

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša Piskernik

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA
BAKTERIJE RODU *Bacillus* IN *Staphylococcus***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS
AGAINST *Bacillus* spp. AND *Staphylococcus* spp.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno 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 in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Saša Piskernik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24 + 579.26:547.9(043)=163.6
KG	patogeni mikroorganizmi/ <i>Bacillus</i> spp./ <i>Staphylococcus</i> spp./protimikrobne učinkovine rastlinskih ekstraktov/rožmarin/ <i>Rosmarinus officinalis</i> L./grozdne pečke/citrusi/oljčni listi/hmelj/protimikrobno delovanje/minimalna inhibitorna koncentracija
AV	PISKERNIK, Saša
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2008
IN	PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE RODU <i>Bacillus</i> IN <i>Staphylococcus</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 65 str., 17 pregl., 27 sl., 81 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na različne seve bakterij rodu <i>Bacillus</i> in <i>Staphylococcus</i> . Uporabili smo komercialno pripravljene ekstrakte rožmarina z različno vsebstvo karnozolne in rožmarinske kisline ter mešanice ekstraktov z dodatkom ekstraktov grozdnih pečk, citrusov, oljčnih listov in storžkov hmelja. Protimikrobno delovanje smo preverjali z metodo difuzije v agarju in z metodo dilucije v agarju in določili minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Za bakterije rodu <i>Bacillus</i> so se vrednosti MIC gibale med 1,56 µg ekstrakta/disk do 800 µg ekstrakta/disk in v območju od 19,53 µg ekstrakta/ml topila do 10000 µg ekstrakta/ml topila pri metodi dilucije v agarju. Za bakterije rodu <i>Staphylococcus</i> so bile MIC vrednosti pri metodi difuzije v območju od 1,56 µg ekstrakta/disk do 50 µg ekstrakta/disk in v območju 19,53 µg ekstrakta/ml topila do 20000 µg ekstrakta/ml topila pri metodi dilucije v agarju. S spremljanjem krivulj bakterijskega odmiranja smo preverjali kinetiko protimikrobnega delovanja dveh izbranih ekstraktov v koncentracijah MIC, določenih v agarju. Pri sevu <i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72 smo ugotovili, da po 24-urni inkubaciji ne samo inhibitorno na rast, ampak celo baktericidno delujejo že minimalne koncentracije obeh testiranih ekstraktov. Pri sevu <i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164 pa baktericidne koncentracije nismo določili, obe koncentraciji ekstrakta sta samo zavrli rast bakterij. Z dodatnimi testi pa smo potrdili povečano občutljivost spor na toplotno obdelavo ob dodatku obeh testiranih ekstraktov. Ugotovili smo, da vodni ekstrakti rožmarina, ki vsebujejo rožmarinsko kislino sicer pokažejo protimikrobno delovanje, vendar je v primerjavi z ekstrakti, ki vsebujejo karnozolno kislino, zanemarljiv. Najboljšo protimikrobno aktivnost smo z vsemi uporabljenimi metodami potrdili pri ekstraktu VivOX 40 z dodatkom ekstrakta hmelja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24 + 579.26:547.9(043)=163.6
CX pathogens/*Bacillus* spp./*Staphylococcus* spp./plant antimicrobials/rosemary/*Rosmarinus officinalis* L./grape seeds/citrus/olive leaves/hops/antimicrobial activity/minimal inhibitory concentration
AU PISKERNIK, Saša
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/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 ROSEMARY EXTRACTS AGAINST *Bacillus* spp. AND *Staphylococcus* spp.
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 65 p., 17 tab., 27 fig., 81 ref.
LA SI
AL sl/en
AB The aim of our research was to investigate antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different strains of *Bacillus* spp. and *Staphylococcus* spp. We have used various extracts of rosemary, containing different levels of carnosic and rosemary acid and mixtures of extracts with added grape seed, citrus, olive leaves and hops strobuli extract. We wanted to prove antimicrobial activity with disk diffusion method, agar dilution method and to determine minimum inhibitory concentrations (MIC) with these two methods. MIC values for *Bacillus* spp. determined with the diffusion method were in the ranges from 1,56 µg extract/disk to 800 µg extract/disk and in the ranges from 19,53 µg extract/ml solvent to 10000 µg extract/ml solvent determined with the dilution method. MIC values for *Staphylococcus* spp. determined with the diffusion method were in the ranges from 1,56 µg extract/disk to 50 µg extract/disk and in the ranges from 19,53 µg extract/ml solvent to 20000 µg extract/ml solvent determined with the dilution method. With time-kill analysis we tried to determine kinetics of antibacterial activity of two selected extracts, using MIC concentrations determined in agar. Both concentrations of the extracts tested were not only inhibitory, but also bactericidal for *Staphylococcus aureus* ŽMJ72. When we used the strain *Bacillus cereus* ŽMJ164, neither of the concentrations tested was bactericidal, but they inhibited bacterial growth. With additional tests we proved the increased sensitivity of spores against heat treatment when added two tested extracts. We also proved that water soluble rosemary extracts, which contain rosemary acid, do show antimicrobial activity, but compared to extracts containing carnosic acid, these effects are fewer. The best antimicrobial activity was proved for the mixture VivOX 40 with hops extract added.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI.....	3
2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih ekstraktov	3
2.1.2 Uporaba rastlinskih ekstraktov v živilstvu	4
2.1.3 Protimikrobne spojine v rastlinskih ekstraktih.....	4
2.2 ROŽMARIN	5
2.2.1 Kemijska sestava rožmarina	6
2.2.2 Eterična olja	6
2.2.3 Druge sestavine ekstrakta rožmarina	6
2.2.4 Uporaba rožmarina	8
2.3 GROZDNE PEČKE	9
2.3.1 Kemijska sestava grozdja in grozdnih pečk.....	9
2.3.2 Olje grozdnih pečk	10
2.3.3 Protimikrobno delovanje grozdnih pečk.....	11
2.3.4 Uporaba grozdnih pečk.....	11
2.4 CITRUSI.....	12
2.4.1 Kemijska sestava citrusov.....	12
2.4.1.1 Flavonoidi citrusov	12
2.4.1.2 Fenolne kisline.....	13
2.4.2 Eterično olje citrusov	14
2.4.3 Protimikrobno delovanje	14
2.4.4 Uporaba	14
2.5 OLJČNI LISTI.....	15
2.5.1 Kemijska sestava oljčnih listov.....	15
2.5.1.1 Olevropein	16
2.5.1.2 Hidroksitirozol	16
2.5.2 Protimikrobno delovanje oljčnih listov	17
2.5.3 Uporaba oljčnih listov	17
2.6 HMELJ	18
2.6.1 Kemijska sestava hmelja.....	18
2.6.1.1 Hmeljne smole	18
2.6.2 Eterično olje hmelja	19
2.6.3 Protimikrobno delovanje	20
2.6.4 Uporaba hmelja	20

2.7	BAKTERIJE RODU <i>Bacillus</i>	21
2.8	BAKTERIJE RODU <i>Staphylococcus</i>	22
2.9	<i>In vitro</i> METODE UGOTAVLJANJA BAKTERIJSKE OBČUTLJIVOSTI	23
2.9.1	Difuzijske metode	24
2.9.2	Dilucijske metode.....	25
2.9.3	Metode spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja	25
2.9.4	Drugi načini.....	26
3	MATERIAL IN METODE DELA.....	28
3.1	POTEK DELA.....	28
3.2	MATERIAL	29
3.2.1	Mikroorganizmi.....	29
3.2.2	Mikrobiološka gojišča	29
3.2.2.1	Agar TSA (Tryptone Soya Agar) – za difuzijsko metodo v agarju ter štetje na ploščah.....	29
3.2.2.2	Agar TSA (Tryptone Soya Agar) – za dilucijsko metodo v agarju.....	29
3.2.2.3	Tekoče gojišče TSB (Tryptone Soya Broth) – za določanje krivulje odmiranja	30
3.2.3	Raztopine in dodatki	30
3.2.3.1	Fiziološka raztopina.....	30
3.2.4	Snovi s protimikrobnim delovanjem	30
3.2.4.1	Ekstrakti rožmarina	30
3.2.4.2	Priprava ekstraktov	31
3.2.5	Druge kemikalije in dodatki.....	31
3.2.6	Laboratorijska oprema	31
3.3	METODE DELA.....	32
3.3.1	Revitalizacija bakterij	32
3.3.2	Priprava inokuluma	32
3.3.3	Določanje koncentracije celic v inokulumu	32
3.3.4	Metoda difuzije v gojišču TSA	33
3.3.4.1	Uporabljen material	33
3.3.4.2	Izvedba metode.....	33
3.3.5	Metoda dilucije v gojišču TSA.....	34
3.3.5.1	Uporabljen material	34
3.3.5.2	Izvedba metode.....	34
3.3.6	Krivulja odmiranja	35
3.3.6.1	Uporabljen material	35
3.3.6.2	Izvedba metode.....	35
3.3.7	Vpliv ekstrakta in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu <i>Bacillus</i>	36
3.3.7.1	Uporabljen material	36
3.3.7.2	Izvedba metode.....	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU TSA	37
4.1.1	Inhibicija rasti bakterij rodu <i>Bacillus</i>	37
4.1.2	Inhibicija rasti bakterij rodu <i>Staphylococcus</i>	41

4.2	PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO DILUCIJE V GOJIŠČU TSA.....	44
4.3	PRIMERJAVA REZULTATOV METODE DIFUZIJE IN DILUCIJE V GOJIŠČU TSA.....	46
4.4	KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA NA BAKTERIJE RODU <i>Staphylococcus</i>	48
4.4.1	Krivulja odmiranja bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> ob dodatku ekstrakta VivOX 40.....	48
4.4.2	Krivulja odmiranja bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja.....	49
4.5	KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA NA BAKTERIJE RODU <i>Bacillus</i>	50
4.5.1	Krivulja odmiranja bakterij rodu <i>Bacillus</i> ob dodatku ekstrakta VivOX 40.....	50
4.5.2	Krivulja odmiranja bakterij rodu <i>Bacillus</i> ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja.....	51
4.6	VPLIV EKSTRAKTA IN SEGREVANJA NA PREŽIVELOST SPOR BAKTERIJ RODU <i>Bacillus</i>	51
4.6.1	Vpliv ekstrakta VivOX 40 in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu <i>Bacillus</i>	52
4.6.2	Vpliv mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu <i>Bacillus</i>	53
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	54
5.1	RAZPRAVA.....	54
5.1.1	Metoda difuzije v gojišču TSA.....	54
5.1.2	Metoda dilucije v gojišču TSA.....	55
5.1.3	Primerjava metode difuzije in dilucije v gojišču TSA.....	56
5.1.4	Kinetika protimikrobnega delovanja izbranih ekstraktov na bakterijo <i>S. aureus</i>	56
5.1.5	Kinetika protimikrobnega delovanja izbranih ekstraktov na bakterijo <i>B. cereus</i>	56
5.1.6	Vpliv ekstrakta in segrevanja na preživelost spor bakterij rodu <i>Bacillus</i>	57
5.2	SKLEPI.....	57
6	POVZETEK.....	58
7	VIRI.....	59
	ZAHVALA.....	66

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Glavne protimikrobne spojine v rastlinah (Cowan, 1999)	4
Preglednica 2-2: Sestava eteričnega olja glede na vrsto spojin (Švigelj, 2006)	6
Preglednica 2-3: Pregled metod za določanje občutljivosti protimikrobnih snovi (Burt, 2004)	24
Preglednica 3-1: Delovni mikroorganizmi	29
Preglednica 4-1: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>B. cereus</i> ŽMJ 91 po dodatku različnih ekstraktov	37
Preglednica 4-2: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>B. mycoides</i> ŽMJ 93 po dodatku različnih ekstraktov	38
Preglednica 4-3: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>B. cereus</i> ŽMJ 164 po dodatku različnih ekstraktov	38
Preglednica 4-4: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu <i>Bacillus</i> , določene z metodo difuzije v gojišču TSA	39
Preglednica 4-5: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>S. aureus</i> ŽMJ 175 po dodatku različnih ekstraktov	41
Preglednica 4-6: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>S. aureus</i> ŽMJ 72 po dodatku različnih ekstraktov	41
Preglednica 4-7: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij <i>S. xylosus</i> DD-34 po dodatku različnih ekstraktov	42
Preglednica 4-8: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu <i>Staphylococcus</i> določene z metodo difuzije v gojišču TSA	42
Preglednica 4-9: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu <i>Bacillus</i> , določene z metodo dilucije v gojišču TSA	44
Preglednica 4-10: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu <i>Staphylococcus</i> , določene z metodo dilucije v gojišču TSA	45
Preglednica 4-11: Pregled uporabljenih koncentracij	46
Preglednica 4-12: Primerjava minimalne inhibitorne koncentracije, ugotovljene z metodama difuzije in dilucije v gojišču TSA, za bakterije rodu <i>Bacillus</i>	46
Preglednica 4-13: Primerjava minimalne inhibitorne koncentracije, ugotovljene z metodama difuzije in dilucije v gojišču TSA, za bakterije rodu <i>Staphylococcus</i>	47

KAZALO SLIK

Slika 2-1: Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) (Rosemary, 2007).....	5
Slika 2-2: Strukturna formula karnozolne kisline (Munne-Bosch in Alegre, 2001)	7
Slika 2-3: Strukturna formula rožmarinske kisline (Chen in Ho,1997)	8
Slika 2-4: Grozdje in grozdne pečke (Cross-section of grapes, 2008)	9
Slika 2-5: Strukturna formula katehina (Yilmaz in Toledo, 2004)	9
Slika 2-6: Reprezentativna struktura oligomere procianidina (Saito in sod., 1998).....	10
Slika 2-7: Različne vrste citrusov (Alden, 2005)	12
Slika 2-8: Strukturna formula naringenina (Bocco in sod., 1998)	13
Slika 2-9: Oljčni listi (Olive leaf (<i>Olea europaea</i>), 2008)	15
Slika 2-10: Strukturna formula oleuropeina (Soni in sod., 2006)	16
Slika 2-11: Strukturna formula hidroksitirosola (Soni in sod., 2006)	16
Slika 2-12: Hmelj – <i>Humulus lupulus</i> (Biersite Wilfried van der Wal, 2000)	18
Slika 2-13: Strukturna formula humulona (Natarajan in sod., 2008)	19
Slika 2-14: Strukturna formula lupulona (Natarajan in sod., 2008)	19
Slika 2-15: Mikrografija bakterije <i>Bacillus cereus</i> (Kalab, 2005)	22
Slika 2-16: Mikrografija na meticilin odporne bakterije <i>S. aureus</i> (Cree, 2007).....	23
Slika 2-17 : Metoda difuzije z diski.....	24
Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela.....	28
Slika 3-2: Kolonije bakterij <i>Staphylococcus aureus</i> na gojišču TSA.....	33
Slika 4-1: Cone inhibicije rast pri sevu <i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	40
Slika 4-2: Cone inhibicije rast pri sevu <i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ 72	43
Slika 4-3: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> ŽMJ72 med 48-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku ekstrakta VivOX 40.....	48
Slika 4-4: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> ŽMJ72 med 48-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja	49
Slika 4-5: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>B. cereus</i> ŽMJ164 med 24-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku ekstrakta VivOX 40.....	50
Slika 4-6: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije <i>B. cereus</i> ŽMJ164 med 24-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja	51
Slika 4-7: Vpliv različnih koncentracij ekstrakta VivOX 40 (24-urna inkubacija pri 37 °C) in 5 minutnega segrevanja pri temperaturah 80 °C, 90 °C in 100 °C na preživelost spor pri bakteriji <i>B. cereus</i> ŽMJ164.....	52
Slika 4-8: Vpliv različnih koncentracij mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja (24- urna inkubacija pri 37 °C) in 5 minutnega segrevanja pri temperaturah 80 °C, 90 °C in 100 °C na preživelost spor pri bakteriji <i>B. cereus</i> ŽMJ 164.....	53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
ATCC	tipski sev zbirke American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. mycooides</i>	<i>Bacillus mycooides</i>
BCA agar	Bacillus cereus agar
BHI	Brain Heart Infusion bujon
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
GRAS	na splošno spoznano kot varno (Generally Recognized As Safe)
EtOH	Etanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
NCTC	tipski sev zbirke National Collection of Type Cultures
OTC	Oksitetraciklin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
TSA	tripton soja agar (Tryptone Soya Agar)
TSB	tripton soja bujon (Tryptone Soya Broth)
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

Aktivnost mikroorganizmov je primarni vzrok za kvarjenje različnih vrst hrane in je pogosto vzrok za izgubo kakovosti in varnosti živil. Skrb zaradi patogenih mikroorganizmov in kvarljivcev v hrani se povečuje zaradi povečanja števila izbruhov bolezni, povzročenih s hrano (Tauxe, 1997). Potrošniki želijo hrano brez oziroma z minimalno vsebnostjo kemičnih konzervansov. Zato tudi narašča zanimanje za naravna protimikrobna sredstva. To so lahko različni rastlinski produkti, kot na primer začimbe in eterična olja (de Souza in sod., 2005). Prav tako pa narašča trend 'zelenega' potrošništva, kar pomeni zmanjševanje sintetičnih aditivov ter uporabo produktov, ki imajo manjši vpliv na okolje. Novi aditivi ter nove metode konzerviranja bodo verjetno potrebne tudi zato, ker se zdravstvene organizacije trudijo zmanjšati uporabo soli, kajti s tem se zmanjša verjetnost nastanka bolezni srca in ožilja (Burt, 2004).

Rastline vsebujejo veliko število različnih spojin, ki zavirajo delovanje presnovnih procesov bakterij, kvasovk in plesni. V rastlinah so glavne spojine s protimikrobnim delovanjem fenolne spojine. Fenolne spojine eteričnih olj začimb in drugih rastlin delujejo proti patogenim bakterijam – proti po Gramu negativnim in po Gramu pozitivnim bakterijam, slednje pa so načeloma bolj občutljive (Lopez-Malo in sod., 2005).

Znani primeri rastlin s protimikrobnim delovanjem so med drugim rožmarin, koriander, cimet, origano, žajbelj, nageljnovc žbice in timijan (Burt, 2004). Za pridobivanje ekstraktov se lahko uporabi praktično vse dele rastline, najbolj bistveni so listi, cvetovi, gomolji, korenine ter plodovi (Lopez-Malo in sod., 2005). Uporabnost ekstrakta rožmarina je dobro poznana, prav tako so dobro raziskane tudi fenolne spojine ekstrakta. Najbolj pomembne med njimi so karnozolna kislina, karnozol in rožmarinska kislina, ki so v večini odgovorne za protimikrobno delovanje ekstrakta (Del Campo in sod., 2000; Basić, 2006; Švagelj, 2006; Rožman, 2007).

V novejši strokovni literaturi je večkrat opisano sinergistično delovanje običajnih konzervansov z naravnimi protimikrobnimi učinkovinami na inhibicijo rasti mikroorganizmov. Tak način uporabe zagotovi širši spekter delovanja z večjim učinkom proti patogenim bakterijam in kvarljivcem. Predvidevajo, da kombinacija protimikrobnih učinkovin deluje na različne vrste v mešani mikroflori ali pa deluje na različne presnovne elemente v podobnih vrstah ali sevih. Teoretično se tako lahko izboljša kontrola v primerjavi z uporabo samo ene učinkovine (Lopez-Malo in sod., 2006).

Predpostavljamo lahko, da tudi s kombinacijo naravnih ekstraktov dosežemo boljši učinek, kot s posameznimi ekstrakti. Zato smo v eksperimentalni del naloge vključili mešanice različnih rastlinskih ekstraktov, za katere je znano, da imajo dober protibakterijski učinek oziroma inhibirajo rast bakterij. Uporabljene mešanice ekstraktov so bile mešanice ekstrakta rožmarina in naslednjih ekstraktov: grozdnih pečk, citrusov, oljčnih listov in storžkov hmelja.

Protimikrobni učinek izbranih ekstraktov in mešanic ekstraktov smo ugotavljali pri bakterijah rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Bakterije rodu *Bacillus* so sporogene in zelo

razširjene v naravi (zemlja, zrak, voda, rastline) in jih pogosto izoliramo iz različnih živil (Jeršek, 2002). Med pomembne bakterije spada *Bacillus cereus* in je sporogena, po Gramu pozitivna aerobna oziroma fakultativno anaerobna paličasta bakterija. Patogenost povezujejo s tvorbo toksinov. Poleg toksinov pa *B. cereus* proizvaja tudi hemolizine in fosfolipaze C, skupaj z ostalimi vrstami bacilov pa tudi številne encime, kot so beta-laktamaze, proteaze, kolagenaze, lipaze, amilaze in druge, zaradi česar so bacili med najpogostejšimi povzročitelji kvarjenja hrane (Kotiranta in sod., 2000).

Bakterije rodu *Staphylococcus* so po Gramu pozitivne okrogle bakterije, ki se nahajajo v mikroskopskih skupkih, podobnih grozdom. So aerobne ali fakultativno anaerobne bakterije in rastejo na nezahtevnih gojiščih. Naseljujejo sluznice in kožo ljudi in toplokrvnih živali (Irlinger, 2007). Med bakterijami rodu *Staphylococcus* je v živilstvu še posebej pomembna vrsta *Staphylococcus aureus*. Določeni sevi proizvajajo toksine, ki povzročajo zastrupitve s hrano zaradi sinteze enterotoksina v živilih (Food Safety online: *Staphylococcus aureus*, 2008).

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Cilji diplomske naloge so bili naslednji:

- Preizkusiti različne metode ugotavljanja protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov pri bakterijah rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*.
- Izbrati optimalno metodo in jo uporabiti za določitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) ekstrakta rožmarina in mešanic, kjer so bili rožmarinskemu ekstraktu dodani ekstrakti grozdnih pečk, citrusov, olivnih listov in storžkov hmelja.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Sestava rastlinskega ekstrakta vpliva na njegovo protibakterijsko učinkovitost, zato smo predpostavljali, da bomo pri mešanicah ekstraktov dosegli boljše protimikrobno učinkovitost.
- Izvedba testiranja protimikrobne aktivnosti lahko vpliva na končni rezultat.
- Odpornost bakterij je vrstno ali celo sevno specifična.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI

2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih ekstraktov

Uporaba naravnih produktov s terapevtskimi lastnostmi je stara toliko kot civilizacija sama. Dolgo časa so bili minerali ter rastlinski in živalski produkti glavni vir zdravilnih učinkovin (Rates, 2001). O tem pričajo tudi različni opisi zdravilnih rastlin, med katerimi sta pomemben del prispevala Hipokrat, ki je že v 5. stol. pr. n. št. opisal med 300 in 400 primerov zdravilnih rastlin ter Diskord, ki je v 1. stol. n. št. napisal *De Materia Medica*, ki predstavlja osnovo modernih farmakopej. Opise zdravilnih rastlin pa lahko zasledimo tudi v Bibliji (Cowan, 1999).

Z industrijsko revolucijo ter razvojem organske kemije je naraščala uporaba sintetičnih produktov za farmakološke namene. Razlogi za tako uporabo so v enostavnem pridobivanju čistih spojin, s strukturnimi modifikacijami so enostavno pridobili močnejše in varnejše droge. Poleg tega pa je imela uporaba naravnih produktov magično-verski pomen in s tem različne poglede na zdravje in bolezni, ki so obstajale v posamezni kulturi. To pa se je križalo z nazori takratnega življenskega sloga. V industrializiranih zahodnih družbah so namreč droge naravnega izvora obravnavali kot versko praznoverje oziroma so tak način zdravljenja pripisovali revnejšim, neizobraženim ljudem (Rates, 2001).

V zadnjih letih pa narašča zanimanje za alternativne terapije in s tem uporaba naravnih produktov iz rastlin v terapevtske namene. Razlogov je veliko: običajna (konvencionalna) medicina je lahko neučinkovita, pojavljajo se stranski učinki zaradi nepravilne uporabe oziroma zlorabe sintetičnih zdravil. Poleg tega pa obstaja velik del svetovne populacije, ki nima dostopa do običajnega zdravljenja. Prav tako pa po mnenju ljudske medicine in zaradi ekološke osveščenosti velja, da so naravni produkti neškodljivi (Rates, 2001).

Prav tako je zanimanje za uporabo rastlinskih snovi s protimikrobnim delovanjem večje tudi zaradi vedno večje odpornosti patogenih bakterij na do sedaj uporabljane antibiotike ter zaradi izumiranja številnih rastlinskih vrst. To pa ima za posledico vedno manjše možnosti za nova odkritja protimikrobnih učinkovin naravnega izvora (Cowan, 1999).

Kljub velikem številu rastlinskih vrst – obstajalo naj bi med 250.000 in 500.000 različnih vrst, pa je njihova uporabnost slabo raziskana. Ljudje jih v prehrani uporabljamo le manjši del – do 10%, nekaj več pa naj bi jih uporabljali v zdravstvene namene (Cowan, 1999; Rates, 2001). Zelišča in začimbe imajo pomembno vlogo v našem vsakdanjem življenju, saj se lahko uporabljajo kot sestavine v hrani, alkoholnih napitkih, zdravilih, parfumih, kozmetiki, ali kot sredstva za obarvanje (Peter in Nirmal Babu, 2004).

2.1.2 Uporaba rastlinskih ekstraktov v živilstvu

Hrani se dodajajo za izboljšanje okusa, pikantnosti in barve. Prav tako pa imajo tudi antioksidativno, protimikrobno, farmacevtsko in hranilno vrednost. Poleg znanih direktnih učinkov ima uporaba rastlinskih ekstraktov lahko tudi kompleksne sekundarne učinke, kot so možno zmanjšanje koncentracije soli in sladkorja, izboljšanje teksture in preprečevanje kvara hrane (Peter in Nirmal Babu, 2004).

2.1.3 Protimikrobne spojine v rastlinskih ekstraktih

Rastline sintetizirajo različne aromatske spojine, ki so večinoma sekundarni metaboliti. Med te spadajo tudi fenoli in do sedaj naj bi bilo izoliranih manj kot 10% vseh teh spojin. Sekundarni metaboliti imajo pomembno vlogo pri obrambi rastline proti mikroorganizmom, insektom ter živalim. Nekatere spojine so ogovorne za vonj, druge za pigment, tretje pa za okus rastline. Prav zaradi teh lastnosti pa so se rastline znašle kot začimbe v prehrani ljudi. Vseeno je potrebna previdnost pri uporabi, saj so lahko nekatere spojine toksične. Uporabne protimikrobne snovi rastlin so razdeljene v razrede in so podane v preglednici 2-1 (Cowan, 1999).

Preglednica 2-1: Glavne protimikrobne spojine v rastlinah (Cowan, 1999)

Razred	Podrazred	primer	Mehanizem
fenolne spojine	enostavni fenoli	katehol	pomankanje substrata
		epikatehin	razbitje membrane
	fenolne kisline	cimetna kislina	
	Kinoni	hipericin	vezava na adhezine, kompleks s celično steno, inaktivacija encimov
	Flavonoidi	krizin	vezava na adhezine
	Flavoni	abisinon	kompleks s celično steno, inaktivacija encimov, inhibicija reverzne transkriptaze HIV
	Flavonoli	totarol	ni znan
	Tanini	elagitanin	vezava na proteine, vezava na adhezine, inhibicija encimov, pomanjkanje substrata, tvorba kompleksa s celično steno, razbitje membrane, kelacija ionov
	Kumarini	varfarin	interakcija z evkariotsko DNA (protivirusno delovanje)
terpeni, eterična olja		kapsaicin	razbitje membrane
Alkaloidi		berberin, piperin	interkalacija v celično steno in/ali v DNA
lektini in polipeptidi		manoza-specifični aglutinin	preprečevanje fuzije ali adsorpcije virusov
		fabatin	tvorba disulfidnih mostičkov

Obstajajo razlike v protimikrobnem delovanju ekstraktov iz istih rastlin. Razloge za te razlike lahko pripišemo različnim geografskim vplivom in sezoni žetve. Vse te spremenljivke vplivajo na kemijsko sestavo in relativno koncentracijo posameznih sestavin ekstraktov. Na povezano delovanje eteričnih olj vpliva kemijska sestava komponent, deleži, v katerih so prisotne in interakcije med njimi. Skupni učinek nekaterih eteričnih olj je lahko večji, kot če bi sešteli samo učinke glavnih učinkovin. K temu pripomorejo tudi stranske učinkovine eteričnih olj in imajo torej pomembno vlogo v protimikrobnem delovanju, ker lahko delujejo sinergistično ali pa okrepijo delovanje (Burt, 2004).

Eterična olja zelišč in začimb imajo status GRAS (angleško 'generally recognized as safe'). Njihova uporaba pa je pogosto omejena zaradi močne arome. Pomembna je torej minimalna koncentracija, ki inhibira rast mikroorganizmov in pri tem ne vpliva na senzorične lastnosti hrane (Burt, 2004).

2.2 ROŽMARIN

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (slika 2-1) spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Je gost zimzelen aromatičen trajen grm. V višino zraste do 2 m in ima kratke, koničaste, lepljive, dlakave, smolnate liste, ki so na zgornji površini temno zelene barve, medtem ko je spodnja površina belkaste barve. Cvetovi so svetlo modre barve. Eterično olje rožmarina se pridobiva iz listov, cvetov in vejic ter je zelo uporabno tako v tradicionalni, kot tudi moderni medicini. Zelo pomembno vlogo pa ima tudi v aromaterapiji ter industriji parfumov in arom (Sasikumar, 2004).



Slika 2-1: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Rosemary, 2007)

2.2.1 Kemijska sestava rožmarina

Na kemijsko sestavo rožmarina vplivajo genetski in okoljski dejavniki, kot so vpliv vode, svetlobe in toplote. Prav tako na vsebnost posameznih učinkovin v ekstraktu vpliv tudi način ekstrakcije oziroma izbira topila ekstrakcije (Carvalho in sod., 2005; Moreno in sod., 2006).

Glede na polarnost lahko fenolne spojine razdelimo v 3 skupine (Del Campo in sod., 2000):

- fenolne kisline: ferulna kislina, kavna kislina, rožmarinska kislina
- flavonoidi: apigenin, rutin
- fenolni diterpeni: karnozolna kislina, karnozol

Najbolj pomembne so nepolarne spojine, se pravi fenolni diterpeni. Zato naj bi karnozolna kislina ter karnozol največ doprinesla k protimikrobnemu delovanju ekstrakta, medtem ko je rožmarinska kislina polarne narave in je zato njeno protimikrobno delovanje slabše (Del Campo in sod., 2000; Moreno in sod., 2006).

2.2.2 Eterična olja

Sestava eteričnega olja rožmarina je odvisna od lokacije rasti in drugih dejavnikov (Sasikumar, 2004). V preglednici 2-2 je predstavljena sestava eteričnega olja rožmarina.

Preglednica 2-2: Sestava eteričnega olja glede na vrsto spojin (Švagelj, 2006)

skupina	Predstavniki
monoterpeni	α -pinen; α -tujen; (-)kamfen; verbenen; sabinen; mircen; α -felandren; <i>p</i> -cimen; α -terpinen; limonen; 1,8-cineol; β -felandren; terpinolen; δ -3-karen; γ -terpinen
alkoholi	linalool; gejeren; verbenol; borneol; terpinen-4-ol; α -terpineol; geraniol
ketoni	kafra; <i>cis</i> -pinokanfon; verbenon
fenoli	karvakrol; timol
estri	bornil-acetat
seskviterpeni	β -kariofilen; α -humulen

Najbolj uveljavljen postopek za pridobivanje eteričnega olja rožmarina je destilacija z vodno paro ali vodo, uporablja pa se tudi superkritična tekočinska ekstrakcija (Sasikumar, 2004; Carvalho in sod., 2005).

2.2.3 Druge sestavine ekstrakta rožmarina

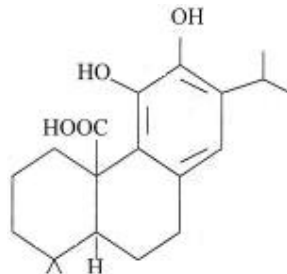
Pri pridobivanju ostalih sestavin ekstrakta rožmarina, se uporablja tako destilacija, kot tudi ekstrakcija z različnimi topili, kot so na primer heksan, benzen, etilen, kloroform, dioksan in metanol ter superkritična tekočinska ekstrakcija. Z različnimi topili in postopki pridobimo lahko ekstrakte z različno vsebnostjo posameznih komponent. S superkritično

tekočinsko ekstrakcijo naprimer pridobimo ekstrakt z boljšim antioksidativnim delovanjem, saj se s to metodo ekstrahira več čiste karnozolne kisline. Po drugi strani pa z ekstrakcijo z etanolom dobimo v ekstraktu več rožmarinske kisline, vendar pa se zraven ekstrahira tudi klorofil (Sasikumar, 2004; Carvalho in sod., 2005).

Kot smo že zapisali, so Del Campo in sod. (2000) razdelili fenolne skupine glede na naraščajočo polarnost v naslednje skupine:

- fenolni diterpeni

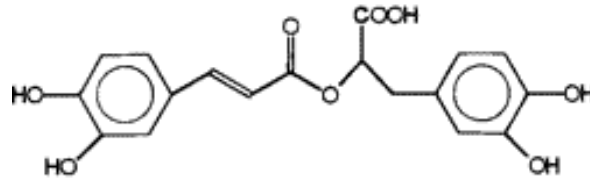
Med fenolnimi diterpeni v listih rožmarina sta najpomembnejša predstavnika karnozolna kislina (slika 2-2) in karnozol. Prisotna sta samo v ekstraktu rožmarina, ne pa tudi v eteričnem olju. Na njuno vsebnost v listih vplivajo različne sezonske oz. klimatske razmere (Munne-Bosch in sod., 2000) in tudi različne faze rasti listov (Del Bano in sod. 2003). Diterpeni imajo pomembno vlogo v rastlinah, ker nastajajo kot odgovor na stresne razmere iz okolja. V celici se karnozolna kislina in karnozol nahajata v kloroplastu (Munne-Bosch in Alegre, 2001). Karnozolna kislina se v prisotnosti kisika oziroma oksidativnega stresa in v polarnih topilih razgradi do karnozola in v druge fenolne spojine, med njimi rožmanol, izorožmanol, epirožmanol, metil karnozat (Munne-Bosch in sod., 2000; Munne-Bosch in Alegre, 2001; Del Bano in sod., 2003).



Slika 2-2: Strukturna formula karnozolne kisline (Munne-Bosch in Alegre, 2001)

- fenolne kisline

Rožmarinska kislina (slika 2-3) je dimer kavne kisline in vsebuje štiri hidroksilne skupine (Chen in Ho, 1997). Topna je v vodi in kot čista spojina ima poleg karnozolne kisline in karnozola visok antioksidativni učinek ter je skupaj z njima odgovorna za protimikrobno in antioksidativno delovanje ekstrakta rožmarina. Kot čista spojina ima dobro delovanje na po Gramu pozitivne bakterije, na po Gramu negativne bakterije pa protimikrobnega učinka nima (Moreno in sod., 2006).



Slika 2-3: Strukturna formula rožmarinske kisline (Chen in Ho,1997)

- flavonoidi

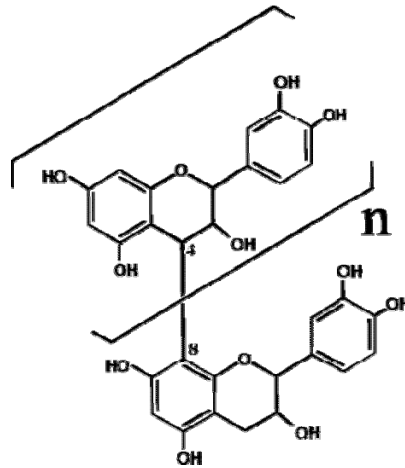
Flavonoidi so hidroksilirane fenolne snovi, ki imajo C3 – C6 skupino vezano na aromatski obroč. V rastlini se sintetizirajo kot odgovor na infekcije z mikroorganizmi, zato je pričakovano, da imajo tudi *in vitro* zelo dober protimikrobni učinek na številne mikroorganizme. Razlog za njihovo učinkovitost je verjetno povezan z njihovo sposobnostjo tvorbe kompleksa z izvenceličnimi proteini in z bakterijsko celično steno. Flavonoidi, ki imajo bolj lipofilen značaj, lahko tudi poškodujejo membrano bakterijskih celic (Cowan, 1999).

2.2.4 Uporaba rožmarina

Rožmarin je široko uporaben v prehrabeni industriji. Pomembno je predvsem njegovo antioksidativno delovanje, saj lahko deluje kot lipidni antioksidant in kelator kovinskih ionov ter ima sposobnost loviti superoksidne radikale. Ekstrakt in tudi eterično olje se uporabljata za stabilizacijo maščob, olj ter hrane, ki vsebuje maščobe. Prav tako se lahko uporablja za stabilizacijo fermentiranih mesnih izdelkov (Sasikumar, 2004).

Munné-Bosch in Alegre (2001) pa poročata, da karnozolna kislina deluje kot lipofilen antioksidant, ki odstranjuje prosti kisik, hidroksilne radikale in maščobne peroksidne radikale. S tem prepreči maščobno peroksidacijo in moteno delovanje bioloških membran. Karnozolna kislina igra pomembno vlogo pri zaščiti rastlin *in vivo* pred oksidativnim stresom.

Karnozol in karnozolna kislina imata tudi antitumorsko in antikarcinogeno delovanje, saj ščitita pred kromosomskimi poškodbami, ki jih povzročajo γ -žarki. Karnozolna kislina pa poveča antikarcinogeno delovanje vitamina D₃ in njegovih analogov ter zavira rast nekaterih drugih tumorskih celic (Del Bano in sod., 2006).



Slika 2-6: Reprezentativna struktura oligomere procianidina (Saito in sod., 1998)

Polifenoli, antociani in proantocianidini v grozdju imajo pomembno vlogo pri barvi, okusu (predvsem adstringentnosti – trpkosti) in stabilnosti rdečih vin. Med fermentacijo grozdja se namreč tanini ekstrahirajo iz kožice in pečk v vino (Yilmaz in Toledo, 2004).

Z analizo HPLC so Vatterm in sod. (2005) določili nekaj pomembnih funkcionalnih fenolov v ekstraktu grozdnih pečk, med njimi so tudi resveratrol, klorogenska, protokatehinska, rožmarinska in kavna kislina.

Semena grozdja rastejo tudi med zorenjem in to lahko vpliva na tanine grozdnih pečk. Bistvene spremembe v sestavi procianidinov se pojavijo v povezavi z zorenjem in lahko vplivajo na njihovo adstringentno delovanje. Na polifenole v grozdju vpliva tudi okolje. Raziskava je pokazala, da se med zorenjem bistveno zmanjša vsebnost polifenolov, in sicer 90% zmanjšanje flavan-3-olnih monomer in 60% zmanjšanje vsebnosti procianidinov. Spremeni pa se tudi barva ovoja semena (Kennedy in sod., 2000).

Grozdne pečke vsebujejo tudi precej vode in v kontroliranem okolju z določeno relativno vlažnostjo izmenjujejo vodo, dokler ne dosežejo ravnovesja. Na vlago med shranjevanjem je najmanj občutljiv katehin, vendar pa visoka relativna vlažnost vpliva na nivo obeh flavan-3-olov (katehina in epikatehina). Med shranjevanjem potekajo tudi hidrolitični procesi. Vrednosti proste galne kisline so na začetku shranjevanja nizke. Nastanek galne kisline med shranjevanjem pa je posledica hidrolize bolj kompleksnih spojin, kot je epikatehin galat in ni povezan z zmanjševanjem vsebnosti flavan-3-olnih monomer. Galna kislina je prav tako dober antioksidant in njeno nastajanje med shranjevanjem lahko kompenzira antioksidativno delovanje pri izgubi katehinov (Hatzidimitriou in sod., 2007).

2.3.2 Olje grozdnih pečk

Grozdne pečke so potencialno zelo dobre za produkcijo olj, kot stranskega produkta pridelovanja vina. Semena vsebujejo 10 – 15% olja, ki ima prijeten, nevtralen okus. Olje ima poleg ostalih sestavin tudi veliko naravnega vitamina E, kar pripomore k oksidativni stabilnosti olja (Beveridge in sod., 2005).

V superkritičnem ekstraktu so poleg fenolnih spojin določili tudi maščobne kisline. Zanimanje za olje iz grozdnih pečk je veliko tudi zaradi nenasičenih maščobnih kislin, kot sta linolna in oleinska kislina. Poleg tega pa olje vsebuje tudi veliko taninov (Palma in sod., 1999). Na sestavo olja vplivajo razni dejavniki, kot so sorta, lokacija gojenja, zrelost grozdja in sestava zemlje (Crews in sod., 2006).

2.3.3 Protimikrobno delovanje grozdnih pečk

Za topne fenole naj bi veljalo, da je njihovo protimikrobno delovanje posledica povečanja kislosti v membrani mikroorganizma ter znotrajceličnega povečanja kislosti, kar povzroča inaktivacijo ATPaze, ki je potrebna za sintezo ATP. Možni mehanizem delovanja je tudi sposobnost vezave prostih elektronov iz verige transporta elektronov vzdolž bakterijske membrane. Taka vezava onemogoči tok elektronov med citokromi in inhibira rast bakterije, saj prekine oksidativno fosforilacijo (Vattem in sod., 2005).

Delna hidrofobnost bifeniлов in polifenolnih spojin lahko omogoči vezavo na lipopolisaharidno plast po Gramu negativnih bakterij. Te spojine povzročijo spremembe v fluidnosti membrane in destabilizacijo, to pa povzroči poškodbo membrane ali pa inhibicijo transporta. Destabilizacija membrane z bifenili pa lahko omogoči enostavnim fenolom, da izrazijo svoj učinek povečanja kislosti in pobiranje elektronov iz transportne verige elektronov (Vattem in sod., 2005).

Tanini in ostali hidrolizirani produkti pa inhibirajo rast mikroorganizmov z odvzemanjem kovinskih ionov, ki so kritični za rast mikroorganizmov in metabolizem ali pa z inhibicijo kritičnih (bistvenih, osnovnih) funkcij bakterijske membrane, kot so ionski kanali in proteolitična aktivnost (Vattem in sod., 2005).

2.3.4 Uporaba grozdnih pečk

Semena grozdja (grozdne pečke) imajo širok spekter farmakoloških učinkovitosti. Med njimi so delovanje proti ulkusu (Saito in sod., 1998) ter inducirana lipidna peroksidacija in DNA fragmentacija v jetrnih in možganskih tkivih. Poleg tega delujejo proti oksidaciji lipoproteinov z nizko gostoto. V večini primerov je delovanje povezano z antioksidativnimi lastnostmi sestavin ekstrakta in se večinoma pripisuje fenolnim spojinam (Palma in sod., 1999).

Fenolne spojine vina so pritegnile precej pozornosti zaradi antioksidativnih lastnosti in njihovih potencialno ugodnih vplivov na zdravje ljudi. Zaradi tega je ekstrakt grozdnih pečk vse bolj popularen kot prehrambeni dodatek (Rodríguez Montealegre in sod., 2006).

2.4 CITRUSI

Rastline rodu *Citrus* (slika 2-7) so predvsem cenjene zaradi užitnih sadežev, imajo pa tudi tradicionalno medicinsko vrednost. Lupina sadežev rodu *Citrus* se v tradicionalni azijski medicini uporablja že stoletja (Choi in sod., 2007). Lupina citrusov, ki ostane po ekstrakciji soka, je primarni odpadni del in lahko znaša tudi do 50% celotne mase sadeža (Oreopoulou in Tzia, 2007). Lupina je dober vir melase, pektina, olja in limonena. Semena so bogat vir nenasičenih maščobnih kislin, vendar pa se olje iz semen ne pridobiva v komercialne namene (Bocco in sod., 1998).



Slika 2-7: Različne vrste citrusov (Alden, 2005)

2.4.1 Kemijska sestava citrusov

Tako semena kot lupina citrusov so zanimiv vir fenolnih spojin, ki vključujejo fenolne kisline in flavonoide (Bocco in sod., 1998).

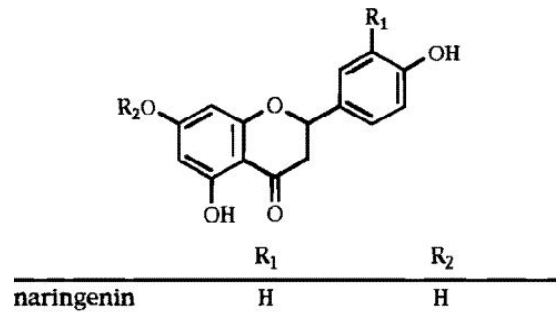
2.4.1.1 Flavonoidi citrusov

Večina rastlin rodu *Citrus* nakopiči znatne količine flavonoidov med razvojem različnih organov. Vse flavonoide, opisane v rodu *Citrus*, lahko razdelimo v naslednje skupine: flavanoni, flavoni, flavonoli ter antocianini – te najdemo samo v rdečih pomarančah. V citrusih so določili več kot 60 posameznih flavonoidov (Benavente-Garcia in sod., 1997).

Bocco in sod. (1998) so fenolne spojine v citrusih razdelili na dve skupini:

- proste fenolne spojine
- vezane fenolne spojine – kavna, kumarna, ferulna in sinapinska kislina

Med proste fenolne spojine spadajo flavanoni in flavoni, od teh je največ flavanonov. V citrusih se običajno pojavljajo kot diglikozidi (Bocco in sod., 1998) in prispevajo k značilnemu okusu citrusov (Tripoli in sod., 2007). Flavanoni so lahko prisotni tudi v aglikonski obliki, kjer sta najbolj pomembna naringenin (slika 2-8) in hesperitin. Med flavone in flavanolne aglikone pa spadajo apigenin, luteolin, diosmin in kvercetin (Tripoli in sod., 2007).



Slika 2-8: Strukturna formula naringenina (Bocco in sod., 1998)

Med glikozidnimi flavanoni sta pomembna dva tipa flavanonov (Tripoli in sod., 2007):

- neohesperidozidi – flavanoni naringin, neohesperidin in neoeriocitrin so sestavljeni iz flavanona z neohesperidozo (ramnozil- α -1,2-glukoza) in imajo grenak okus
- rutinozidi – flavanoni hesperidin, narirutin, didimin pa imajo flavanon in disaharidni ostanek rutinoza (ramnozil- α -1,6-glukoza) ter so brez okusa

Fenolne spojine in flavonoide lahko detektiramo z metodo HPLC-MS (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti in sklopitev z masno spektrometrijo) in jih tako lahko razdelimo v dve skupini glede na različne čase elucije (Tripoli in sod., 2007):

- flavanon glikozidi – se izločijo prvi
- polimetoksilirani flavoni – se izločijo drugi in so manj polarni

V plodovih citrusov so flavanoni prisotni v znatno večjih količinah, kot pa polimetoksilirani flavoni, vendar pa imajo ti večjo biološko aktivnost (Benavente-Garcia in sod., 1997). Pomembni polimetoksilirani flavoni so tangeretin, nobiletin, heksametoksiflavon, heptametoksiflavon (Tripoli in sod., 2007).

Antocianini predstavljajo barvne komponente rastlin in predvsem sadežev, pa tudi listov, popkov in korenin. V pomarančah se nahajajo v epikarpu, lahko pa obarvajo tudi mezokarp. Vsebnost je močno odvisna od stopnje zrelosti sadeža (Tripoli in sod., 2007).

V citrusih najdemo tudi katehine, levkoantocianine in proantocianine, vendar pa to niso specifične sestavine citrusov, saj jih najdemo tudi v drugih vrstah zelenjave (Tripoli in sod., 2007).

2.4.1.2 Fenolne kisline

Citrusi vsebujejo estre in glikozide *trans*-hidroksicimetnih kislin. Med hidroksicimetne kisline, ki so v citrusih, spadajo kavna, kumarna, ferulna in sinapinska kislina, prevladuje pa ferulna kislina. Rdeče pomaranče vsebujejo večje količine hidroksicimetnih kislin kot običajne pomaranče. Hidroksicimetne kisline so mnogokrat vezane na antocianine, kar je logično, saj so prav hidroksicimetne kisline prekursorji antocianinov. Velike količine teh

kislin v rdečih pomarančah so lahko kontrolni faktor pigmentacije. Za razliko od rdečih pomaranč pa običajne pomaranče ne vsebujejo antocianinov in imajo nizko vsebnost kavne kisline (Rapisarda in sod., 1998).

2.4.2 Eterično olje citrusov

Olje citrusov se nahaja v flavedu, to je obarvan del lupine pomaranč. V hladnostiskanem olju pomaranč so določili več kot 200 spojin, ki jih lahko razdelimo v dve frakciji (Chafer in sod., 2001):

- terpeni – predstavljajo približno 95% pomarančnega olja. Glavna komponenta je limonen, to je nenasičen terpen z 10 ogljikovimi atomi
- oksigenirane spojine – aldehidi, alkoholi, estri in ketoni. Te spojine dajejo citrusom značilno aromo oziroma vonj. Glavna komponenta te frakcije pa je linalol.

2.4.3 Protimikrobno delovanje

Študije so že pokazale protibakterijsko delovanje. Pomembna pa je tudi povezava med strukturo in aktivnostjo, ki vpliva na protivirusno delovanje. To protivirusno delovanje naj bi bilo povezano z neglikozidnimi spojinami. Kvercetin in hesperidin naprimer inhibirata infektivnost in replikacijo virusov, kot sta virus herpes simplex in poliovirus. Naringenin, flavonoid iz grenivke, takega protivirusnega delovanja nima (Tripoli in sod., 2007).

Raziskave so pokazale tudi modulatorno funkcijo komponent olja grenivke na izlivne črpalke večkratno odpornih sevov *S. aureus* (MRSA – na meticilin odpornih sevov *S. aureus*). Njihova občutljivost za antibiotike se je po dodatku rastlinske učinkovine povečala (Abulrob in sod., 2004).

2.4.4 Uporaba

Pomembne lastnosti flavonoidov, ki pa niso povezane z antioksidativnim delovanjem, vključujejo njihovo sposobnost spremeniti aromo in/ali okus različnih sestavin in pripravkov, ki se uporabljajo v kozmetični in prehrabeni industriji. Obstajajo nekateri flavonoidi citrusov, ki so brez okusa, pa vseeno spremenijo okus soka in ostalih prehrabnih produktov. Primer je dodatek neodiosmina soku citrusov, ki bistveno spremeni mejo zaznavanja grenkega okusa (Benavente-Garcia in sod., 1997).

Kemijske strukture flavanonov so specifične za posamezno vrsto citrusov in so zato lahko markerji za potvorbe komercialnih sokov. Primer je glikoziliran flavanon naringin, ki ni nikoli prisoten v soku sladke pomaranče (Tripoli in sod., 2007).

2.5 OLJČNI LISTI

Oljka (*Olea europaea*, Oleaceae) je eno najbolj pomembnih dreves v državah Sredozemlja (Savournin in sod., 2001). Oljčni listi (slika 2-9) so stranski produkt pri gojenju oliv. Najdemo jih v velikih količinah v industriji olja, predstavljajo 10% celotne mase oliv. Smatrajo se kot poceni surovina, ki se lahko uporablja kot učinkovit vir produktov z visoko dodano vrednostjo. V zgodovini so se listi že uporabljali kot ljudsko zdravilo za zdravljenje bolezni, kot je na primer malarija (Bouaziz in sod., 2008).

Dlake oljčnih listov imajo različne vloge pri varovanju rastline, med njimi je varovanje pred insekti in zmanjševanje nivoja UV sevanja, ki prodre v notranjost lista. Dlake vsebujejo posebne pigmente, ki so karakterizirani kot fenolne spojine in imajo veliko flavonoidov (Ryan in sod., 2002).



Slika 2-9: Oljčni listi (Olive leaf (*Olea europaea*), 2008)

2.5.1 Kemijska sestava oljčnih listov

Glavne fenolne spojine v oljčnih listih lahko razdelimo v 5 skupin (Benavente – Garcia in sod., 2000):

- olevropeozidi – olevropein in verbaskozid
- flavoni – luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin in diosmetin
- flavonoli – rutin
- flavan-3-oli – katehin
- substituirani fenoli – tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kislina in kavna kislina

2.5.2 Protimikrobno delovanje oljčnih listov

Olevropein protimikrobno deluje na različne seve patogenih bakterij, tako po Gramu pozitivnih kot po Gramu negativnih. Poleg tega ima tudi protivirusno delovanje – deluje predvsem na viruse z ovojnico (Caturla in sod., 2005). Olevropein ima v primerjavi s hidroksitirosolem slabše protimikrobno delovanje. Čeprav imata olevropein in hidroksitirosole o – položaj dveh –OH skupin, ki je odgovoren za protimikrobno delovanje, se domneva, da je manjša učinkovitost olevropeina povezana z glikozidno skupino, ki lahko onemogoči prehod (penetracijo) skozi celično membrano ali doseg tarčnega mesta (Caturla in sod., 2005; Tuck in Hayball, 2002). Ravno zaradi te glikozidne skupine pa naj bi bil olevropein bolj toksičen za po Gramu pozitivne kot pa za po Gramu negativne bakterije. Razlog naj bi bil ta, da zaradi glikozidnega dela molekule olevropein ne more prehajati skozi zunanjo membrano po Gramu negativnih bakterij in tako ne more doseči tarčnega mesta (Furneri in sod., 2002).

Bakterijske membrane vsebujejo precejšnjo količino negativno nabitih fosfolipidov, kot sta na primer fosfatidilglicerol in kardiolipin. Olevropein učinkuje na te fosfolipide in na ta način lahko razložimo njegov antibakterijski učinek (Caturla in sod., 2005).

Prav tako olevropein in njegovi produkti hidrolize lahko inhibirajo nastanek in produkcijo enterotoksina B bakterije *Staphylococcus aureus*, razvoj bakterije *Salmonella enteritidis* ter kalitev spor in posledično razvoj bakterij *Bacillus cereus* (Tripoli in sod., 2005).

2.5.3 Uporaba oljčnih listov

Ekstrakt oljčnih listov se lahko uporablja za stabilizacijo rafiniranega oljčnega olja. Zavira oksidacijo in preprečuje žarkost olja z izboljšanjem stabilnosti in povečanjem vsebnosti sterolov (Bouaziz in sod., 2008). Zaradi velike količine fenolnih spojin, ki delujejo antioksidativno, se v zadnjem času oljčne liste dodaja tudi prezrelim olivam pred procesom pridobivanja olja za boljšo aromo in že prej omenjeno stabilizacijo (Ranalli in sod., 2006).

Obstaja veliko študij, kjer je potrjeno bioaktivno delovanje polifenolnih komponent oljčnih listov, na primer protivirusno delovanje, preventivno pri kardiovaskularnih boleznih, inhibiciji ateroskleroze, preventivno pri rakavih obolenjih in protivnetno (Tripoli in sod., 2005; De Leonardis in sod., 2008).

Pomembno je antioksidativno delovanje fenolov oljčnih listov na različne lipide v hrani. Treba pa je tudi omeniti, da so lahko ti fenoli pri določenih koncentracijah toksični za različne celice (De Leonardis in sod., 2008).

2.6 HMELJ

Rastlina hmelja pripada družini *Cannabinaceae*. Kultivirane vrste hmelja (*Humulus lupulus*) (slika 2-12) se kot sestavine piva omenjajo že v zgodovini. Hmelj je verjetno postal sestavina piva prav zaradi svoje bakteriostatične aktivnosti, ki je povečala kakovost in stabilnost piva. Hmelj so v medicinske namene uporabljali v samostanih v 8. in 9. stoletju (Larson in sod., 1996).

Rastlina hmelja je ovijalka. Samo ženski cvetovi – storžki se uporabljajo v pivovarstvu. Zreli storžki vsebujejo rumene smolnate granule, imenovane lupulin, ki so pomembni zaradi grenčin (Sakamoto in Konings, 2003).



Slika 2-12: Hmelj – *Humulus lupulus* (Biersite Wilfried van der Wal, 2000)

2.6.1 Kemijska sestava hmelja

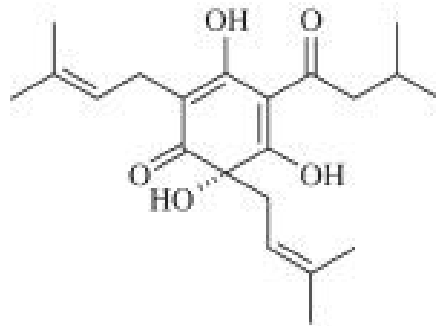
Storžki ženske rastline hmelja vsebujejo smole in eterično olje, ki pivu dajo značilen grenak okus in aromo. Grenke sestavine hmelja so razdeljene na α -kislone in β -kislone. α - in β -kislone imajo osnovno aciklično strukturo (2,4-ciklohesadien-1-on), vendar se analogi razlikujejo v stranski verigi (Larson in sod., 1996).

Ostale, prav tako pomembne sestavine hmelja, pa so eterično olje, halkoni (ksantohumol in izoksantohumol), kondenzirani tanini, fenolne kisline (predvsem ferulna in klorogenska kislina) ter flavonoidni glikozidi (kamferol, kvercetin, astragalina in rutin) (Zanolini in sod., 2005).

2.6.1.1 Hmeljne smole

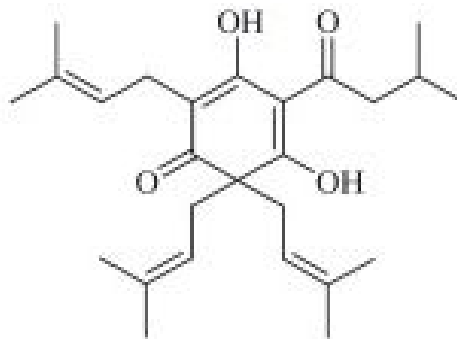
Skupno predstavljajo smole 15-30% storžka in so topne v etru in hladnem metanolu. Naprej smole delimo na mehke in trde smole. Mehke smole so topne v heksanu, medtem ko trde smole predstavljajo netopni ostanek. Mehke smole sestavljajo predvsem alfa in beta kislone, nekaj pa je nedefiniranega ostanka (Sakamoto in Konings, 2003).

Alfa kislinski del je zmes homolognih sestavin, ki pa se kot take ne prenesejo v pivo. Z izomerizacijo se med vrenjem pretvorijo v izo-alfa-kislino, ki so bolj topne in bolj grenke kot prvotne spojine. Pomembne alfa kisline so humulon (slika 2-13), kohumulon in adhumulon. Izo- α -kislino teh spojin so izohumulon, izokohumulon in izoadhumulon (Sakamoto in Konings, 2003).



Slika 2-13: Strukturna formula humulona (Natarajan in sod., 2008)

Beta kisline oziroma lupuloni (slika 2-14) pa so slabo topni v pivu in zato niso podvrženi izomerizaciji, kot alfa kisline. Posledično se zato ne prenesejo v pivo. Prav tako so zmes homolognih sestavin, kot so lupulon, kolupulon in adlupulon (Sakamoto in Konings, 2003).



Slika 2-14: Strukturna formula lupulona (Natarajan in sod., 2008)

2.6.2 Eterično olje hmelja

Eterično olje hmelja vsebuje veliko število hlapnih komponent. Med njimi so enostavni oksidirani alkani, monoterpeni in seskviterpeni. Glavne spojine so monoterpen mircen, seskviterpena kariofilen in humulen, ki skupaj predstavljajo do 82% eteričnega olja. Vsebnost teh spojin je odvisna od kultivarja in metode detekcije (Chadwick in sod., 2006).

2.6.3 Protimikrobno delovanje

Poleg tega, da pivu dajo grenko aromo in okus, imajo ekstrakti hmelja tudi protimikrobno delovanje. Raziskave so pokazale, da imajo beta kisline boljše protimikrobno delovanje kot pa izo-alfa-kisline. Grenke kisline hmelja delujejo predvsem na po Gramu pozitivne bakterije, kot so bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*, pa tudi na glive (Larson in sod., 1996), ne inhibirajo pa rasti po Gramu negativnih bakterij (Sakamoto in Konings, 2003). Ksantohumulol pa ima širok spekter delovanja proti velikemu številu bakterij, virusov in gliv (Natarajan in sod., 2008).

Protimikrobno delovanje alfa kislin (humulon) in beta kislin (lupulon) je že dolgo tema različnih raziskav. Dokazano je bilo, da je protimikroben učinek alfa in beta kislin boljši kot pa delovanje izo-alfa-kislin, vendar pa so manj topne v vodi in pivu. Prav tako se moč antiseptičnega delovanja hmelja viša z nižjim pH (Sakamoto in Konings, 2003).

Sestavine hmelja (lupulon, humulon, izohumulon in humulinska kislina) povzročajo poškodbe in puščanje citoplazmatske membrane bakterije *Bacillus subtilis*, kar povzroča inhibicijo aktivnega transporta sladkorjev in aminokislin. Posledično so opazili tudi inhibicijo dihanja in sinteze proteinov, RNA in DNA (Sakamoto in Konings, 2003).

Glede na 'bakteriostatično moč' hmeljevih sestavin ima vrelni produkt humulona – se pravi izohumulon, manjšo bakteriostatično moč v sladnem ekstraktu kot izvorni humulon (Sakamoto in Konings, 2003).

V bakterijah *Lb. brevis* trans-izohumulon zmanjša dvig levcina in povzroča počasno odpuščanje levcina. Potenciometrične študije so pokazale, da nedisociiran trans-humulon po vsej verjetnosti deluje kot ionofor – katalizira elektronevtralni pritok nedisociiranega izohumulona, notranjo disociacijo (H⁺)-izohumulona in odtok izohumulon kompleksa z dvovalentnimi kationi, kot je Mn²⁺. Rezultat tega delovanja je znižanje pH gradienta po celi membrani (Sakamoto in Konings, 2003).

Natarajan in sod. (2008) pa so preverjali skupno delovanje nekaterih sestavin hmelja in nekaterih antibiotikov. *In vitro* so dokazali na pozitivno sodelovanje lupulona in ksantohumulona z nekaterimi komercialnimi antibiotiki. Uporabljene mešanice so inhibirale rast po Gramu pozitivnih in tudi nekaj po Gramu negativnih bakterij.

2.6.4 Uporaba hmelja

Hmelj ima tudi različne sedativne učinke, vendar pa mehanizmi delovanja še niso raziskani. Poleg tega ima ekstrakt hmelja oziroma njegove sestavine antioksidativno delovanje ter lahko delujejo kemopreventivno proti raku. Hmelj pa vsebuje tudi eno najmočnejših *in vitro* estrogenskih spojin (Chadwick in sod., 2006).

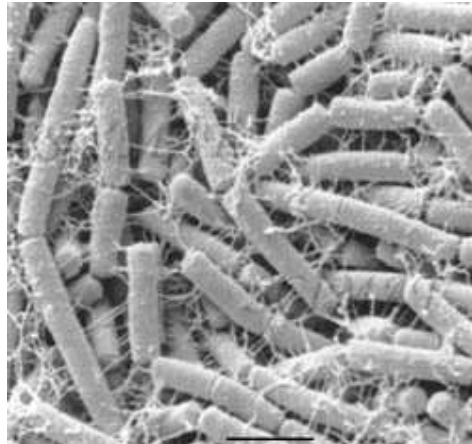
2.7 BAKTERIJE RODU *Bacillus*

Rod *Bacillus* sestavljajo aerobne ali fakultativno anaerobne po Gramu pozitivne palčke, ki tvorijo spore (Notermans in Batt, 1998). Glede na genetsko in fenotipsko raznolikost lahko rod *Bacillus* razdelimo na šest skupin. Skupino *B. cereus* sestavljajo naslednje vrste: *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephansis* in *B. anthracis* (Ehling-Schulz in sod., 2005). Skupina *B. cereus* je zelo homogena, zato so si vrste med seboj podobne, vendar pa še vedno niso dovolj dobro raziskane (Jensen in sod., 2003).

Bacillus cereus (slika 2-15) je torej po Gramu pozitiven oportunističen humani patogen, ki tvori endospore. Povzroča dva tipa sindromov zastrupitve s hrano (Ehling-Schulz in sod., 2005). Emetični sindrom je posledica zaužitja emetičnega toksina (cerevlid – ciklični peptid), ki nastane v hrani (Carlin in sod., 2006). Cerevlid je toplotno obstojen peptid, ne izgubi aktivnosti pri 121°C, prenese velik razpon pH vrednosti (med pH 2 in pH 11) in je odporen na delovanje pepsina in tripsina (Kotiranta in sod., 2000). Diarealni sindrom pa je posledica zaužitja celic *B. cereus* v hrani. Med vegetativno rastjo celic nastaja toksin v tankem črevesju (Carlin in sod., 2006).

Bakterije *B. cereus* so prisotne v naravi, pogosto jih izolirajo iz zemlje in rastlin. Kot običajna populacija zemlje se lahko organizem prenese na vegetacijo in tako v hrano. Nahajajo se v različni hrani, tudi v mlečnih izdelkih, mesu, začimbah in žitaricah (Notermans in Batt, 1998).

Spore bakterij *B. cereus* so relativno odporne na toploto. Proces kaljenja je hiter, pri nekaterih sevih traja do 30 minut. Kaljenje spor je med različnimi sevi precej heterogen proces. Delimo jih na spore s hitro in na spore s počasno germinacijo. Spore s počasno germinacijo naj bi bile bolj toplotno odporne. So pa dokazali, da so med sevi, ki proizvajajo več toplotno odpornih spor, tudi sevi s sporami s hitro germinacijo (Notermans in Batt, 1998). Avtorji navajajo različne vzroke za toplotno odpornost bakterijskih spor, med njimi je pomembna temperatura sporulacije. Bakterijske spore so bolj odporne na toploto, kadar sporulirajo pri višjih temperaturah, vendar pa je ta pojav pogojen z vrsto bakterije. Poleg tega na bakterijsko toplotno odpornost vpliva tudi vrednost pH gojišča in vodna aktivnost (Leguerinel in sod., 2007). Spore, ki preživijo toplotno obdelavo, so pogosto poškodovane, kar pomeni, da potrebujejo boljše okolje z več hranili. Glavni znak poškodb bakterijski spor s toploto je občutljivost na kislo okolje (Moussa-Boudjema in sod., 2006).



Slika 2-15: Mikrografija bakterije *Bacillus cereus* (Kalab, 2005)

2.8 BAKTERIJE RODU *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* sestavlja 36 vrst, ki so sestavljene iz sevov, ki so patogeni, saprofitni ali pa se uporabljajo kot starter kulture v živilski industriji. Bakterije rodu *Staphylococcus* so razširjene v naravi in so del normalne bakterijske flore kože in sluznic ljudi. Različne seve pa so izolirali tudi iz živil, kot so meso, sir in mleko ter iz okolja, na primer iz zemlje, zraka ali vode (Irlinger, 2007).

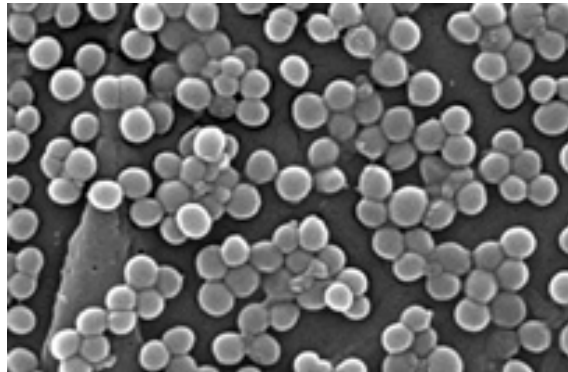
Bakterije rodu *Staphylococcus* so po Gramu pozitivni koki, ki se urejajo v nepravilne gruče. So negibljivi, fakultativno anaerobni, vendar pa bolje rastejo v aerobnem okolju. Glede na izdelovanje encima koagulaze delimo stafilokoke v dve skupini: na koagulazno pozitivne in koagulazno negativne stafilokoke (Seme, 2002).

Večina vrst je koagulazno negativnih in njihov patogeni potencial (obstoj enterotoksigenih sevov in na več učinkovin odpornih sevov) še ni podrobno raziskan. Med koagulazno negativne spada tudi *S. xylosus*, ki se smatra za nepatogenega in ga redko povezujejo z infekcijami. Raziskave so pokazale, da lahko nekateri sevi *S. xylosus* razvijejo odpornost na nekatere antibiotike in lahko predstavljajo naravni rezervoar genov za odpornost na antibiotike. Med koagulazno pozitivne pa spada *S. aureus* (slika 2-16) (Irlinger, 2007).

S. aureus je pogosto vzrok infekcij, tako v bolnišnicah, kot tudi v okolju in postaja vse bolj virulenten in odporen na antibiotike. *S. aureus* običajno živi kot komensal v človeškem nosu, in sicer pri 30 – 70% populacije (Lindsay in Holden, 2004).

Kolonizacijo hrane z bakterijami *S. aureus* že dolgo povezujejo z obliko gastroenteritisa, ki se kaže kot bruhanje z ali brez diareje. Ta pojav je posledica zaužitja toksinov s hrano, ki je bila okužena z bakterijami *S. aureus*. Zastrupitev običajno izzveni v 24 – 48 urah (Dinges in sod., 2000). Za zastrupitev s hrano, okuženo s stafilokoki, je značilna kratka inkubacijska doba, sledi slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu in diareja. Zastrupitev ni smrtno nevarna, v redkih primerih je prišlo do smrti zaradi komplikacij akutne stafilokokne enterotoksikoze (Balaban in Rasooly, 2000).

Enterotoksini stafilokokov spadajo v družino pirogenih toksinov stafilokokov in streptokokov. Imajo skupno strukturo in funkcijo. Povzročajo sindrome podobne toksičnemu šoku, pa tudi zastrupitve s hrano ter nekatere alergijske in avtoimunske bolezni. Enterotoksini so družina glavnih seroloških tipov toplotno stabilnih enterotoksinov, imenovanih SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEJ. Delujejo kot močni gastrointestinalni toksini, ter kot superantigeni, ki stimulirajo nespecifično proliferacijo (močno povečanje) T celic (Balaban in Rasooly, 2000).



Slika 2-16: Mikrografija na meticilin odporne bakterije *S. aureus* (Cree, 2007)

2.9 *In vitro* METODE UGOTAVLJANJA BAKTERIJSKE OBČUTLJIVOSTI

Bakterijsko občutljivost za protimikrobne snovi največkrat preverjamo z difuzijskimi in dilucijskimi metodami. Izbira metode je odvisna od različnih dejavnikov. Med njimi so pomembni enostavnost metode, fleksibilnost, uporaba avtomatiziranih naprav za identifikacijo in samo testiranje (Woods in Washington, 1999).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je običajno merilo protimikrobnega delovanja. Definicije MIC so v različnih publikacijah različne, kar lahko predstavlja oviro pri primerjanju posameznih študij. Pogosta je definicija, ki pravi, da je minimalna inhibitorna koncentracija tista najmanjša koncentracija, ki inhibira vidno rast mikroorganizma (Burt, 2004). Določanje MIC je uporabno za oceno (vrednotenje) relativne stopnje občutljivosti bakterij na različna protimikrobna sredstva in za primerjavo relativnega učinka protimikrobnih sredstev na različne vrste mikroorganizmov (Woods in Washington, 1999).

Preglednica 2-3: Pregled metod za določanje občutljivosti protimikrobnih snovi (Burt, 2004)

Namen	Metoda	Način odčitavanja
Presejalni testi protimikrobne aktivnosti	Metoda difuzije v agarju z diski Metoda difuzije v agarju z luknjicami	
Določanje protimikrobne aktivnosti	Dilucijska metoda v agarju Dilucijska metoda v bujonu	Rast na gojišču Vidna rast/motnost Optična gostota (absorbanca) Sprememba prevodnosti/impedance Štetje kolonij/kultivabilnost
Ugotavljanje kinetike protimikrobne aktivnosti (trajanje in hitrost aktivnosti)	Krivulja preživetja/krivulja odmiranja	
Opazovanje fizičnih učinkov protimikrobne aktivnosti	Elektronska mikroskopija	

2.9.1 Difuzijske metode

Metoda difuzije v agarju z diski (slika 2-17) se uporablja za določanje in kategorizacijo občutljivosti posameznih mikroorganizmov. Pri izvedbi metode uporabljamo komercialno pripravljene papirnate diske, ki jih prepojimo z določeno količino protimikrobnega sredstva in položimo na površino agarske plošče, inokulirane s preiskovano kulturo. Protimikrobno sredstvo nato prehaja skozi disk v agar. Čim večja je razdalja od diska, tem manjša je koncentracija protimikrobnega sredstva, in sicer pada logaritemsko. Na površinah, kjer je protimikrobno sredstvo delovalo inhibitorno, se pojavijo inhibicijske cone, kjer ni rasti (Woods in Washington, 1999).



Slika 2-17 : Metoda difuzije z diski

Metoda difuzije v agarju z diski ima kar nekaj prednosti: metoda je tehnično enostavna in zelo ponovljiva, cenovno ugodna in ne zahteva nobene posebne opreme, omogoča pa določanje kvalitativnih rezultatov (občutljiv, vmesen, odporen). Prva omejitev te metode je spekter organizmov, pri katerih je metoda standardizirana. Slabost metode je lahko tudi, da določa le kvalitativen rezultat, bolj zaželen je kvantitativen rezultat (Woods in Washington, 1999).

2.9.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije protimikrobnega sredstva, ki je potreben, da inhibira rast mikroorganizma in se običajno izraža v $\mu\text{g/ml}$. Protokoli za določanje protimikrobnega inhibitornega delovanja se izvajajo z metodami v tekočih ali na trdnih gojiščih. Med metode dilucije spadajo: dilucijska metoda v agarju (protimikrobno sredstvo razredčimo v trdnem gojišču) ter makro oziroma mikrodilucijska metoda v bujonu (protimikrobno sredstvo razredčimo v tekočem gojišču) (Woods in Washington, 1999).

Protimikrobna sredstva običajno testiramo pri 2-kratnih serijskih razredčitvah. Minimalna inhibitorna koncentracija je potem najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast mikroorganizma. Koncentracijsko območje je odvisno od testiranega protimikrobnega sredstva in izbranega organizma. Območja morajo vključevati koncentracije, ki omogočajo določanje interpretacijskih kategorij (občutljiv, vmesen, odporen). Hkrati pa morajo biti območja sprejemljiva za kontrolne referenčne seve (Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda v agarju je dobro standardizirana, zanesljiva tehnika za testiranje občutljivosti. Lahko jo uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih sistemov. Poleg tega pa je možno tudi hkratno testiranje posameznih izolatov. V primerjavi z dilucijsko metodo v bujonu je tu detekcija kontaminacije hitrejša. Največja slabost dilucijske metode v agarju je velika poraba materiala in časa, ki je potreben za pripravo agarjskih plošč, še posebej pri velikem številu različnih protimikrobnih sredstev (Woods in Washington, 1999).

2.9.3 Metode spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja

Hitrost in/ali trajanje bakteriostatičnega ali baktericidnega učinka se lahko določi z analizami krivulje preživetja oziroma odmiranja mikrobne kulture v odvisnosti od časa. Število živih celic, ki so ostale v ravnem mediju po dodatku protimikrobnega sredstva, je grafično prikazano v odvisnosti od časa. Najpogosteje uporabljene metode za določanje teh učinkov so merjenje optične gostote in štetje živih celic po nacepljanju na gojišča (Burt, 2004). Pri tej metodi je tudi najbolj nazorno viden učinek koncentracije inokuluma kulture na protimikrobni učinek testne snovi.

2.9.4 Drugi načini

Poleg merjenja inhibicije rasti lahko protimikrobno delovanje spremljamo še na druge načine, naprimer z elektronskim mikroskopom, s spremljanjem (ugotavljanjem) inhibicije membranskih črpalk in s tem eventualnega sinergističnega učinka z drugimi snovmi, z ugotavljanjem učinka na bakterijske spore, ugotavljanjem inhibicije sinteze toksinov.

Poškodbe celičnih sten in izgubo celične vsebine lahko spremljamo z elektronskim mikroskopom. Pri pripravi vzorcev za elektronski mikroskop moramo zagotoviti, da so opazovane razlike med kontrolnimi in tretiranimi celicami zaradi učinkov protimikrobnih snovi in ne zaradi metode priprave preparatov (Burt, 2004).

Bakterije so zelo spretno pri pridobivanju odpornosti na antibiotike in biocide. Med temi problematičnimi klinično pomembnimi patogeni je tudi na meticilin odporni *S. aureus* (Oluwatuyi in sod., 2004). To predstavlja velik problem v medicinski mikrobiologiji. Pri naraščajoči odpornosti na antibiotike sodelujejo membranski proteini, ki aktivno izčrpavajo specifično zdravilno učinkovino ali skupino zdravil iz celic. Lahko izčrpavajo različne vrste molekul, kot na primer črpalke bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in *S. aureus* (Abulrob in sod., 2004; Oluwatuyi in sod., 2004). Inhibitor črpalke je definiran kot modulator, ki značilno vpliva na sposobnost črpalke za izločanje antibiotikov. Lahko pa ovira izločanje normalnih fizioloških substratov te črpalke. Taki modulatorji se lahko uporabljajo za izboljšanje delovanja protimikrobnega sredstva, katerega klinična učinkovitost je omejena z vse večjim porastom odpornih sevov (Abulrob in sod., 2004). Takšno delovanje modulatorja, ki poveča bakterijsko občutljivost za antibiotike, so potrdili tudi za fenolne diterpene, kot sta karnozol in karnozolna kislina iz rožmarina (Oluwatuyi in sod., 2004; Gibbons, 2005).

Za zagotovitev varnosti pasteriziranih in steriliziranih živil je pomembno razumeti faktorje, ki vplivajo na toplotno odpornost spor, kot so na primer spore bakterije *B. cereus*. Na germinacijo, razvoj in toplotno odpornost *B. cereus* spor imajo vpliv temperatura gojenja, sestava in pH gojišča, kot tudi prisotnost dovoljenih aditivov v hrani. Acidifikacija ima skupaj s toplotno obdelavo sinergistični učinek, ker zmanjša toplotno odpornost bakterije *B. cereus* in inhibira rast spor (Moussa-Boudjemaa in sod., 2006).

Dokazali so, da fenolne spojine zelenega čaja povečajo toplotno občutljivost spor bakterij rodu *Bacillus* in *Clostridium*, zato te ne preživijo temperatur (50 – 60 °C), pri katerih so topli napitki hranjeni v tovrstnih avtomatih. Zato zavrejo razvoj in rast teh bakterij v tovrstnih napitkih (Sakanaka in sod., 2000).

Nekatere plesni rodu *Aspergillus* proizvajajo različne hepato-karcinogene aflatoksine, katerih biosintezo stimulira oksidativni stres. Vendar mehanizem delovanja še ni znan, je pa dokazano, da nekateri naravni antioksidanti inhibirajo biosintezo aflatoksinov, brez vpliva na rast plesni, saj zmanjšajo oksidativni stres plesni (Kim in sod., 2007).

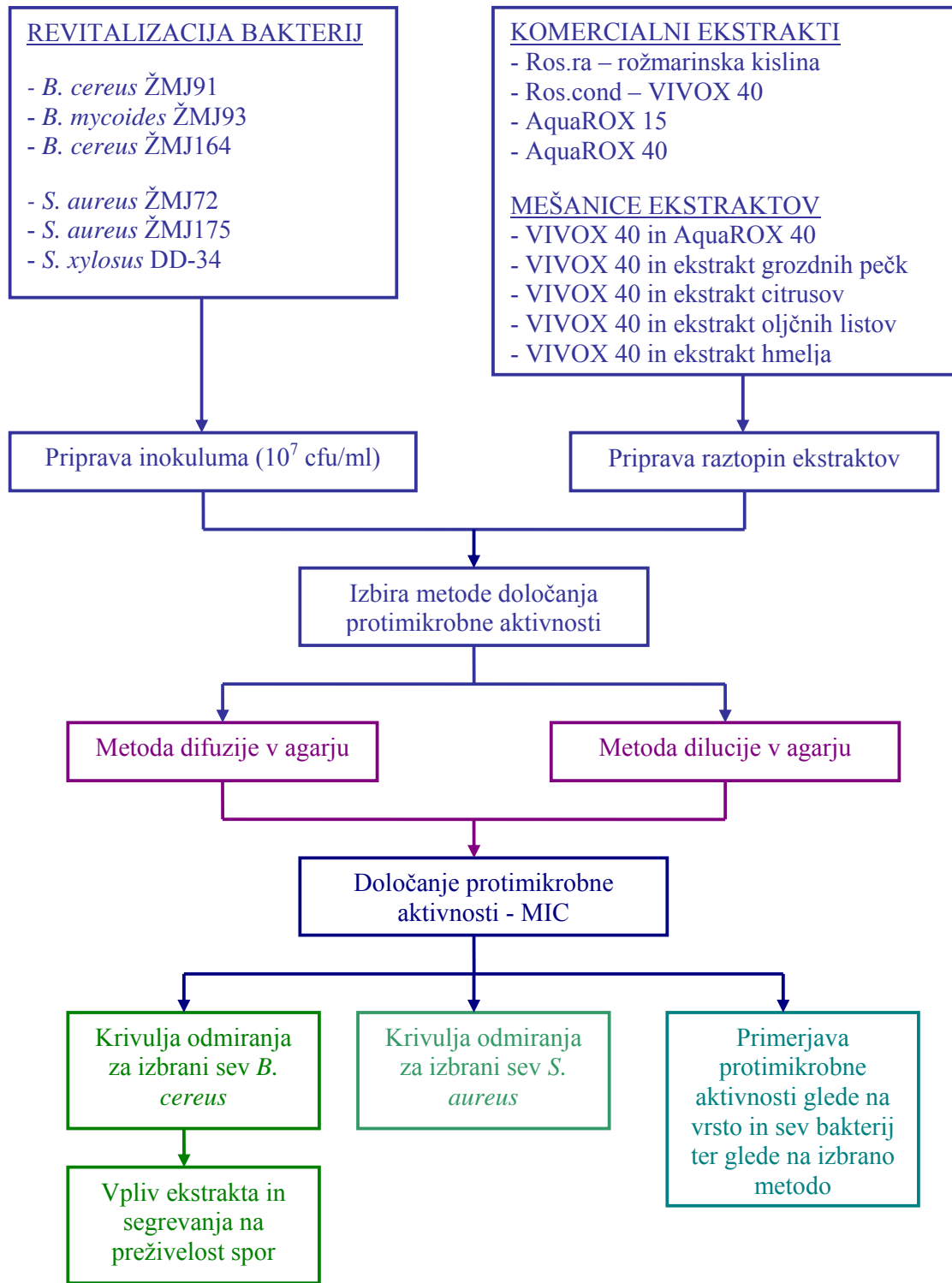
Med pomembne toksine, kar se tiče varnosti hrane, spadajo tudi enterotoksini bakterij rodu *Staphylococcus*. Ti so odporni na delovanje nekaterih encimov (na primer pepsin) in na toploto (Balaban in Rasooly, 2000). Pomembno vlogo ima lahko tudi koncentracija

glukoze v gojišču, ki prepreči nastanek enterotoksina in vpliva tudi na rast bakterij (Tassou in sod., 2000).

Na sintezo enterotoksina pa lahko vpliva tudi dodatek protimikrobnega sredstva. Tako delovanje, ki ne bi inhibiralo bakterijske rasti, ampak le sintezo toksina, bi bilo idealno v fermentiranih izdelkih, kjer obstaja tveganje sinteze toksina, zaželjena pa je rast in encimska aktivnost starterske kulture (naprimer stafilokoki v fermentiranih mesnih izdelkih).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 POTEK DELA



Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri eksperimentu smo uporabili 2 seva bakterije *Bacillus cereus*, en sev bakterije *Bacillus mycoides*, dva seva bakterije *Staphylococcus aureus* ter en sev bakterije *Staphylococcus xylosus*.

Preglednica 3-1: Delovni mikroorganizmi

Oznaka seva	Vir seva
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ91	S1 (R2S)
<i>Bacillus mycoides</i> ŽMJ93	
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	WSBC 10530
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ175	NCTC 1803
<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34	BACTOFORM SM-181

Legenda: WSBC: tipski sev zbirke Weihenstephan *B. cereus* Culture Collection; ATCC: tipski sev zbirke American Type Culture Collection; NCTC: tipski sev zbirke National Collection of Type Cultures; ŽMJ: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Agar TSA (Tryptone Soya Agar) – za difuzijsko metodo v agarju ter štetje na ploščah

Sestavine:

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

Priprava:

Sestavine smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali ter sterilizirali v avtoklavu 15 min na 121 °C. Po končani sterilizaciji smo gojišče aseptično razlili v sterilne petrijevke ali pa smo ga do uporabe hranili na 45°C.

3.2.2.2 Agar TSA (Tryptone Soya Agar) – za dilucijsko metodo v agarju

Sestavine so enake kot pri opisu v točki 3.2.2.1

Priprava:

Sestavine smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali ter avtoklavirali 10 min na 100 °C. Tako so se vse sestavine dobro raztopile, da smo lahko potem z dispenzorjem

razdelili gojišče v epruvete po 6 ml. Epruvete smo sterilizirali 15 min na 121°C. Pred uporabo smo agar v epruvetah ponovno raztopili z avtoklaviranjem 10 min na 100°C.

3.2.2.3 Tekoče gojišče TSB (Tryptone Soya Broth) – za določanje krivulje odmiranja

Sestavine:

- 15 g Tryptone soya Broth – tripton soja bujon (Oxoid, CM0129)

Priprava:

15 g medija TSB smo dobro raztopili v 500 ml destilirane vode ter z dispenzorjem razdelili v epruvete po 9 ml. Gojišče smo nato sterilizirali 15 min na 121°C.

3.2.3 Raztopine in dodatki

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo raztopine KH_2PO_4 :

- 3,4 g KH_2PO_4 (Kemika, 11161, Hrvaška)
- 1100 ml destilirane vode

Priprava:

3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 ml destilirane vode in umerili pH na 7,2 ter tako dobili osnovno raztopino. 1,25 ml te osnovne raztopine smo odpipetirali v 1000 ml destilirane vode, dobro premešali ter z dispenzorjem razdelili v epruvete po 9 ml. Epruvete smo sterilizirali 15 min na 121°C.

3.2.4 Snovi s protimikrobnim delovanjem

3.2.4.1 Ekstrakti rožmarina

- Ekstrakt rožmarina Ros.ra – rožmarinska kislina
- Ekstrakt rožmarina Ros.cond – VIVOX 40
- Mešanica VIVOX 40 in AquaROX 40
- Mešanica VIVOX 40 in ekstrakt grozdnih pečk
- Mešanica VIVOX 40 in ekstrakt citrusov
- Mešanica VIVOX 40 in ekstrakt olivnih listov
- Mešanica VIVOX 40 in ekstrakt hmelja
- Ekstrakta rožmarina AquaROX 15 in AquaROX 40
- absolutni etanol (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)
- destilirana voda

Vsi ekstrakti oziroma mešanice, ki smo jih uporabili, so bili pridobljeni v sodelovanju s podjetjem Vitiva, Markovci.

3.2.4.2 Priprava ekstraktov

- ekstrakti
- absolutni etanol
- destilirana voda

Priprava:

Najprej smo si pripravili 16% osnovno raztopino posameznega ekstrakta: v plastično epruveto smo zatehtali 0,160 g ustreznega ekstrakta, dodali 1 ml ustreznega topila ter na vrtničnem mešalu mešali dokler se ni ekstrakt popolnoma raztopil. Šele potem smo iz osnovnih raztopin pripravili ustrezne serijske razredčitve.

3.2.5 Druge kemikalije in dodatki

- absolutni etanol
- raztopina oksitettraciklina – OTC (Krka, 743054, Slovenija)
- diski premera 6 mm (BD, 231039, Francija)

3.2.6 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu:

- Zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra PIO, Slovenija)
- Avtoklav (Tip 250, Sutjeska, Beograd)
- Tehnica (Sartorius analytic, Nemčija)
- Digitalna tehnica (PB1502-S, Mettler Toledo, Švica)
- Inkubator (Kambič SP190, Slovenija)
- Mikrovalovna pečica (Sanyo, Japonska)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Vrtinčnik (Yellowline, IKA)
- Stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehnica, Slovenija)
- Plinski gorilnik
- Optični čitalec (ScanPrisa 1240 UT, Acer, Tajvan)

Poleg navedenih aparatov smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: cepilne zanke, avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija), nastavke za pipete (Eppendorf, Nemčija; Plastibrand, Nemčija), mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija), petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice (Duran), merilne valje (Plastibrand, Nemčija), plastične lončke (Labortechnika Golias, Slovenija), dispensor (Eppendorf easypet, Nemčija), parafilm »M« (PM 992, American National Can) in programsko opremo Microsoft Office in Corel Draw (verzija 12).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Izolate bakterij smo pred pričetkom eksperimenta hranili v hladilniku na selektivnih gojiščih, in sicer: bakterije rodu *Bacillus* na agarju BCA ter bakterije rodu *Staphylococcus* na agarju TSA. S cepilno zanko smo ob ognju posamezne izolate prenesli na trdno gojišče TSA. Tako pripravljene petrijeve plošče smo inkubirali 24 ur na temperaturi 37 °C (za bakterije rodu *Bacillus*) ter 48 ur na temperaturi 37 °C (za bakterije rodu *Staphylococcus*).

3.3.2 Priprava inokuluma

Po 24- oziroma 48- urni inkubaciji smo najprej preverili rast značilnih kolonij na selektivnih gojiščih. Posamezne čiste kulture smo potem pred eksperimentom namnožili v BHI bujonu in sicer tako, da smo posamezno značilno kolonijo iz agar plošče prenesli v BHI bujon, dobro premešali na vrtničnem mešalu ter inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C med stresanjem pri 100 obratih/minuto. Predvidevali smo, da so se bakterije namnožile do koncentracije 10⁷ cfu/ml.

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Za določanje števila bakterij smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Število za delitev sposobnih celic smo določili kot cfu/ml vzorca, na gojišču TSA.

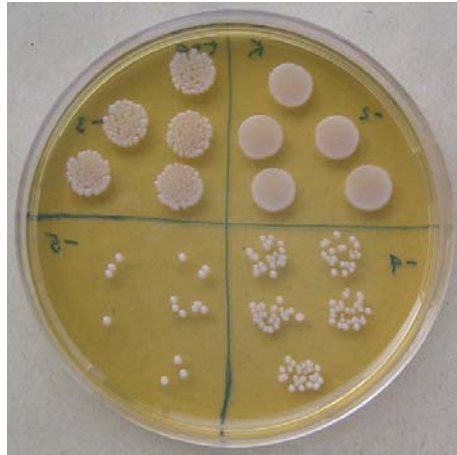
Razredčevanje po Koch-u:

Po 24-urni inkubaciji smo iz bujona BHI aseptično odpipetirali 1 ml inokuluma v 9 ml fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalniku. Postopek razredčevanja vzorca smo ponavljali do koncentracije ~10² in ~10¹ cfu/ml vzorca. Po 0,1 ml tako razredčenega vzorca smo odpipetirali na agar TSA in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Petrijeve plošče smo inkubirali na 37 °C, 24 ur za bacile oziroma 48 ur za stafilokoke. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo bakterij (N). Pri izračunu smo upoštevali samo tiste petrijevke, kjer je zraslo od 15 – 300 kolonij in za te uporabili enačbo 3-1:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)} \quad \dots(3-1)$$

Legenda: $\sum C$: seštevek vseh kolonij na vseh števnihih ploščah; n_1 : število petrijevk pri prvi razredčitvi; n_2 : število petrijevk pri drugi razredčitvi; R: faktor razredčitve pri prvi upoštevanji razredčitvi; N: koncentracija bakterij (cfu/ml)

Uporabili smo tudi drugačen način nacepljanja plošč in štetja kolonij na trdnem gojišču (slika 3-2). To metodo smo uporabljali pri krivuljah odmiranja, kjer smo uporabili veliko število plošč za štetje kolonij in na ta način prihranili veliko materiala.



Slika 3-2: Kolonije bakterij *Staphylococcus aureus* na gojišču TSA

Slika 3-2 prikazuje izvedbo štetja kolonij na gojišču TSA. Predhodno smo pripravili petrijeve plošče z gojiščem TSA. Na spodnjo stran smo si označili razdelke, ki predstavljajo mesta posameznih razredčitev. Namesto 0,1 ml ustrezno razredčenega vzorca smo odpipetirali po 10 μ l posamezne razredčitve vzorca. V vsak razdelek smo odpipetirali po 5 kapljic volumna 10 μ l za vsako razredčitev. Teh 5 kapljic je predstavljalo 5 paralelk. Počakali smo, da se je tekočina vpila v gojišče in nato inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C.

Pri bakterijah *Bacillus cereus* smo nato zaradi hitre rasti skrajšali čas inkubacije (18h – 20h) oziroma smo po določenem času inkubacije petrijeve plošče pustili na sobni temperaturi in tako upočasnili rast kolonij ter si s tem olajšali štetje.

3.3.4 Metoda difuzije v gojišču TSA

3.3.4.1 Uporabljen material

- Gojišče TSA
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Oksitetraciklin
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije ekstraktov
- Čista kultura bakterij
- Fiziološka raztopina
- Papirnati diski

3.3.4.2 Izvedba metode

Z metodo difuzije v gojišču TSA smo določali protimikrobno aktivnost ekstraktov rožmarina ter mešanic ekstraktov na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*.

Predhodno smo razredčili kulturo: en ml kulture, namnožene v bujonu BHI, smo odpipetirali v 9 ml sterilne fiziološke raztopine. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalniku. Po en ml tako razredčene kulture smo aseptično odpipetirali v prazne sterilne petrijevke in prelili s TSA agarjem ter previdno premešali. Ko se je agar strdil, smo na gojišče aseptično položili po 4 papirnate diske. Na tako pripravljene diske smo odpipetirali po 10 µl ustreznih razredčitev ekstraktov rožmarina. Na eni petrijevi plošči smo si pripravili diske za kontrole na katere smo odpipetirali po 10 µl antibiotika oksitetraciklina (ta je predstavljal pozitivno kontrolo), sterilne destilirane vode (negativna kontrola) ter absolutnega etanola, s čimer smo preverili učinek topila. Tako pripravljene petrijeve plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C ter po končani inkubaciji odčitali rezultate. Z računalniškim programom Corel Draw smo izmerili polmere inhibicijskih con in tako določili minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov. Vrednost MIC je bila najnižja koncentracija protimikrobnega sredstva, ki je bila nanešena na disk in je povzročila nastanek inhibicijske cone.

Rezultate protimikrobnega delovanja ekstraktov, pridobljene z metodo difuzije v agarškem gojišču, smo pripravili in uredili v računalniškem programu Microsoft Office Excel 2003.

Vse analize smo izvedli v dveh ponovitvah (paralelkah) in rezultate podali kot povprečno vrednost (\bar{X}), ki smo jo izračunali s pomočjo enačbe 3-2:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(3-2)$$

Legenda: n: število vzorcev; X_i : vrednost i-te meritve

3.3.5 Metoda dilucije v gojišču TSA

3.3.5.1 Uporabljen material

- Gojišče TSA
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije ekstraktov
- Čista kultura bakterij

3.3.5.2 Izvedba metode

V prvem delu eksperimenta smo ugotovili, da imajo ekstrakti različen protimikroben učinek na izbrane seve bakterij. Zato smo z metodo dilucije v gojišču TSA želeli potrditi minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*, ki smo jih dobili z metodo agar difuzije v gojišču TSA.

Pri metodi dilucije v agarju smo uporabili koncentracijo celic v inokulumu $\sim 10^4$ cfu/ml, zato smo predhodno pripravili razredčitve kulture v fiziološki raztopini po Koch-u do razredčitve $\sim 10^5$ cfu/ml.

Nato smo si pripravili 16% osnovne raztopine ekstraktov ter ustrezne serije razredčitev ekstraktov v ustreznem topilu.

Predhodno smo raztopili gojišče TSA v epruveh in ga ohladili na 45°C. Potem smo dodali ustrezno količino ekstrakta in vse skupaj dobro premešali. Mešanico smo nato razlili v male petrijeve plošče s premerom 35 mm. Ko se je gojišče ponovno strdilo, smo s cepilno zanko na površino nanесли razredčeno kulturo. Pozitivno kontrolo smo pripravili tako, damo smo uporabili samo gojišče TSA na katerega smo nanесли kulturo. Petrijeve plošče smo inkubirali pri temperaturi 37 °C, in sicer 24 ur za bacile in 48 ur za stafilokoke. Po končani inkubaciji smo odčitali rezultate. Minimalna inhibitorna koncentracija je bila najnižja koncentracija, pri kateri ni bilo vidne rasti na površini gojišča.

3.3.6 Krivulja odmiranja

3.3.6.1 Uporabljen material

- Gojišče TSB
- Gojišče TSA
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Različne koncentracije ekstraktov
- Čista kultura bakterij

3.3.6.2 Izvedba metode

S krivuljo odmiranja smo preverjali kinetiko protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina ter mešanic ekstraktov na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*.

Predhodno smo si pripravili dve koncentraciji ekstrakta – minimalni inhibitorni koncentraciji, dobljeni z metodo difuzije in metodo dilucije v gojišču TSA. V predhodno pripravljene epruvete z gojiščem TSB smo dodali ustrezno količino ekstrakta in kulturo bakterij. Končna koncentracija kulture v gojišču TSB z dodatkom ekstrakta je bila $\sim 10^5$ cfu/ml. Epruvete smo inkubirali 24-48 ur pri temperaturi 37 °C med stresanjem pri 150 obratih/minuto.

Vzorčili smo ob časih 0, 3, 6, 9, 24 in 48 ur. Iz vsake epruvete smo odvzeli določeno količino vzorca in ustrezno razredčili. Po 0,1 ml ustrezne razredčitve vzorca smo nacepili na agar TSA in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Petrijeve plošče smo inkubirali na temperaturi 37 °C, 24 ur. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali povprečno koncentracijo preživelih bakterij (cfu/ml).

3.3.7 Vpliv ekstrakta in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu *Bacillus*

3.3.7.1 Uporabljen material

- Gojišče TSA
- Gojišče TSB
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Različne koncentracije ekstraktov
- Čista kultura bakterij

3.3.7.2 Izvedba metode

Preverili smo, kako različne koncentracije ekstraktov skupaj s segrevanjem pri različnih temperaturah vplivajo na nastanek spor pri bakterijah rodu *Bacillus*.

Predhodno smo si iz 16% osnovne raztopine pripravili serije razredčitev ekstraktov v absolutnem etanolu. V predhodno pripravljene epruvete z gojiščem TSB smo dodali ustrezno količino ekstrakta in kulturo bakterij. Končna koncentracija kulture v gojišču TSB z dodatkom ekstrakta je bila $\sim 10^6$ cfu/ml. Epruvete smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C med neprestanim stresanjem na stresalniku.

Po inkubaciji smo iz vsake epruvete odpipetirali v sterilne epruvete enake količine vzorcev ter segrevali pri različnih temperaturah. Segrevali smo v vodni kopeli 5 minut, pri temperaturi 80 °C, 90 °C in 100 °C. Po 0,1 ml vsakega vzorca smo odpipetirali na agar TSA in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Petrijeve plošče smo inkubirali na temperaturi 37 °C, 24 ur. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali povprečno koncentracijo preživelih spor.

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

4 REZULTATI

V eksperimentalnem delu smo poskušali dokazati, da različne mešanice rastlinskih ekstraktov inhibitorno vplivajo na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Da bi ugotovili, katere koncentracije inhibirajo rast, smo uporabili metodo difuzije v gojišču TSA ter metodo dilucije v gojišču TSA.

4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU TSA

Z metodo difuzije v gojišču TSA smo v prvem delu eksperimenta določali protimikrobno učinkovitost sedmih ekstraktov na 3 seve bakterij rodu *Bacillus* in 3 seve bakterij rodu *Staphylococcus*. Uporabili smo mešanice ekstraktov, katerih osnova je bil ekstrakt rožmarina VIVOX 40. Za primerjavo smo ugotavljali tudi protimikrobni učinek samega pripravka VIVOX 40 ter rožmarinske kisline. Za vsak sev smo uporabili 10 koncentracij posameznega ekstrakta, in sicer v razponu koncentracij od 0,0156% – 8%.

4.1.1 Inhibicija rasti bakterij rodu *Bacillus*

Preglednica 4-1: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *B. cereus* ŽMJ91 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						Rožmarinska kislina
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	
800,00	+	+	+	+	+	+	-
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	+	+	+	+	+	-
12,50	+	+	+	+	+	+	-
6,25	+	-	-	-	-	+	-
3,13	-	-	-	-	-	+	-
1,56	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 4-2: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *B. mycooides* ŽMJ93 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	Rožmarinska kislina
800,00	+	+	+	+	+	+	-
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	+	+	+	+	+	-
12,50	+	-	-	+	+	+	-
6,25	-	-	-	-	-	+	-
3,13	-	-	-	-	-	+	-
1,56	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 4-3: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *B. cereus* ŽMJ164 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	Rožmarinska kislina
800,00	+	+	+	+	+	+	+
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	+	+	+	+	+	-
12,50	+	+	+	+	+	+	-
6,25	+	+	+	+	+	+	-
3,13	+	-	-	-	-	+	-
1,56	-	-	-	-	-	+	-

V preglednicah 4-1, 4-2 in 4-3 smo predstavili rezultate, dobljene pri metodi difuzije za uporabljene seve in mešanice rastlinskih ekstraktov. Preglednice predstavljajo prisotnost con inhibicije, kjer znak + pomeni prisotnost cone inhibicije rasti, znak – pa odsotnost cone

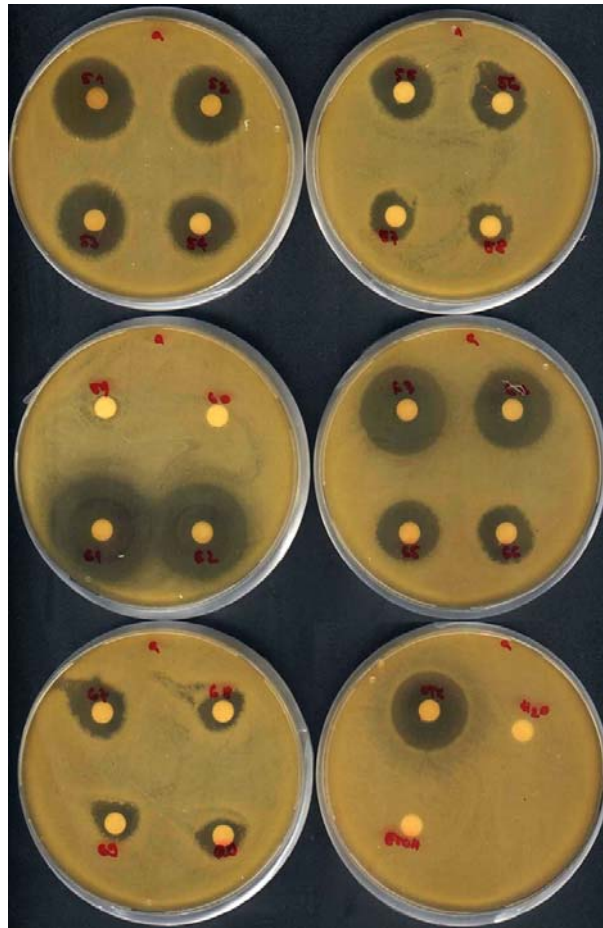
inhibicije. Tako je minimalna inhibitorna koncentracija tista prva vrednost, pri kateri je cona prisotna.

Preglednica 4-4: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Bacillus*, določene z metodo difuzije v gojišču TSA

Ekstrakt	MIC (μg ekstrakta/disk)		
	<i>B. cereus</i> ŽMJ91	<i>B. mycooides</i> ŽMJ93	<i>B. cereus</i> ŽMJ164
VivOX 40	6,25	12,50	3,13
VivOX 40 + AquaROX 40	12,50	25,00	6,25
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	12,50	25,00	6,25
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	12,50	12,50	6,25
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	12,50	12,50	6,25
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	3,13	3,13	1,56
Rožmarinska kislina - topilo EtOH	800	800	800

Za lažje razumevanje in boljši pregled med posameznimi vrednostmi MIC smo podatke zbrali v posebni preglednici. Iz preglednice 4-4 je razvidno, da imajo mešanice ekstraktov slabši oziroma enak protimikrobni učinek, kot pa sam VivOX 40, razen v primeru mešanice VivOX 40 + ekstrakt hmelja, kjer se je pokazala boljša učinkovitost pri vseh treh testnih sevih. V tem primeru gre verjetno za sinergizem oziroma izredno dobro delovanje ekstrakta hmelja. V ostalih mešanicah pa sinergizma ni opaziti in je protimikrobna učinkovitost vpliv delovanja VivOX 40.

Ekstrakt VivOX 40 vsebuje karnozolno kislino, in sicer 40,69%, ne vsebuje pa rožmarinske kisline. Rožmarinska kislina sama je pokazala slabo protimikrobno delovanje.



Slika 4-1: Cone inhibicije rasti pri sevu *Bacillus cereus* ŽMJ164

Na sliki 4-1 je primer cone inhibicije rasti pri sevu *B. cereus* ŽMJ164 za mešanici ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov ter ekstrakt Vivox 40 + ekstrakt hmelja. Številke si sledijo od 51 – 60 za mešanico ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov ter od 61 – 70 za mešanico VivOX 40 + ekstrakt hmelja, in sicer številka 51 predstavlja najvišjo koncentracijo dodanega ekstrakta, številka 60 pa najnižjo koncentracijo dodanega ekstrakta. Enako velja za drugo mešanico ekstrakta. Petrijeva plošča na sliki 4-1 desno spodaj pa predstavlja cone inhibicije kontrolnih spojin. Uporabili smo antibiotik oksitetraciklin, destilirano vodo ter absolutni etanol.

Pri conah inhibicije za mešanico ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja opazimo, da je tudi pri najnižji koncentraciji dodanega ekstrakta opazna cona inhibicije rasti. Vendar smo vseeno določili to koncentracijo za minimalno inhibitorno, saj je cona precej majhna. Poleg tega pa smo koncentracijo preverili z metodo dilucije v gojišču TSA in so nam koncentracije, dobljene pri tej metodi, služile za orientacijo pri nadaljnjih raziskavah in poskusih. S slike 4-1 je razvidno, da so cone inhibicije rasti mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja precej večje kot cone inhibicije rasti mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov pri isti koncentraciji dodanega ekstrakta. Iz teh razlik smo sklepali na boljše in močnejše delovanje mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Tudi v

primerjavi s cono inhibicije rasti za izbrani antibiotik smo opazili, da ima najvišja koncentracija te mešanice precej večjo cono inhibicije.

4.1.2 Inhibicija rasti bakterij rodu *Staphylococcus*

Preglednica 4-5: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *S. aureus* ŽMJ175 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						Rožmarinska kislina
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	
800,00	+	+	+	+	+	+	-
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	-	+	-	+	+	-
12,50	+	-	+	-	-	+	-
6,25	-	-	-	-	-	-	-
3,13	-	-	-	-	-	-	-
1,56	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 4-6: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *S. aureus* ŽMJ72 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						Rožmarinska kislina
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	
800,00	+	+	+	+	+	+	-
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	+	+	+	+	+	-
12,50	+	-	-	+	-	+	-
6,25	+	-	-	-	-	+	-
3,13	-	-	-	-	-	-	-
1,56	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 4-7: Prisotnost con inhibicije rasti bakterij *S. xyloso* DD-34 po dodatku različnih ekstraktov

µg ekstrakta/ disk	prisotnost inhibicijske cone						Rožmarinska kislina
	VivOX 40	VivOX 40 +AquaROX 40	VivOX 40 + ekstrakt grozdja	VivOX 40 + ekstrakt citrusov	VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	VivOX 40 + ekstrakt hmelja	
800,00	+	+	+	+	+	+	-
400,00	+	+	+	+	+	+	-
200,00	+	+	+	+	+	+	-
100,00	+	+	+	+	+	+	-
50,00	+	+	+	+	+	+	-
25,00	+	+	+	+	+	+	-
12,50	+	+	+	+	+	+	-
6,25	+	+	+	+	-	+	-
3,13	+	-	-	-	-	+	-
1,56	+	-	-	-	-	+	-

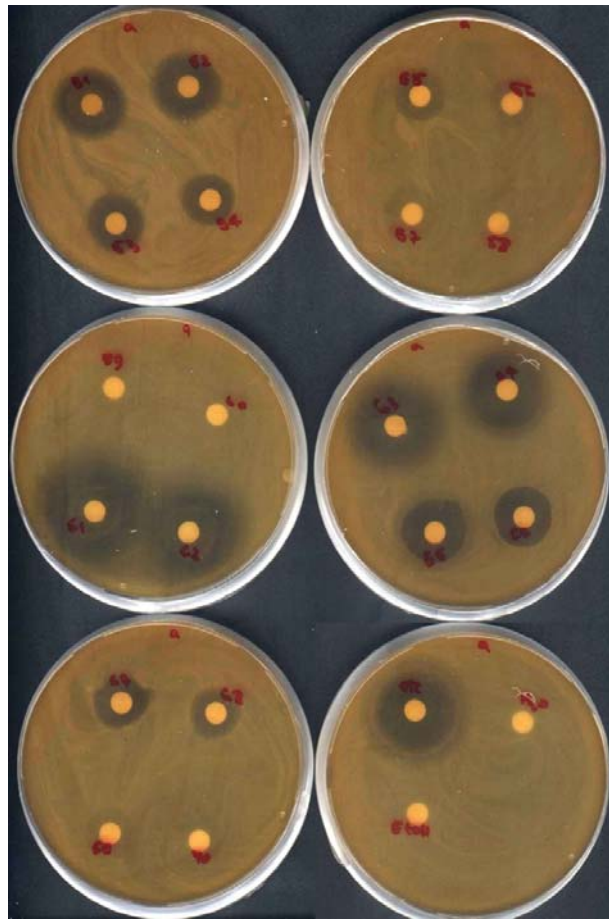
Preglednice 4-5, 4-6 in 4-7 prikazujejo prisotnost con inhibicije rasti za različne seve in ekstrakte. Tudi pri teh preglednicah znak + pomeni, da je bila cona inhibicije rasti prisotna, znak – pa pomeni, da cone inhibicije ni bilo opaziti.

Preglednica 4-8: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Staphylococcus* določene z metodo difuzije v gojišču TSA

Ekstrakt	MIC (µg ekstrakta/disk)		
	<i>S. aureus</i> ŽMJ175	<i>S. aureus</i> ŽMJ72	<i>S. xyloso</i> DD-34
VivOX 40	12,50	6,25	1,56
VivOX 40 + AquaROX 40	50,00	25,00	6,25
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	12,50	25,00	6,25
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	50,00	12,50	6,25
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	25,00	25,00	12,50
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	12,50	6,25	1,56

Mešanice ekstraktov pa so na bakterije rodu *Staphylococcus* vplivale drugače kot na bakterije rodu *Bacillus*, kot je razvidno iz preglednice 4-8. Tudi odčitavanje inhibitornih con je bilo težje. Pri najvišjih koncentracijah so bile cone čiste, potem pa se je pri nižjih koncentracijah ekstraktov pojavil motni zunanji rob. Vseeno smo izmerili celo cono, tudi tiste z zunanjim motnim robom. Pri bakterijah rodu *Staphylococcus* je bil najbolj uspešen ekstrakt VivOX 40, mešanica VivOX 40 + hmelj pa ni pokazala bistveno boljše aktivnosti.

Že v preglednicah 4-5, 4-6 in 4-7 so opazne razlike med vrednostmi MIC za mešanice v primerjavi z ekstraktom VivOX 40. Poleg tega pa je v preglednici 4-8 razvidno tudi, da so se pojavile razlike v vrednostih MIC med posameznimi sevi. Najbolj enotno delovanje med mešanicami je opaziti pri *S. xylosum*, ta pa je edini nepatogeni sev, ki smo ga izbrali in testirali. Izoliran je bil iz komercialne starter kulture za mesno industrijo. Med izbranimi sevi se je izkazal kot najbolj občutljiv.



Slika 4-2: Cone inhibicije rast pri sevu *Staphylococcus aureus* ŽMJ 72

Slika 4-2 prikazuje primere con inhibicije rasti pri sevu *Staphylococcus aureus* ŽMJ72 za mešanici ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov ter ekstrakt Vivox 40 + ekstrakt hmelja. Prav tako kot pri sliki 4-1 si tu po številkah sledijo zaporedne razredčitve posamezne mešanice. Zopet številka 51 predstavlja najvišjo koncentracijo dodanega ekstrakta, številka 60 pa najnižjo koncentracijo dodanega ekstrakta za mešanico ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov. Številke 61 – 70 pa predstavljajo zaporedne koncentracije mešanice ekstrakt Vivox 40 + ekstrakt hmelja. Na sliki 4-2 je tudi petrijeva plošča s conami inhibicije rasti za kontrolne spojine. Zopet smo uporabili antibiotik oksitetraciklin, destilirano vodo ter absolutni etanol.

Pri primerjavi velikosti con inhibicije rasti pri istih koncentracijah dodanega ekstrakta zopet opazimo večje cone pri mešanici Vivox 40 + ekstrakt hmelja. Tudi v primerjavi z antibiotikom so cone inhibicije rasti pri najvišjih koncentracijah te mešanice večje.

Opazimo lahko tudi moten zunanji rob, tako pri coni inhibicije rasti antibiotika, kot tudi pri nekaterih koncentracij obeh mešanic ekstraktov. Razvidno je tudi, da so cone inhibicije rasti pri nižjih koncentracijah obeh mešanic rahlo motne, vendar so večinoma še vseeno dobro vidne in smo jih tudi upoštevali pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije. Možen razlog za ta pojav je šibkejši vpliv izbranih ekstraktov na bakterije rodu *Staphylococcus*. Minimalne inhibitorne koncentracije so bile namreč višje kot tiste, ki smo jih določili za bakterije rodu *Bacillus*.

4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV DOLOČEN Z METODO DILUCIJE V GOJIŠČU TSA

Z metodo dilucije v gojišču TSA smo želeli potrditi rezultate prvega dela eksperimenta. Metoda je glede interpretacije rezultatov lažja. Opazovali smo rast na gojišču pri posameznih koncentracijah dodanega ekstrakta v gojišču TSA.

Preglednica 4-9: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Bacillus*, določene z metodo dilucije v gojišču TSA

Ekstrakt	MIC (µg ekstrakta/ml gojišča)		
	<i>B. cereus</i> ŽMJ91	<i>B. mycooides</i> ŽMJ93	<i>B. cereus</i> ŽMJ164
VivOX 40	156,25	156,25	78,13
VivOX 40 + AquaROX 40	156,25	156,25	156,25
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	156,25	156,25	156,25
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	156,25	156,25	156,25
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	156,25	156,25	156,25
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	19,53	19,53	19,53
Rožmarinska kislina - topilo d H ₂ O	10000	10000	10000
Rožmarinska kislina - topilo EtOH	5000	5000	5000
AquaROX 40	1250	1250	1250
AquaROX 15	5000	5000	5000

Med rezultati, dobljenimi s to metodo, nismo opazili toliko nihanj, kar je razvidno iz preglednice 4-9. Za najbolj učinkovito se je zopet izkazala mešanica VivOX 40 + ekstrakt hmelja, in s tem tudi potrdila predvidevanja iz prvega dela eksperimenta.

S to metodo smo testirali tudi rožmarinsko kislino, raztopljeno v dveh različnih topilih ter dva komercialno pripravljena ekstrakta AquaROX 40 in AquaROX 15, ki vsebujeta rožmarinsko kislino. AquaROX je tudi del prve mešanice ekstrakta in je zanimiv za primerjavo. Iz preglednice 4-9 je razvidno, da gre protimikrobni učinek pripisati ekstraktu

VivOX 40, ki vsebuje karnozolno kislino. Rožmarinska kislina sama ali pa kot učinkovina v komercialno pripravljenih ekstraktih nima protimikrobnega delovanja.

Določene ekstrakte smo testirali samo s to metodo iz preprostega razloga, ker je ta metoda bolj občutljiva in smo rezultate lažje interpretirali.

Preglednica 4-10: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Staphylococcus*, določene z metodo dilucije v gojišču TSA

Ekstrakt	MIC (μg ekstrakta/ml gojišča)		
	<i>S. aureus</i> ŽMJ175	<i>S. aureus</i> ŽMJ72	<i>S. xylosus</i> DD-34
VivOX 40	156,25	156,25	156,25
VivOX 40 + AquaROX 40	312,5	312,5	312,5
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	312,5	312,5	312,5
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	312,5	625	312,5
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	312,5	312,5	312,5
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	19,53	19,53	39,06
Rožmarinska kislina - topilo d H ₂ O	10000	10000	10000
Rožmarinska kislina - topilo EtOH	10000	10000	10000
AquaROX 40	5000	5000	5000
AquaROX 15	10000	10000	20000

Tudi pri bakterijah rodu *Staphylococcus* so rezultati dokaj skladni, kar je razvidno iz preglednice 4-10. Najbolj učinkovita je mešanica VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Rožmarinska kislina in oba ekstrakta, ki vsebujeta rožmarinsko (AquaROX 40 in AquaROX 15) kislino pa so precej neučinkoviti.

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV METODE DIFUZIJE IN DILUCIJE V GOJIŠČU TSA

Za boljši pregled in razumevanje naslednjih preglednic smo zbrali vse uporabljene koncentracije in jih prikazali v preglednici 4-11.

Preglednica 4-11: Pregled uporabljenih koncentracij

µg ekstrakta/disk	µg ekstrakta/ml gojišča	koncentracija (%)
800,00	80000	8
400,00	40000	4
200,00	20000	2
100,00	10000	1
50,00	5000	0,5
25,00	2500	0,25
12,50	1250	0,125
6,25	625	0,063
3,13	313	0,031
1,56	156	0,016
0,78	78,13	0,008
0,39	39,06	0,004
0,20	19,53	0,002

Preglednica 4-12: Primerjava minimalne inhibitorne koncentracije, ugotovljene z metodama difuzije in dilucije v gojišču TSA, za bakterije rodu *Bacillus*

Ekstrakt	<i>B. cereus</i> ŽMJ91		<i>B. mycooides</i> ŽMJ93		<i>B. cereus</i> ŽMJ164	
	difuzija (%)	dilucija (%)	difuzija (%)	dilucija (%)	difuzija (%)	dilucija (%)
VivOX 40	0,063	0,016	0,125	0,016	0,031	0,008
VivOX 40 + AquaROX 40	0,125	0,016	0,250	0,016	0,063	0,016
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	0,125	0,016	0,250	0,016	0,063	0,016
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	0,125	0,016	0,125	0,016	0,063	0,016
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	0,125	0,016	0,125	0,016	0,063	0,016
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	0,031	0,002	0,031	0,002	0,016	0,002
Rožmarinska kislina - topilo d H ₂ O	/	1	/	1	/	1
Rožmarinska kislina - topilo EtOH	8	0,5	8	0,5	8	0,5
AquaROX 40	/	0,125	/	0,125	/	0,125
AquaROX 15	/	0,5	/	0,5	/	0,5

Preglednica 4-13: Primerjava minimalne inhibitorne koncentracije, ugotovljene z metodama difuzije in dilucije v gojišču TSA, za bakterije rodu *Staphylococcus*

Ekstrakt	<i>S. aureus</i> ŽMJ175		<i>S. aureus</i> ŽMJ72		<i>S. xyloso</i> DD-34	
	difuzija (%)	dilucija (%)	difuzija (%)	dilucija (%)	difuzija (%)	dilucija (%)
VivOX 40	0,125	0,016	0,063	0,016	0,016	0,016
VivOX 40 + AquaROX 40	0,5	0,031	0,25	0,031	0,063	0,031
VivOX 40 + ekstrakt grozdja	0,125	0,031	0,25	0,031	0,063	0,031
VivOX 40 + ekstrakt citrusov	0,5	0,031	0,125	0,063	0,063	0,031
VivOX 40 + ekstrakt olivnih listov	0,25	0,031	0,25	0,031	0,125	0,031
VivOX 40 + ekstrakt hmelja	0,125	0,002	0,063	0,002	0,016	0,004
Rožmarinska kislina - topilo d H ₂ O	/	1	/	1	/	1
Rožmarinska kislina - topilo EtOH	/	1	/	1	/	1
AquaROX 40	/	0,5	/	0,5	/	0,5
AquaROX 15	/	1	/	1	/	2

V preglednicah 4-12 in 4-13 nekateri podatki niso vnešeni. Razlog za to je, da se je metoda dilucije v gojišču TSA izkazala za boljšo, saj smo dobili nižje vrednosti MIC. Poleg tega je interpretacija rezultatov lažja, zato smo rožmarinsko kislino in ekstrakta AquaROX 40 in AquaROX 15 testirali samo s to metodo. Izbrali smo jih za primerjavo učinkovitosti karnozolne kisline, ki jo vsebujejo VivOX 40 in mešanice ekstraktov proti učinkovitosti rožmarinske kisline, ki je zastopana v ekstraktih AquaROX 40 in AquaROX 15. Ekstrakti, ki vsebujejo karnozolno kislino, so se pokazali kot bolj učinkoviti. Metoda dilucije v gojišču TSA se je izkazala za bolj občutljivo, potrebne so nižje koncentracije ekstraktov za inhibicijo rasti bakterij.

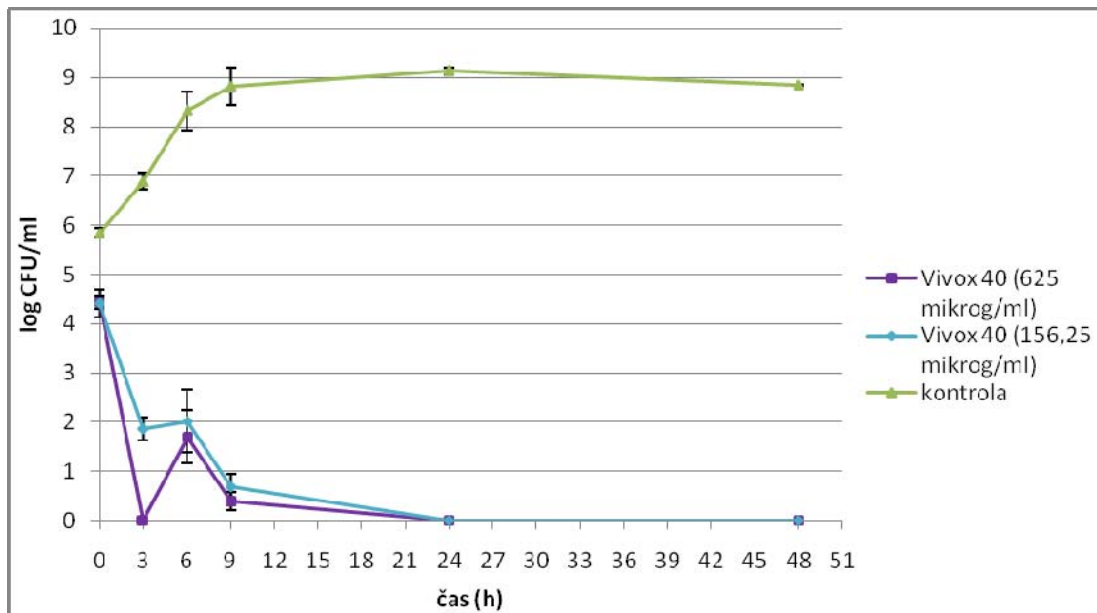
V prvem delu eksperimenta smo testirali tudi rožmarinsko kislino, izbrano topilo je bila destilirana voda. Vendar pa na gojišču ni bilo vidnih con inhibicije rasti niti pri najvišji koncentraciji ekstrakta (to je 80000 µg ekstrakta/ml topila). Tudi to je eden od razlogov, zakaj nekateri podatki v preglednicah 4-11 in 4-12 niso vključeni.

Med ekstrakti, ki vsebujejo rožmarinsko kislino, je največjo aktivnost pokazal AquaROX 40, ki tudi vsebuje največ rožmarinske kisline. Pri bakterijah rodu *Bacillus* pa je opaziti razliko v minimalni inhibitorni koncentraciji rožmarinske kisline glede na uporabljeno topilo.

4.4 KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA NA BAKTERIJE RODU *Staphylococcus*

Preverjali smo kinetiko protimikrobnega delovanja ekstraktov na bakterije rodu *Staphylococcus*. Izbrali smo samo en sev: *S. aureus* ŽMJ72 ter mešanico ekstrakta VivOX 40 + ekstrakt hmelja in ekstrakt VivOX 40.

4.4.1 Krivulja odmiranja bakterij rodu *Staphylococcus* ob dodatku ekstrakta VivOX 40

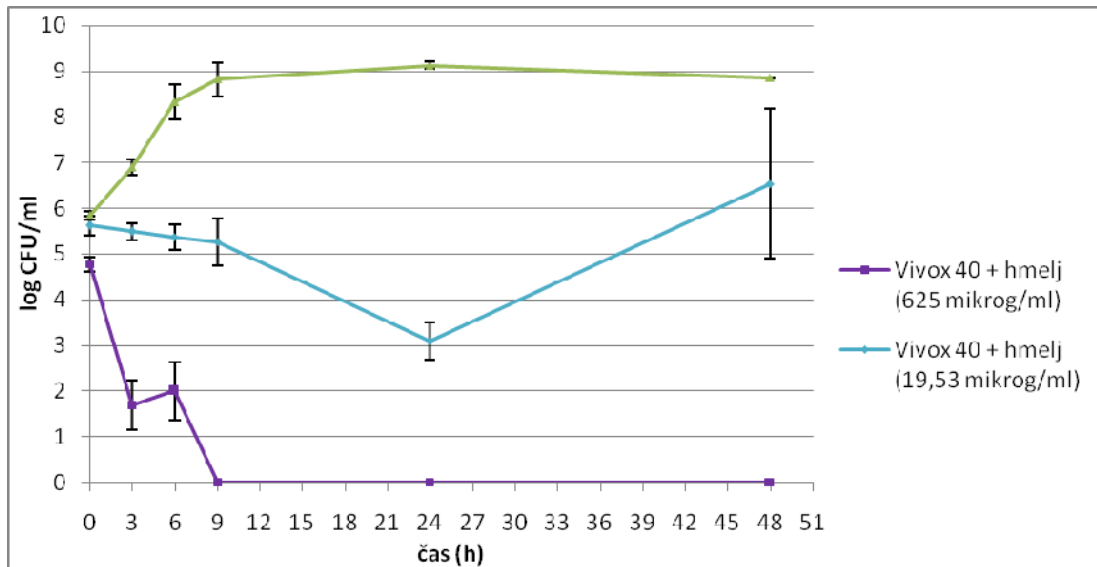


Slika 4-3: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije *S. aureus* ŽMJ72 med 48-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku ekstrakta VivOX 40

Pri ekstraktu VivOX 40 smo izbrali dve minimalni inhibitorni koncentraciji: prvo vrednost (625 µg/ml) smo dobili z metodo difuzije, drugo vrednost (156,25 µg/ml) pa z metodo dilucije.

Obe koncentraciji dodanega ekstrakta sta že takoj po dodatku znižali koncentracijo celic za približno 1,5 log stopnje. Obe koncentraciji pa sta povsem zavrli rast bakterijskih celic po 24 urah, delovali sta celo baktericidno.

4.4.2 Krivulja odmiranja bakterij rodu *Staphylococcus* ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja



Slika 4-4: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije *S. aureus* ŽMJ72 med 48-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja

Tudi pri mešanici ekstrakta VivOX 40 + ekstrakt hmelja smo uporabili dve minimalni inhibitorni koncentraciji: prvo vrednost (625 µg/ml) smo dobili z metodo difuzije, drugo vrednost (19,53 µg/ml) pa z metodo dilucije v gojišču TSA.

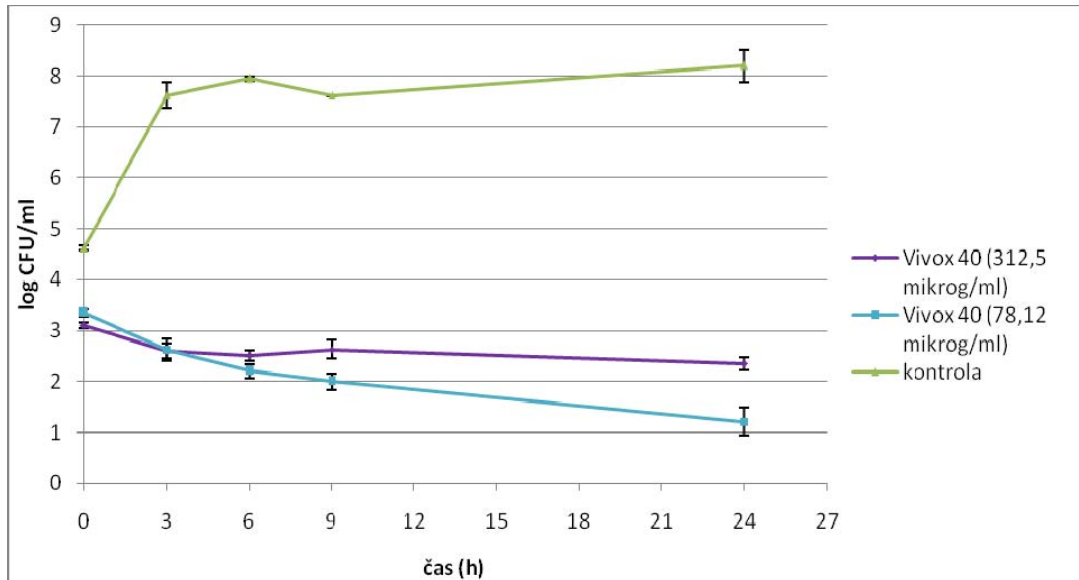
S slike 4-4 je razvidno, da je višja koncentracija dodanega ekstrakta že takoj ob dodatku znižala koncentracijo celic za približno 1 log stopnjo, nižja koncentracija pa na začetku ni imela bistvenega vpliva. Višja vrednost (625 µg/ml), ki smo jo dobili z metodo difuzije, je povsem zavrla rast in že po 9 h delovala baktericidno. Nižja vrednost (19,53 µg/ml) pa kaže na počasnejše odmiranje in je po 48 urah dosegla vrednost v območju med 10^5 - 10^8 CFU/ml, torej ni povsem zavrla rasti bakterij.

Ti rezultati kažejo, da je mešanica s hmeljem zelo primerljiva pri inhibiciji rasti kot enaka koncentracija ekstrakta VivOX 40 (slika 4-3), koncentracija, določena kot MIC z metodo dilucije, pa se je v tekočem gojišču izkazala za nekoliko prenizko za učinkovito inhibicijo rasti bakterij *S. aureus* ŽMJ72.

4.5 KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA NA BAKTERIJE RODU *Bacillus*

Preverjali smo kinetiko protimikrobnega delovanja ekstrakta VivOX 40 in mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja na bakterije rodu *Bacillus*. Vse poskuse smo opravili s sevom *B. cereus* ŽMJ164, saj med sevi pri občutljivejši, dilucijski metodi, ni bilo razlik v vrednostih MIC.

4.5.1 Krivulja odmiranja bakterij rodu *Bacillus* ob dodatku ekstrakta VivOX 40

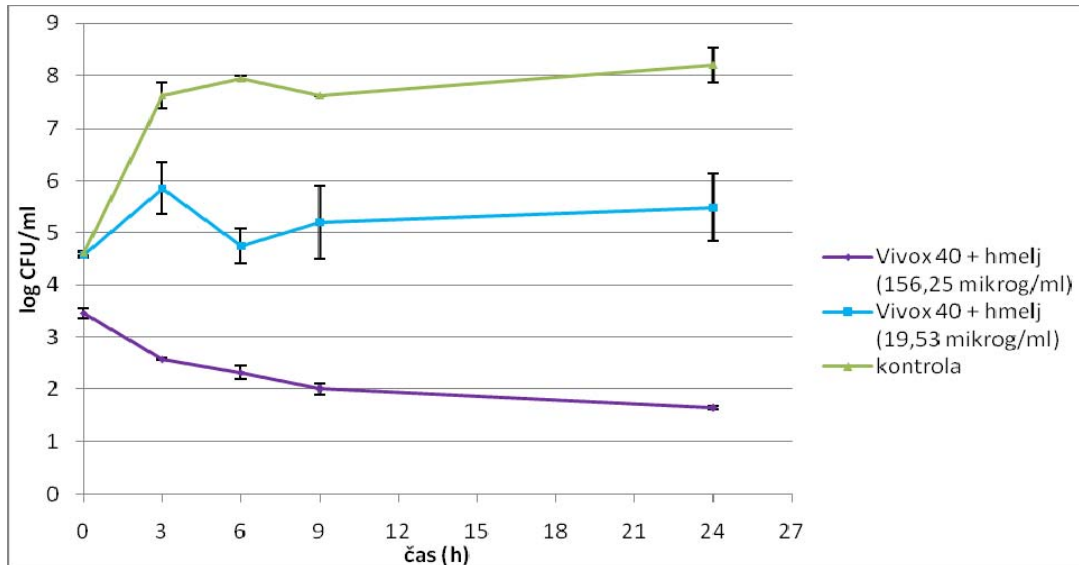


Slika 4-5: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije *B. cereus* ŽMJ164 med 24-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku ekstrakta VivOX 40

Izbrali smo dve minimalni inhibitorni koncentraciji: prvo, višjo vrednost (312,5 µg/ml) smo dobili z metodo difuzije, drugo, nižjo vrednost (78,12 µg/ml) pa z metodo dilucije v gojišču TSA.

Na sliki 4-5 opazimo, da sta obe koncentraciji dodanega ekstrakta takoj po dodatku znižali koncentracijo celic za približno 1 log stopnjo in tudi v nadaljevanju poskusa preprečili razmnoževanje bacilov. Koncentracija je po 24 urah ostala v območju $10 \cdot 10^3$ CFU/ml. To je v skladu s pričakovanji, saj je bakterija *B. cereus* ŽMJ164 sporogena bakterija. Spore bakterij preživijo v okolju z ekstraktom.

4.5.2 Krivulja odmiranja bakterij rodu *Bacillus* ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja



Slika 4-6: Kontrolna rastna krivulja in krivulja odmiranja bakterije *B. cereus* ŽMJ164 med 24-urno inkubacijo pri temperaturi 37 °C, v tekočem gojišču TSB ob dodatku mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakta hmelja

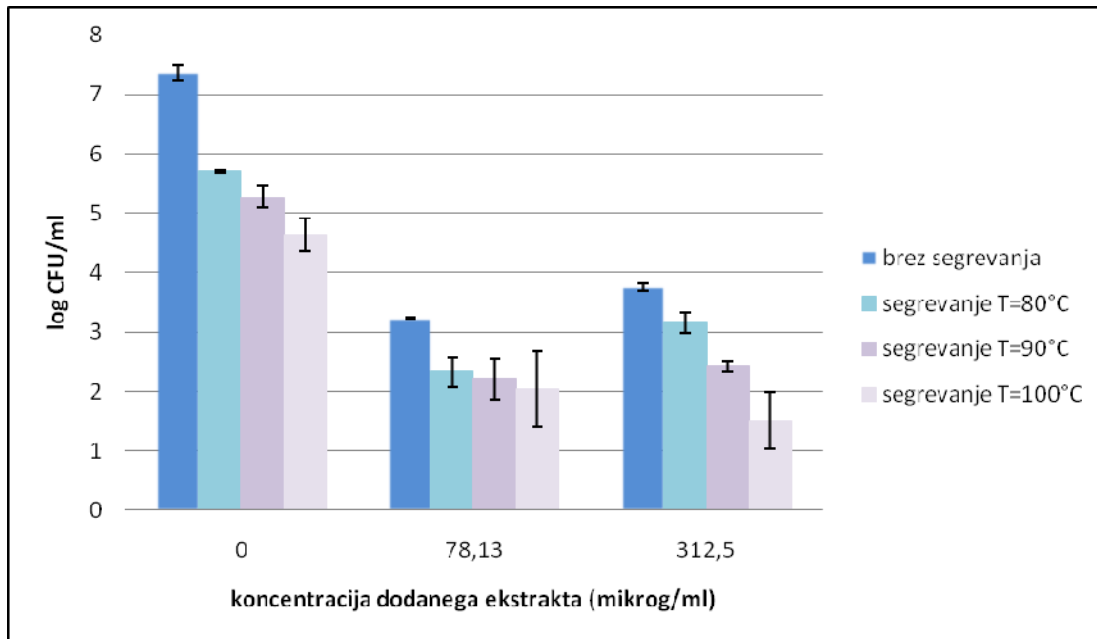
Višja koncentracija ekstrakta (156,25 µg/ml) je znižala koncentracijo celic takoj ob dodatku za približno 1,5 log stopnje, medtem ko nižja vrednost (19,53 µg/ml) ob dodatku ni imela vpliva na koncentracijo celic. Tekom poskusa pa sta obe koncentraciji preprečili razmnoževanje bakterij in znižali koncentracijo celic. Po 24 urah je višja koncentracija ekstrakta znižala koncentracijo celic pod 10^2 CFU/ml, nižja koncentracija pa je zadržala končno koncentracijo celic med 10^5 - 10^6 CFU/ml.

4.6 VPLIV EKSTRAKTA IN SEGREVANJA NA PREŽIVELOST SPOR BAKTERIJ RODU *Bacillus*

Pri preverjanju kinetike protimikrobnega delovanja ekstraktov na bakterije rodu *Bacillus* smo ugotovili, da so uporabljene koncentracije ekstrakta sicer zavrle rast bakterij, vendar jih niso uničile. Zato smo preverili, kakšen je skupni vpliv ekstrakta in toplotne obdelave pri različnih temperaturah na spore bakterij *Bacillus*. Očitno je namreč, da spor s samim protimikrobnim dodatkom ne moremo uničiti, predpostavili pa smo, da se ob dodatku ekstrakta lahko poveča toplotna občuljivost spor.

Izbrali smo sev *B. cereus* ŽMJ164. Zopet smo izbrali mešanico ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja ter sam VivOX 40. Poleg tega, da sta se izkazala za najbolj učinkovita, smo ju uporabili pri preverjanju kinetike protimikrobnega delovanja in je bilo zato smiselno nadaljevati testiranje skupnega vpliva ekstrakta in segrevanja pri teh dveh ekstraktih.

4.6.1 Vpliv ekstrakta VivOX 40 in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu *Bacillus*

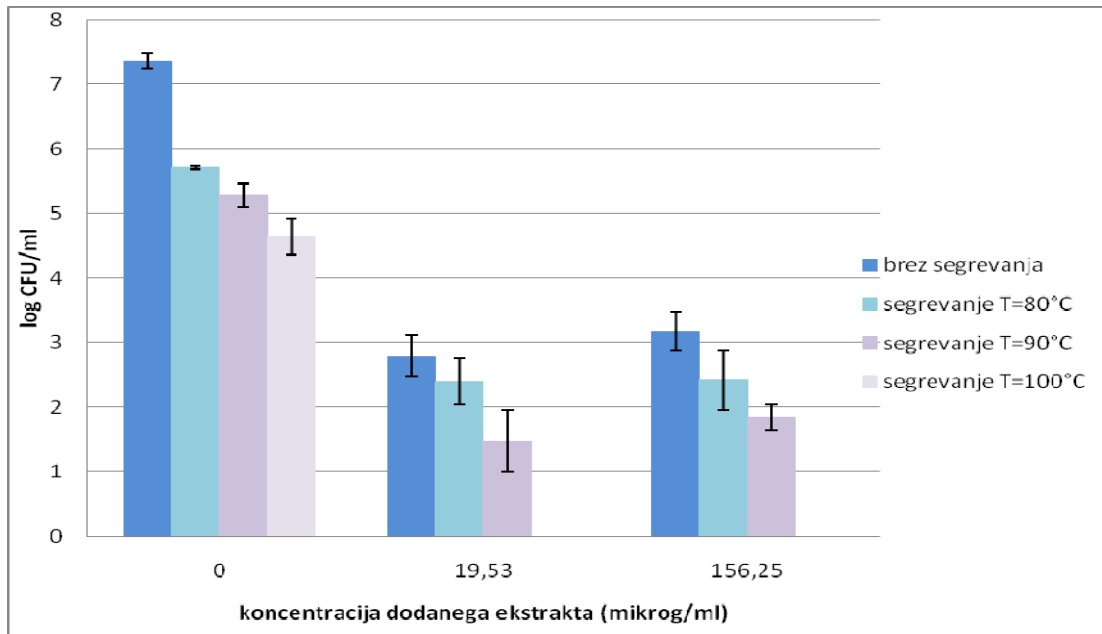


Slika 4-7: Vpliv različnih koncentracij ekstrakta VivOX 40 (24-urna inkubacija pri 37 °C) in 5 minutnega segrevanja pri temperaturah 80 °C, 90 °C in 100 °C na preživelost spor pri bakteriji *B. cereus* ŽMJ164

Slika 4-7 kaže skupni vpliv ekstrakta med 24-urno inkubacijo in 5-min segrevanja pri temperaturah 80 °C, 90 °C in 100 °C na preživelost spor bakterij *B. cereus* ŽMJ164. Prvi stolpec kaže samo vpliv temperature na preživelost spor, začetna koncentracija pa je visoka zaradi rasti med 24-urno inkubacijo. Povsod smo za primerjavo preverili samo delovanje ekstrakta, brez segrevanja. Iz tega je razvidna inhibicija rasti med 24-urno inkubacijo. Najboljše rezultate smo dobili s kombinacijo ekstrakta in segrevanja pri temperaturi 100 C.

Obe uporabljeni koncentraciji ekstrakta sta minimalni inhibitorni koncentraciji, pridobljeni z metodama difuzije v gojišču TSA in dilucije v gojišču TSA. Vendar pa vseeno nobena od koncentracij ekstrakta VivOX 40 v kombinaciji s segrevanjem ni popolnoma uničila spor bakterij *B. cereus* ŽMJ164. Smo pa dokazali, da lahko s skupnim delovanjem ekstrakta in segrevanja znižamo koncentracijo preživelih spor, sposobnih za klitje in rast.

4.6.2 Vpliv mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja in toplotne obdelave na preživelost spor bakterij rodu *Bacillus*



Slika 4-8: Vpliv različnih koncentracij mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja (24-urna inkubacija pri 37 °C) in 5 minutnega segrevanja pri temperaturah 80 °C, 90 °C in 100 °C na preživelost spor pri bakteriji *B. cereus* ŽMJ 164

S slike 4-8 je razvidno, da je skupni vpliv ekstrakta in segrevanja pri temperaturi 100 °C popolnoma uničil spore bakterij *B. cereus* ŽMJ 164 pri obeh koncentracijah dodanega ekstrakta. Torej se je tudi v tem primeru dodatek ekstrakta hmelja izkazal kot učinkovit dodatek, ki poleg inhibicije rasti poveča tudi občutljivost bakterijskih spor na toplotno obdelavo (primerjava s sliko 4-7).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V eksperimentu smo preučevali vpliv ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Izbrali smo komercialno pripravljene ekstrakte in primerjali učinkovitost ekstrakta VivOX 40 ter mešanice le-tega z drugimi ekstrakti. Zanimalo nas je ali imajo mešanice ekstraktov sinergistični učinek.

Glavne učinkovine v ekstraktu rožmarina in drugih rastlinskih ekstraktih so fenolne spojine. Mednje spada tudi karnozolna kislina, glavna učinkovina v ekstraktu rožmarina, ki je odgovorna za njegovo protimikrobno delovanje (Del Campo in sod., 2000). Ekstrakt VivOX 40 je vseboval 40,69% karnozolne kisline, za mešanice pa sestave aktivnih snovi nismo poznali. Tako rezultate težko primerjamo z rezultati drugih avtorjev. Poleg tega se pojavijo razlike v sestavi ekstraktov tudi glede na uporabljen del rastline. Posamezne sestavine niso prisotne v vseh delih rastline, prav tako je koncentracije sestavin odvisna od starosti rastline in drugih okoljskih razmer (rastišča, podnebja ipd.) (Del Bano in sod., 2003).

Uporabili pa smo tudi mešanice ekstrakta rožmarina z drugimi mešanicami. V ekstraktu grozdnih pečk so glavne učinkovine katehin, epikatehin in galna kislina, v ekstraktu citrusov so prisotni različni flavanoni in flavoni, v ekstraktu oljčnih listov sta pomembna olevropein in hidroksitirozol, v ekstraktu hmelja pa predvsem hmeljne smole (Yilmaz in Toledo, 2004; Hatzidimitriou in sod., 2007; Bocco in sod., 1998; Benavente-Garcia in sod., 2000; Larson in sod., 1996)

Eksperiment smo izvedli s tremi *in vitro* metodami za določanje protimikrobnega delovanja ekstraktov na izbrane bakterije: metoda difuzije v agarju in metoda dilucije v agarju in spremljanje krivulj bakterijskega odmiranje v tekočem gojišču med 24-48 urno inkubacijo po dodatku ekstrakta.

5.1.1 Metoda difuzije v gojišču TSA

Metoda difuzije z diski se pogosto uporablja kot presejalna (screening) metoda za preverjanje delovanja protimikrobnih snovi. Uporablja se kot predhoden test protimikrobne aktivnosti, kateremu kasneje sledijo natančnejše študije (Burt, 2004).

Metoda je precej enostavna, vendar smo za izvedbo porabili veliko materiala, tako gojišča, kot tudi samih ekstraktov. Rezultati, ki smo jih dobili s to metodo, so podani v preglednicah 4-4 in 4-8.

Najbolj učinkovita je bila mešanica ekstrakta VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Inhibicijo rasti smo dosegli pri zelo nizkih koncentracijah, vrednost za oba seva *B. cereus* je bila 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH, za sev *B. mycoides* pa še nižja, 156,25 µg ekstrakta/ml EtOH. V primerjavi s samim ekstraktom VivOX 40, se je mešanica izkazala za bolj učinkovito. Nobena od ostalih mešanic ni pokazala boljšega delovanja. Minimalne inhibitorne koncentracije ostalih mešanic so bile enake kot vrednosti za VivOX 40, ali pa celo višje.

Pri bakterijah rodu *Staphylococcus* pa mešanica ekstrakta VivOX 40 + ekstrakt hmelja ni pokazala bistveno boljšega delovanja, vrednosti so bile enake kot pri ekstraktu VivOX 40. Pri bakterijah rodu *Staphylococcus* smo opazili zanimiv pojav. Inhibicijske cone na gojišču so bile pri višjih koncentracijah čiste, pri nižjih pa se je pojavila motnost v obliki motnega zunanjšega roba cone. Vseeno smo cone upoštevali skupaj z motnim robom, torej smo izmerili celo cono.

Pri mešanicah ekstraktov lahko spremljamo tudi morebitni sinergistični učinek posameznih učinkovin. Možni so različni učinki delovanja posameznih učinkovin. O aditivnem učinku govorimo, kadar je skupen učinek enak vsoti učinkov posameznih komponent, o sinergizmu pa, kadar je skupni učinek obeh komponent močnejši kot pa vsota posameznih učinkov. Antagonizem pa pomeni, da je učinek ene ali obeh komponent skupaj manjši, kot pri posameznih komponentah (Burt, 2004). Iz naših rezultatih lahko le sklepamo o teh učinkih, kajti nismo imeli podatkov o vseh komponentah mešanic. Zato lahko govorimo o delovanju mešanice glede na VivOX 40.

Pri primerjavi rezultatov glede na rod preiskovanih bakterij, smo ugotovili, da smo za bakterije rodu *Bacillus* dobili nižje MIC vrednosti, kot za bakterije rodu *Staphylococcus*, kar nakazuje na večjo občutljivost na delovanje ekstraktov.

5.1.2 Metoda dilucije v gojišču TSA

V primerjavi z metodo difuzije, je ta metoda dolgotrajnejša. Za to metodo obstaja več različnih načinov določanja rezultata. Najbolj uporabljena sta merjenje optične gostote in štetje kolonij, kot merilo celic, sposobnih za življenje (Burt, 2004). Prav tako je metoda dilucije standardizirana in zanesljiva tehnika testiranja. Lahko jo uporabimo kot referenco za oceno točnosti preostalih tehnik testiranja (Woods in Washington, 1999).

Rezultati te metode so podani v preglednicah 4-9 in 4-10. Vrednosti za mešanice ekstraktov so enake vrednostim ekstrakta VivOX 40, razen mešanice ekstrakta VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Minimalna inhibitorna koncentracija je znašala 19,53 µg/ml za skoraj vse testirane seve, razen *S. xylosus* (39,06 µg/ml).

Tako kot pri prejšnji metodi, tudi s to metodo nismo dobili protimikrobnega učinka za ekstrakte, ki vsebujejo rožmarinsko kislino. Vrednosti so bile občutno previsoke in potencialna uporaba v živilih ni preveč verjetna. Pri tako visokih koncentracijah sta vonj in barva precej zaznavna.

Rezultati, ki smo jih dobili pri tej metodi, so bolj homogeni in ni velikih odstopanj med posameznimi vrednostmi MIC. To velja predvsem za bakterije rodu *Bacillus* in pri teh rezultatih ne moremo govoriti o antagonističnem učinku ter tudi ne o sinergističnem ali aditivnem učinku. Pri vseh treh sevih bakterij rodu *Staphylococcus* pa imajo večinoma vse mešanice rahlo slabše delovanje. Potrebna bi bila bolj podrobna raziskava vseh komponent mešanic, da bi lahko z gotovostjo trdili o teh medsebojnih učinkih.

5.1.3 Primerjava metode difuzije in dilucije v gojišču TSA

Povedali smo že, da se obe metodi uporabljata za določanje minimalne inhibitorne koncentracije. Pri eksperimentalnem delu pa smo ugotovili, da se rezultati ne ujemajo, kot smo pričakovali. Rezultati so skupaj zbrani v preglednicah 4-11 in 4-12.

Metodo dilucije smo uporabili za potrditev že dobljenih rezultatov. Razlog za to neujemanje rezultatov je lahko v slabši difuziji ekstrakta skozi gojišče pri metodi difuzije. Vsi ekstrakti niso bili dobro topni v absolutnem etanolu. Tudi pri ekstraktih, ki so se dobro raztapljali v etanolu, smo pri večjih koncentracijah opazili usedlino.

5.1.4 Kinetika protimikrobnega delovanja izbranih ekstraktov na bakterijo *S. aureus*

V tem delu eksperimenta smo s krivuljo odmiranja preverjali kinetiko protimikrobnega delovanja ekstrakta na bakterijo *S. aureus*. Izbrali smo minimalni inhibitorni koncentraciji dveh najbolj učinkovitih ekstraktov. Koncentraciji teh dveh ekstraktov smo izbrali glede na rezultate metode difuzije in metode dilucije v gojišču TSA. Izbrali smo minimalne inhibitorne koncentracije, določene z obema metodama. Podatke smo podali v obliki krivulj in rezultati so prikazani na slikah 4-3 in 4-4.

Merili smo koncentracijo celic v neselektivnem bujonu TSB. Bujonu TSB smo dodali prej določeni koncentraciji ekstrakta ter inokulum in med konstantnim mešanjem na stresalniku inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C.

V tem eksperimentu smo dokazali, da je vrednost, dobljena z metodo difuzije, baktericidna, medtem ko pri vrednosti, dobljeni z metodo dilucije, tega za mešanico ekstrakta Vivox 40 in ekstrakt hmelja nismo dokazali.

5.1.5 Kinetika protimikrobnega delovanja izbranih ekstraktov na bakterijo *B. cereus*

Prav tako smo merili koncentracijo celic v neselektivnem bujonu TSB, skupaj z določeno koncentracijo ekstrakta in inokulumom bakterij. Med mešanjem smo zmes inkubirali pri temperaturi 37 °C 24 ur. Rezultat smo podali v obliki krivulj in so prikazani na slikah 4-5 in 4-6.

Izbrane so bile vrednosti dveh najbolj učinkovitih ekstraktov, in sicer minimalna inhibitorna koncentracija, dobljena z metodo difuzije ter z metodo dilucije v gojišču TSA.

Rezultati ne presenečajo, treba je upoštevati, da so bakterije rodu *Bacillus* sporogene in se prilagodijo na delovanje ekstrakta. Zato tudi nikoli ne dosežemo baktericidnega učinka.

Pri določanju kinetike protimikrobnega delovanja ekstrakta Vivox 40 je nižja koncentracija dodanega ekstrakta bolj inhibitorna. To smo pri neodvisnem poskusu ponovno dokazali in odstopanja med obema poskusoma so prikazana na sliki 4-5. Poskus smo ponovili tudi tretjič in zopet dobili enake rezultate.

5.1.6 Vpliv ekstrakta in segrevanja na preživelost spor bakterij rodu *Bacillus*

V nekaterih študijah so dokazali, da nekateri naravni ekstrakti lahko popolnoma zavrejo klitje in rast bakterijskih spor (Juneja in Friedman, 2007). Zato smo tudi mi preverili, kako na preživelost spor bakterij rodu *Bacillus* vpliva dodatek ekstrakta in segrevanje.

Eksperiment smo izvedli tako da smo najprej zmes gojišča, ustrezne koncentracije ekstrakta in inokuluma inkubirali 24 ur na 37 °C. Po končani inkubaciji smo enake količine zmesi segrevali v vodni kopeli pri različnih temperaturah 5 minut.

Rezultati so razvidni na sliki 4-7 za ekstrakt VivOX 40 in na sliki 4-8 za mešanico ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Najbolj učinkovita je bila kombinacija ekstrakta in temperature segrevanja pri 100 °C. Bolj učinkovita je bila zopet mešanica s hmeljem, ki je zmanjšala preživelost spor pri vseh eksperimentih (slika 4-7 in 4-8). Iz obeh slik je razvidno, da z dodatkom ekstrakta lahko zmanjšamo temperaturo segrevanja, a dosežemo enak učinek.

5.2 SKLEPI

Z metodo difuzije in dilucije v agarju smo določili minimalne inhibitorne koncentracije različnih ekstraktov rožmarina in mešanic, kjer so bili rožmarinskemu ekstraktu dodani ekstrakti grozdnih pečk, citrusov, oljčnih listov in hmelja. Izbrali smo dva najbolj učinkovita ekstrakta za spremljanje kinetike protimikrobnega delovanja. Iz rezultatov dela povzemamo naslednje sklepe:

- Metoda difuzije daje običajno višje vrednosti MIC kot metoda dilucije, razlika pa je odvisna od uporabljenega ekstrakta in testiranega mikroorganizma.
- Poleg nižjih vrednosti MIC so tudi razlike med testiranimi ekstrakti manjše pri metodi dilucije.
- Krivulje inhibicije rasti oziroma odmiranja so potrdile majhne razlike med uporabljenimi koncentracijami, dodatno pa pokažejo baktericidno delovanje ekstraktov proti bakterijam rodu *Staphylococcus*, ne pa tudi proti sporogenim bakterijam.
- Čeprav nismo potrdili baktericidnega učinka na sporogene bacile, smo z dodatnimi testi po dodatku ekstrakta VivOX 40 in mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja dokazali povečano občutljivost spor na toplotno obdelavo.
- Ugotovili smo, da vodni ekstrakti rožmarina, ki vsebujejo rožmarinsko kislino, sicer pokažejo protimikrobno delovanje, vendar je v primerjavi z ekstrakti, ki vsebujejo karnozolno kislino, zanemarljiv. Najboljšo protimikrobno aktivnost smo z vsemi uporabljenimi metodami potrdili pri ekstraktu VivOX 40 + ekstrakt hmelja.

6 POVZETEK

Rastline, zelišča in začimbe so pomemben vir različnih spojin, med njimi so predvsem pomembne fenolne spojine. Zaradi dokazanega protimikrobnega delovanja narašča zanimanje za njihovo uporabo v živilski industriji, saj lahko nadomestijo kemične konzervanse. Večina teh rastlinskih ekstraktov in eteričnih olj ima oznako GRAS, vendar pa so nekateri med njimi lahko tudi toksični. Uporabljajo se lahko kot sestavine hrane, za aromo, barvo in okus. Imajo pa tudi antioksidativne lastnosti. Njihova uporaba kot protimikrobna sredstva je lahko omejena prav zaradi močne arome.

Pomemben vir različnih fenolnih spojin so agroindustrijski stranski produkti, ki nastanejo pri predelavi. Ti so lahko bogat vir vlaknin, nekateri vsebujejo barvila, antioksidativne spojine ter ostale biološko aktivne spojine, ki imajo na primer ugodne vplive na zdravje. Med take produkte prištevamo tudi lupine citrusov, ki ostanejo po ekstrakciji soka, grozdne pečke, kožice in peclje ter oljčne liste (Oreopoulou in Tzia, 2007; Makris in sod., 2007).

Vse bolj pogosto pa je opisano sinergistično delovanje različnih mešanic protimikrobnih sredstev, na primer mešanice običajnih konzervansov in naravnih protimikrobnih sredstev. V eksperimentalnem delu smo preverili delovanje različnih mešanic naravnih protimikrobnih učinkovin na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Predvidevali smo, da s takimi kombinacijami lahko dosežemo boljši učinek. Za določanje protimikrobnega delovanja se uporablja več metod, v eksperimentu smo uporabili dve metodi, pri katerih smo določali MIC – minimalno inhibitorno koncentracijo. Najprej smo vrednosti MIC določali z metodo difuzije v agarju, nato pa smo te rezultate preverili še z metodo dilucije v agarju. Pričakovali smo bolj homogene rezultate obeh metod. Razlog za višje vrednosti MIC pri metodi difuzije je lahko slabše prehajanje ekstrakta skozi gojišče.

V eksperimentalnem delu smo ugotovili, da so imele izbrane mešanice sicer dobro protimikrobno delovanje, vendar pa za večino nismo dokazali sinergističnega učinka, ker nismo testirali vseh posameznih komponent mešanic. Največji protimikrobni učinek je imela mešanica VivOX 40 + ekstrakt hmelja. Pri metodi dilucije v agarju smo za skoraj vse seve določili MIC vrednost 19,53 µg ekstrakta/ml topila. Vrednosti pri metodi difuzije v agarju pa so bile višje. Preverili smo tudi delovanje rožmarinske kisline in njenih ekstraktov, ki pa niso pokazali dobrega protimikrobnega delovanja. Vrednosti, ki smo jih pridobili predvsem z metodo dilucije so bile visoke (od 1250 oziroma 5000 µg ekstrakta/ml gojišča).

Spremljali smo tudi kinetiko protimikrobnega delovanja dveh izbranih ekstraktov na bakterije. S tem smo primerjali vrednosti MIC, ki smo ju predhodno dobili pri metodi difuzije in metodi dilucije v agarju. Poskušali smo določiti tudi baktericidno koncentracijo. Pri bacilih nobena od koncentracij dodanega ekstrakta ni bila baktericidna. Razlog za to je sporogenost bakterij rodu *Bacillus*. Čeprav nismo dokazali baktericidnega učinka ekstraktov na sporogene bakterije, smo z dodatnimi testi po dodatku ekstrakta VivOX 40 in mešanice ekstrakt VivOX 40 + ekstrakt hmelja dokazali povečano občutljivost spor na toplotno obdelavo.

7 VIRI

Abulrob A.-N., Suller M.T.E., Gumbleton M., Simons C., Russell A.D. 2004. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Phytochemistry*, 65: 3021–3027

Alden L. 2005. Citrus fruit. The Cook's Thesaurus
<http://www.foodsubs.com/Fruitcit.html> (11.1.2008): 1 str.

Balaban N., Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 1-10

Basić I. 2006. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Campylobacter*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., Del Rio J.A. 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4505 – 4515

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68: 457-462

Beveridge T.H.J., Girard B., Kopp T., Drover J.C.G. 2005. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1799 -1804

Biersite Wilfried van der Wal. 2000. Utrecht, Hogeschool voor de Kunsten Utrecht
<http://kmt.hku.nl/~wilfried/> (18.1.2008): 1 str.

Bocco A., Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2123-2129

Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253–262

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

Cadot Y., Miñana-Castelló M.T., Chevalier M. 2006. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9206 -9215

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

Carvalho R.N., Moura L.S., Rosa P.T.V., Meireles M.A.A. 2005. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 35: 197-204

Caturla N., Pérez-Fons L., Estepa A., Micol V. 2005. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 137: 2-17

Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R. 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13: 119-131

Chafer A., Berna A., Monton J.B., Mulet A., 2001. High pressure solubility data of the system limonene + linalool + CO₂. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 46: 1145-1148

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

Choi S.-Y., Ko H.-C., Ko S.-Y., Hwang J.-H., Park J.-G., Kang S.-H., Han S.-H., Yun S.-H., Kim S.-J. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30: 772-778

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

Cree R. 2007. Temple emergency medicine receives \$1,8M to find best MRSA treatment. Philadelphia, Temple University
<http://www.temple.edu/medicine/MERSA.htm> (24.1.2008): 1 str.

Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guet S., Winkelmann W. 2006. Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6261 -6265

Cross-section of grapes. 2008. Darien, Jupitermedia Corporation
<http://www.jupiterimages.com/popup2.aspx?navigationSubType=itemdetails&itemID=23040181> (4.1.2008): 1 str.

De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V., Ranalli G. 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 266: 653-659

de Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E. de O., Nogueira Trajano V.N., Barbosa Filho J.M. 2005. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 549-558

Del Bano M.J., Castillo J., Benavente-García O., Lorente J., Martín-Gil R., Acevedo C., Alcaraz M. 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ -rays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2064 -2068

Del Bano M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-Garcia O., Del Rio J.A., Ortuno A., Quirin K.W., Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4247-4253

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

Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 16-34

Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.-H., Lindbäck T., Andersson M., Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P.E., Märtilbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M., Scherer S. 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151: 183-197

Food Safety online: *Staphylococcus aureus*. 2008. Woerden, Food Doctors
http://www.fooddoctors.com/FSF/S_aureus.pdf (3.2.2008): 1 str.

Gibbons S. 2005. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry Reviews*, 4: 63-78

Hatzidimitriou E., Nenadis N., Tsimidou M.Z. 2007. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (a_w) conditions. *Food Chemistry*, 105: 1504-1511

Irlinger F. 2007. Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016

Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5: 631-640

Jeršek B. 2002. Osnovni principi identifikacije bakterij in kvasovk v živilih. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17-18

Juneja V. K., Friedman M. 2007. Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling. *Journal of Food Protection*, 70: 218-222

Kalab M. 2005. *Bacillus cereus*. Kanada, Scimat
http://www.magma.ca/~scimat/b_cereus.htm (24.1.2008): 1 str.

Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L. 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55: 77-85

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

Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2, 2: 189–198.

Larson A.E., Yu R.R.Y., Lee O.A., Price S., Haas G.J., Johnson E.A. 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 195-207

Leguérinel I., Couvert O., Mafart P. 2007. Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 100–104

Lindsay J.A., Holden M.T.G. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in Microbiology*, 12: 378-385

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

López-Malo A., Palou E., León-Cruz R., Alzamora S.M. 2006. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. V: Advances in food mycology. Hocking A.D., Pitt J.I., Samson R.A., Thrane U. (eds). New York, Springer Science+Business Media, Inc.: 261-286

Makris D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K. 2007. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 125-132

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-Boudjema 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., Schwarz K. 2000. The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *European Food Research and Technology*, 210: 263-267

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

Natarajan P., Katta S., Andrei I., Babu Rao Ambati V., Leonida M., Hass G.J. 2008. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*, 15: 194-201

Notermans S., Batt C.A. 1998. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84: 51S–61S

Olive leaf (*Olea europaea*). 2008. Herbwisdom
<http://www.herbwisdom.com/herb-olive-leaf.html> (17.1.2008): 1 str.

Oluwatuyi M., Kaatz G.W., Gibbons S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65: 3249–3254

Oreopoulou V., Tzia C. 2007. Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. V: Utilization of plant by-products and treatment of waste in the food industry. Oreopoulou V., Russ W. (eds). New York, Springer Science + Business Media, LLC: 209-232

Palma M., Taylor L.T., Varela R.M., Cutler S.J., Cutler H.G. 1999. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5044 -5048

Peter K.V., Nirmal Babu K. 2004. Introduction. V: Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Peter K.V. (ed). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 1-8

Rapisarda P., Carollo G., Fallico B., Tomaselli F., Maccarone E. 1998. Hydroxycinnamic acids as markers of Italian blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 464 -470

Rates S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613

Rhodes P.L., Mitchell J.W., Wilson M.W., Melton L.D. 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 281-286

Rodríguez Montealegre R., Romero Peces R., Chacón Vozmediano J.L., Martínez Gascueña J., García Romero E. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687-693

Rosemary. 2007. London, BBC Worldwide Limited

<http://www.bbcgoodfood.com/content/knowhow/glossary/rosemary/> (21.12.2007): 1 str.

Rožman T., 2007. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarinana različne vrste bakterij rodu *Listeria*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 70 str.

Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176

Saito M., Hosoyama H., Agria T., Kataoka S., Nobuyuki Y. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1460-1464

Sakanaka S., Juneja L.R., Taniguchi M. 2000. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90: 81-85

Sakamoto K., Konings W.N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 105-124

Sasikumar B., 2004. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243-255

Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., Balansard G. 2001. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 618 -621

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

Soni M.G., Burdock G.A., Christian M.S., Bitler C.M., Crea R. 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 903-915

Švagelj M. 2006. Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na bakterijah *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.

Tassou C., Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33: 273-280

Tauxe R.V. 1997. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 4: 425-434.

Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104: 466-479

Tuck K.L., Hayball P.J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 636-644

Vattem D.A., Lin Y.-T. , Ghaedian R., Shetty K. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, 40: 51583-1592

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

Yilmaz Y., Toledo R.T. 2004. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 422-433

Zanoli P., Rivasi M., Zavatti M., Brusiani F., Baraldi M. 2005. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 102-106

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem za strokovno pomoč in nasvete pri samem delu in pisanju naloge ter za natančen in poglobljen pregled teksta. Najlepša hvala tudi, ker ste mi omogočili strokovno izobraževanje v Kopenhagnu.

Recenzentki prof. dr. Veroniki Abram se zahvaljujem za strokoven in temeljit pregled diplomske naloge.

Dr. Anji Klančnik in Mariji Kurinčič hvala za pomoč v laboratoriju, strokovne nasvete in koristne napotke.

Jani Avbelj se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju.

Za pregled naloge in urejanje virov se zahvaljujem univ. dipl. ing. Ivici Hočevnar.

Najlepša hvala tudi mojim staršem in bratu za podporo, razumevanje in potrpljenje tekom študija. Hvala ker ste mi stali ob strani.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem za nepozabna študijska leta!