v agarju</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1.3 Primerjava rezultatov, dobljenih z difuzijsko metodo v agarju ter</b> <b>dilucijsko metodo v agarju in tekočem gojišču</b> .....	<b>46</b>

<b>5.1.4 Kinetika inhibicije rasti/odmiranja .....</b>	<b>47</b>
5.1.4.1 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička pri bakteriji <i>B. cereus</i> .....	47
5.1.4.2 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah <i>B. cereus</i> in <i>S. aureus</i> .....	47
5.2 SKLEPI.....	48
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>49</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>51</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 2-1:</b> Nekate metode za določanje občutljivosti bakterij za protimikrobne snovi (Burt,2004).....	16
<b>Preglednica 2-2:</b> Nekateri najpogostejši izrazi in njihove definicije, ki se v literaturi uporabljajo kot merilo protimikrobne učinkovitosti (Burt, 2004).....	17
<b>Preglednica 3-1:</b> Delovni mikroorganizmi rodu <i>Bacillus</i> in <i>Staphylococcus</i> .....	21
<b>Preglednica 4-1:</b> Vsebnost fenolnih spojin v komercialnih rožmarinovitih ekstraktih .....	27
<b>Preglednica 4-2:</b> Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem <i>Bacillus cereus</i> WSBC 10530 z metodo difuzije v agarju .....	30
<b>Preglednica 4-3:</b> Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 z metodo difuzije v agarju.....	31
<b>Preglednica 4-4:</b> Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja čistih fenolnih kislin, ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem <i>Bacillus cereus</i> WSBC 10530 z metodo dilucije v agarju .....	33
<b>Preglednica 4-5:</b> Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja čistih fenolnih kislin, ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 z metodo dilucije v agarju .....	34
<b>Preglednica 4-6:</b> Vrednosti MIC, pridobljene z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju za <i>Bacillus cereus</i> WSBC 10530 .....	36
<b>Preglednica 4-7:</b> Vrednosti MIC, pridobljene z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju za <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	36



## KAZALO SLIK

<b>Slika 2-1:</b> Zgradba hidroksibenzojskih (a) in hidroksicimetnih (b) kislin (Ayaz in sod., 2008) .....	4
<b>Slika 2-2:</b> Strukturna formula kina kisline (Murugan in sod., 2005) .....	6
<b>Slika 2-3:</b> Strukturna formula klorogenske kisline (Marshall in sod., 2000) .....	7
<b>Slika 2-4:</b> Strukturna formula karnozola (A) in karnozolne kisline (B) (Horiuchi in in sod., 2007) .....	7
<b>Slika 2-5:</b> Strukturna formula rožmarinske kisline (Petersen in Simmonds, 2003) .....	8
<b>Slika 2-6:</b> Mesta in mehanizmi protimikrobnega delovanja sestavin eteričnih olj v bakterijski celici (Burt, 2004) .....	9
<b>Slika 2-7:</b> Navadni riček ( <i>Camelina sativa</i> ) (Der Leindotter ( <i>Camelina sativa</i> Crtz.), 2008) .....	10
<b>Slika 2-8:</b> Seme navadnega rička (Cappers in sod., 2006) .....	11
<b>Slika 2-9:</b> Rožmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) (Thompson, 2007) .....	12
<b>Slika 2-10:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> (Kunkel, 2004) .....	13
<b>Slika 2-11:</b> <i>Bacillus cereus</i> (Terra, 2005) .....	14
<b>Slika 2-12:</b> Zgradba celične stene in citoplazemske membrane po Gramu pozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997) .....	15
<b>Slika 3-1:</b> Shema poteka dela .....	20
<b>Slika 3-2:</b> Razredčitve ekstraktov rožmarina VivOX 70 in INOLENS 18 v gojišču TSB (v dveh ponovitvah) ter kontrola (gojišče TSB in kultura) .....	26
<b>Slika 3-3:</b> Kontrola koncentracije celic v inokulumu <i>S. aureus</i> s štetjem kolonij po nacepiti na ploščo .....	26
<b>Slika 4-1:</b> Metoda difuzije v agarju z diski za rožmarinov ekstrakt VivOX 70 in testni organizem <i>B. cereus</i> .....	28
<b>Slika 4-2:</b> Metoda difuzije v agarju z diski za ekstrakt semen navadnega rička in testni organizem <i>B. cereus</i> .....	28
<b>Slika 4-3:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij <i>B. cereus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom ekstrakta semen navadnega rička .....	37
<b>Slika 4-4:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij <i>B. cereus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta VivOX 70 .....	38
<b>Slika 4-5:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij <i>S. aureus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta VivOX 70 .....	39

<b>Slika 4-6:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij <i>B. cereus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta INOLENS 18.....	40
<b>Slika 4-7:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta INOLENS 18.....	41
<b>Slika 4-8:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>B. cereus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta AquaROX 40.....	42
<b>Slika 4-9:</b> Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> med 24-urno inkubacijo pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta AquaROX 40.....	43

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	tipski sev zbirke American Type Culture Collection
BCA agar	<i>Bacillus cereus</i> agar
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	Brain Heart Infusion bujon
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Units)
DMSO	dimetil sulfoksid
EtOH	etanol
GRAS	na splošno spoznano kot varno (angl. Generally Recognized As Safe)
MALDI	matrična laserska ionizacija (angl. Matrix - Assisted Laser Desorption/ Ionization)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. Minimal Inhibitory Concentration)
MK	maščobna kislina
NGF	rastni faktor živčnih celic (angl. Nerve Growth Factor)
OTC	oksitetraciklin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	tripton soja agar (angl. Tryptone Soya Agar)
TSB	tripton soja bujon (angl. Tryptone Soya Broth)
UV	ultravijolično
WSBC	tipski sev zbirke Weihenstephan <i>B. cereus</i> Culture Collection
ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

## 1 UVOD

V današnjem svetu je skrb za zdravje ljudi eden glavnih ciljev razvitih dežel. Ohranjanje in krepitev zdravja pa je tesno povezano s prehrano in prehranjevalnimi navadami ljudi. Varna in kakovostna hrana je osnova zdrave prehrane. Ljudje smo z uživanjem hrane izpostavljeni različnim zdravju škodljivim snovem. Pojem »varna hrana« danes vključuje poleg kemijske varnosti tudi preprečevanje bolezni, povzročenih z zaužitjem mikrobiološko onesnažene hrane. Proizvajalci za podaljšanje obstojnosti živil posegajo po kemijskih konzervansih, ki preprečujejo oz. upočasnijo kemijsko in mikrobiološko kvarjenje (Gošnjak, 2004).

Sodobni potrošniki zahtevajo prehransko bolj zdravo hrano, bolj primerno za uporabo, bolj svežo, bolj naravno in hkrati manj toplotno obdelano in brez kemijskih dodatkov. Posledica teh trendov je večje tveganje rasti mikroorganizmov, kar vpliva na varnost in trajnost živil. Alternativno nadomestilo za kemijske konzervanse pa so lahko tudi naravni rastlinski ekstrakti, ki imajo poleg antioksidativnega tudi protimikrobno delovanje (Gould, 2004).

Pomembno pa je poudariti, da le nekateri rastlinski ekstrakti lahko izpolnijo zahteve glede izbora splošno uporabnega dodatka živilu. Imeti morajo širok spekter protimikrobnega delovanja, primerne fizikalno kemijske lastnosti (topnost, hidrofilnost oz. hidrofobnost, obstojnost), učinkovitost v živilu, ki mora biti povsem varno za potrošnika, poleg tega ne sme spremeniti senzoričnih lastnosti živila. Protimikrobni učinki rastlinskih izvlečkov so znani za številne rastline, vendar pa so ekstrakti zaradi svojih močnih arom omejeni pri uporabi v hrani (Del Campo in sod., 2000).

Fenolne spojine so sekundarni produkti metabolizma rastlin, ki jih z ustrezno ekstrakcijsko metodo pridobimo iz rastlinskega substrata. V rastlini fenolne spojine ščitijo pred napadom insektov, bakterij in plesni, povečajo pa tudi odpornost rastline pred izpostavljenostjo UV žarkom (Pietta, 2000). Ugotovljeno je bilo, da ima večina fenolnih spojin precej širok spekter protimikrobnega delovanja, učinkujejo lahko tako bakteriostatično kot fungistatično.

Navadni riček (*Camelina sativa*) spada v družino križnic. Slovenija je ena redkih držav, kjer še vedno pridelujejo navadni riček, in sicer na Koroškem. Glavni produkt navadnega rička so semena, ki vsebujejo približno 40 % olja na suho snov. Olje iz semen navadnega rička vsebuje visok delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin, in sicer 40-60 % vseh MK.

Protimikrobni učinek fenolnih spojin v ekstraktu semen navadnega rička, komercialnih ekstraktih rožmarina in čistih fenolnih kislin smo ugotavljali pri bakterijah *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*. Bakterije rodu *Bacillus* so razširjene v naravi (zemlja, zrak, voda, rastline) in so jih pogosto izolirali tudi iz različnih živil živalskega izvora, vključno s toplotno obdelanimi živali, v katerih spore preživijo toplotno obdelavo in lahko povzročajo kvarjenje. Nekateri sevi vrste *B. cereus* pa lahko povzročajo celo toksikoinfekcije s hrano. Bakterije rodu *Staphylococcus* naseljujejo sluznice in kožo ljudi in toplokrvnih živali. Najbolj proučena vrsta je *S. aureus*, ki je prav tako pogost povzročitelj kvarjenja hrane in zastrupitev z enterotoksinom, ki ga lahko izločajo v živila. Zato je inhibicija rasti bakterij

*Bacillus* in *Staphylococcus* s fenolnimi spojinami v rastlinskih ekstraktih vsekakor zaželjena za zagotavljanje varnosti, kakovosti in podaljšane obstojnosti živil.

## 1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Cilji naloge so bili:

- Izbrati optimalno metodo ugotavljanja protimikrobne aktivnosti pri izbranih sevih bakterij *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*;
- Določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) fenolnih spojin v ekstraktu semen navadnega rička, izbranih čistih fenolnih spojin in komercialnih rastlinskih izvlečkov;
- Potrditi, da je navadni riček dober vir fenolnih spojin s protimikrobno učinkovitostjo;
- Potrditi, da imajo fenolne spojine v ekstraktu navadnega rička sinergistično protimikrobno delovanje, ki je učinkovitejše od čistih fenolnih kislin in primerljivo z delovanjem nekaterih drugih komercialnih rastlinskih izvlečkov.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Razmaščena semena navadnega rička so dober vir protimikrobnih snovi, vendar način določanja protimikrobne aktivnosti vpliva na dobljeni rezultat, zato je pomembna izbira metode;
- Čiste fenolne kisline in rožmarinovi ekstrakti imajo protimikrobni učinek na bakterije *B. cereus* in *S. aureus*, pri ekstraktih semen navadnega rička pa zaradi vsebnosti različnih protimikrobno aktivnih fenolnih spojin lahko pričakujemo boljši učinek od čistih fenolnih kislin.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Vedno večje zanimanje po nadomestitvi tradicionalnih konzervansov z naravnimi je spodbudilo raziskave o novih virih naravnih konzervansov. Že od nekdaj je znano, da imajo aromatične rastline in njihove začimbe, kot tudi njihova eterična olja in ekstrakti močno protimikrobno delovanje. Rastlinske ekstrakte zato lahko uporabimo za upočasnitev ali inhibicijo rasti patogenih mikroorganizmov in mikrobnih povzročiteljev kvarjenja hrane. Velika večina teh ekstraktov je na splošno spoznana kot varna (angl. generally recognized as safe, GRAS) (Santoyo in sod., 2005).

Rastlinske protimikrobne spojine lahko razdelimo na več skupin (Cowan, 1999):

- fenoli in polifenoli (enostavni fenoli in fenolne kisline, kinoni, flavoni, flavonoidi in flavonoli, tanini in kumarini)
- terpenoidi in aromatična olja
- alkaloidi
- lektini in polipeptidi.

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih spojin, večinoma so to fenolne spojine ali njihovi derivati, ki so najbolj odgovorni za protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov. To so sekundarni metaboliti, ki služijo kot obrambni mehanizem rastline pred mikroorganizmi, insekti in rastlinojedci. Nekateri sekundarni metaboliti, kot naprimer terpenoidi, dajejo rastlinam značilen vonj, drugi (kinoni in tanini) pa so odgovorni za pigmente. Mnogi so odgovorni za rastlinsko aromo, nekaj rastlin in začimb, ki jih uporabljamo ljudje v prehrani, pa ima pozitivno vlogo tudi z zdravstvenega vidika (Cowan, 1999).

#### 2.1.1 Fenolne spojine v rastlinah

Glavna skupina fenolnih spojin so fenolne kisline, ki so v velikem številu prisotne v hrani rastlinskega izvora (Friedman in sod., 2003).

Fenolne kisline razdelimo v dve skupini (Mattila in sod., 2006):

- hidroksibenzojske kisline (galna kislina, protokatehujska kislina, vanilinska kislina, siringinska kislina in kina kislina)
- hidroksicimetne kisline (*p*-kumarna kislina, kavna kislina, ferulna kislina, sinapinska kislina)

Fenolne kisline so v rastlinski hrani večinoma v vezani obliki. Hidroksicimetne kisline se v hrani pogosto pojavljajo v obliki preprostih estrov s kino kislino ali glukozo. Najbolj topna hidroksicimetna kislina je najverjetneje prav klorogenska kislina, ki je spojina kavne in kine kisline. Za razliko od hidroksicimetnih kislin so derivati hidroksibenzojskih kislin zastopani v hrani v obliki glukozidov, medtem ko so glukozni estri le redki (Mattila in sod., 2006).

Najenostavnejši fenoli so sestavljeni iz enega samega substituiranega benzenovega obroča. Ferulna in kavna kislina sta najbolj pogosta predstavnika te številne skupine. Pogosti začimbi, pehtran in timijan, vsebujeta kavno kislino, ki je učinkovita proti virusom, bakterijam in glivam. Mesto vezave in število hidroksilnih skupin, vezanih na benzenovem obroču, vpliva na toksičnost do določenega mikroorganizma; večja hidroksilacija vodi v večjo toksičnost. V povezavi s tem je znano, da imajo bolj oksidirani fenoli večji inhibicijski učinek (Cowan, 1999).

Na sintezo fenolov močno vplivajo naslednji faktorji: svetloba, temperatura, vsebnost ogljikovih hidratov, mineralov in vode v celici. Biosinteza fenolnih spojin v rastlinah je kompleksen proces in je rezultat medsebojnega sodelovanja več različnih poti. Vse fenolne spojine, z izjemo flavonoidov, nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikimske kisline (Abram in Simčič, 1997).

### 2.1.1.1 Zgradba fenolnih kislin

Fenolne kisline, za katere domnevamo, da se nahajajo v metanolnem ekstraktu iz semen navadnega rička, so: galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, kina, *p*-kumarna, kavna, ferulna, sinapinska, klorogenska, karnozolna in rožmarinska kislina.



<b>Kislina</b>	R1	R2	R3	R4	<b>Kislina</b>	R5	R6
Galna	H	OH	OH	OH	<i>p</i> -Kumarna	H	H
Protokatehajska	H	OH	OH	R	Kavna	H	OH
Vanilinska	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ferulna	H	OCH <sub>3</sub>
Siringinska	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Sinapinska	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Slika 2-1:** Zgradba hidroksibenzojskih (a) in hidroksicimetnih (b) kislin (Ayaz in sod., 2008)

Hidroksicimetne kisline so zaradi njihove propenske stranske verige veliko manj polarne od hidroksibenzojskih kislin. Ta lastnost lahko pospeši prehod molekul skozi celično membrano in na ta način poveča njihov inhibicijski učinek (Rodriguez Vaquero in sod., 2007). Puupponen-Pimiä in sod. (2005) so proučevali učinek polifenolnih sestavin na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije in ugotovili, da *p*-kumarna, kavna, ferulna in cimeta kislina inhibirajo rast bakterij *Escherichia coli* in *Salmonella enterica* pri visokih koncentracijah (10 mg/ml). Galna in protokatehajska kislina imata tri in dve hidroksilni skupini v svoji zgradbi, vanilinska kislina pa eno hidroksilno ter eno metoksi skupino.

## Galna kislina

Galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska kislina) je naravni produkt hidrolize taninov. Je učinkovita protimikrobna spojina in številni antioksidativni in protimikrobni prehrabeni aditivi vsebujejo galno kislino kot glavno sestavino (Strlič in sod., 2002). Leta 2007 so Chanwitheesuk in sod. uspešno izolirali protimikrobno sestavino, galno kislino, iz etanolnega ekstrakta *Caesalpinie mimosoides*. Galna kislina je inhibirala rast bakterij *S. typhi* in *S. aureus*, vrednost MIC je bila 2500 µg/ml in 1250 µg/ml.

## Protokatehujska kislina

Protokatehujska kislina (3,4-dihidroksibenzojska kislina) je bel prah, je slabo topna v vodi in dobro topna v etanolu. V naravi je prisotna v mnogih rastlinah in rastlinskih smolah, še posebej veliko protokatehujske kisline pa lahko najdemo v hibiskusu (*Hibiscus sabdariffa* L.), japonskem kostmičju (*Lonicera japonica*), ožepku (*Hyssopus officinalis* L.), baziliki (*Ocimum basilicum* L.) in origanu (*Origanum majorana* L.) (Zgórka in Głowniak, 2001). Številne *in vitro* študije so pokazale, da je protokatehujska kislina sposobna inhibirati rast številnih bakterij in plesni (Yin in Chao, 2008).

## Vanilinska kislina

Vanilinska kislina (4-hidroksi-3-metoksibenzojska kislina) je oksidirana oblika vanilina. Dobimo jo v obliki belih ali rumenih kristalov. Je najpomembnejša sestavina biovanilina, ki je v svetu eden najbolj cenjenih naravnih arom. Derivati vanilinske kisline se v Evropi uporabljajo kot blago poživilo (Ghosh in sod., 2006).

## Siringinska kislina

Čista siringinska kislina (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojska kislina) se nahaja v obliki belih kristalov. V vodi je slabo topna, prav tako tudi v etanolu. Je prevladujoča komponenta v rdečem grozdju, najdemo pa jo tudi v borovnicah, lubenici, breskvah, zelenem grozdju, grenivki in rdečem vinu (Mattila in sod., 2006). Raziskave so pokazale, da je siringinska kislina neučinkovita proti bakterijam *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* in *S. enterica* (Friedman in sod., 2003).

## *p*-Kumarna kislina

*p*-Kumarna kislina (4-hidroksicimetna kislina) je največ v naravi. Prosto ali vezano v obliki estra ali glikozida *p*-kumarno kislino najdemo v številnih užitnih delih rastlin kot so arašidi, paradižnik, korenje, zelje in česen. Največ *p*-kumarne kisline (od 100 do 200 µg/g suhe snovi) so izolirali iz cvetov sivke in timijana ter listov ožepka in rožmarina, za šentraj pa je bila vrednost nad 2000 µg/g (0,2%) suhe snovi (Zgórka in Głowniak, 2001). Čista *p*-kumarna kislina se nahaja v obliki kristalov, ki so slabo topni v vodi, vendar zelo dobro topni v etanolu in dietil etru (Ayaz in sod., 2008).



### Kavna kislina

Čista kavna kislina (3,4-dihidroksicimetna kislina) je rjavkast prah. Topna je v vroči vodi in alkoholu. Kavno kislino so našli v številnih rastlinah kot metabolni produkt. Kavna kislina je prevladujoča fenolna komponenta v sončničnih semenih, močno vpliva na topnost rastlinskih proteinov. Našli so jo tudi v paradižniku, njena koncentracija je večja v lupini paradižnika, kot v mesu. Te fenolne komponente so odgovorne za encimsko porjavenje, v paradižniku pa delujejo predvsem kot antioksidanti (Chen in Ho, 1997).

### Ferulna kislina

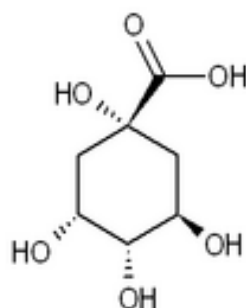
Čista ferulna kislina (4-hidroksi-3-metoksicimetna kislina) je svetlo rumen kristaliničen prah. Topna je v vodi, etanolu, dietil etru, etil acetatu in acetonu. Najdemo jo v listih in semenih številnih rastlin, še posebej pa v žitaricah, kot so riž, koruza in oves. Poleg tega je tudi v kavi, jabolkih, artičoki, arašidih, ananasu in pomaranči (Zhao in Moghadasian, 2008). V pomarančnem soku je odgovorna za nespremenjeno aromo med skladiščenjem. Prav tako je eden najpomembnejših antioksidantov v pivu. Fenilni estri kavne in ferulne kisline se nahajajo tudi v propolisu oz. zadelavini, ki ima znano protimikrobno delovanje in se že stoletja uporablja kot protivnetno sredstvo v ljudski medicini (Chen in Ho, 1997).

### Sinapinska kislina

Čista sinapinska kislina (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kislina) je rumeno rjav kristaliničen prah. Ni topna v vodi. V nekaterih rastlinskih ekstraktih, vključno s semeni rdečega zelja in navadnega rička, je zastopana v večji koncentraciji kot ostale fenolne kisline, in sicer v prosti, zaestreni ali glikozilirani obliki (Ayaz in sod., 2008).

### Kina kislina

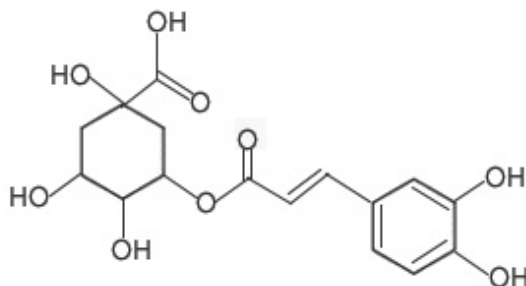
Kina kislina (1,3,4,5-tetrahidroksicikloheksankarboksilna kislina) je bel kristaliničen prah. V naravi jo najdemo v številnih rastlinah in sicer v listih tobaka, listih korenja, jabolkih, breskvah, hruškah, slivah in v zelenjavi. Kina kislina je poleg šikimske kisline ključni intermediat pri biosintezi aromatskih spojin. Je topna v vodi in alkoholu, vendar netopna v etru. Kina kislina je izhodiščna snov za sintezo novih zdravil (Buchler GmbH, 2004).



**Slika 2-2:** Strukturna formula kina kisline (Murugan in sod., 2005)

## Klorogenska kislina

Klorogenska kislina (3-kafeoilkila kislina) je naravni fenolni produkt, izoliran iz listov in plodov rastlin, pa tudi iz kavnih semen. Po strukturi je klorogenska kislina ester kina in kavne kisline. Nahaja se v obliki trdnih kristalov. Klorogenska kislina je topna v organskih topilih, kot so etanol, dimetilsulfoksid (DMSO) in dimetil formamid (Marshall in sod., 2000).

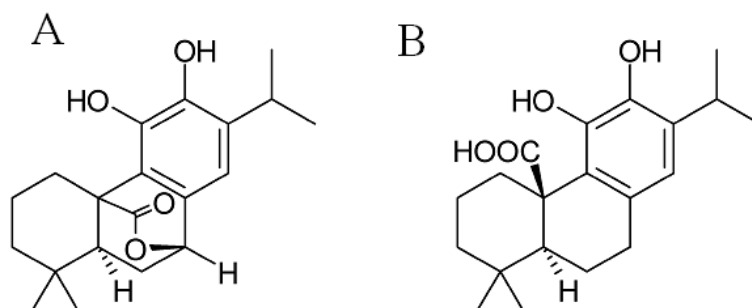


**Slika 2-3:** Strukturna formula klorogenske kisline (Marshall in sod., 2000)

Topnost klorogenske kisline v teh topilih je približno 25 mg/mL. Prav tako kot kavne je tudi klorogenske kisline veliko v paradižniku. Dobro je znano, da je klorogenske kisline 5-10 % mase kavnih zrn in igra pomembno vlogo pri barvi kave in oblikovanju njene arome (Chen in Ho, 1997).

## Karnozolna kislina in karnozol

Rožmarinovi ekstrakti, pridobljeni iz listov, imajo zelo visoko antioksidativno in protimikrobno aktivnost, zato se vedno bolj uporabljajo kot aditivi v prehrani. Najpomembnejša sestavina je diterpen, karnozolna kislina, ki jo je v izobilju v listih rožmarina (Munné-Bosch in Alegre, 2001). V naravi jo najdemo v nekaterih rastlinah iz družine usnatic, predvsem v rožmarinu in žajblju. Vsebnost karnozolne kisline v posušenih rožmarinovitih listih je med 2 in 3 % . Topna je v metanolu, etanolu, acetonu in deloma tudi v vodi (Rižner Hraš in sod., 2000).

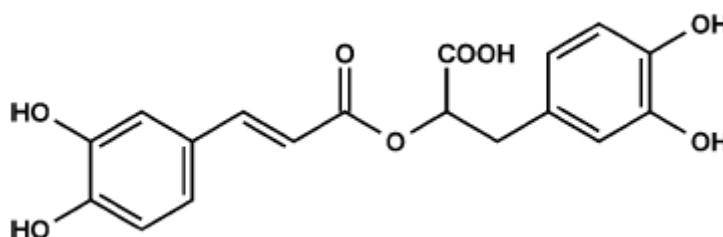


**Slika 2-4:** Strukturna formula karnozola (A) in karnozolne kisline (B) (Horiuchi in sod., 2007)

Fenolni diterpeni so glavna komponenta nepolarne frakcije v ekstraktu rožmarina in predvidevajo, da sta zato karnozol in karnozolna kislina odgovorna za protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina. Karnozol je lakton karnozolne kisline. Zaradi tega imata podobno protimikrobno delovanje, vendar pa ima sam karnozol manjši protimikrobni učinek (Del Campo in sod., 2000).

#### Rožmarinska kislina

Rožmarinska kislina je ester kavne in 3-(3,4-dihidroksi fenil) mlečne kisline. Zgrajena je iz dveh fenolnih obročev, med katerima sta karbonilna in karboksilna skupina. Vsak obroč pa vsebuje po dve hidroksilni skupini (Chen in Ho, 1997).



**Slika 2-5:** Strukturna formula rožmarinske kisline (Petersen in Simmonds, 2003)

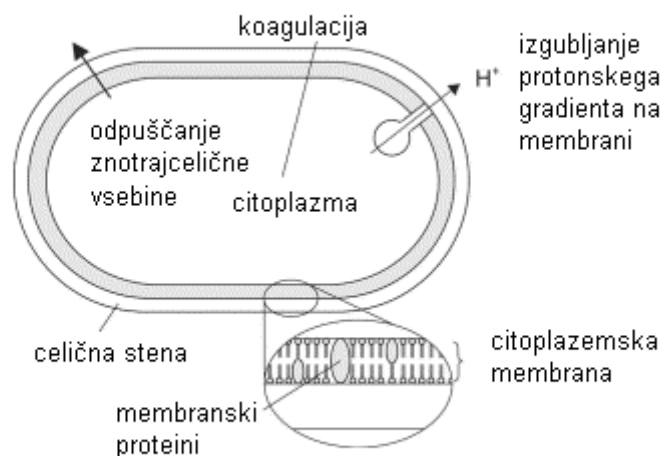
Je derivat fenolnih kislin in je poleg karnozolne kisline in karnozola najbolj odgovorna za protimikrobno delovanje rožmarinovega ekstrakta (Moreno in sod., 2006). Rožmarinska kislina je vodotopna in jo pridobivajo z vodno ekstrakcijo. Čista ima dober protimikroben učinek na po Gramu pozitivne bakterije, kjer je določena minimalna inhibitorna koncentracija 16-60  $\mu\text{g/ml}$ . Na po Gramu negativne bakterije čista spojina nima protimikrobnega učinka in je verjetno aktivna le v prisotnosti karnozolne kisline (Petersen in Simmonds, 2003).

#### 2.1.1.2 Protimikrobno delovanje fenolnih spojin

Glede na to, da rastlinski ekstrakti vsebujejo veliko različnih kemijskih spojin, je zelo verjetno, da njihova protimikrobna aktivnost ni vezana na en sam specifičen mehanizem, ampak na več različnih tarč v celici. Pomembna lastnost veliko fenolnih spojin je njihova hidrofobnost, ki jim omogoča vezavo z lipidi bakterijske celične membrane in mitohondrijev, s tem se spremeni struktura celične membrane, tako da postane bolj propustna. Pojavi se pomanjkanje ionov in drugih celičnih sestavin. Manjša izguba iz bakterijske celice ne vpliva na celično sposobnost za življenje, večja izguba celičnih sestavin oz. izguba določenih molekul in ionov pa povzroči celično smrt (Burt, 2004).

Način protimikrobnega delovanja fenolnih spojin je odvisen tudi od njihove koncentracije. Nychas (1995) meni, da v manjših koncentracijah vplivajo na encime, ki so povezani z oskrbo celice z energijo, medtem ko večje koncentracije lahko povzročijo obarjanje proteinov. Interakcije z membranskimi proteini pa lahko povzročijo spremembo strukture bakterijske celice in njene funkcionalnosti.

Protimikrobna učinkovitost ekstraktov je odvisna od strukture in medsebojnih interakcij posameznih kislin. O sinergizmu govorimo, ko je učinek večih sestavin ekstrakta večji kot vsota posameznih učinkov (Burt, 2004).



**Slika 2-6:** Mesta in možni mehanizmi protimikrobnega delovanja sestavin eteričnih olj v bakterijski celici (Burt, 2004)

Delovanje polifenolov je lahko direktno zaviralno oz. destruktivno na določene mikroorganizme ali pa delujejo le kot sinergisti in povečajo učinek ostalih konzervansov. Fenolne spojine so zelo reaktivne. Pri vezavi na proteine mnogokrat povzročijo inaktivacijo posameznih encimov ali povzročijo poškodbe na genskem materialu. Ugotovili so, da povzroči dodatek fenolnih spojin na rastni medij motnje na citoplazmatski membrani, tako da celica skozi membrano v okolico izgubi mnogo znotrajceličnega materiala. Na protimikrobno aktivnost polifenolov vplivajo še prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura. Soli delujejo sinergistično s polifenoli ter tako povečajo njihovo protimikrobno učinkovitost (Davidson in Branen, 2005).

Da dosežemo v živilu enak protimikrobni učinek kot v *in vitro* pogojih, je potrebna večja koncentracija ekstrakta. Mnogo študij je potrdilo vpliv hrane na odpornost mikroorganizmov do fenolnih spojin, vendar ne opisujejo natančno vzrokov in mehanizma odpornosti. Večje količine hranil v živilih v primerjavi z gojiščem omogočajo bakterijam, da hitreje popravijo škodo, ki je nastala na celicah. Ne le intrinzični dejavniki hrane (maščoba, proteini, vsebnost vode, antioksidanti, konzervansi, pH, sol in ostali aditivi), tudi ekstrinzični dejavniki (temperatura, pakiranje v vakum/plin/zrak/, lastnosti mikroorganizmov) vplivajo na bakterijsko občutljivost (Burt, 2004).

### 2.1.2 Navadni riček (*Camelina sativa*) kot vir protimikrobno aktivnih fenolnih spojin

Navadni riček (*Camelina sativa*) spada v družino križnic - Brassicaceae. Izvorna rastlina je divji riček, ki se kot plevel pojavlja na naših njivah in ob poteh. Pridelava rička ni zahtevna in ne obremenjuje okolja. Danes riček pridelujejo in raziskujejo v Avstriji, Nemčiji, Belgiji, Rusiji, Ameriki, Kanadi, na Irskem in v Veliki Britaniji. Zaradi edinstvenih lastnosti olja in različnih možnosti uporabe so riček uvrstili med »nove« poljščine, kar še dodatno vzpodbuja razvoj in raziskave (Grobelnik Mlakar in sod., 2003).

V Sloveniji riček pridelujejo na Koroškem, kjer iz njega pridobivajo ričkovo ali, kakor ga imenujejo, »trotrovo« olje. Rastlina je enoletnica, izredno šibka, z dobro razvejano glavno korenino. Iz listne rozete zraste od 30 do 100 cm visoko, rahlo dlakavo steblo, ki ob zrelosti oleseni. Steblo in listi so najbolj podobni lanu, socvetje pa je rumeno cvetoč grozd. Plod je lušček hruškaste oblike, v katerem so zelo drobna semena rdečkaste barve (Grobelnik Mlakar in sod., 2003).



**Slika 2-7:** Navadni riček (*Camelina sativa*) (Der Leindotter (*Camelina sativa* Crtz.), 2008)

Riček je skromna, glede tal in klimatskih razmer nezahtevna rastlina. Uspeva tako na humusnih kot tudi na slabše rodovitnih ilovnato-peščenih tleh, kar je sicer za oljnice neobičajno. Olje, ki ga pridobimo iz semen navadnega rička, vsebuje zelo visoko koncentracijo polinenasičenih maščobnih kislin in sicer 40-60 % vseh maščobnih kislin. (Abramovič in sod., 2007).

Zaradi visoke vsebnosti esencialnih maščobnih kislin alfa linolenske (omega-3) in linoleinske (omega-6) maščobne kisline ter visoke vsebnosti in stabilnosti vitamina E uvrščajo ričkovo olje med funkcionalno hrano. Na Finskem so s klinično študijo potrdili terapevtske učinke ričkovega olja pri boleznih srca in ožilja (padec LDL holesterola). Ričkovo olje lahko uporabljamo v margarinah, obogatenih z omega-3 MK, kot biodizel, primeren je za izdelavo barv (Grobelnik Mlakar in sod., 2003).

Na Koroškem pridobivajo ričkovo ali totrovo olje iz posušenega semena, ki ga zmeljejo in pomešajo z vodo v gosto rjavo zmes. Zmes pražijo pri temperaturi 60 do 90 °C, dokler ne postane sipka in na otip suha. Nato iz nje s stiskalnico iztisnejo olje. Sveže olje pustijo stati približno dva tedna, da se zbistri, nato ga cedijo skozi gazo. Totrovo olje je bistro, rumene do zeleno rumene barve, značilnega vonja in rahlo pekočega okusa. V tradicionalni medicini ga uporabljajo za zdravljenje želodčnih težav in opeklin (Grobelnik Mlakar in sod., 2003).

V ekstraktu semen navadnega rička so določili prisotnost fenolnih spojin, med katerimi prevladujejo hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline, kumarini, flavonoidi in lignini (Matthäus, 2002). Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktu razmaščenih semen navadnega rička določena z Folin-Ciocalteu metodo in izražena na galno kislino se giblje od 1 mg/g do 2,4 mg/g (Matthäus in Zubr, 2000). Velike razlike se kažejo med vzorci iz različnih lokacij. Na vrednost vpliva izbira ekstrakcijskega topila. Na splošno velja, da količina ekstrahiranih fenolnih spojin pada s padcem polarnosti topila. Prevladujoča fenolna kislina v semenih rastlin iz družine križnic je sinapinska kislina. Med oljnicami, ki spadajo v družino križnic je bolje raziskana oljna repica. V preostanku semen po stiskanju olja iz oljne repice so ugotovili predvsem prisotnost sinapinske kisline in njenih estrov (glukozil sinapat in sinapin, ki je ester sinapinske kisline in holina) (Vuorela in sod., 2004).



**Slika 2-8:** Seme navadnega rička (Cappers in sod., 2006)

V diplomski nalogi sem uporabila metanolni ekstrakt razmaščenih semen navadnega rička. Glede na predhodne raziskave (Abramovič in sod., 2007) smo pričakovali visoko vsebnost fenolnih spojin, ki so vir antioksidativne in predvidoma tudi protimikrobne učinkovitosti. Na ta način predstavljajo ti ekstrakti možnost nadaljnega izkoriščanja stranskega proizvoda, ki nastaja pri pridobivanju olja (Abramovič in sod., 2007).

### 2.1.3 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je zimzeleni sredozemski grm, zraste do enega metra visoko. Lističi so na zgornji strani zeleni in gladki, na spodnji strani pa imajo dlačice in žleze z eteričnimi olji. Rožmarin je nekoliko grenkega, trpkega in aromatičnega okusa, ki spominja na smolo, vonj pa je izrazit in zelo prijeten (González-Trujano in sod., 2007).

Med zelišči in začimbami je rožmarin pogosta hišna rastlina na različnih koncih sveta. Uporablja se kot začimba v prehrani, v kozmetiki in tradicionalni medicini. Prav tako je poznan po svojih antioksidativnih in protimikrobnih aktivnostih (Santoyo in sod., 2005).



**Slika 2-9:** Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) (Thompson, 2007)

Za protimikrobno delovanje rožmarinovitih ekstraktov so odgovorne nepolarne fenolne snovi. Cuvelier in sod. (1996) so razvrstili fenolne snovi rožmarinovitih ekstraktov, glede na polarnost, v tri skupine:

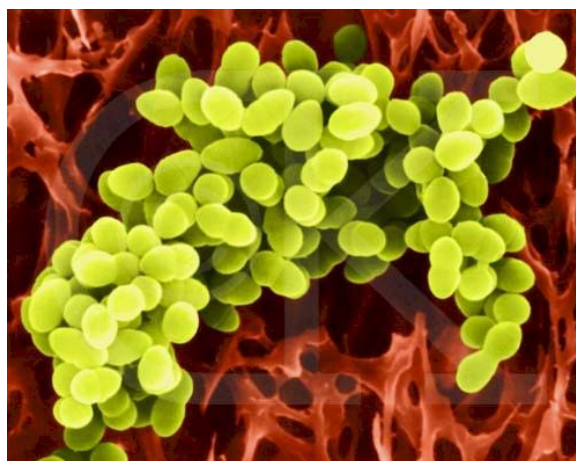
- fenolne kisline (ferulna kislina, kavna kislina in rožmarinska kislina)
- flavonoidi (apigenin in rutin)
- fenolni diterpeni (karnozolna kislina in karnozol)

Za protimikrobno delovanje ekstraktov je pomemben način ekstrakcije. V industrijskih razmerah (v diplomski nalogi sem uporabila industrijsko pripravljen rožmarinov ekstrakt) se večinoma uporablja superkritična tekočinska ekstrakcija. Ekstrakti, pridobljeni na ta način, imajo drugačno sestavo od ekstraktov, pridobljenih z vodno ekstrakcijo ali z ekstrakcijo ob uporabi organskih topil. Ker so rožmarinovi ekstrakti uvrščeni med GRAS živila, predstavljajo alternativo sintetičnim protimikrobnim snovem (Santoyo in sod., 2005).

## 2.2 BAKTERIJE RODU *Staphylococcus*

Stafilokoki so po Gramu pozitivni koki s premerom približno 1  $\mu\text{m}$ . Urejajo se v nepravilne gruče. So negibljivi, fakultativni anaerobi, ki imajo encim katalazo, bolje rastejo v aerobnem okolju in ne sporulirajo. Glede na prisotnost koagulaze, delimo stafilokoke v dve skupini: na koagulazno pozitivne in koagulazno negativne stafilokoke. Koagulazno pozitiven je samo *S. aureus*, ki na krvnem agarju raste največkrat v obliki gladkih zlatorumenih kolonij, velikih do 2 mm, obdanih z ozkim pasom popolne (beta) hemolize (Seme, 2002a).

Okužbe s sevi *S. aureus*, ki izločajo toksine, se kažejo s klinično sliko zastupitve s hrano in sindroma toksičnega šoka. Druge vrste stafilokokov, ki se od bakterije *S. aureus* ločijo po tem, da ne sintetizirajo koagulaze (koagulazno negativni stafilokoki), so del normalne bakterijske flore kože in nekaterih sluznic (Seme, 2002a).



**Slika 2-10:** *Staphylococcus aureus* (Kunkel, 2004)

Živila, ki so najpogosteje povezana z zastupitvami s stafilokoknimi toksini so: meso (govedina, svinjina, perutnina) in mesni izdelki (klobase, salame, hrenovke), solate, ki vsebujejo jajca, perutnino, krompir, s kremami polnjeni slaščičarski izdelki in mlečni izdelki (sir). Vsem tem izdelkom je skupno to, da zahtevajo posebno obdelavo med pripravo in so pogosto dalj časa izpostavljeni sobni temperaturi (Food Safety online, 2008).

## 2.3 BAKTERIJE RODU *Bacillus*

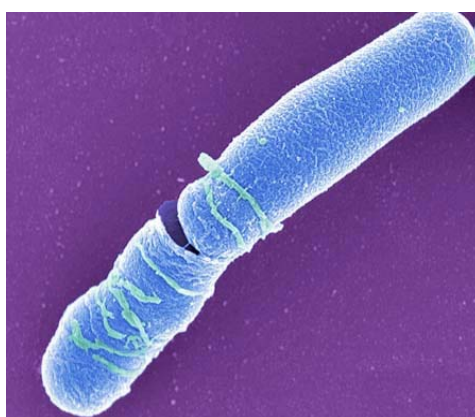
*B. cereus* je po obliki kolonij in mikroskopsko zelo podoben antraksovemu bacilu. Je po Gramu pozitiven, spороgen, gibljiv in dela beta hemolizo na krvnem agarju. V naravi so spore *B. cereus* razširjene v prsti, prahu, vodi, rastlinah, dlaki ter koži živali (Gubina, 2002).

V živilstvu so bacili poznani kot povzročitelji kvara. Izvor kontaminacije so številne surovine (riž, žita, mleko, voda, začimbe), oprema in okolje (prah, zemlja). Razloga za njihovo številčnost v živilih sta vsesplošna razširjenost teh mikroorganizmov in izredna



sposobnost spor, da preživijo pasterizacijo, sušenje, zamrzovanje in sanitacijo s kemičnimi sredstvi. Zato je pogosta kontaminacija sušenih, zmrznjenih in predhodno toplotno obdelanih živil. Težave pri sušenih in zmrznjenih živilih lahko nastopijo pri pripravi gotove jedi, ker ob tem nudimo ugodne pogoje za kaljenje spor v vegetativne celice in njihovo rast. Pri toplotno obdelanih živilih pa kaljenje spor nastopi v primeru, če živila ne ohladimo takoj pod 6 °C oz., če ga pustimo na sobni temperaturi do naslednjega dne (Andersson in sod., 1995).

Vrste rodu *Bacillus* sintetizirajo izvencelične encime in s tem povzročajo kvar živil. So saharoliti, lipoliti in proteoliti. Škrob razgrajujejo do oligosaharidov, disaharidov in monosaharidov, proteine razgrajujejo do peptidov, maščobe pa do prostih maščobnih kislin (Bailey in Holy, 1993).



**Slika 2-11:** *Bacillus cereus* (Terra, 2005)

*B. cereus* povzroča gastroenteritis z drisko in bljuvanjem, lahko pa tudi zunajčrevesne okužbe. Zastrupitev s hrano povzroči toksin, ki učinkuje enterotoksično in hemolitično ter deluje na prepustnost žil v črevesni steni, posledica je driska. Bljuvanje povzroča emetični toksin. Inkubacijska doba je lahko kratka, v 4 urah po zaužitju hrane se pojavita huda slabost in bljuvanje. Kadar je inkubacijska doba dolga, se v 10 do 18 urah po zaužitju hrane pojavijo krči v trebuhu in driska (Carlin in sod., 2006).

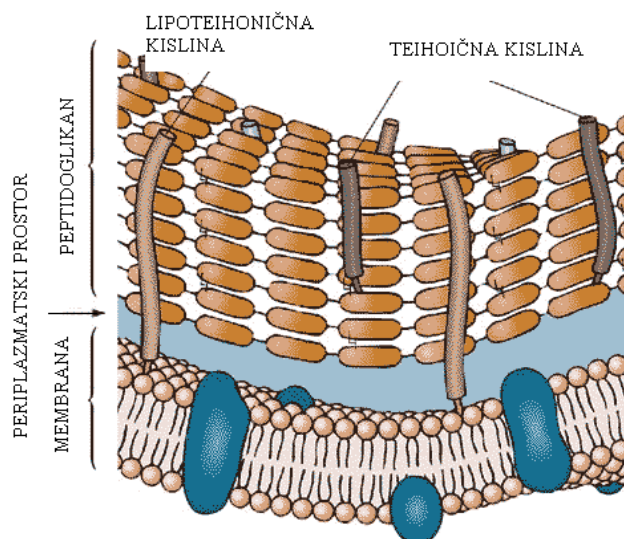
Eden od vzrokov, da je vrsta *B. cereus* prisotna v tako velikem številu, je adhezivnost spor na različne površine, predvsem hidrofobne. Na površini spor se nahajajo dolgi »izrastki«, ki pripomorejo k prilepljanju na površino (Andersson in sod., 1995).

*B. cereus* dobro raste na standardnih gojiščih. Diagnosticiramo ga z biokemičnimi in molekularnimi testi. Da je *B. cereus* povzročil okužbo s hrano, moramo pomisliti, kadar ugotovimo v vzorcu hrane več kot 100.000 CFU/g te bakterije (Gubina, 2002).

## 2.4 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI

Bakterije *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus* so po Gramu pozitivne bakterije, za katere je značilno, da imajo citoplazemsko membrano in debelo rigidno celično steno, sestavljeno iz peptidoglikana in poliolpolifosfatnih polimerov, imenovanih teihoična kislina (Singleton in Sainsbury, 1980).

Peptidoglikan (murein) zagotavlja trdnost celične stene, kjer predstavlja glavno sestavino stene (20-80 nm) pri po Gramu pozitivnih bakterijah in je s tem tudi nosilec večine lastnosti celične stene. Peptidoglikan je sestavljen iz dveh gradnikov, N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline. To sta aminosladkorja, izmenjujoče ponovljena v nekaj desetih kopijah, kar oblikuje dolg linearni filament. Več takih filamentov je povezanih med seboj s peptidi, ki dajejo trdnost celični steni. To trdnost pa še dodatno utrjuje teihoična kislina, ki je sestavljena iz polimerov glicerola, fosfatov in sladkornega alkohola ribitola. Kadar je na teihoično kislino vezan lipid, nastane lipoteihoična kislina (Madigan in sod., 1997).



**Slika 2-12:** Zgradba celične stene in citoplazemske membrane po Gramu pozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997)

Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002b):

- sprememba tarčnega mesta oz. oprijemališča antibiotika;
- encimska razgradnja antibiotika;
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik;
- sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik;
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim prenosom;

Ti mehanizmi so najbolj preučeni pri antibiotikih, delujejo pa tudi pri delovanju drugih protimikrobnih snovi, vključno z rastlinskimi izvlečki (Seme, 2002b).

## 2.5 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

Za ugotavljanje občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem obstajajo določena priporočila (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Barker, 1999). Za testiranje občutljivosti bakterij uporabljajo številne metode, dilucijske in difuzijske. Izbira metode je odvisna od mnogih zahtev, med drugim od občutljivosti metode, enostavnosti izvedbe, fleksibilnosti in možne avtomatizacije metode. Na končni izid testa vpliva mnogo dejavnikov: metode separacije oz. ekstrakcije protimikrobnih snovi, volumen inokuluma, rastna faza tarčnega organizma, vrsta rastnega medija, pH medija ter čas in temperatura inkubacije (Rios in sod., 1988).

**Preglednica 2-1:** Nekatero metode za določanje občutljivosti bakterij za protimikrobne snovi (Burt, 2004)

Namen	Metoda	Način odčitavanja
Presejalni testi protimikrobne aktivnosti	Metoda difuzije v agarju z diski  Metoda difuzije v agarju z luknjicami	Cona inhibicije rasti na agarju
Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti	Dilucijska metoda v agarju  Dilucijska metoda v bujonu	Rast na gojišču  Vidna rast/ motnost Absorbanca (optična gostota) Sprememba prevodnosti Štetje kolonij
Ugotavljanje kinetike protimikrobne aktivnosti	Krivulja preživetja	Vidna rast/ motnost Optična gostota Absorbanca (optična gostota) Sprememba prevodnosti Štetje kolonij
Opazovanje fizičnih učinkov protimikrobne aktivnosti	Elektronska mikroskopija	

Odpornost je definirana kot začasna ali trajna sposobnost mikroorganizma in njegovih potomcev, da ohrani živost in se razmnožuje pod pogoji, ki bi uničili oz. ustavili razvoj ostalih mikroorganizmov (Cloete, 2003). Najpogosteje uporabljeno merilo odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim sredstvom je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

**Preglednica 2-2:** Nekateri najpogostejši izrazi in njihove definicije, ki se v literaturi uporabljajo kot merilo protimikrobne učinkovitosti (Burt, 2004)

Izraz	Definicija
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)	- najnižja koncentracija, ki zniža preživelost celic v inokulumu - najnižja koncentracija protimikrobnega agensa, ki inhibira vse testirane organizme po 48 urni inkubaciji - najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast testnega mikroorganizma - najnižja koncentracija, ki se kaže v značilnem znižanju števila celic v inokulumu (>90 %)
Minimalna baktericidna koncentracija (MBC)	- koncentracija, ki ubije 99,9% ali več inokuluma - najnižja koncentracija, pri kateri ni opaziti rasti ob ponovni kultivaciji v svež bujon
Bakteriostatična koncentracija	- najnižja koncentracija, pri kateri bakterije ne rastejo v bujonu, vendar zrastejo po precepitvi na sveže gojišče
Baktericidna koncentracija	- najnižja koncentracija, pri kateri bakterije ne rastejo v bujonu, in ne zrastejo po precepitvi na sveže gojišče

Določanje vrednosti MIC je uporabno za vrednotenje relativne stopnje občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem in za primerjanje relativnih aktivnosti agensov proti različnim vrstam mikroorganizmov (Burt, 2004). Tako lahko glede na vrednost MIC določimo učinkovitost protimikrobnega sredstva. Če se pojavlja sprememba v občutljivosti mikroorganizma do določenega protimikrobnega sredstva, to pomeni, da je organizem razvil odpornost, saj ga začne zavračati in se nanj ne odziva več. Tarče delovanja protimikrobnih sredstev so ponavadi celična stena, proteini v membrani, sinteza folne kisline, metabolizem nukleinskih kislin, genetski material, encimi, itd. (Gilbert in McBain, 2003). Raziskave so pokazale, da so vrednosti MIC za različne mikroorganizme v bujonu nekoliko nižje kot na agarju (Burt, 2004).

### 2.5.1 Difuzijske metode

Difuzijske metode se veliko uporabljajo za rutinske preiskave, omogočajo hitrejše rezultate, a imajo omejitve. Engberg in sod. (1999) so ugotovili, da difuzijske metode dajejo nižje rezultate za vrednosti MIC kot druge metode.

Difuzijske metode v agarju z diski

Difuzijska metoda z diski se uporablja za določanje občutljivosti bakterijskih izločkov za različna protimikrobna sredstva. Pri izvedbi te metode postavimo papirnate diske, prepojene z določeno količino protimikrobne snovi, na agar, inokuliran s testnim mikroorganizmom. Protimikrobno sredstvo difundira skozi agar. Ko razdalja od diska narašča, koncentracija protimikrobnega sredstva logaritemsko pada. Nastanejo inhibicijske cone. Čim širše so, tem bolj učinkovito je protimikrobno sredstvo. Metoda ima številne prednosti: tehnično je preprosto izvedljiva in ponovljiva, cenovno je ugodna in ne zahteva drage opreme, daje rezultate, ki se lahko interpretirajo in je prilagodljiva glede na izbiro protimikrobnih sredstev za testiranje (Woods in Washington, 1999).

### 2.5.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne koncentracije (najpogosteje izražene v  $\mu\text{g/mL}$ ) protimikrobnega agensa, ki je potreben, da ubije ali inhibira mikroorganizem. Protokoli za določanje protimikrobne inhibitorne aktivnosti so izpeljani z metodami v tekočih ali na trdnih gojiščih. Če protimikrobni agens razredčimo v trdnem gojišču, govorimo o dilucijski metodi v agarju, če pa testirani agens razredčimo v tekočem gojišču, pa govorimo o makro- ali mikrodilucijski metodi v bujonu (Woods in Washington, 1999).

#### Dilucijske metode v agarju

Dilucijska metoda v agarju je dobro standardizirana in zanesljiva tehnika testiranja, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje drugih metod. V primerjavi z dilucijsko metodo v bujonu omogoča hitrejšo detekcijo kontaminacije. Največja slabost dilucijske metode v agarju je velika poraba materiala in časa (Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana metoda za ugotavljanje občutljivosti bakterij. Za testiranje občutljivosti bakterij *Staphylococcus aureus* se izvaja v aerobnih pogojih na trdnem gojišču (najpogosteje se uporablja gojišče TSA – tripton soja agar), vendar se zaradi dolgotrajnosti le redko uporablja v laboratorijih za rutinske preiskave. Omogoča sočasno testiranje večjega števila izolatov, opazna pa je tudi naključna kontaminacija in heterogenost mikroorganizmov na gojišču (Woods in Washington, 1999).

### 2.5.3 Kinetika rasti ali odmiranja

Bakteriocidni ali bakteriostatični učinek v odvisnosti od kontaktnega časa protimikrobnega sredstva lahko podamo s krivuljo inhibirane rasti ali krivuljo odmiranja. Najpogosteje uporabljena metoda za določanje teh učinkov je merjenje optične gostote kot merila koncentracije celic v tekočem gojišču in štetje kolonijskih enot po nacepljanju in inkubaciji na trdnem gojišču (Burt, 2004).

### 2.5.4 Drugi načini

Spremljanje fizikalnih učinkov protibakterijske aktivnosti protimikrobnih snovi pa lahko poteka z elektronskim mikroskopom. Na ta način lahko raziskujemo poškodbe bakterijske celične stene in izgube celičnih vsebin. Pri pripravi vzorcev za elektronski mikroskop moramo zagotoviti, da so zaznane razlike med kontrolnimi in tretiranimi celicami posledica učinkov protimikrobnih snovi in ne metode priprave preparatov (Burt, 2004).

Poleg ugotavljanja inhibicije rasti lahko protimikrobno učinkovitost merimo tudi tako, da ugotavljamo povečano občutljivost spor na toplotno obdelavo ali tako, da merimo zmanjšano sintezo toksinov.

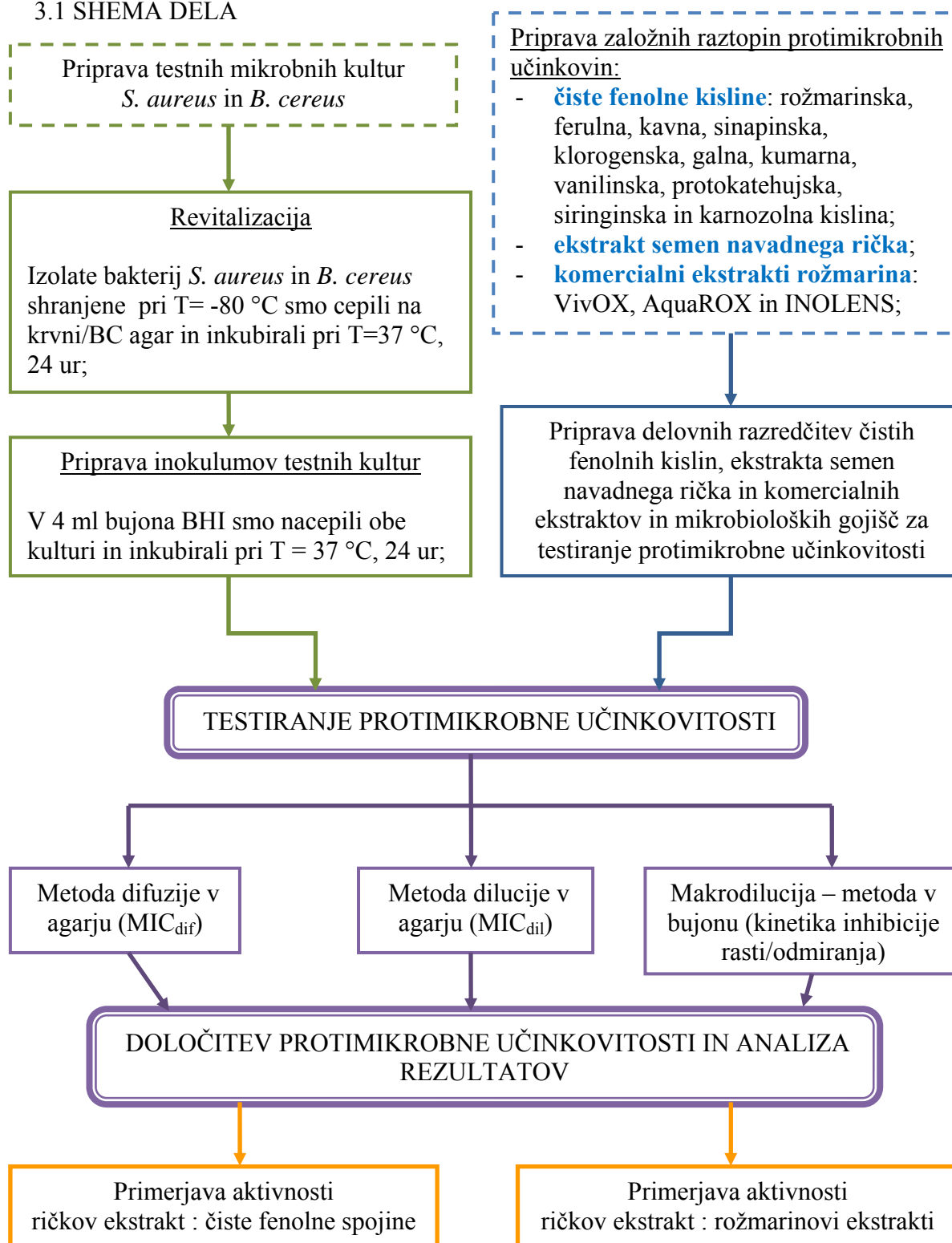
*B. cereus* je psihrotrofni mikroorganizem, največkrat izoliran iz pasteriziranih in steriliziranih živil. Da bi zagotovili varnost teh produktov, je pomembno razumeti faktorje,

ki vplivajo na toplotno odpornost bakterijskih spor. Ugotovljeno je bilo, da temperatura subkulture in sestava ter pH gojišča, pa tudi prisotnost nekaterih dovoljenih aditivov v hrani, vplivajo na klitje, razvoj in toplotno odpornost bakterijskih spor. Nakisanje ima skupaj s toplotno obdelavo sinergističen učinek, in sicer zmanjša toplotno odpornost *B. cereus* in inhibira rast spor. Za ostale mikroorganizme, ki prav tako tvorijo spore, je bilo ugotovljeno, da je znižanje D-vrednosti (čas, ki je potreben za 90% redukcijo mikroorganizmov pri konstantni temperaturi) pri nakisanju odvisno od substrata in od tipa kislinskega medija (Moussa-Boudjemaa in sod., 2006).

Plesni vrste *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus* so sposobne proizvajati kancerogene aflatoksine. Že zelo majhna okužba z aflatoksini ima lahko velik negativni učinek na varnost živil in ekonomsko vrednost kmetijskih pridelkov. Znano je, da oksidativni stres stimulira sintezo aflatoksinov plesni *A. parasiticus*, po drugi strani pa določeni antioksidanti inhibirajo njihovo sintezo. Tanini iz orehov inhibirajo sintezo aflatoksinov s pomočjo galne kisline, ki ima proti-aflatoksigene učinke. Aflatoksigeni aspergili rastejo na maščobno bogatih rastlinskih gojiščih (arašidi, lešniki, orehi). Proti-aflatoksigena aktivnost naravnih antioksidantov, kot je galna kislina, je verjetno v povezavi z njihovo sposobnostjo zmanjševanja oksidativnega stresa gliv (Kim in sod., 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 SHEMA DELA



Slika 3-1: Shema poteka dela

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Mikroorganizmi

Pri poskusih smo uporabili sev *B. cereus* ŽMJ 164 (WSBC 10530) in sev *S. aureus* ŽMJ 72 (ATCC 25923) iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo. Kulture so bile trajno shranjene v tekočem gojišču z dodatkom glicerola.

**Preglednica 3-1:** Delovni mikroorganizmi rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*

Izolat	
ŽMJ 164	<i>B. cereus</i> WSBC 10530 – emetični toksin
ŽMJ 72	<i>S. aureus</i> ATCC 25923

### 3.2.2 Mikrobiološka gojišča

#### 3.2.2.1 Agar TSA (angl. tryptone soya agar)

Osnovni medij:

- 20 g tripton soja agar (Oxoid, CM0131, Anglija)

Dodatki:

- 1,25 g dikalijev hidrogenfosfata  $K_2HPO_4$
- 1,25 g D-(+)-glukoze (Kemika, 0705007, Hrvaška)
- 3,0 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija)

Priprava za dilucijsko metodo v agarju:

Sestavine smo zatehtali v 1000 ml steklenico in dolili 500 ml destilirane vode, premešali ter najprej v avtoklavu segrevali 10 min na 100 °C, da so se sestavine dobro raztopile. Z dispensorjem smo odmerili po 6 ml gojišča v epruvete. Epruvete smo nato pokrili s pokrovčkom ter sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Do uporabe smo epruvete hranili v vodni kopeli na 45 °C. Epruvete smo lahko hranili v hladilniku, vendar smo jih morali pred uporabo ponovno avtoklavirati 10 min na 100 °C.

Priprava za štetje na ploščah:

Zatehtali smo 20 g osnovnega medija za TSA, dodali dodatke in raztopili v 500 ml destilirane vode. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 min pri 121 °C.

#### 3.2.2.2 Agar BCA (angl. *Bacillus cereus* agar)

Osnovni medij:

- 20,5 g *Bacillus cereus* agar base (Oxoid, CM617, Anglija)

Dodatki:

- *Bacillus cereus* antimicrobial supplement (Biolife, 4240001, Italija)
- 25 ml egg yolk emulsion, 50 % - jajčna emulzija (Biolife, 42111601, Italija)



Priprava:

Zatehtali smo 20,5 g osnovnega gojišča, dodali 475 ml destilirane vode in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min). Nato smo ohladili na 47 °C. Ko je bila zmes ohlajena, smo dodali oba dodatka in destilirano vodo. Zmes smo razlili v petrijevke in pustili, da se je agar strdil. Tako pripravljene plošče smo lahko hranili v hladilniku 1 mesec.

### 3.2.2.3 Tekoče gojišče TSB (angl. tryptone soya broth)

Osnovni medij:

- 15 g tryptone soya broth – tripton soja bujon (Oxoid, CM0129, Anglija)

Priprava:

Zatehtali smo 15 g osnovnega medija TSB in ga raztopili v 500 ml destilirane vode. Sterilizirali smo pri 121 °C, 15 min. Tako pripravljenega smo shranili v hladilniku.

## 3.2.3 Raztopine in dodatki

### 3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo raztopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :

- 3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Hrvaška)
- 1100 ml destilirane vode

Priprava:

Pripravili smo 100 ml vodne raztopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s koncentracijo topljenca 3,4 g na 100 ml. Za tem smo 1,2 ml tako pripravljene osnovne raztopine razredčili na 1000 ml z destilirano vodo. Zmes smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

### 3.2.3.2 Drugo

- Absolutni etanol (Merck Schuchardt, Nemčija)
- Etanol 96 % (Merck Schuchardt, Nemčija)
- Diski premera 6 mm (BD, 231039, Francija)

## 3.2.4 Kisline in ekstrakti

### 3.2.4.1 Komerzialno pripravljene kisline

Komerzialno pripravljene kisline - rožmarinska kislina in karnozolna kislina (Vitiva, Slovenija), ferulna kislina in kumarna kislina (Merck Schuchardt, Nemčija), kavna kislina (Sigma – Aldrich Chemie, Švica), klorogenska kislina, vanilinska kislina, kina kislina, sinapinska kislina, galna kislina, protokatehujnska kislina (Sigma – Aldrich Chemie, Nemčija), siringinska kislina (Fluka, Sigma – Aldrich Chemie, Nemčija).

Priprava izhodne raztopine:

Zatehtali smo ustrezno količino posamezne kisline. Za pripravo izhodnih raztopin smo uporabili ustrezno topilo. Preiskovane fenolne kisline (z izjemo kina in klorogenske kisline, ki sta topni v vodi) so topne v etanolu.

Ustrezno koncentracijo v gojišču smo dosegli na dva načina:

- izhodno raztopino smo razredčili z ustreznim topilom;
- ustrezen volumen izhodne raztopine smo odpipetirali v gojišče.

#### 3.2.4.2 Ekstrakt semen navadnega rička

Ekstrakt semen navadnega rička (Katedra za kemijo, Oddelek za živilstvo, BF) - Ekstrakt je bil pridobljen iz zmletih in razmaščenih semen navadnega rička z uporabo ekstrakcijskega topila metanol/voda (70:30 v/v). Po odparevanju topila smo suhi preostanek raztopili v vodi. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v pripravljene raztopini, določena z metodo Folin – Ciocalteu, je bila 2,7 mg/ml (izražena na klorogensko kislino).

Priprava raztopin z ustrezno koncentracijo ekstrakta semen navadnega rička:

Ekstrakt semen navadnega rička je bil pripravljen kot vodna raztopina, koncentracija skupnih fenolnih spojin je bila 2,7 mg/ml. Željeno koncentracijo fenolnih spojin ekstrakta semen navadnega rička v gojišču smo dobili tako, da smo pipetirali ustrezen volumen raztopine ekstrakta semen rička v gojišče TSA.

#### 3.2.4.3 Ekstrakti rožmarina

Komercialno pripravljene ekstrakti VivOX 15, VivOX 20, VivOX 40 in VivOX 70, AquaROX 15 in AquaROX 40, INOLENS 12 in INOLENS 18 iz Vitive (Markovci, Slovenija).

Priprava raztopin z ustrezno koncentracijo komercialnih ekstraktov:

Zatehtali smo ustrezno količino rožmarinovega ekstrakta in ga raztopili v etanolu. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v pripravljene raztopini je bila določena z metodo Folin-Ciocalteu v laboratoriju Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, BF. Ustrezno koncentracijo ekstrakta oz. skupnih fenolnih spojin v gojišču smo dosegli tako, da smo izhodno raztopino razredčili z etanolom in odpipetirali določen volumen tako pripravljene raztopine v gojišče.

#### 3.2.5 Laboratorijska oprema

- Splošna mikrobiološka oprema: cepilne zanke, avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf), nastavki za pipete – 10 µl, 100 µl in 1000 µl (Eppendorf, Plastibrand), epice (Eppendorf), petrijeve plošče (Labor tehnika Golias), bele mikrotitrne ploščice z ravnim dnom (Nunc), laboratorijske steklenice – 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran), merilni valji (Plastibrand), plastični lončki (Labor tehnika Golias), plastične kivete, pipetor (Eppendorf easypet), parafilm »M« (American National Can), plinski gorilnik, pinceta, steklovina
- Zaščitna mikrobna komora SMBC 122AV (Iskra PIO, Slovenija)

- Avtoklav (Sutjeska, Srbija)
- Sušilnik (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- Digestorij (TIP382, Medilab Rauh, Slovenija)
- Tehnica (Sartorius analytica, Nemčija)
- Digitalna tehnica (PB1502-S, Mettler Toledo, Švica)
- Inkubator (Kambič SP190, Slovenija)
- Mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo, Japonska)
- Zmrzovalnik (LTH, Slovenija)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Vrtinčnik (Yellowline, IKA)
- Plinski gorilnik
- Vodna kopel (Kambič, Slovenija)
- Stresalnik (Vibromix 314 EVT, Tehnica, Slovenija)
- Programska oprema: Microsoft office, programski paket Magellan

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Revitalizacija bakterij

Izolate bakterij *S. aureus*, shranjene pri temperaturi – 80 °C, smo s cepilno zanko ob ognju prenesli na krvni agar, izolate bakterij *B. cereus*, ki so bile prav tako shranjene pri temperaturi -80 °C, pa na BC agar. Petrijeve plošče smo nato zložili v inkubator in jih aerobno inkubirali pri temperaturi 37 °C do pojava tipičnih kolonij bakterij *S. aureus* in *B. cereus*.

#### 3.3.2 Priprava inokuluma

Po inkubaciji smo pregledali plošče in ugotavljali prisotnost značilnih kolonij na selektivnem gojišču. Nato smo v epruvete s 4 ml bujona BHI nacepili obe kulturi, premešali na vrtinčniku in jih inkubirali na stresalniku, pri temperaturi 37 °C, 24 ur. Tako smo dosegli ustrezno koncentracijo celic v zgodnji stacionarni fazi.

#### 5.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Ker je za vsako uporabljeno metodo ugotavljanja občutljivosti bakterij pomembna koncentracija celic, smo vzporedno z vsako metodo določali tudi število za delitev sposobnih celic v inokulumu, in sicer kot CFU/ml vzorca na selektivnem gojišču TSA.

Aseptično smo odpipetirali 1 ml inokuluma iz gojišča BHI v epruveto z 9 ml fiziološke raztopine in razredčevali po Kochu do  $10^{-7}$  in  $10^{-8}$  pri bakterijah *S. aureus* oziroma do  $10^{-6}$  in  $10^{-7}$  pri bakterijah *B. cereus*. Ustrezne razredčitve smo aseptično odpipetirali na trdno gojišče TSA ter jih s sterilno palčko razmazali po gojišču. Petrijevke smo inkubirali pri temperaturi 37 °C, 24 ur pri bacilih oz. 48 ur pri stafilokokih. Po inkubaciji smo prešteli kolonije na ploščah, na katerih je zraslo od 10 do 300 kolonij.

Za izračun povprečne koncentracije smo uporabili enačbo:

$$\text{CFU/ml} = \Sigma C / (n_1 + 0,1 * n_2) * R$$

$\Sigma C$  vsota kolonij, ki so zrasle na vseh ploščah  
 $n_1$  število plošč pri prvi razredčitvi  
 $n_2$  število plošč pri drugi razredčitvi  
R prva razredčitev

### 3.3.4 Izvedba difuzijske metode v agarju

1 ml pripravljenega inokuluma čiste kulture smo inokulirali v prazno, sterilno petrijevko, prelili s TSA agarjem ter previdno premešali. Ko se je agar strdil, smo označili mesta, na katera smo kasneje postavili diske. Na diske smo nato dodali 10  $\mu$ l izhodne raztopine ekstrakta in ustreznih razredčitev. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili disk, prepojen z antibiotikom (oksitetraciklin - NA30), kot negativno pa smo dodali absolutni etanol in vodo. Petrijeve plošče smo inkubirali s pokrovom navzgor 24 ur za *B. cereus* in 48 ur za *S. aureus*, pri temperaturi 37 °C. Po 24- oz. 48- urni inkubaciji smo izmerili cone inhibicije rasti okoli diskov.

### 3.3.5 Izvedba dilucijske metode v agarju

Priporočena koncentracija celic v inokulumu pri dilucijski metodi v agarju je 10<sup>4</sup> CFU/ml. Pripravili smo razredčitve kulture v fiziološki raztopini in tako dobili standardiziran inokulum.

Predhodno smo si iz osnovnih raztopin ekstraktov in kislin pripravili serije razredčitev v absolutnem etanolu.

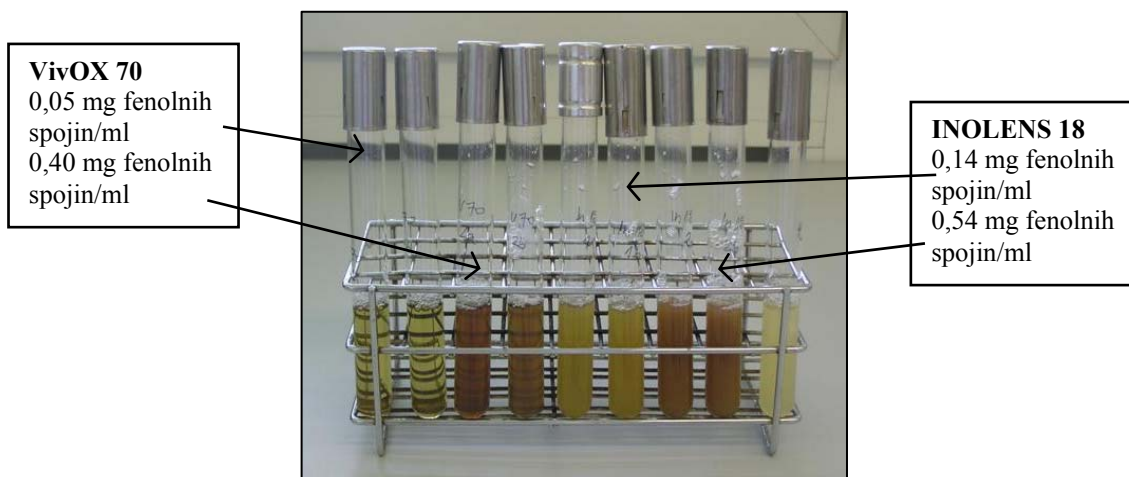
Prav tako smo predhodno pripravili epruvete z gojiščem ter jih postavili v vodno kopel na 45 °C. V tako pripravljene epruvete smo pipetirali ustrezno količino ekstrakta in vsebino premešali na vrtničnem mešalu ter prelili v male petrijeve plošče (premer 35 mm) in počakali, da se je zmes ekstrakta in gojišča TSA strdila. S cepilno zanko smo po površini strjene zmesi nacepili kulturo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili gojišče TSA brez dodane raztopine ekstrakta. Petrijeve plošče smo inkubirali s pokrovom navzdol, pri temperaturi 37 °C, 24 ur za bakterije rodu *Bacillus* in 48 ur za bakterije rodu *Staphylococcus*. Po inkubaciji smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo - najnižjo koncentracijo ekstrakta v gojišču, ki je zavrla (inhibirala) rast bakterij.

Vzporedno smo določali število celic v inokulumu s štetjem kolonij na selektivnem gojišču TSA na enak način, kot je opisano v točki 3.3.3.

### 3.3.6 Izvedba dilucijske metode v bujonu oz. spremljanje kinetike inhibicije rasti/odmiranja bakterij

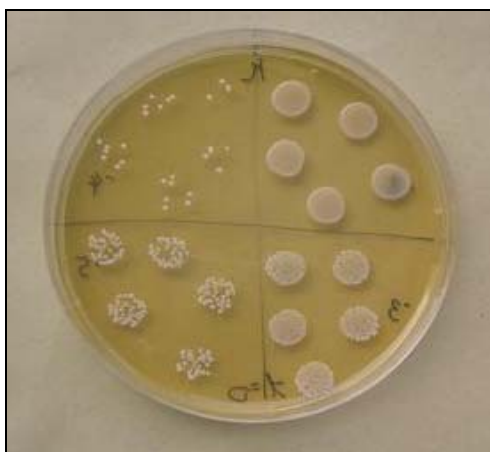
Dilucijsko metodo v bujonu smo izvedli za komercialno pripravljene ekstrakte, ki so bili glede na rezultate difuzijske in dilucijske metode najbolj učinkoviti. To so bili AquaROX 40, VivOX 70 in INOLENS 18.

V epruvete smo najprej odpipetirali 9 ml tekočega gojišča TSB, nato smo dodali ustrezen volumen ekstrakta in nazadnje še 1 ml kulture ( $10^{-1}$ ). Nato smo dali epruvete v stresalnik, ter vzorčili na vsake 3 ure, 24 ur.



**Slika 3-2:** Razredčitve ekstraktov rožmarina VivOX 70 in INOLENS 18 v gojišču TSB (v dveh ponovitvah) ter kontrola (gojišče TSB in kultura *S. aureus*)

Po končanem poizkusu smo prešteli število kolonij na ploščah, izračunali koncentracijo CFU/ml in narisali krivulje odmiranja/ rasti.



**Slika 3-3:** Kontrola koncentracije celic v inokulumu *S. aureus* s štetjem kolonij po nacepiti na ploščo

## 4 REZULTATI

Ugotavljali smo, če je ekstrakt semen navadnega rička dober naravni vir protimikrobnih snovi. Za to nalogo smo najprej uporabili enostaven način testiranja, to je difuzijska metoda v agarju. Učinkovitost ekstrakta semen navadnega rička smo primerjali z nekaterimi komercialnimi rastlinskimi ekstrakti.

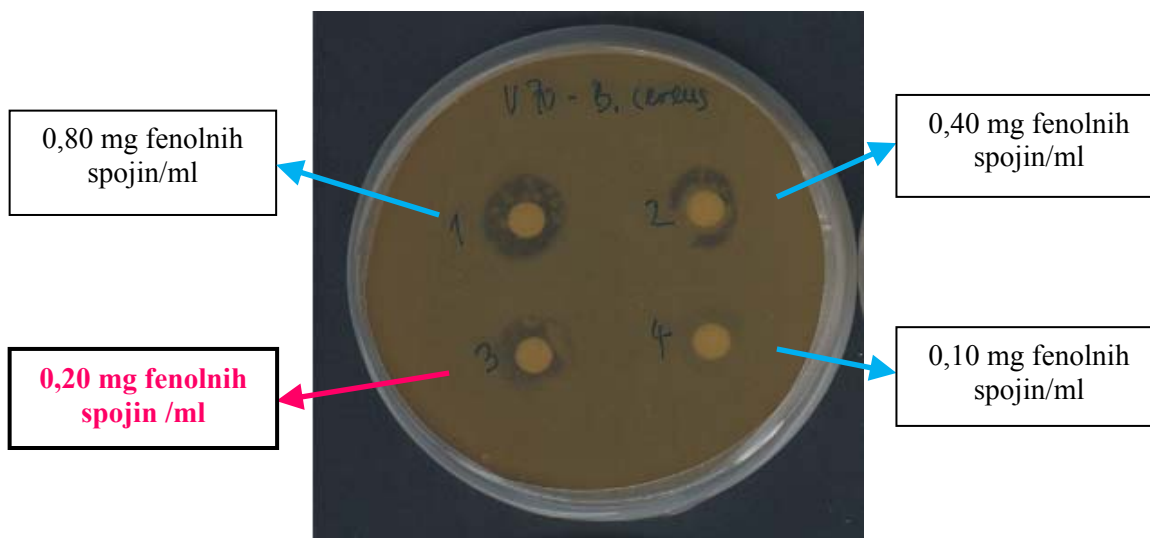
Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu semen navadnega rička je bila izražena z mg klorogenske kisline/g ekstrakta. Zato smo tudi v rožmarinovih ekstraktih vsebnost fenolnih spojin določili s Folin – Ciocalteu metodo (Katedra za kemijo, Oddelek za živilstvo, BF) in izrazili z mg klorogenske kisline/g ekstrakta. Rezultati so podani v preglednici 4-1. Zaradi boljše primerjave z ekstraktom semen navadnega rička so vsi nadaljnji rezultati o protimikrobni učinkovitosti ekstraktov izraženi kot mg fenolnih spojin na ml gojišča v dilucijskem testu v agarju ali tekočem gojišču. Določili smo minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), ki so inhibirale rast na agarju ali v tekočem gojišču.

**Preglednica 4-1:** Vsebnost fenolnih spojin v komercialnih rožmarinovih ekstraktih

Komercialni rožmarinovi ekstrakti	Vsebnost fenolnih spojin (mg klorogenske kisline/g ekstrakta)
AquaROX 15	593
AquaROX 40	915
INOLENS 12	183
INOLENS 18	217
VivOX 15	198
VivOX 20	216
VivOX 40	438
VivOX 70	636

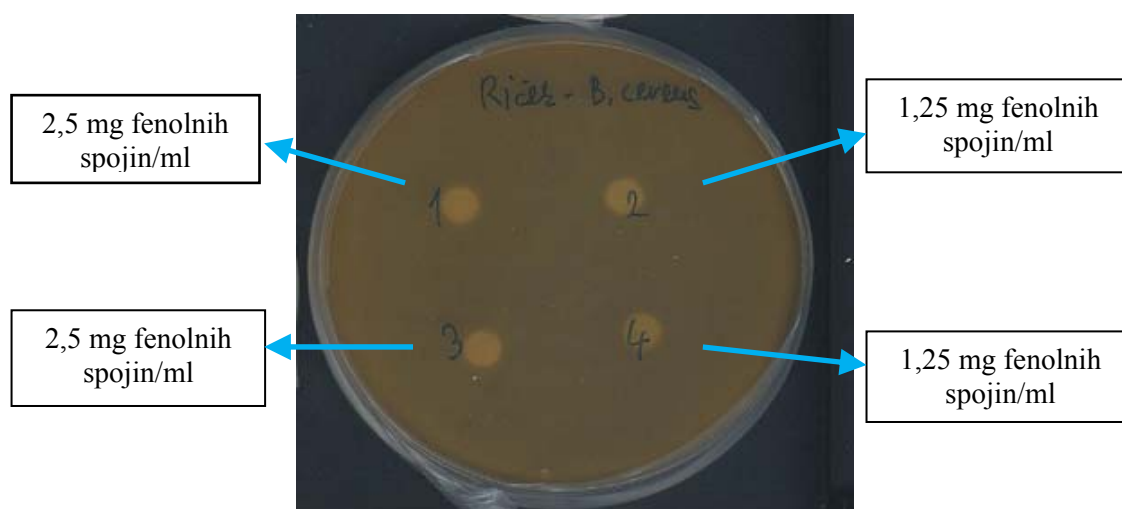
#### 4.1 DIFUZIJSKA METODA V AGARJU

Na sliki 4-1 je prikazana difuzijska metoda v agarju z diski za ekstrakt VivOX 70, kjer smo testirali koncentracije med 0,16 in 1,25 mg ekstrakta/ml oziroma med 0,10 in 0,80 mg fenolnih spojin/ml. S slike je razvidno, da je druga najnižja koncentracija inhibirala rast bakterij, pojavila se je cona okoli diska.



**Slika 4-1:** Metoda difuzije v agarju z diski za rožmarinov ekstrakt VivOX 70 in testni organizem *B. cereus*

To metodo smo uporabili tudi za testiranje MIC vrednosti ekstrakta semen navadnega rička, vendar nismo dosegli koncentracije, ki bi povzročila inhibicijo bakterijske rasti.



**Slika 4-2:** Metoda difuzije v agarju z diski za ekstrakt semen navadnega rička in testni organizem *B. cereus*

Iz semen navadnega rička smo lahko ekstrahirali le 2,7 mg fenolnih spojin/ml, to pomeni, da je bila najvišja koncentracija, ki smo jo lahko odpipetirali na diske, 2,5 mg fenolnih spojin/ml ekstrakta (0,926 ml ekstrakta rička + 0,074 ml vode). V vseh primerih smo na diske dodajali le 10 µl ekstrakta oz. njegove ustrezne razredčitve, zato je bila koncentracija fenolnih spojin prenizka za inhibicijo bakterijske rasti.

Vsi rezultati protimikrobnega testiranja komercialnih rožmarinovitih ekstraktov in ekstrakta semen rička s testnima organizmoma *B. cereus* in *S. aureus* in difuzijsko metodo v agarju z diski so podani v preglednicah 4-2 in 4-3.



**Preglednica 4-2:** Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem *Bacillus cereus* WSBC 10530 z metodo difuzije v agarju (+ pomeni rast kulture, - pomeni inhibicijo rasti, / pomeni, da konc. ni bila testirana)

Protimikrobne snovi	MIC, določena z metodo difuzije v agarju (mg fenolnih spojin/ml) za <i>B. cereus</i>														
	20	11,86	10	5	4,58	2,5	1,25	0,63	0,31	0,23	0,20	0,16	0,14	0,12	0,08
Ekstrakt semen navadnega rička	/	/	/	/	/	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/
AquaROX 15	/	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/
AquaROX 40	/	-	-	-	-	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
INOLENS 12	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+	/	/	/
INOLENS 18	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	+
VivOX 15	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	+
VivOX 20	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	+
VivOX 40	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	+
VivOX 70	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	+	+	+	/

**Preglednica 4-3:** Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 z metodo difuzije v agarju (+ pomeni rast kulture, - pomeni inhibicijo rasti, / pomeni, da konc. ni bila testirana)

Protimikrobne snovi	MIC, določena z metodo difuzije v agarju (mg fenolnih spojin/ml) za <i>S. aureus</i>															
	20	18,30	11,86	10	5	2,5	1,25	0,99	0,92	0,63	0,54	0,40	0,31	0,28	0,16	0,08
Ekstrakt semen navadnega rička	/	/	/	/	/	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/
AquaROX 15	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
AquaROX 40	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
INOLENS 12	/	/	/	/	-	-	-	-	-	+	+	+	+	/	/	/
INOLENS 18	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	+	+	/	/
VivOX 15	/	/	/	/	-	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	/
VivOX 20	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	+	+	+	/	/
VivOX 40	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VivOX 70	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	+	+	/	/

Preglednici 4-2 in 4-3 sta zbirni preglednici opravljenih poskusov, kjer so za vsak ekstrakt predstavljene najmanj štiri različne testirane koncentracije. V vseh primerih (razen pri ekstraktu semen navadnega rička) so vidne najmanjše koncentracije ekstraktov, ki so povzročile inhibicijsko cono. Rezultati so izraženi kot najnižja koncentracija fenolnih spojin na ml topila (etanola), ki je povzročila vsaj minimalno inhibicijsko cono.

Najbolj učinkoviti so bili ekstrakti skupine VivOX. Izračunali smo, da so bile najmanjše koncentracije, ki so povzročile inhibicijsko cono, med 0,12 in 0,20 mg fenolnih spojin/ml pri bakterijah *B. cereus* in med 0,28 in 0,99 mg fenolnih spojin/ml pri bakterijah *S. aureus*. Slabše učinkovita pa sta bila ekstrakta skupine AquaROX. Potrebovali smo med 4,58 in 11,86 mg fenolnih spojin/ml, da smo dosegli inhibicijski učinek na bakterije *B. cereus* in *S. aureus*. Pri ekstraktu iz semen navadnega rička vrednost MIC ni bila dosežena. Učinkovitih koncentracij fenolnih kislin glede na njihovo koncentracijo v ekstraktu semen navadnega rička in standardno izvedbo metode nismo mogli odpipetirati na diske.

#### 4.2 DILUCIJSKA METODA V AGARJU

Nato smo preverili še dilucijsko metodo v agarju. Rezultati protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička, čistih fenolnih spojin in komercialnih rastlinskih ekstraktov proti testnima organizmoma *B. cereus* in *S. aureus*, izmerjeni z metodo dilucije v agarju, so podani v preglednicah 4-4 in 4-5.

**Preglednica 4-4:** Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja čistih fenolnih kislin, ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem *Bacillus cereus* WSBC 10530 z metodo dilucije v agarju (+ pomeni rast kulture, - pomeni inhibicijo rasti, / pomeni, da konc. ni bila testirana)

Protimikrobne snovi	MIC, določena z metodo dilucije v agarju (mg fenolnih spojin/ml) za <i>B. cereus</i>														
	20	10	5	2,97	2,5	1,25	1,14	0,63	0,31	0,16	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02
Galna kislina	-	-	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/
Protokatehujska kislina	-	-	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/
Vanilinska kislina	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siringinska kislina	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kina kislina	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>p</i> -Kumarna kislina	/	/	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kavna kislina	/	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferulna kislina	/	/	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinapinska kislina	/	/	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Klorogenska kislina	-	-	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/
Kamozolna kislina	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Rožmarinska kislina	-	-	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/
Ekstrakt semen navadnega rička	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+	+	+	+	/
AquaROX 15	/	/	-	-	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/
AquaROX 40	/	/	/	-	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	/
INOLENS 12	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	+	+	+
INOLENS 18	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	+	+
VivOX 15	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	+
VivOX 20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	+
VivOX 40	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	+
VivOX 70	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+

**Preglednica 4-5:** Rezultati testiranja protimikrobnega delovanja čistih fenolnih kislín, ekstrakta semen navadnega rička in ekstraktov rožmarina za testni organizem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 z metodo dilucije v agarju (+ pomeni rast kulture, - pomeni inhibicijo rasti, / pomeni, da konc. ni bila testirana)

Protimikrobne snovi	MIC, določena z metodo dilucije v agarju (mg fenolnih spojin/ml) za <i>S. aureus</i>															
	10	5	2,97	2,5	2,29	1,25	1,14	0,63	0,31	0,23	0,16	0,14	0,08	0,07	0,05	0,04
Galna kislina	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Protokatehujska kislina	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Vanilinska kislina	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Siringinska kislina	-	-	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Kina kislina	-	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
p-Kumarna kislina	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/
Kavna kislina	-	-	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Ferulna kislina	/	-	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Sinapinska kislina	/	-	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Klorogenska kislina	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Karnozolna kislina	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Rožmarinska kislina	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Ekstrakt semen navadnega rička	/	/	/	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/
AquaROX 15	/	-	-	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
AquaROX 40	/	/	-	-	-	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
INOLENS 12	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	+	+	+	/	/	/
INOLENS 18	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	+	+	+	+
VivOX 15	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+
VivOX 20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+
VivOX 40	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+
VivOX 70	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	+

Rezultati učinkovitosti posameznih ekstraktov so podobni kot pri difuzijskem testu, le da so se pokazale kot učinkovite že nižje koncentracije, poleg tega pa so večje razlike med skupinama AquaROX in VivOX.

Ekstrakt semen navadnega rička se je izkazal tudi protimikrobno bolj učinkovit kot same čiste fenolne kisline.

Na podoben način so v korelaciji tudi podatki o glavnih sestavinah v komercialnih ekstraktih ter njihovi protimikrobni učinkovitosti in aktivnosti čistih fenolnih kislin. Najbolj učinkoviti so bili vsi tisti ekstrakti, ki so imeli največjo koncentracijo karnozolne kisline, ker je ta tudi kot čista kislina protimikrobno najučinkovitejša. Poleg tega pa so bili ekstrakti v vseh primerih nekoliko bolj učinkoviti kot čista glavna sestavina.

V primerjavi z ostalimi komercialnimi ekstrakti je bil ekstrakt semen navadnega rička manj učinkovit proti testnima organizmoma.

Ugotovili smo tudi, da so vsi ekstrakti in kisline bolj učinkovali na bacile, kot na stafilokoke. To pomeni, da so stafilokoki manj občutljivi na protimikrobne snovi, oz. so bolj odporni. Preverili smo tudi vpliv etanola na rast bakterij. Ugotovili smo, da dodatek etanola v količinah  $\leq 2$  ml na 6 ml gojišča ne vpliva na rast bakterij. Večji volumen pa že lahko inhibira rast bakterij *B. cereus* in *S. aureus*.

#### 4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV OBEH METOD

Zanimalo nas je tudi, kakšna je primerljivost rezultatov, dobljenih z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju. Rezultati so podani v preglednicah 4-6 in 4-7.

**Preglednica 4-6:** Vrednosti MIC, pridobljene z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju za *Bacillus cereus* WSBC 10530

	MIC za <i>B. cereus</i>			
	Ekstrakt (mg/ml)		Fenolne spojine (mg/ml)	
	Difuzija	Dilucija	Difuzija	Dilucija
AquaROX 15	20	5	11,86	2,97
AquaROX 40	5	1,25	4,58	1,14
INOLENS 12	1,25	0,31	0,23	0,06
INOLENS 18	0,63	0,16	0,14	0,03
VivOX 15	0,63	0,14	0,12	0,03
VivOX 20	0,63	0,13	0,14	0,03
VivOX 40	0,31	0,07	0,14	0,03
VivOX 70	0,31	0,06	0,20	0,04
Navadni riček	/	/	/	0,63

**Preglednica 4-7:** Vrednosti MIC, pridobljene z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju za *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

	MIC za <i>S. aureus</i>			
	Ekstrakt (mg/ml)		Fenolne spojine (mg/ml)	
	Difuzija	Dilucija	Difuzija	Dilucija
AquaROX 15	20	5	11,86	2,97
AquaROX 40	20	2,5	18,30	2,29
INOLENS 12	5	1,25	0,92	0,23
INOLENS 18	2,5	0,63	0,54	0,14
VivOX 15	5	0,42	0,99	0,08
VivOX 20	2,5	0,36	0,54	0,08
VivOX 40	0,63	0,16	0,28	0,07
VivOX 70	0,63	0,08	0,40	0,05
Navadni riček	/	/	/	1,25

Vrednosti MIC, ki smo jih določili z difuzijsko metodo so bile bistveno večje, dejanski pomen tega na rast bakterij v tekočem gojišču pa smo preverili s testiranjem ugotovljenih koncentracij z obema metodama tako, da smo spremljali kinetiko inhibicije rasti in odmiranja bakterij v tekočem gojišču med 24-urno inkubacijo. Rezultati so zbrani v naslednjem poglavju (4.4).

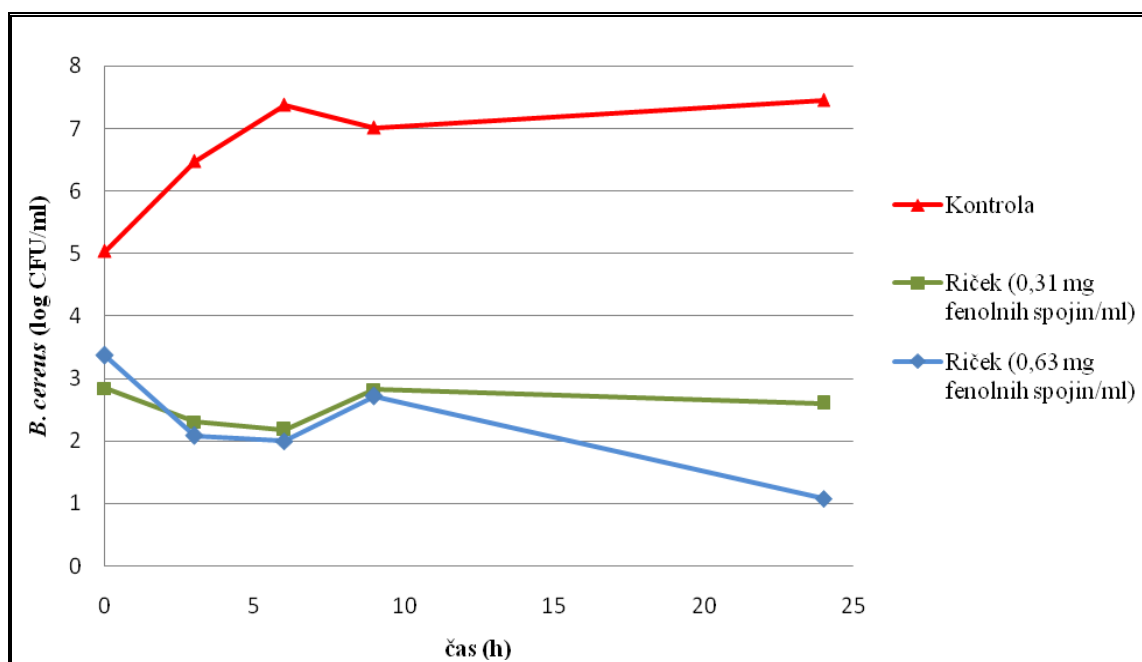
#### 4.4 KINETIKA INHIBICIJE RASTI/ODMIRANJA V TEKOČEM GOJIŠČU

Da bi lahko natančneje definirali protimikrobni učinek koncentracij MIC, dobljenih na agarških gojiščih, smo spremljali rast oz. odmiranje testnih kultur tudi v tekočem gojišču. Izbrali smo ekstrakte, ki so bili z obema metodama najbolj učinkoviti. Rezultati so prikazani na slikah 4-3 do 4-9.

Testirane koncentracije smo izbrali na podlagi rezultatov difuzijske metode v agarju z diski in dilucijske metode v agarju.

##### 4.4.1 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička pri bakteriji *B. cereus*

Pri ekstraktu semen navadnega rička z difuzijsko metodo v agarju nismo dobili MIC vrednosti, zato smo pri kinetiki protimikrobnega delovanja uporabili dve koncentraciji, od katerih je ena inhibirala, druga pa omogočala rast na agarški plošči. Želeli smo potrditi, da MIC vrednost inhibira rast testnega organizma tudi v tekočem gojišču.



**Slika 4-3:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *B. cereus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom ekstrakta semen navadnega rička (standardne deviacije niso prikazane)

S krivulje odmiranja za bakterijo *B. cereus* lahko vidimo, da pri vrednosti MIC za riček (0,63 mg/ml), ki smo jo dobili z dilucijsko metodo v agarju, število celic postopoma pada proti vrednosti nič. Za drugo koncentracijo smo si izbrali nižjo koncentracijo (0,31 mg/ml). Delovanje je bilo za obe koncentraciji inhibitorno le prvih 6 ur, nato pa je število bakterij zopet začelo naraščati, a le nekaj ur, nato pa je ostalo približno enako pri manjši koncentraciji, pri večji koncentraciji pa je spet padlo. Koncentracija celic pa v nobenem



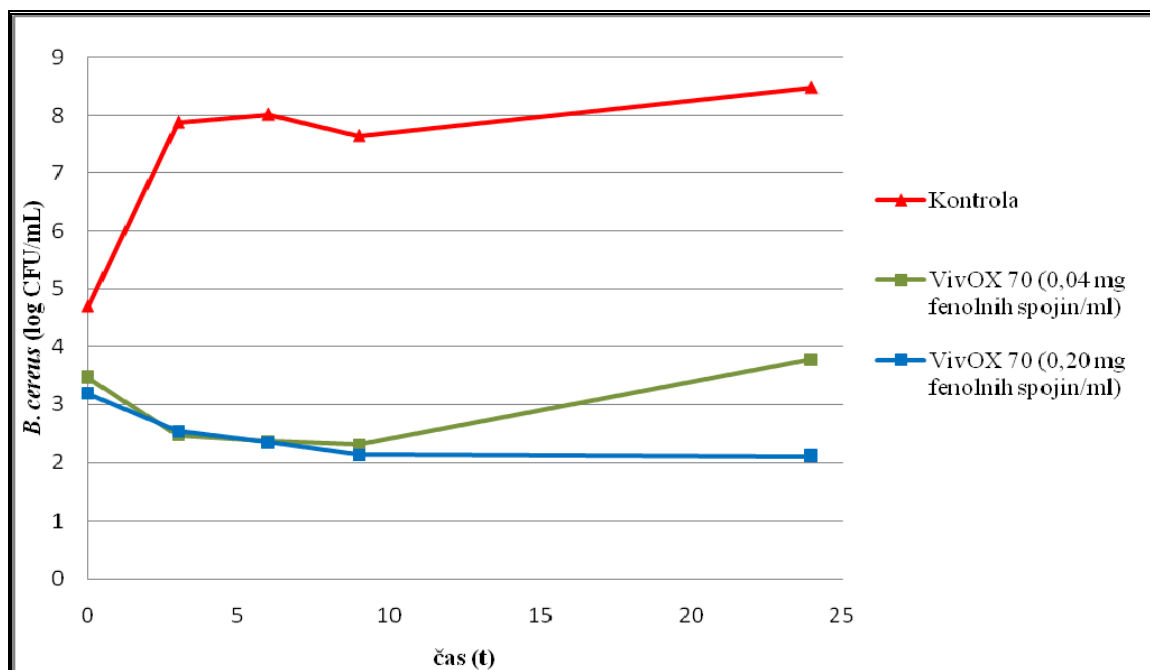
primeru ni preseгла začetne koncentracije celic, torej sta bili v smislu inhibicije rasti učinkoviti obe testirani koncentraciji.

Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da v tekočem gojišču inhibitorno delujejo na rast bakterij že manjše koncentracije, kot smo jih določili z metodo dilucije v agarju.

#### 4.4.2 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus*

Komercialni rožmarinovi ekstrakti so zelo učinkoviti in se dobro topijo v etanolu, zato so bolj primerni za raziskave kot ekstrakt semen navadnega rička ali čiste fenolne kisline. Zato smo tudi mi izbrali komercialne ekstrakte za nadaljna testiranja. Da bi prišli do najboljših rezultatov, pa smo izbrali le najbolj učinkovite.

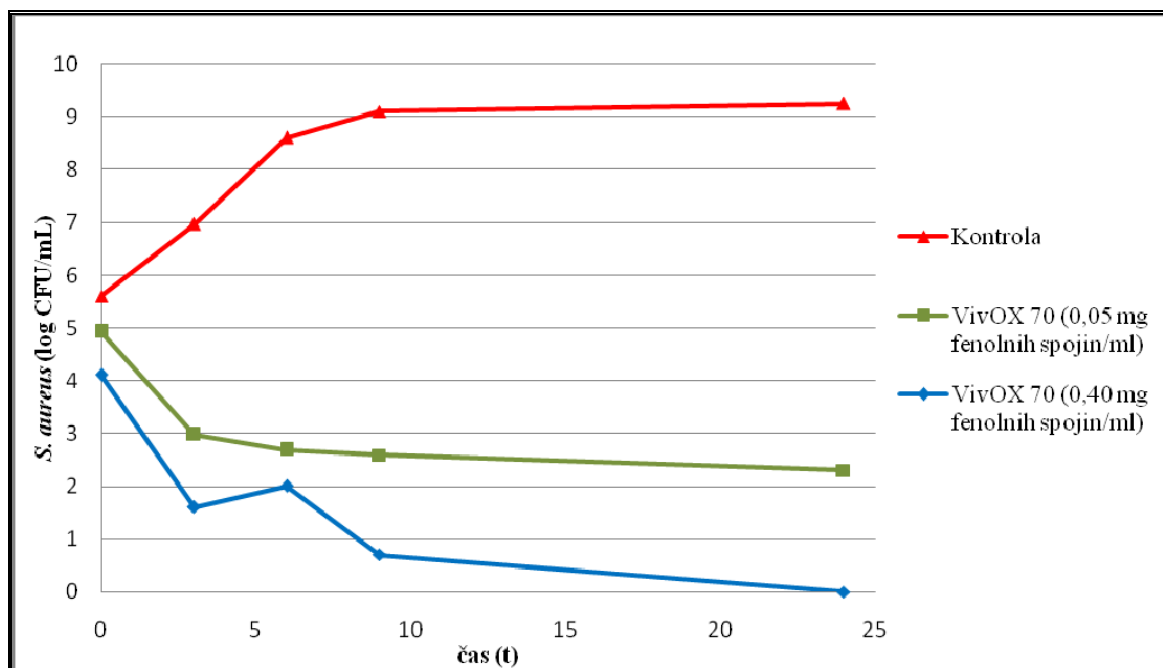
Kinetika protimikrobnega delovanja rožmarinovega ekstrakta VivOX 70 pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus* je prikazana na slikah 4-4 in 4-5.



**Slika 4-4:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *B. cereus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta VivOX 70 (standardne deviacije niso prikazane)

Prvo vrednost MIC za VivOX 70 (0,04 mg fenolnih spojin/ml) smo dobili z metodo dilucije v agarju, drugo vrednost (0,20 mg fenolnih spojin/ml) pa z metodo difuzije v agarju (preglednica 4-6). Ker je bila koncentracija, dobljena z difuzijsko metodo večja, je bila tudi rast bakterij bolj inhibirana. V drugem primeru, ko je bila minimalna inhibitorna koncentracija, določena v agarju manjša, pa je število živih bakterij najprej padalo, nato pa zopet začelo naraščati. Za točnejšo določitev inhibicijskega učinka slednje koncentracije bi

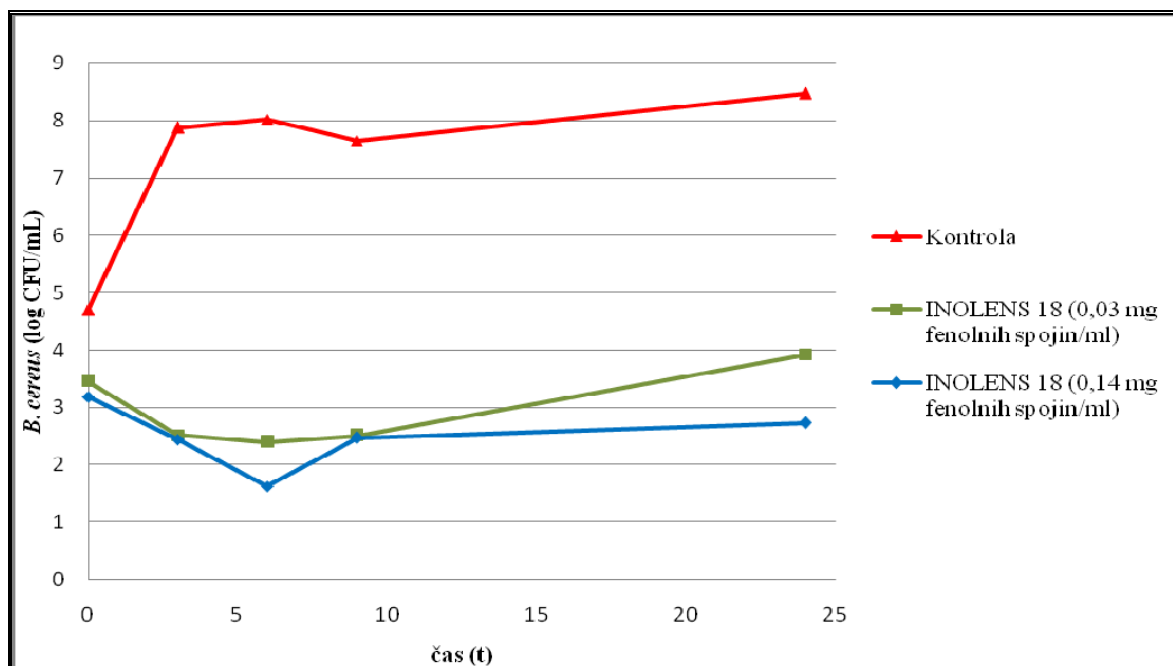
morali podaljšati čas inkubacije, vendar kljub vsem lahko rečemo, da sta obe testirani koncentraciji delovali inhibitorno na rast bakterij *Bacillus cereus*.



**Slika 4-5:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *S. aureus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta VivOX 70 (standardne deviacije niso prikazane)

V obeh primerih je ekstrakt zelo učinkovito inhibiral rast stafilokokov, večja koncentracija je delovala celo baktericidno, saj po 24-ih urah nismo več ugotovili živih celic.

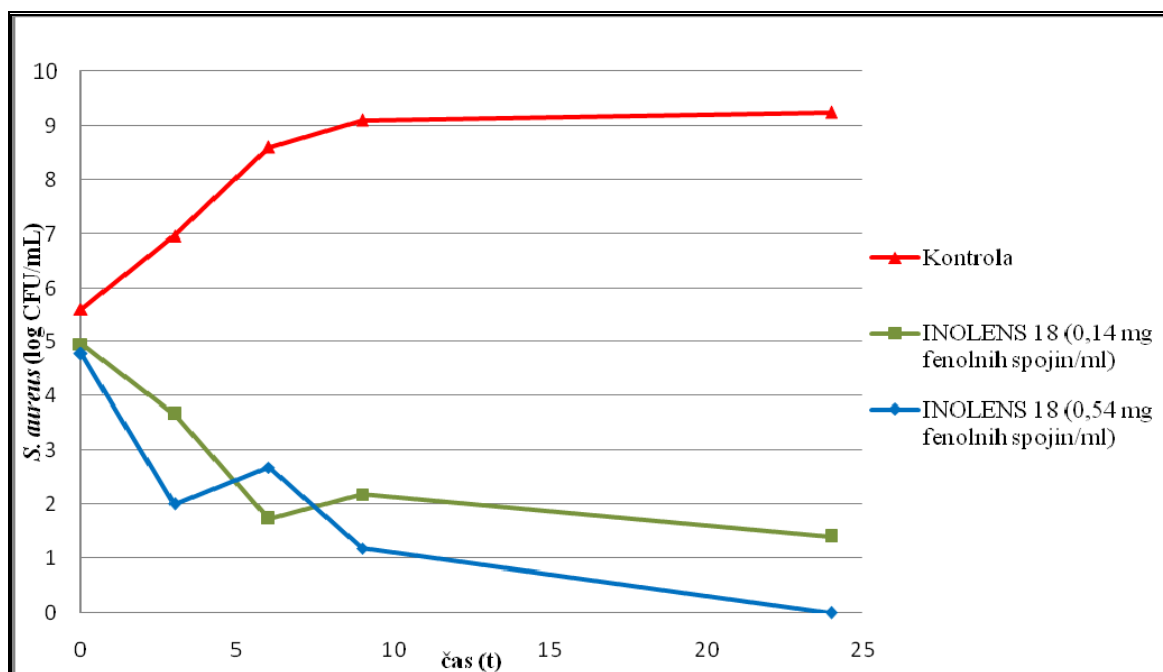
Na slikah 4-6 in 4-7 je prikazana kinetika protimikrobnega delovanja rožmarinovega ekstrakta INOLENS 18 pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus*.



**Slika 4-6:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *B. cereus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta INOLENS 18 (standardne deviacije niso prikazane)

Prvo vrednost MIC ekstrakta INOLENS 18 (0,03 mg fenolnih spojin/ml) smo dobili z dilucijsko metodo v agarju, drugo vrednost (0,14 mg fenolnih spojin/ml) pa z difuzijsko metodo v agarju (preglednica 4-6). Kot vidimo na sliki 4-6, je druga koncentracija inhibirala rast bakterij prvih 6 ur, nato pa je število bakterij zopet začelo naraščati. Krivulji sta si podobni, le da je pri prvi koncentraciji število celic večje. Za točnejši rezultat inhibicijske aktivnosti bi bilo potrebno podaljšati čas inkubacije, vendar sta obe testirani koncentraciji delovali inhibitorno na rast bakterij *Bacillus cereus*.

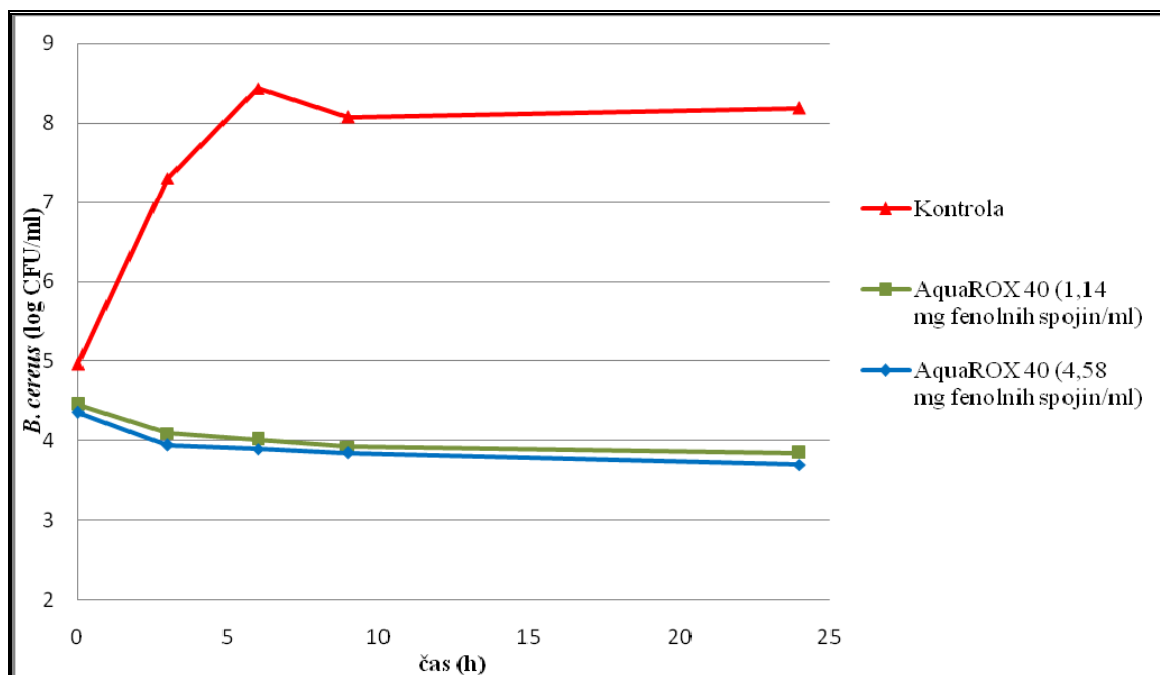
Preverili smo tudi učinkovitost INOLENS 18 na bakterije *S. aureus*.



**Slika 4-7:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *S. aureus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta INOLENS 18 (standardne deviacije niso prikazane)

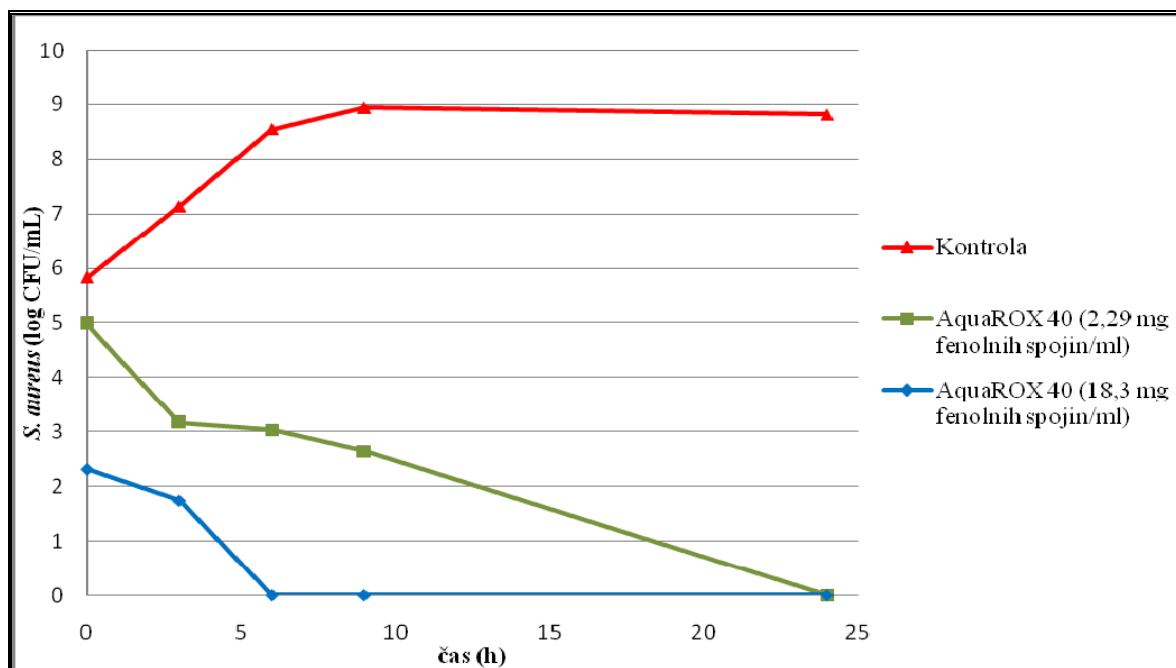
Obe koncentraciji sta bili zelo učinkoviti pri inhibiciji rasti, večja testirana koncentracija ekstrakta INOLENS 18 je tekom 24-urne inkubacije delovala celo baktericidno.

Kinetiko protimikrobnega delovanja rožmarinovega ekstrakta AquaROX 40 pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus* kažeta sliki 4-8 in 4-9.



**Slika 4-8:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *B. cereus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta AquaROX 40 (standardne deviacije niso prikazane)

Obe testirani koncentraciji sta se izkazali kot inhibitorni, razlike med njima so bile minimalne.



**Slika 4-9:** Rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterij *S. aureus* med 24-urno inkubacijo, pri 37 °C, v tekočem gojišču TSB z dodatkom rožmarinovega ekstrakta AquaROX 40 (standardne deviacije niso prikazane)

V tem primeru sta bili krivulji odmiranja različni. Obe koncentraciji ekstrakta, tako koncentracija dobljena z dilucijsko metodo v agarju (2,29 mg fenolnih spojin/ml), kot koncentracija, dobljena z difuzijsko metodo v agarju (18,3 mg fenolnih spojin/ml), uničita vse bakterije. Že manjša koncentracija 2,29 mg fenolnih spojin/ml zadošča za baktericidno delovanje ekstrakta.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V našem poskusu smo preučevali vpliv fenolnih spojin v ekstraktu iz semen navadnega rička na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus* oz. njegovo aktivnost glede na čiste fenolne kisline in komercialno pripravljene rožmarinove ekstrakte.

Fenolne spojine, med katere spadajo tudi kisline, ki smo jih obravnavali v diplomski nalogi, so po raziskavah številnih avtorjev odgovorne za protimikrobno delovanje ekstraktov. Moreno in sod. (2006) so z metodo HPLC izolirali karnozolno kislino iz rožmarinovitih ekstraktov, da bi potrdili njeno protimikrobno delovanje. Izolirane spojine so imele podobne vrednosti MIC kot rožmarinovi ekstrakti, na osnovi česar so povzeli, da je karnozolna kislina najodgovornješa komponenta za protimikrobno delovanje ekstrakta rožmarina. Glede na to, da je tudi navadni riček naravni vir fenolnih spojin, nas je zanimalo protimikrobno delovanje ekstrakta iz semen navadnega rička in posameznih fenolnih kislin, za katere domnevamo, da so v omenjenem ekstraktu, proti po Gramu pozitivnim bakterijam *B. cereus* in *S. aureus*.

Uporaba protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini je doprinesla k povečani odpornosti bakterij proti protimikrobnim snovem (Threlfall in sod., 2000). Zaradi tega so za testiranje v kliničnih, veterinarskih in živilskih mikrobioloških laboratorijih razvili različne metode ugotavljanja učinkovitosti protimikrobnih sredstev oz. odpornosti mikroorganizmov nanje. V splošnem lahko te metode razdelimo na difuzijske in dilucijske oz. razredčitvene metode. Pri vseh omenjenih metodah določamo eno vrednost, običajno MIC, ki je inhibirala oz. ustavila rast bakterij. Poleg tega poznamo še metode, ki omogočajo opazovanje protimikrobnega učinka v daljšem časovnem obdobju, kar pomeni, da podajo določeno informacijo o načinu oz. dinamiki protimikrobnega delovanja (Lopez-Malo Virgil in sod., 2005).

Poskus smo opravili s tremi različnimi *in vitro* metodami ugotavljanja bakterijske občutljivosti oz. učinkovitosti protimikrobnih učinkovin, in sicer: z metodo difuzije v agarju z diski, dilucijsko metodo v agarju in dilucijsko metodo v bujonu oz. s spremljanjem kinetike odmiranja testnih organizmov po dodatku ekstrakta v tekoče gojišče.

#### 5.1.1 Difuzijska metoda v agarju

Difuzijska metoda se rutinsko zelo veliko uporablja, ker je relativno enostavna. Za testiranje aktivnosti novih protimikrobnih snovi se lahko uporablja kot presejalna (»screening«) metoda. Še posebej je uporabna pri preverjanju velikega števila izolatov, torej pri določanju protimikrobnega spektra novih protimikrobnih sredstev (Dorman in Deans, 2000).

Difuzijska metoda je manj občutljiva od dilucijske, potrebno je tudi več materiala, tako gojišča kot tudi samega ekstrakta, da eksperiment lahko uspešno izpeljemo. To je tudi razlog, da nam poskus z ekstraktom semen navadnega rička ni uspel. Rezultati, ki smo jih dobili s to metodo, so podani v preglednicah 4-2 in 4-3.

Difuzijska metoda v agarju je uspešna pri uporabi natančno določenih inhibitorjev, ko pa testiramo ekstrakte, ki vsebujejo neznane sestavine, pa lahko pride do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Tako je lahko zaradi ekstrinzičnih faktorjev protimikrobna učinkovitost ekstraktov inhibirana ali povečana. Vrsta agarja, koncentracija soli, temperatura inhibicije in velikost molekul protimikrobnih snovi vplivajo na rezultate pridobljene z difuzijsko metodo v agarju. S to metodo ne moremo ločiti med baktericidnim in bakteristatičnim učinkom, minimalna inhibitorna koncentracija ni natančno določena (Eloff, 1998).

Pri bakterijah *Staphylococcus* je bil najbolj učinkovit ekstrakt VivOX 40. Inhibicijo rasti smo dosegli pri vrednosti 0,28 mg fenolnih spojin/ml. Najmanj učinkovit pa je bil ekstrakt AquaROX 40, inhibicijo rasti smo dosegli pri vrednosti 18,30 mg fenolnih spojin/ml. Ugotovljene minimalne inhibitorne koncentracije za bakterije rodu *Bacillus* kažejo na to, da je bil najbolj učinkovit komercialni ekstrakt VivOX 15. Inhibicijo rasti smo dosegli pri koncentraciji 0,12 mg fenolnih spojin/ml.

Glede na sestavo ekstraktov, ki je povezana z njihovim protimikrobnim učinkom, ter glede na rezultate pri dilucijski metodi v agarju in v tekočem gojišču, bi lahko trdili, da rezultati, dobljeni z difuzijsko metodo v agarju, niso najbolj natančni in zanesljivi. V večini primerov so vrednosti višje od pričakovanih.

### 5.1.2 Dilucijska metoda v agarju

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika testiranja, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje drugih metod. Je najpogosteje priporočena metoda za ugotavljanje občutljivosti (Woods in Washington, 1999).

Pri ekstraktih, ki so zmes različnih fenolnih spojin lahko spremljamo tudi morebitni sinergistični učinek posameznih učinkovin. Aditiven učinek je, kadar je skupen učinek enak vsoti učinkov posameznih komponent. O sinergizmu govorimo, kadar je skupni učinek obeh komponent močnejši kot pa vsota posameznih učinkov. Nasprotno pa govorimo o antagonizmu, kadar je učinek obeh komponent nižji, kot vsota posameznih učinkov (Burt, 2004). Iz naših rezultatov je vidno sinergistično delovanje posameznih fenolnih kislin, ki so glavne sestavine v rožmarinovitih ekstraktih in ekstraktu semen navadnega rička. Najbolj učinkoviti so bili ekstrakti skupine VivOX, ki vsebujejo največjo koncentracijo karnozolne kisline, ta je tudi kot čista kislina protimikrobno najučinkovitejša.

Rezultati te metode so podani v preglednicah 4-4 in 4-5. Ugotovili smo, da je bila med fenolnimi kislinami najbolj učinkovita karnozolna kislina, sledile so ji *p*-kumarna, ferulna in sinapinska kislina. Najmanj učinkoviti fenolni kislini pa sta bili kina in rožmarinska kislina. Z dobljenimi rezultati lahko potrdimo, da struktura fenolnih kislin vpliva na protimikrobno učinkovitost. Čiste fenolne kisline, ki spadajo v skupino hidroksicimetnih kislin, so bile bolj učinkovite od hidroksibenzojskih, kar je bilo pričakovati. Te vrste kislin imajo v svoji strukturi alkeno skupino (-CH=CH-), kar zniža polarnost. Zato so v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami v vodi manj topne ali celo netopne. Poleg tega pa na protimikrobno učinkovitost kislin vpliva tudi prisotnost in število -OCH<sub>3</sub> skupin,



tako naj bi bila najbolj učinkovita sinapinska kislina (2 metoksi), sledita ji ferulna (1 metoksi) in *p*-kumarna (0 metoksi). Žal smo naredili premalo vmesnih razredčitev, da bi lahko to trditev tudi potrdili. Po drugi strani pa prisotnost –OH skupin zmanjša učinkovitost kislin, zato imajo galna, kina, klorogenska in rožmarinska kislina najslabšo protimikrobno učinkovitost (so pa vse topne v vodi).

Ekstrakt semen navadnega rička je bil bolj učinkovit kot čiste fenolne kisline, z izjemo karnozolne kisline. Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta semen rička je znašala 0,63 mg fenolnih spojin/ml gojišča za sev *B. cereus* in 1,25 mg fenolnih spojin/ml gojišča za sev *S. aureus*. Glede na to, da je v ekstraktu semen navadnega rička glavna sestavina sinapinska kislina, ki ima slabšo protimikrobno učinkovitost od ekstrakta, lahko tudi v tem primeru govorimo o sinergističnem delovanju (Vuorela in sod., 2004). Vsekakor pa bi bile potrebne podrobnejše raziskave vseh komponent ekstrakta semen navadnega rička, da bi lahko z gotovostjo potrdili njihove medsebojne učinke.

Ko smo primerjali minimalne inhibitorne koncentracije med seboj glede na rod bakterij, smo ugotovili, da so bakterije rodu *Bacillus* bolj občutljive na delovanje ekstraktov, saj so bile MIC vrednosti nižje, kot pri bakterijah rodu *Staphylococcus*. Dejstvo pa je, da smo pri bakterijah rodu *Staphylococcus* vedno dosegli baktericidni učinek, pri bakterijah rodu *Bacillus* pa nikoli. Vzrok je v tem, da so bacili sporogene bakterije in spore vedno preživijo dodatek ekstrakta. To pa je vidno šele pri spremljanju kinetike rasti in odmiranja.

### **5.1.3 Primerjava rezultatov, dobljenih z difuzijsko metodo v agarju ter dilucijsko metodo v agarju in tekočem gojišču**

Kot smo že povedali, se difuzijska in dilucijska metoda uporabljata za določanje minimalne inhibitorne koncentracije. Tekom poskusa pa smo ugotovili, da se rezultati razlikujejo. Podani so v preglednicah od 4-2 do 4-5 ter 4-6 in 4-7 in na slikah 4-3 do 4-9.

Primerjava difuzijske in dilucijske metode v agarju

Razlog za razlike med metodama je lahko slaba difuzija protimikrobnih učinkovin skozi agar, zato je najmanjša ugotovljena koncentracija, ki je povzročila inhibicijo bakterijske rasti, večja kot pri dilucijski metodi. Poleg tega različne protimikrobne snovi difundirajo različno, kar privede do napak, če primerjamo učinkovitost ekstraktov z različno sestavo protimikrobnih snovi (Ellof, 1998).

Primerjava dilucijske metode v agarju in v tekočem gojišču (spremljanje kinetike)

Da bi lahko natančneje definirali vrednosti MIC, ki smo jih dobili z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju, smo ob dodatku znane količine ekstrakta spremljali časovno odvisnost rasti/odmiranja bakterij. Z difuzijsko in dilucijsko metodo v agarju ne moremo določiti minimalne baktericidne koncentracije (MBC), to nam pokažejo krivulje odmiranja.

#### 5.1.4 Kinetika inhibicije rasti/odmiranja

Krivulje inhibicije ali celo odmiranja se pogosto uporabljajo za ovrednotenje protimikrobnega delovanja sredstev proti bakterijam, kvasovkam, plesnim. Ker podajajo rezultate večjega števila vzorčenj, so bolj informativne kot rezultati metod s končno točko merjenja. Meritve koncentracije mikrobnih celic smo izvedli v neselektivnem bujonu TSB, v katerega smo dodali protimikrobno sredstvo v določeni koncentraciji in inokulum testnega mikroorganizma. Inkubacija je potekala pri optimalni temperaturi 37 °C, 48 ur. Rezultati so podani v obliki krivulj in so prikazani na slikah od 4-3 do 4-9.

Modelni poskusi tega diplomskega dela so pokazali, da so v tekočem gojišču inhibitorno delovale na rast vse koncentracije, ki smo jih predhodno določili z difuzijsko ali dilucijsko metodo. Pri ekstraktu semen navadnega rička se je pokazalo, da so inhibitorno učinkovale celo manjše koncentracije. Rezultati kažejo na to, da so vrednosti MIC, dobljene z dilucijsko metodo v agarju točnejše. Po vsej verjetnosti pa bi lahko nadaljevali z razvojem še cenejše in točnejše izbirne metode za testiranje učinkovitosti rastlinskih ekstraktov, ker so bile koncentracije, dobljene na agarjskih ploščah, dostikrat večje od tistih, ki so med inkubacijo v tekočem gojišču že delovale inhibitorno.

##### 5.1.4.1 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta semen navadnega rička pri bakteriji *B. cereus*

Meritve koncentracije mikrobnih celic smo izvedli v TSB bujonu, v katerega smo dodali različne koncentracije protimikrobnega sredstva in inokulum bakterij *B. cereus*. Inkubacija je potekala pri optimalnih pogojih, 37 °C, 24 ur (slika 4-3).

Koncentracije protimikrobnega sredstva v tem delu eksperimenta smo izbrali na osnovi rezultatov dilucijske metode v agarju. Uporabili smo dve različni koncentraciji v območju vrednosti MIC, določene z dilucijsko metodo v agarju. Izbrali smo si MIC vrednost 0,63 mg/ml in nižjo koncentracijo 0,31 mg/ml. Pri obeh koncentracijah je delovanje ekstrakta bakteristatično. Lahko bi celo rekli, da je vrednost MIC v tem primeru celo nižja od vrednosti, ki smo jo določili z dilucijsko metodo v agarju in je 0,31 mg fenolnih kislin/ml.

##### 5.1.4.2 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus*

Meritve koncentracije mikrobnih celic smo tudi tokrat izvedli v TSB bujonu, v katerega smo dodali različne koncentracije protimikrobnega sredstva in inokulum bakterij *B. cereus* in *S. aureus*. Inkubacija je potekala pri optimalnih pogojih, 37 °C, 24 ur (slike 4-4 do 4-9).

Koncentracije protimikrobnega sredstva smo izbrali na osnovi rezultatov dilucijske metode v agarju in difuzijske metode z diski. Uporabili smo torej dve različni koncentraciji, in sicer vrednost MIC določeno z agar dilucijsko metodo in vrednost MIC določeno z difuzijsko metodo. Ugotovili smo, da se rezultati razlikujejo med seboj na osnovi različne vrste mikroorganizma. Pri bakteriji *B. cereus* nikoli nismo dosegli baktericidnega učinka. V vseh primerih je bila rast bakterij nekoliko zavrta, pri nižjih koncentracijah (agar dilucijska metoda) pa je celo naraščala, a ni presegla začetnega števila. Pri bakteriji *S.*

*aureus* pa je bilo stanje popolnoma drugačno. Največja koncentracija dodanega ekstrakta je vedno delovala baktericidno po 24-ih urah inkubacije.

## 5.2 SKLEPI

Določili smo minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta semen navadnega rička, izbranih čistih fenolnih spojin in rožmarinovih ekstraktov. Za določitev minimalne inhibitorne koncentracije smo uporabili difuzijsko metodo v agarju in dilucijsko metodo v agarju. Dobljene koncentracije smo nato uporabili pri spremljanju kinetike protimikrobnega delovanja. Povzamemo lahko naslednje sklepe:

- Pri dilucijski metodi se kažejo kot učinkovite že nižje koncentracije, razlika pa je odvisna od ekstrakta in testnega mikroorganizma.
- Rezultati, dobljeni z krivuljami inhibicije rasti/odmiranja kažejo, da so vrednosti MIC, dobljene z dilucijsko metodo v agarju, točnejše. Poleg tega krivulje pokažejo tudi baktericidno delovanje proti bakterijam rodu *Staphylococcus*, pri sporogenih bakterijah rodu *Bacillus* pa pride do inhibicije rasti.
- Potrdili smo, da je ekstrakt semen navadnega rička dober vir fenolnih spojin s protimikrobno učinkovitostjo. Vrednost MIC dobljena z dilucijsko metodo v agarju za ekstrakt semen navadnega rička je 0,63 mg fenolnih spojin/ml gojišča pri testnem organizmu *B. cereus* in 1,25 mg fenolnih spojin/ml gojišča pri testnem organizmu *S. aureus*.
- Med fenolnimi kisljinami je najbolj učinkovita karnozolna kislina, med rožmarinovimi ekstrakti pa ekstrakti skupine VivOX.
- Ekstrakt semen navadnega rička in tudi rožmarinovi ekstrakti so v primerjavi s čistimi fenolnimi kisljinami, ki jih vsebujejo, bolj učinkoviti, kar kaže na sinergistično delovanje različnih fenolnih spojin rastlinskih ekstraktov.

## 6 POVZETEK

V živilstvu narašča zanimanje za uporabo naravnih snovi s protimikrobnim delovanjem. Sprejete so kot varne, mnoge se že uporabljajo kot aditivi zaradi dobro preučenega antioksidativnega delovanja. Tudi kupci dajejo prednost živilom brez kemijskih konzervansov, z manjšo koncentracijo soli in sladkorja ter brez radikalnih načinov konzerviranja. Med naravne rastlinske dodatke sodijo tudi komercialni rožmarinovi ekstrakti, ki se v praksi uporabljajo že leta in navadni riček, katerega protimikrobno učinkovitost smo dokazali v diplomski nalogi.

Navadni riček je imel v zgodovini pomembno mesto med poljščinami, predvsem zaradi nezahtevnosti rastline, njene vsestranske uporabnosti ter zelo velike hranilne in zdravilne vrednosti olja. V olju rička je visok odstotek tokoferolov, ki delujejo kot antioksidanti in stimulirajo imunski sistem. Ričkovo olje se uporablja tudi kot nosilec za naravne pesticide, kot osnova za ekološke barve in lake, v kozmetični industriji in za bio gorivo. Seme je visoko hranljivo in kot tako primerno za uporabo v prehrani.

Rožmarin je rastlina, ki se lahko uporablja kot zelišče ali začimba, v kozmetiki, farmaciji, medicini in v živilstvu. Rožmarin je znan vir določenih polifenolnih spojin, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno in protimikrobno delovanje. Najbolj pomembne sestavine za tovrstno delovanje so po ugotovitvah Morena in sod. (2006) karnozolna kislina in karnozol, kavna kislina in njeni derivati, npr. rožmarinska kislina.

Bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus* so med pomembnimi povzročitelji kvarjenja živil in tudi toksikoinfekcij ljudi. Zaradi specifične strukture celične stene so občutljive za delovanje naravnih protimikrobnih snovi v nizkih koncentracijah.

V diplomski nalogi smo ugotavljali protimikrobno aktivnost ekstrakta semen navadnega rička, čistih fenolnih spojin in ekstraktov rožmarina na bakterije *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus* s tremi metodami. Uporabili smo standardno dilucijsko metodo v agarju, difuzijsko metodo v agarju z diski in metodo v bujonu. Želeli smo izbrati optimalno metodo in jo uporabiti za določitev minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov in čistih fenolnih kislin, ki inhibirajo rast bakterij *B. cereus* in *S. aureus*. Namen dela je bil potrditi, da je navadni riček vir fenolnih spojin s protimikrobno učinkovitostjo ter da imajo fenolne spojine, za katere domnevamo, da se nahajajo v metanolnem ekstraktu iz semen navadnega rička sinergistično protimikrobno delovanje, ki je učinkovitejše od čistih fenolnih spojin in primerljivo z delovanjem komercialnih rastlinskih ekstraktov.

V eksperimentalnem delu smo uporabili čiste fenolne spojine, ekstrakt semen navadnega rička in rožmarinove ekstrakte. Testne kulture smo pripravili v tekočem gojišču BHI. Koncentracije ekstraktov smo pripravili glede na preučevano metodo. Pri vseh metodah smo kulturo inkubirali na trdnem gojišču TSB, 24 do 48 ur pri 37°C. Po inkubaciji smo odčitali rezultate. Kot vrednost MIC smo šteli tisto koncentracijo, pri kateri ni bilo vidne rasti bakterij na gojišču.

Ugotovili smo, da so rezultati dilucijske metode v agarju in difuzijske metode z diski težko primerljivi. Pri difuzijski metodi so za minimalno inhibicijsko cono potrebne večje

koncentracije ekstraktov v gojišču kot pri dilucijski metodi. Predvidevamo, da je vzrok za to slaba difuzija agensa v agarju in sama metoda difuzije. Z dilucijsko metodo v agarju smo določili vrednost MIC ekstraktov rožmarina v območju 0,03 do 2,97 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *B. cereus* in od 0,05 do 2,97 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *S. aureus*. Z difuzijsko metodo pa smo določili vrednost MIC v območju 0,12 do 11,86 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *B. cereus* in od 0,28 do 18,30 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *S. aureus*.

Za čiste fenolne kisline so bile vrednosti MIC od 0,16 do 10 mg fenolnih spojin/ml pri bakterijah *B. cereus* in *S. aureus*, določene z dilucijsko metodo v agarju.

Vrednosti MIC za ekstrakt semen navadnega rička, določeni z difuzijsko metodo v agarju, sta bili: 0,63 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *B. cereus* in 1,25 mg fenolnih spojin/ml pri bakteriji *S. aureus*.

Pri preučevanju morebitnega sinergističnega delovanja fenolnih spojin smo ugotovili, da imajo fenolne spojine v ekstraktu semen navadnega rička sinergistično protimikrobno delovanje.

Z rezultati smo potrdili možnost uporabe ekstrakta semen navadnega rička kot protimikrobnega sredstva, ki inhibira rast patogenih mikroorganizmov v hrani in s tem preprečuje njeno kvarjenje. Potrebno pa je poudariti, da je uporaba ekstraktov semen navadnega rička kot protimikrobnih sredstev omejena zaradi dodajanja velikih količin ekstrakta, ki lahko povzroči oster vonj in spremembo barve živila. Visokim koncentracijam ekstrakta bi se lahko ognili z uporabo ekstrakta v kombinaciji z nekaterimi sestavinami, ki imajo sinergistično protimikrobno delovanje.

## 7 VIRI

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589

Abramovič H., Butinar B., Nikolič V. 2007. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. Food Chemistry, 104: 903-909

Andersson A., Rönner U., Granum P.E. 1995. What the problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology, 28: 145-155

Ayaz F.A., Hayirhoglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Grúz J., Valentová K., Ulrichová J., Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. Food Chemistry, 107: 19-25

Bailey C.P., von Holy A. 1993. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. Food Microbiology, 10: 287-294

Barker K.F. 1999. Antibiotic resistance: a current perspective. Journal of Clinical Pharmacology, 48: 109-124

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

Buchler GmbH. 2004. Quinic acid. Braunschweig, Buchler GmbH  
<http://www.quinine-buchler.com/quinicacid.htm> (29.09.2007): 1 str.

Cappers R.T.J., Bekker R.M., Jans J.E.A. 2006. Digitale zadenatlas van Nederland = Digital seed atlas of the Netherlands. Eelde, Barkhuis Publishing  
[http://seeds.eldoc.ub.rug.nl/IMGS/covers/root/Brassicaceae/Camelina/sativa\\_ssp.\\_sativa/4780.jpg](http://seeds.eldoc.ub.rug.nl/IMGS/covers/root/Brassicaceae/Camelina/sativa_ssp._sativa/4780.jpg) (27.9.2007): 1 str.

Carlin F., Fricker M., Pielat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salonen M.S., Svensson B., Nguyen-the C., Ehling-Schulz M. 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. International Journal of Food Microbiology, 109: 132-138

Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A., Kilburn J.D., Rakariyatham N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Food Chemistry, 100: 1044-1048

Chen J.H., Ho C.T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2374-2378

Cloete T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 277-282

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 564-582

Cuvelier M.E., Richard H., Bersed C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 645-652

Davidson P.M., Branen A.L. 2005. Food antimicrobials – an introduction. V: *Antimicrobials in food*. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 1-10

Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63, 10: 1359-1368

Der Leindotter (*Camelina sativa* Crtz.). 2008. Saarbrücken, Gesellschaft für nachwachsende Rohstoffe e.V.  
<http://www.leindotter.de/literatur.html> (04.08.2008): 1 str.

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

Eloff J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711-713

Engberg J., Andersen R., Skov F., Aarestrup F. M., Gerner-Smidt P. 1999. Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods including the E test for antibiotic susceptibility testing of thermophilic *Campylobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 5:580-584

Food Safety online: *Staphylococcus aureus*. 2008. Woerden, Food Doctors  
[http://www.fooddoctors.com/FSF/S\\_aureus.pdf](http://www.fooddoctors.com/FSF/S_aureus.pdf) (27.09.2007): 1 str.

Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 66, 10: 1811-1821

Ghosh S., Sachan A., Mitra A. 2006. Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotti* MTCC 6581. *Current Science*, 90, 6: 825-829

Gilbert P., McBain A.J. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 189-208

González-Trujano M.E., Peña E.I., Martínez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Déciga-Campos M., López-Muñoz F.J. 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 476-482

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

Gošnjak M. 2004. Spremembe zakonodaje za zagotavljanje mikrobiološke varnosti živil v luči evropskih zahtev. V: *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 37-44

Grobelnik Mlakar S., Jakop M., Bavec F. 2003. Navadni riček (*Camelina sativa* (L.) Crantz). *Sodobno kmetijstvo*, 36, 11/12: 28-30

Gubina M. 2002. Patogene bakterije. Rod *Bacillus*. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 229-232

Horiuchi K., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Tsuchiya T. 2007. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30: 287-290

Kim J.H., Yu J., Mahoney N., Chan K.L., Molyneux R.J., Varga J., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Nierman W.C., Campbell B.C. 2007. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 49-60

Kunkel D. 2004. *Staphylococcus aureus*. Science stock photography. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc.  
[http://www.denniskunkel.com/product\\_info.php?products\\_id=1404](http://www.denniskunkel.com/product_info.php?products_id=1404) (29.09.2007): 1 str.

Lopez-Malo Virgil A., Palou E., Alzamora S.M. 2005. Naturally occurring compounds – plant sources. V: *Antimicrobials in food*. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 429-451

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1997. *Brock biology of microorganisms*. 8<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 70-76, 145

Marshall M.R., Kim J., Wei C. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. Rome, Food and Agriculture Organization  
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>  
(04.08.2008): 1 str.

Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 3444-3452



Matthäus B., Zubr J. 2000. Variability of specific components in *Camelina sativa* oilseeds cakes. *Industrial Crops and Products*, 12: 9-18

Mattila P., Hellström J., Törrönen R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 19: 7193-7199

Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231

Moussa-Boudjemaa B., Gonzalez J., Lopez M. 2006. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores in carrot extract acidified with different acidulants. *Food Control*, 17: 819-824

Munne-Bosch S., Alegre L. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnolic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiology*, 125: 1095-1102

Murugan A., Yadav A.K., Gurjar M.K. 2005. Stereoselective syntheses of (+)-proto-, (-)-gala quercitols and carba-L-rhamnose from D-(-)-quinic acid. *Tetrahedron Letters*, 46: 6235-6238

Nychas G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plant. V: New methods of food preservation. Gould G.W. (ed.), London, Blackie Academic&Professional: 59-89

Petersen M., Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125

Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 7: 1035-1042

Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kähkönen M., Heinonen M., Määttä-Riihinen K. 2005. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 991-1000

Rios J. L., Recio M. C., Villar A. 1988. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149

Rižner Hraš A., Hadolin M., Knez Ž., Bauman D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with [alpha]-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233

Rodriguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 587-593

Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J., Reglero G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68, 4: 790-795

Seme K. 2002a. Patogene bakterije. Stafilokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145

Seme K. 2002b. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Singleton P., Sainsbury D. 1980. Dictionary of microbiology. Chichester, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons: 388-388

Strlič M., Radovič T., Kolar J., Pihlar B. 2002. Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6313-6317

Terra. 2005. Contiene una bacteria del tipo *Bacillus cereus*. Nebraska, Universidad de Nebraska  
<http://www.terra.es/tecnologia/articulo/html/tec13488.htm> (2.2.2008): 1 str.

Thompson P. 2007. I.D. Guide for trees, shrubs, vines and groundcovers. Clemson, Clemson University, College of Agriculture, Forestry and Life sciences. Department of Horticulture  
[http://www.clemson.edu/hort/scmg/familiartreesofsc/mgplants/rosmarinus\\_officinalis.JPG](http://www.clemson.edu/hort/scmg/familiartreesofsc/mgplants/rosmarinus_officinalis.JPG)  
(27.09.2007): 1 str.

Threlfall E.J., Wart L. R., Frost J.A., Wilshaw G.A. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. International Journal of Food Microbiology, 62: 1-5

Vuorela S., Meyer A.S., Heinonen M. 2004. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 26: 8202-8207

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

Yin M., Chao C. 2008. Anti-campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. International Journal of Food Microbiology: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro2008.06.002, 5 str.

Zgórka G., Głowniak K. 2001. Variation of free phenolic acid in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26: 79-87

Zhao Z., Moghadasian M.H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chemistry, 109: 691-702

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri opravljanju diplomskega dela.

Hvala somentorici doc. dr. Heleni Abramovič za pomoč pri opravljanju diplomskega dela.

Hvala recenzentki prof. dr. Veroniki Abram za skrben in natančen pregled diplomskega dela.

Velika hvala Anji Klančnik za dobro voljo, pomoč v laboratoriju in strokovne nasvete med delom v laboratoriju.

Hvala tudi sošolcu Marku Gorgijevu za pripravo ekstrakta in Jani Martinuč za izvedbo nekaterih kemijskih analiz.

Zahvala gre tudi Jani Avbelj za pomoč v laboratoriju.

Hvala Ivici Hočevar za pomoč pri iskanju in natančnem urejanju virov.

Hvala tudi mojim staršem za moralno in finančno podporo tekom študija.