

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tanja ROŽMAN

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA
RAZLIČNE VRSTE BAKTERIJ RODU *Listeria***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS
(*Rosmarinus officinalis* L.) AGAINST DIFFERENT SPECIES OF *Listeria***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI:

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

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

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Rožman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24:582.929.4(043)=863
KG patogeni mikroorganizmi/*Listeria/Listeria monocytogenes*/rožmarin/*Rosmarinus officinalis* L./ekstrakt rožmarina/protimikrobno delovanje/karnozolna kislina/minimalna inhibitorna koncentracija/minimalna baktericidna koncentracija
AV ROŽMAN, Tanja
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2007
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA RAZLIČNE VRSTE BAKTERIJ RODU *Listeria*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 70 str., 18 pregl., 14 sl., 15 pril., 85 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na različne vrste bakterij rodu *Listeria* in primerjalno tudi na bakterije vrst *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in seva *Salmonella* Infantis. Uporabili smo dva različna komercialno pripravljena ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, ki sta vsebovala različno koncentracijo karnozolne kisline. Protimikrobni učinek izbranih ekstraktov smo želeli dokazati z dvema najpogosteje uporabljenima metodama: metoda difuzije v trdem gojišču in metoda razredčevanja v tekočem gojišču. Celice testnih bakterij smo pripravili v tekočem gojišču TSB, pri vseh metodah smo kulture inkubirali 24 do 48 ur na trdnem gojišču TSA z dodatkom ekstrakta pri 37 °C. Rastopine ekstraktov smo pripravljali v absolutnem etanolu, koncentracije ekstraktov pa smo izbrali glede na proučevano metodo. Pri metodi difuzije v trdnem gojišču TSA smo po inkubaciji odčitali nastale inhibicijske cone, s katerimi smo določali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), kot tiste koncentracije, pri katerih ni bilo vidne rasti bakterij na gojišču. Vrednosti MIC smo določili v območju med 625 µg ekstrakta/ml EtOH do 5000 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.con in med 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH do 2500 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.conh. Ugotovili smo, da je odpornost listerij proti ekstraktoma rožmarina odvisna od izbranega ekstrakta, izbrane koncentracije ter vrste in seva listerij. Izbrana ekstrakta nista imela protimikrobnega učinka na bakterije rodu *Salmonella*. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo določali minimalne baktericidne koncentracije (MBC), kot tiste koncentracije, pri katerih preživi 0,1 % testnih bakterij. Uporabili smo dva različna seva bakterij vrste *Listeria monocytogenes* in vrednosti MBC v večini poskusov določili med 15,63 µg/ml TSB in 98,5 µg/ml TSB za oba uporabljena ekstrakta. Rezultati so ponovno potrdili našo domnevo, da je odpornost listerij proti ekstraktoma rožmarina odvisna od vrste in seva.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24:582.929.4(043)=863
CX pathogens/*Listeria*/*Listeria monocytogenes*/rosemary/*Rosmarinus officinalis*
L./rosemary extracts/antimicrobial activity/carnosic acid/minimal inhibitory
concentration/minimal bactericidal concentration
AU ROŽMAN, Tanja
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food science and
Technology
PY 2007
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS (*Rosmarinus*
officinalis L.) AGAINST DIFFERENT SPECIES OF *Listeria*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 70 p., 18 tab., 14 fig., 15 ann., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our research was to investigate antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Listeria* sp. and *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Infantis. We have used two extracts of rosemary, Ros.con and Ros.conh, containing different levels of carnosic acid. We wanted to proof an antimicrobial activity of selected rosemary extracts with two most commonly used methods: disc diffusion method and broth dilution method. All tested cultures were prepared in a TSB broth. By all methods, the cultures were incubated for 24 to 48 hours on TSA agar with addition of plant extract at 37 °C. Solutions of extracts were prepared in absolute ethanol, the concentrations of extracts were prepared in accordance with the studied method. With the disc diffusion method we have obtained the zone of inhibition diameter after the incubation and the lowest concentrations, where no visible bacterial growth was recorded, were assumed as minimal inhibitory concentration values (MIC). We determined MIC values in the ranges from 625 µg extract/ml EtOH to 5000 µg extract/ml EtOH for Ros.con and from 312.5 µg extract/ml EtOH do 2500 µg extract/ml EtOH for Ros.conh in the medium. We have established, that the resistance of *Listeria* species against rosemary extracts depends on: selected extract, selected concentration, various species and strain of listeria. The results showed, that the extracts had no antimicrobial effect on bacteria *Salmonella*. With broth dilution method we have determined minimal bactericidal concentration (MBC), as the concentration giving 0.1 % bacterial survival. With this method we have tested two different strains of *L. monocytogenes* and in the most cases, we determined MBC values in the range from 15.63 µg/ml TSB to 98.5 µg/ml TSB Ros.con and Ros.conh in the medium. Results have confirmed our assumption that resistance of *Listeria* against rosemary extracts depended on the selected species and strain.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI RODU <i>Listeria</i>	3
2.2 PATOGENOST BAKTERIJ RODU <i>Listeria</i>	4
2.3 RAZŠIRJENOST BAKTERIJ VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.4 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI	6
2.4.1 Naravna odpornost	6
2.4.2 Pridobljena odpornost	6
2.4.3 Vpliv dejavnikov okolja na rast in preživelost bakterij rodu <i>Listeria</i>	6
2.5 PROTIMIKROBNA SREDSTVA	7
2.5.1 Rastline in rastlinski ekstrakti	8
2.5.2 Protimikrobne spojine v rastlinskih ekstraktih	8
2.5.2.1 Fenoli in polifenoli	8
2.5.2.2 Terpenoidi in eterična olja	10
2.5.3 Mehanizem delovanja fenolnih spojin na bakterijske celice	10
2.6 ROŽMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	12
2.6.1 Kemijska sestava rožmarina	12
2.6.1.1 Eterična olja	13
2.6.1.2 Druge sestavine rožmarinskih ekstraktov	13
2.6.2 Protimikrobno delovanje rožmarina	15
2.6.3 Uporaba v živilstvu	15
2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI	16
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 POTEK DELA	19
3.2 MATERIAL	20
3.2.1 Bakterije	20
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	20
3.2.2.1 Selektivna gojišča	20
3.2.2.2 Neselektivna gojišča	21
3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem	22
3.2.3.1 Ekstrakti rožmarina	22
3.2.3.2 Natrijev nitrit	22
3.2.4 Druge kemikalije in dodatki	23
3.2.5 Laboratorijska oprema	24
3.3 METODE DELA	25
3.3.1 Revitalizacija bakterij	25

3.3.2	Priprava inokuluma	25
3.3.3	Metoda difuzije v gojišču TSA	25
3.3.3.1	Uporabljen material.....	25
3.3.3.2	Izvedba metode	26
3.3.4	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB.....	27
3.3.4.1	Uporabljen material.....	27
3.3.4.2	Izvedba metode	27
3.3.5	Določitev števila preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču	29
3.3.6	Določanje preživelosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču TSB z dodanim NaNO₂ z metodo razredčevanja.....	30
3.3.6.1	Uporabljen material.....	30
3.3.6.2	Določanje vsebnosti NaNO ₂ dodanega v gojišče TSB.....	30
3.3.6.3	Spektrofotometrično določanje NaNO ₂	30
3.3.6.4	Izvedba metode	31
3.3.7	Statistična analiza.....	31
4	REZULTATI	33
4.1	PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA Ros.con in Ros.conh DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU TSA	33
4.1.1	Velikosti inhibicijskih con pri različnih bakterijskih sevih.....	33
4.1.2	Določitev vplivov na velikost inhibicijskih con.....	34
4.1.2.1	Vpliv vrste ekstrakta.....	34
4.1.2.2	Vpliv koncentracije ekstrakta.....	35
4.1.2.3	Vpliv vrste bakterij.....	35
4.1.2.4	Vpliv vrste seva bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	36
4.2	PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA Ros.con in Ros.conh DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB	37
4.2.1	Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115	38
4.2.1.1	Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB z 20 vol. % dodatkov po 24 in 48-urni inkubaciji.....	38
4.2.1.2	Protimikroben učinek ekstrakta Ros.con na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24 in 48-urni inkubaciji.....	40
4.2.1.3	Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.con na različne koncentracije bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115.....	43
4.2.2	Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58.....	44
4.2.2.1	Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.con na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji	44
4.2.2.2	Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.conh na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji	47
4.2.2.3	Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 48-urni inkubaciji	50
4.3	PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO ₂ DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB.....	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1	RAZPRAVA	56
5.1.1	Metoda difuzije v gojišču TSA	56

5.1.1.1	Vpliv vrste ekstrakta.....	57
5.1.1.2	Vpliv koncentracije ekstrakta.....	57
5.1.1.3	Vpliv vrste bakterij.....	57
5.1.1.4	Vpliv vrste seva bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	58
5.1.2	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB.....	58
5.1.3	Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta rožmarina Ros.con na različne koncentracije bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115.....	59
5.1.4	Protimikroben učinek NaNO₂ določen z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB.....	60
5.2	SKLEPI.....	61
6	POVZETEK.....	62
7	VIRI.....	64
8	ZAHVALA.....	71
9	PRILOGE.....	72

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000).....	9
Preglednica 2-2: Pregled pojmov pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004)	17
Preglednica 3-1: Bakterijski sevi.....	20
Preglednica 3-2: Laboratorijska oprema	24
Preglednica 4-1: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina določene za različne bakterije z metodo difuzije v gojišču TSA	34
Preglednica 4-2: Vpliv vrste ekstrakta rožmarina na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA	34
Preglednica 4-3: Vpliv koncentracije ekstrakta na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA	35
Preglednica 4-4: Vpliv vrste bakterij na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA	36
Preglednica 4-5: Vpliv vrste seva bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA	36
Preglednica 4-6: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh po 24 in 48-urni inkubaciji (20 vol. % dodatkov).....	38
Preglednica 4-7: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB z 20 vol. % dodatkov	39
Preglednica 4-8: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24 in 48-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)	41
Preglednica 4-9: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov	41
Preglednica 4-10: Vpliv dodatka ekstrakta Ros.con (500 µg ekstrakta/ml TSB) na rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115	43
Preglednica 4-11: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)	45
Preglednica 4-12: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov	46
Preglednica 4-13: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh po 24-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)	48
Preglednica 4-14: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov	49
Preglednica 4-15: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh po 48-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov).....	51
Preglednica 4-16: Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov	51
Preglednica 4-17: MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije sevov <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 in <i>L. monocytogenes</i> ŽM58	54
Preglednica 4-18: Rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah NaNO ₂ po 24-urni inkubaciji.....	54

KAZALO SLIK

Slika 2-1: <i>Listeria monocytogenes</i> (Kunkel, 2004).....	3
Slika 2-2: Shema intracelularnega cikla bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i> (Kuhn in Goebel, 1999).....	5
Slika 2-3: Zgradba celične stene Gram pozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997)	11
Slika 2-4: Rožmarin (SAT Group, 2006).....	12
Slika 2-5: Strukturna formula karnozolne kisline in karnozola (Munne-Bosch in Alegre, 2001)	14
Slika 2-6: Strukturna formula rožmarinske kisline (Baskan in sod., 2007).....	14
Slika 2-7: Strukturna formula luteolina (Zhang in sod., 2007a)	15
Slika 2-8: Prikaz inhibicijskih con nastalih pri metodi difuzije v agarju (VMT Vision Machine Technic, 2007).....	18
Slika 2-9: Prikaz postopka metode razredčevanja v tekočem gojišču	18
Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela.....	19
Slika 3-2: Shema določanja MIC z metodo difuzije v gojišču TSA	26
Slika 3-3: Shema določanja preživelosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ob dodatku različnih koncentracij ekstraktov rožmarina z metodo razredčevanja v tekočem gojišču	28
Slika 4-1: Povprečne inhibicijske cone za bakterije sevov <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 in <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh ...	37
Slika 4-2: Preživelost bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 po 24 in 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (20 vol. % dodatek)	39
Slika 4-3: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (20 vol. % dodatek)	40
Slika 4-4: Preživelost bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 po 24 in 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (10 vol. % dodatek)	42
Slika 4-5: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	42
Slika 4-6: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	43
Slika 4-7: Vpliv dodatka ekstrakta Ros.con (500 µg ekstrakta/ml TSB) na rast bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115	44
Slika 4-8: Preživelost bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 24 inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (10 vol. % dodatek).....	46
Slika 4-9: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	47
Slika 4-10: Preživelost bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 24 inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh (10 vol. % dodatek)	49
Slika 4-11: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	50
Slika 4-12: Preživelost bakterij seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh (10 vol. % dodatek).....	52
Slika 4-13: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	53
Slika 4-14: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)	53

KAZALO PRILOG

Priloga A 9-1: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>S. Infantis</i> ŽM9 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	72
Priloga A 9-2: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>B. cereus</i> ŽMJ91 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	73
Priloga A 9-3: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 določen z metodo difuzije v gojišču TSA.....	74
Priloga A 9-4: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM51 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	75
Priloga A 9-5: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM52 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	76
Priloga A 9-6: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM53 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	77
Priloga A 9-7: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM58 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	78
Priloga A 9-8: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM80 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	79
Priloga A 9-9: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM92 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	80
Priloga A 9-10: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM108 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	81
Priloga A 9-11: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. monocytogenes</i> ŽM115 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	82
Priloga A 9-12: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. ivanovii</i> ŽM65 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	83
Priloga A 9-13: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. grayi</i> ŽM66 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	84
Priloga A 9-14: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva <i>L. innocua</i> ŽM68 določen z metodo difuzije v gojišču TSA	85
Priloga A 9-15: Spektrofotometrično določanje vsebnosti NaNO ₂ v vzorcu pri valovni dolžini 540 nm.....	86

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
ALOA	gojišče ALOA (ang. Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti)
ATTC	(ang. American Type Culture Collection)
BC	gojišče <i>Bacillus cereus</i> agar
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	(ang. Brain Heart Infusion Broth)
BP	(ang. Baird Parker agar)
Cfu	kolonijska enota (ang. Colony forming unit)
EtOH	etanol
<i>L. grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
N	število mikroorganizmov (cfu/ml ali cfu/g)
NaNO ₂	natrijev nitrit
OTC	oksitetraciklin
Ros.con	ekstrakt rožmarina z 22,04 % karnozolne kisline
Ros.conh	ekstrakt rožmarina z 40,49 % karnozolne kisline
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. Infantis</i>	<i>Salmonella</i> Infantis
TSA	gojišče triptični soja agar (ang. Tryptone soya agar)
TSB	gojišče triptični soja bujon (ang. Tryptone soya broth)
XLD	gojišče XLD (ang. Xylose lysine desoxycholate agar)
ŽM	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete
ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

1 UVOD

Zahteve potrošnikov po vedno bolj varnih, pestrih in naravnih živilih, z zmanjšano uporabo kemijskih konzervansov, soli, sladkorja in omejeno uporabo ekstremnih postopkov konzerviranja (npr.: pasterizacija, sterilizacija) silijo prehrambeno industrijo k raziskovanju in uporabi naravnih sestavin za ohranjanje kakovosti in varnosti živil. Oksidacija v živilih povzroča razgradnjo lipidov in proteinov, kar zaporedno pripomore k spremembi okusa, vonja, arome, barve in teksture ter s tem povezanega skrajšanja obstojnosti izdelka, mikroorganizmi, njihovi encimi in drugi produkti metabolizma pa povzročajo kvar živil in hkrati okužbe in zastrupitve ljudi (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

Uporaba rastlin, njihovih eteričnih olj, ekstraktov ali izoliranih aktivnih snovi za kontrolo kvara živil tako predstavlja zaželeno alternativo kemičnim konzervansom, vendar pa so zaradi svojih močnih arom omejeni pri uporabi v živilih in na žalost še ne dobro raziskani vir protimikrobnih snovi (Del Campo in sod., 2000).

Humana listerioza, ki jo povzročajo bakterije vrste *Listeria monocytogenes*, je redka bolezen, smrtnost pa je zelo velika, med 20 in 60 %. Živila v katerih so bakterije vrste *L. monocytogenes* najpogosteje prisotne so surovo in predelano meso vseh vrst, jajca, surovo in pasterizirano mleko, sir in drugi mlečni izdelki, morski sadeži, sladoled, krompir, redkve (Carrasco in sod., 2006, Manzano in sod., 1997). Za bakterije je značilno, da so odporne proti visokim koncentracijam soli, relativno nizki vrednosti pH, še posebej velik problem pa je, da se lahko razmnožujejo in rastejo pri temperaturah hladilnika (Duxbury, 2004; Vazquez-Boland in sod., 2001).

Najbolj poznane začimbe in zelišča s protimikrobnim delovanjem so rožmarin, cimet, koriander, origano, žajbelj, timijan, česen, čebula, nageljnova žbica (Burt, 2004; Lopez-Malo Vigli in sod., 2005a), njihove rastlinske ekstrakte pa pridobivajo iz skorje, listov, cvetov, plodov in semen. Uporaba rožmarina in ekstrakta rožmarina je dobro poznana. Najbolj proučena je njegova antioksidativna aktivnost, a se zadnje čase vedno bolj raziskuje tudi kot protimikrobni potencial (Yanishlieva-Maslarova in Heinonen, 2001; Burt, 2004). Ekstrakt rožmarina vsebuje fenolne spojine, kot so karnozolna kislina, karnozol in rožmarinska kislina, ki so odgovorne za protimikrobno delovanje na bakterije in kvasovke. (Del Campo in sod., 2000).

Protimikrobna aktivnost določene snovi je najpogosteje izražena kot minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), v nekaterih primerih se uporablja tudi minimalna baktericidna koncentracija (MBC) ali bakteristatična koncentracija (Burt, 2004).

V praktičnem delu diplomske naloge smo določali protimikrobno delovanje dveh ekstraktov rožmarina, z dvema različnima metodama, na različne vrste bakterij rodu *Listeria* in na bakterije vrst *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in seva *Salmonella* Infantis. Uporabljeni ekstrakti Ros.con in Ros.conh sta vsebovala različno koncentracijo karnozolne kisline, ki je ena izmed fenolnih komponent za katero smo predvidevali, da ima ključno vlogo pri protimikrobni aktivnosti na izbrane bakterijske izolate.

1.1 CILJ NALOGE

Glavni namen naloge je bil določiti ali imata ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh protimikroben učinek na bakterije rodu *Listeria*. V praktično delo smo vključili dve metodi določanja protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina. Ugotoviti smo želeli morebitne razlike med izbranimi sevi bakterij ter določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) in minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstraktov rožmarina. Za izbrane izolate bakterij vrste *Listeria monocytogenes* smo želeli tudi oceniti protimikrobno učinkovitost samih ekstraktov rožmarina in v kombinaciji s protimikrobnim učinkom natrijevega nitrita.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Raztopini ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh imata protimikroben učinek na bakterije rodu *Listeria* in tudi na druge Gram pozitivne bakterije kot so bakterije vrst *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*.
- Odpornost listerij proti ekstraktom rožmarina je odvisna od vrste in seva.
- Pričakovali smo večji inhibitorni učinek ekstrakta Ros.conh, saj je vseboval večji odstotek karnozolne kisline.
- Raztopina natrijevega nitrita ima protimikrobni učinek na bakterije vrste *Listeria monocytogenes*.

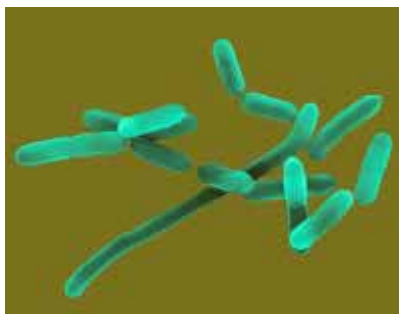
2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI RODU *Listeria*

Taksonomija rodu se je močno spremenila v zadnjih petdesetih letih. Uvajanje molekularno bioloških metod v filogenetskih študijah je omogočilo boljše razumevanje med posameznimi vrstami znotraj rodu *Listeria*, ki sedaj vključuje le še 6 različnih vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* in *L. grayi* (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Vse vrste rodu *Listeria* so si fenotipsko med seboj zelo podobne, ločimo jih na podlagi testiranja: β -hemolize, proizvodnje kisline iz D-ksiloze, L-ramnoze, α -metil-D-manozida in manitola. Fenotipska podobnost je posledica visoke genomske homologije med različnimi vrstami. Hemoliza je ključna značilnost za razvrstitev izolatov, hkrati pa je najtežja značilnost za odkrivanje (Rocourt in Buchrieser, 2007). Kot primer, za bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki so patogene za človeka, je značilno, da tvorijo β -hemolizo na krvnem agarju, izkoriščajo ramnozo in ne ksilozo, ter imajo pozitiven rezultat pri testu CAMP (Adamič in sod., 2003).

Listerije so majhne (široke 0,5 μm in dolge 1 – 2 μm), po Gramu večinoma pozitivne in nesporogene palčke z zaokroženim koncem. Celice najdemo posamično ali v kratkih verižicah, ki se lahko formirajo v obliko V oziroma Y (Slika 2-1). Včasih so celice kokoidne oblike, srednje velikosti (širina in dolžina okoli 0,5 μm) in jih tako zlahka zamešamo s streptokoki. Občasno v starejših kulturah celice izgubijo sposobnost ohranjanja in tvorbe Gram pozitivnih celičnih sten (Rocourt in Buchrieser, 2007).



Slika 2-1: *Listeria monocytogenes* (Kunkel, 2004)

Na hranljivem agarju listerije po 24-urni inkubaciji tvorijo majhne kolonije od 0,2 – 0,8 mm široke, ki so gladke, okrogle, modrikasto sive, prosojne in rahlo izbočene, s fino površino in celim robom. Po 5 do 10 dnevni inkubaciji imajo kolonije premer 5 mm in več. Za listerije je značilno, da večinoma dobro rastejo na bakterioloških gojiščih, rast pa lahko pospešimo s prisotnostjo fermentabilnih sladkorjev, kjer se običajno uporablja glukoza. Na trdih gojiščih kulture listerij tvorijo oster in kisel vonj, ki je posledica tvorbe karboksilnih in hidroksi kislin ter alkoholov, v bujonu pa postane medij po 8 do 24-urni inkubaciji pri 37 °C moten. Poleg tega listerije bolje rastejo v atmosferi z nižjo koncentracijo kisika kot je v ozračju (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Listerije so aerobne, mikroaerofilne, fakultativno anaerobne, katalaza pozitivne in oksidaza negativne. Rastejo v širokem temperaturnem območju od 1 – 2 °C do 45 °C. Pri temperaturah hlajenja je rast upočasnjena. V bujonu rastejo listerije pri pH med 4,5 in 9,6, optimalno pa pri

pH 7. Sposobne so rasti v mediju, ki vsebuje 10 % NaCl, preživijo pa tudi višje koncentracije. Preživetje pri nizki pH vrednosti in visoki koncentraciji soli je temperaturno odvisno (Rocourt in Buchrieser, 2007).

2.2 PATOGENOST BAKTERIJ RODU *Listeria*

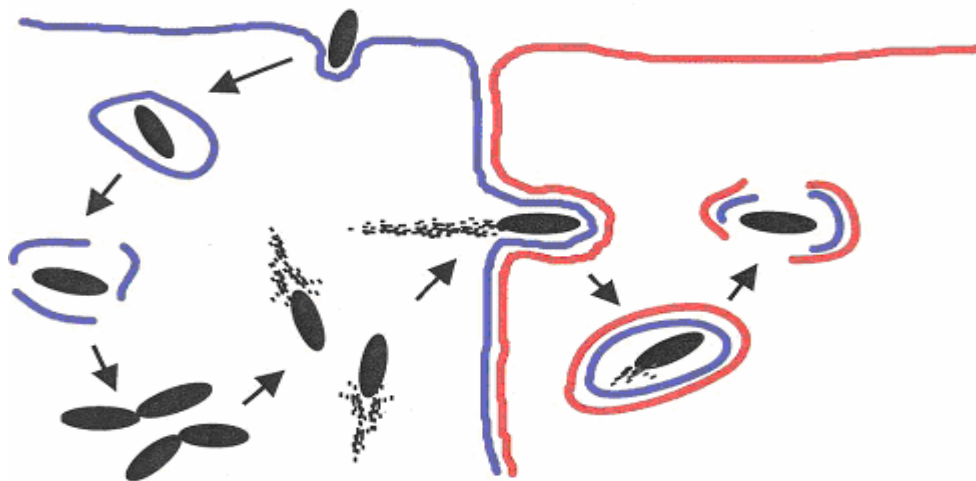
Izmed šestih vrst v rodu *Listeria* sta za ljudi patogeni samo dve vrsti: *L. monocytogenes* in *L. ivanovii*. Najbolj razširjena vrsta v hrani pa je *L. innocua*, ki za človeka ne predstavlja nevarnosti obolenja za listeriozo. Humani primeri listerioze, ki jih povzročajo bakterije vrste *L. ivanovii* so redki, predstavljajo pa nevarnost predvsem za prežvekovalce (Vazquez – Boland in sod., 2001). Tako je najpomembnejša patogena vrsta rodu *Listeria*, ki povzroča listeriozo *L. monocytogenes*, ki je prepoznavna kot humani patogen že od leta 1929 (Painter in Slutsker, 2007) in skupaj z bakterijami rodu *Campylobacter*, *Yersenia* in *Salmonella* predstavljaja pomembno skupino patogenih kontaminantov v hrani (Gandhi in Chikindas, 2007; Zhang in sod., 2007b).

Humana listerioza je sicer redka bolezen, a je smrtnost zelo velika, med 20 in 60 %. Zato je zelo pomembno zgodnje in zanesljivo določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilih (Smole Možina in sod., 2005). Bolezen se pojavlja posamično, pa tudi epidemično. V zadnjih desetletjih obolenost ljudi za listeriozo v svetu postopoma narašča. Infektivna doza za človeka ni znana, verjetno je odvisna od gostiteljeve dovzetnosti. V največji nevarnosti pred okužbo so bolniki z motnjami imunskega sistema, nosečnice, novorojenčki, alkoholiki, diabetiki, starejši ljudje, zasvojenici z mamili... (Marinšek in Grebenc, 2002).

Simptomi listerioze so vročina, bolečine v mišicah in včasih gastrointestinalni simptomi, kot sta slabost in diareja. Kadar se okužba razširi na živčni sistem, se pojavi glavobol, otrdel vrat, zmedenost, težave z ravnotežjem, krči in splav pri nosečnicah (Duxbury, 2004).

V Sloveniji je število prijavljenih in ugotovljenih primerov relativno majhno. V letih 1965 do 1970 smo imeli povprečno 3,5 primera letno, v naslednjih osmih letih pa v povprečju 1,5 primera letno (Marinšek in Grebenc, 2002). V Združenih državah Amerike je bilo leta 1997 število okužb z bakterijo *L. monocytogenes* iz živil ocenjeno na 2000 primerov (Tauxe, 2002).

Na sliki 2-2 je prikazan postopek vdora patogene bakterije v gostiteljsko celico s fagocitozo. Ob vstopu bakterije v gostiteljsko celico se ta obda z membrano v tako imenovano fagocitno vakuolo. Fagosomalna membrana kmalu razpade kar omogoči prehod bakterijske celice v gostiteljevo citoplazmo in začetek replikacije celic. Tako razmnoževanje listerije sproži delovanje aktin-polimeraze in s tem nastanek aktinskih filamentov v gostiteljevi celici, kar na sliki opazimo kot temno liso okoli bakterijskih celic. Ti omogočajo intracelularne premike bakterije in s tem prehod v naslednjo gostiteljsko celico. Ob ponovnem prehodu skozi membrano se bakterijska celica tokrat obda z dvojno gostiteljevo membrano, postopek celotnega cikla pa se ponovi (Gandhi in Chikindas, 2007; Kuhn in Goebel, 1999; Vazquez-Boland in sod., 2001).



Slika 2-2: Shema intracelularnega cikla bakterij vrste *Listeria monocytogenes* (Kuhn in Goebel, 1999)

Večje število izbruhov listerioze s smrtnim izidom in predpisano uvajanje sistema HACCP so le še poudarili potrebo po hitrejših in bolj učinkovitih metodah za odkrivanje majhnega števila bakterij *L. monocytogenes* v živilih (Donnelly, 1999).

2.3 RAZŠIRJENOST BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes*

Bakterije rodu *Listeria*, vključno z bakterijsko vrsto *L. monocytogenes*, so v naravi zelo razširjene. Najdemo jih v vodi, zemlji, razpadajočem rastlinskem materialu, silaži, živalskih iztrebkih (Sauders in Wiedmann, 2007). Približno 5-10 % ljudi ima bakterije *L. monocytogenes* v prebavnem traku. Posledica tako povsod razširjene bakterije *L. monocytogenes* je pogosta prisotnost v človekovi prehranjevalni verigi. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja (Jeršek, 2006).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so izolirali iz širokega spektra živil: surovega in predelanega mesa vseh vrst, jajc, surovega in pasteriziranega mleka, sirov in drugih mlečnih izdelkov, morskih sadežev, sladoledov, krompirja, redkve (Carrasco in sod., 2006, Manzano in sod., 1997)

Poljedelske rastline se lahko okužijo z omenjeno vrsto bakterij iz zemlje in preko gnojnice. Živali pa so lahko samo prenašalci omenjene bakterije in same ne zbolijo za listeriozo ter na tak način kontaminirajo živila živalskega izvora (Duxbury, 2004).

2.4 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI

Listerije so zmožne preživeti v živilsko predelovalnem okolju in lahko rastejo v različnih razmerah, ki se uporabljajo za konzerviranje, vključno z zmrzovanjem (Lado in Yousef, 2007) in visoko osmolarnostjo (Guerra in sod., 2001). Njihova prilagodljivost na široko območje okoliških razmer je ključno dejstvo, ki bakterije vrste *L. monocytogenes* ločuje od drugih nesporogenih patogenih bakterij, ki povzročajo zastrupitve in/ali okužbe z živili.

Odpornost mikroorganizmov je definirana kot začasna ali trajna sposobnost mikroorganizma in njegovih potomcev, da ohrani živost in se razmnožuje v razmerah, ki bi uničile oz. ustavile razvoj drugih mikroorganizmov (Cloete, 2003). Večina avtorjev se strinja, da je najboljša merilo odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim sredstvom minimalna inhibitorna koncentracija – MIC (Burt, 2004).

2.4.1 Naravna odpornost

Imenujemo jo tudi prirojena ali intrinzična odpornost in je nastala zaradi genetskih, strukturnih ali fizioloških lastnosti mikroorganizmov. Vedno je značilna za določeno bakterijsko skupino, rod ali vrsto (Berce in sod., 2004). Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni, kadar nimajo tarčnih mest, na katere protimikrobna sredstva delujejo (Seme, 2002).

2.4.2 Pridobljena odpornost

Pridobljena odpornost je rezultat spremenjene celične fiziologije in strukture in je nastala zaradi genetskih sprememb mikroorganizma. Značilna je le za posamezne seve določene bakterijske vrste ali rodu (Seme in sod., 1998; Quintiliani in sod., 1999). Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genske informacije z genskim prenosom iz druge bakterije s transformacijo ali konjugacijo (Quintiliani in sod., 1999; Seme, 2002; Cloete 2003).

2.4.3 Vpliv dejavnikov okolja na rast in preživelost bakterij rodu *Listeria*

Temperaturno območje rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* je postalo zelo zanimivo, saj imajo te bakterije značilnosti tako psihrotrofnih kot mezofilnih bakterij in so zato ena izmed redkih nesporogenih in patogenih vrst bakterij, ki lahko rastejo v hrani tudi pri temperaturi hladilnika. Rastejo v zelo širokem temperaturnem območju od 1-2 do 45 °C, optimalna temperatura rasti pa je določena med 30 in 37 °C. Temperature, ki so višje od 50 °C imajo letalen učinek na omenjene bakterije (Lado in Yousef, 2007).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* imajo pri nevtralnem pH in pri visoki vsebnosti hranil mejo rasti pri okoli 0°C (Microorganisms in foods, 1996). El-Shenawy in Marth (1988) sta ugotovila, da bakterije vrste *L. monocytogenes* rastejo pri temperaturi 1°C v primernem gojišču zelo počasi, ob dvigu temperature na 3 do 6 °C pa koncentracija celic zelo hitro naraste tudi do 10⁸ cfu/ml. (Lou in Yousef, 1999).

V različnih živilih lahko bakterije vrste *L. monocytogenes* preživijo nekaj tednov tudi pri zelo nizki temperaturi -18°C , v laboratorijskih gojiščih in pri kislem pH pa je preživetje pri tako nizkih temperaturah slabše (Microorganisms in foods, 1996).

L. monocytogenes lahko raste v pH območju med 4,0 do 9,6, optimalna rast pa je določena v območju blizu nevtralnega pH (Lado in Yousef, 2007). George in sod. (1988) so tako zaznali rast bakterij v tekočem gojišču TSB, kateremu so predhodno znižali pH s klorovodikovo kislino in ga inokulirali z 16 različnimi izolati bakterij vrste *L. monocytogenes* pri pH 4,4 in 4,6 med 20 in 30-urno inkubacijo. Kasneje so objavili rast bakterij vrst *L. innocua*, *L. seeligeri* in *L. ivanovii* v gojišču BHI, kateremu so znižali pH s klorovodikovo kislino, pri vrednostih kot so 4,53, 4,88 in 5,16. Tako so za bakterije vrste *L. monocytogenes* in večino ostalih bakterij rodu *Listeria* določili minimalno pH vrednost, pri kateri omenjene bakterije še rastejo tudi pod 5 (Lou in Yousef, 1999), medtem ko rasti pod pH 4 še niso dokumentirali (Lado in Yousef, 2007).

Rast listerij pri nizkih pH vrednostih je odvisna tudi od temperature, vrste dodane kisline v gojišče in od časa inkubacije. Tako so preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* dokazali v pomarančnem soku, pri temperaturi 4°C in pH vrednosti 3,6 (Lado in Yousef, 2007).

Vodna aktivnost (a_w) je poleg temperature najpomembnejši fizikalni dejavnik, ki vpliva na rast in metabolizem mikroorganizmov, in označuje dostopnost vode mikroorganizmom v mediju (Smole Možina in Bem, 2003). Rast listerij glede na vodno aktivnost je podobna kot pri drugih Gram pozitivnih bakterijah. Najnižja vrednost vodne aktivnosti, pri kateri še rastejo je 0,92, optimalna pa pri 0,97. V primerjavi z drugimi mikroorganizmi, ki povzročajo zastrupitve oz. okužbe s hrano, pa so se bakterije vrste *L. monocytogenes* sposobne razmnoževati celo pri vrednosti 0,90 (Lado in Yousef, 2007).

S spremenjeno sestavo atmosfere se rast bakterij vrste *L. monocytogenes* le malo spremeni. Generacijski čas je podoben tako pri aerobnih, anaerobnih in mikroaerofilnih razmerah. Višje vsebnosti CO_2 nimajo inhibitornega učinka pri nizkih temperaturah (Microorganisms in foods, 1996).

2.5 PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Oksidacija lipidov in mikrobna kontaminacija sta odločilna faktorja, ki vplivata na kvaliteto živil in njihovo obstojnost. Tako oksidacija v mesu in mesnih izdelkih povzroča razgradnjo lipidov in proteinov, kar zaporedno pripomore k spremembi okusa, vonja, arome, barve in teksture. Rast mikroorganizmov pa povzroči prezgodnje kvarjenje izdelka in ter v primeru patogenih mikroorganizmov okužbe in zastrupitve ljudi (Fernandez-Lopez in sod., 2004).

Uporaba kemijskih snovi za preprečevanje oksidacije in mikrobne kontaminacije v živilski industriji je ena izmed starejših uporabnih metod (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005a). Vendar je zaskrbljenost med potrošniki v zvezi s sintetičnimi dodatki prisilila proizvodnjo v iskanje naravnih aditivov rastlinskega izvora. Njihova uporaba je v zadnjih letih tudi močno narastla (Fernandez-Lopez in sod., 2004). Tako rastline, njihova eterična olja in izolirane aktivne snovi predstavljajo dobro in zaželjeno alternativo kemičnim konzervansom (Sasikumar, 2001).

Potrošniki zahtevajo vedno bolj varna, pestra in naravna živila, z manj dodanimi kemijskimi aditivi in funkcionalnimi lastnostmi. Tako je naloga živilske industrije zagotoviti snovno izboljšanje izdelkov, preprečiti možne okužbe z mikroorganizmi in ohraniti kakovost živil (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005a). Zdravstvene organizacije se trudijo zmanjšati porabo soli zaradi zmanjšanja verjetnosti nastanka bolezni srca in ožilja, kar pomeni, da bo za kar nekaj živil potrebno najti nove načine konzerviranja (Burt, 2004).

Kljub temu še vedno med dodatke k živilom, ki imajo največji praktičen pomen za inhibicijo rasti mikroorganizmov v mesu, mleku ter mesnih in mlečnih izdelkih, prištevamo kuhinjsko sol oz. NaCl, nitritno sol oz. NaNO₂ in nekatere začimbe (Smole Možina in Bem, 2003).

2.5.1 Rastline in rastlinski ekstrakti

Rastline in rastlinski ekstrakti imajo bogato zgodovino uporabe v zdravilstvu, prehrani, religiji in drugih namenih (Cowan, 1999), a so na žalost še ne dobro raziskan vir protimikrobnih snovi (Sasikumar, 2001). Po predvidevanjih obstaja na zemlji od 250.000 do 500.000 različnih vrst rastlin, od tega se jih relativno malo (1 – 10 %) uporablja v prehrani ljudi in živali, uporaba v zdravstvene namene pa verjetno precej večja (Cowan, 1999).

V človeškem življenju imajo zelišča in začimbe veliko vlogo kot dodatki k hrani ter alkoholnim in brezalkoholnim pijačam, saj izboljšajo senzorične lastnosti, kot so okus, aroma in barva. Pogosto se uporabljajo tudi v zdravilstvu, medicini in kozmetični industriji. Zelišča in začimbe imajo tudi pomembne antioksidativne, protimikrobne in druge bioaktivne lastnosti ter lahko pomembno dopolnijo prehransko vrednost živil (Sasikumar, 2001).

2.5.2 Protimikrobne spojine v rastlinskih ekstraktih

Rastline lahko skoraj brezmejno sintetizirajo aromatske spojine kot so fenolne spojine in njihovi oksigenirani derivati, ki služijo tudi kot obrambni mehanizem pred mikroorganizmi, insekticidi in rastlinojedim živalim (Cowan, 1999).

Cowan (1999) je rastlinske protimikrobne spojine razdelil v naslednje skupine:

- Fenoli in polifenoli
- Terpenoidi in eterična olja
- Alkaloidi
- Lektini in polipeptidi

2.5.2.1 Fenoli in polifenoli

V to skupino so uvrščeni enostavni fenoli in fenolne kisline, kinoni, flavoni, flavonoidi, flavonoli, tanini in kumarin.

Enostavni fenoli so spojine, ki so sestavljeni iz enega benzenskega obroča, na katerega je vezana najmanj ena –OH skupina in se med seboj razlikujejo glede na lego hidroksilne skupine (Cowan, 1999), vendar pa to ne vpliva močno na stopnjo protimikrobne aktivnosti

(Burt, 2004). V naravi so običajne spojine z več -OH skupinami in se zato zanje uveljavlja tudi drugo ime: polifenoli. Nahajajo se predvsem v zelenih delih rastline, koži, skorji in plodu (Araujo in sod., 2003). Med najbolj pogoste predstavnike štejemo tudi rožmarinsko kislino.

Fenolne spojine lahko razvrstimo na več načinov, vse bolj se uveljavlja kvalifikacija po številu C-atomov (Abram, 2000).

Preglednica 2-1: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000)

Število C-atomov	SKUPINA
6	Fenoli
7	Fenolne kisline
8	Fenilacetne kisline
9	Hidroksicimetne kisline Fenilpropani Kumarini Izokumarini Kromoni
10	Naftokinoni
13	Ksantoni
14	Stilbeni Antrakinoni
15	Flavonoidi
18	Lignani Neolignani
30	Biflavonoidi
n	Lignin Melanin Kondenzirani tanini

Flavanol
Flavonol
Flavon
Flavanon
Antocianidin
Izoflavon

Flavoni, flavonoidi in flavonoli so spojine zgrajene iz 15 C-atomov. Osnovno strukturo flavonoidov sestavljajo obroči, ki jih označujemo s $C_6C_3C_6$. Flavonoidi so polifenoli saj imajo več -OH skupin in jih delimo v 6 skupin (preglednica 2-1).

Glede na to, da se flavonoidi sintetizirajo v rastlini kot odgovor na infekcije, ne preseneča dejstvo, da so v številnih laboratorijskih raziskavah dokazali sposobnost delovanja proti široki paleti mikroorganizmov. Njihova učinkovitost je odvisna predvsem od njihove sposobnosti tvorbe kompleksa z zunajceličnimi proteini in celično steno ter z inaktivacijo določenih encimov (Cowan, 1999).

Kinoni so sestavljeni iz fenolnih obročev in dveh keto skupin in so pridobljeni z oksidacijo dveh hidroksilnih skupin. Reagirajo s proteini patogenih mikroorganizmov in ob tem formirajo melanoidne polimere. Tanini so polimerne fenolne spojine, ki jih dobimo s polimerizacijo kinonov. Tudi pri njih je dokazano protimikrobno delovanje. Kumarini so fenolne substance, ki nastanejo z združitvijo benzena in α -pirolnega obroča in so odgovorni za značilen vonj sena. Nekateri kumarini imajo protimikroben učinek (Cowan, 1999).

2.5.2.2 Terpenoidi in eterična olja

Eterična olja so sekundarni metaboliti rastlin in so obogatena s spojinami z izoprensko strukturo – terpeni, z osnovno zgradbo $C_{10}H_{16}$. V rastlinah se pojavljajo kot diterpeni, triterpeni in tetraterpeni. Terpeni ali terpenoidi (vsebujejo tudi druge kemijske elemente, najpogosteje kisik) imajo protimikrobno delovanje. Mehanizem delovanja eteričnih olj še ni povsem pojasnjen, domnevajo pa, da so v membranski razkroj vključene lipidne komponente. Terpeni so sintetizirani iz acetatnih enot in kot taki imajo lastnosti maščobnih kislin (Cowan, 1999).

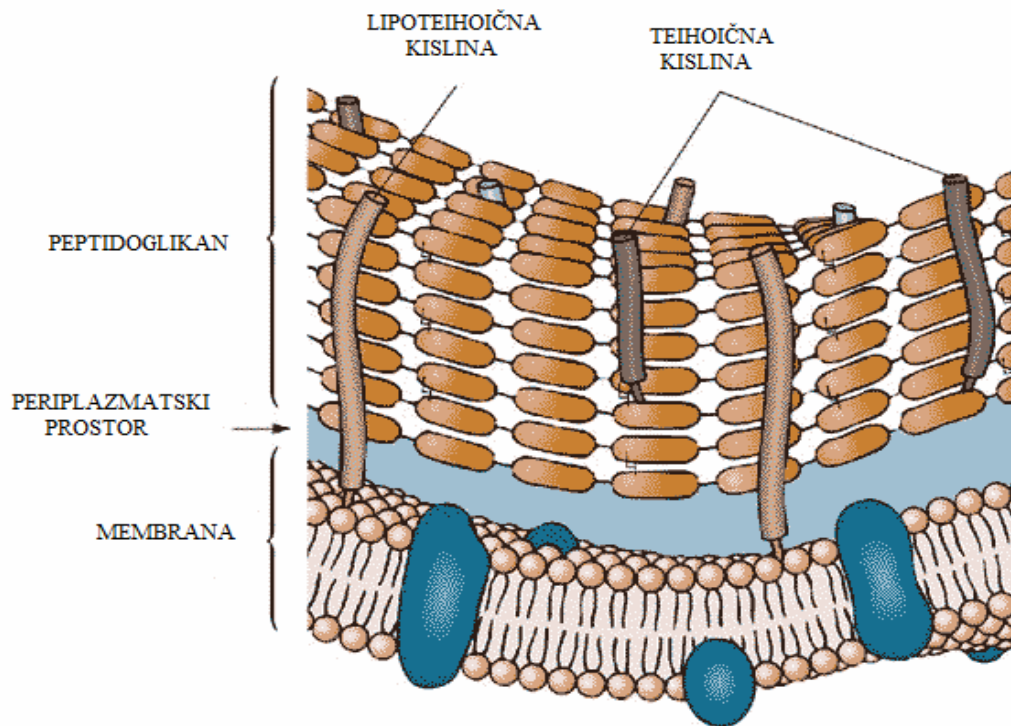
Glavne rastlinske komponente s protimikrobno aktivnostjo so fenolne spojine (Cowan, 1999). Vsebnost fenolnih spojin je odvisna od vrste rastline, kultiviranja, rastišča (vsebnost hranilnih snovi v zemlji), podnebnih razmer, geografske lege ter od načina predelave (Hakkinen in sod., 1999).

2.5.3 Mehanizem delovanja fenolnih spojin na bakterijske celice

Čeprav so poznali protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov že v preteklosti, je bilo o mehanizmu delovanja povedano zelo malo. Glede na ogromno število kemijskih sestavin prisotnih v rastlinah, bi lahko trdili, da obstaja več načinov, kako do tarčnih mest na celici. Učinek je odvisen od rodu in vrste bakterij, saj imajo hidrofobne spojine omejen učinek na Gram negativne bakterije. Lipopolisaharidna membrana namreč omeji njihov prehod v notranjost bakterijske celice (Davidson in Branen, 2005).

Gram pozitivne bakterije, kot so bakterije rodu *Listeria*, imajo debelo rigidno celično steno, sestavljeno iz peptidoglikana (mureina) in teihoične kisline. Peptidoglikan zagotavlja trdnost celične stene in je hkrati glavna sestavina celične stene (20 – 80 nm) Gram pozitivnih bakterij, medtem ko je pri Gram negativnih bakterijah le ena od številnih komponent celične stene (5 – 10 nm).

Peptidoglikan je sestavljen iz *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki se izmenjajoče ponavljata v nekaj desetih kopijah, kar tvori dolg linearen filament. Več teh filamentov je med seboj povezanih s peptidi, ki dajejo trdnost celični steni. To trdnost pa še dodatno utrjuje teihoična kislina, ki je sestavljena iz polimerov glicerola, fosfatov in sladkornega alkohola ribitola. Kadar je na teihoično kislino vezan lipid, nastane lipoteihoična kislina (Madigan in sod., 1997).



Slika 2-3: Zgradba celične stene Gram pozitivnih bakterij (Madigan in sod., 1997)

Fenolne spojine vplivajo na bakterijsko rast in njen metabolizem. Zaradi svoje hidrofobnosti povzročajo poškodbe celične membrane, membranskih proteinov in s tem povečanje njene permeabilnosti in odpuščanje znotrajcelične vsebine (Ouattara in sod., 1997). To privede do izgubljanja protonskega gradienta na membrani, prepreči se transport elektronov in aktivnega transporta, kar na koncu privede do celične smrti (Burt, 2004).

2.6 ROŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je zimzelen grm iz družine ustnatic, doma iz Sredozemlja (Pantić-Starič, 1985). Gojijo ga v Španiji, na Portugalskem, Franciji, Dalmaciji, tudi v Nemčiji in drugih delih Evrope ter celo v Kaliforniji. Močno razvejan in gosto olistan, aromatičen rožmarinov grm lahko zraste do 2 metra visoko, vendar je običajno precej nižji. Usnjati, od 1 do 3 cm dolgi suličasti listi brez pecljev imajo navznoter zavite robove. Na zgornji strani so temno zeleni, spodaj pa dlakavi in belkasti. Rožmarin cveti z malimi bledomodrimi ali belimi cvetovi, razvrščenimi na zgornjih delih vejic v navideznih vretencih. Cenjen je tudi kot medonosna rastlina (Nussdorfer N., 1991).



Slika 2-4: Rožmarin (SAT Group, 2006)

2.6.1 Kemijska sestava rožmarina

Kemijska sestava rožmarina varira glede na sorto, klimo, sestavo tal, od letnega časa pobiranja, od agrotehničnih metod in nenazadnje tudi od sestave ekstraktov ter od načina in razmer izvedbe ekstrakcije (Ibanez in sod., 1999; Ouahada, 2000; Porte in sod., 2000; Guazzi in sod., 2001).

Rožmarin je v zadnjem času zanimiv predvsem zaradi svojega antioksidativnega in protimikrobnega delovanja. Glavne komponente rožmarina so: eterična olja, flavonoidi, fenolne kisline, diterpeni, triterpeni, maščobe, ogljikovi hidrati, pepel, prehranske vlaknine, proteini in voda (Araujo in sod., 2003; Del Bano in sod., 2003; Angioni in sod., 2004; Almela in sod., 2006).

2.6.1.1 Eterična olja

Eterično olje je zmes različnih aromatičnih snovi, ki se v splošnem lahko razdeli na hlapno in nehlapno frakcijo. Nehlapno frakcijo predstavljajo različni ogljikovodiki, maščobne kisline, steroli, karotenoidi, voski, kumarini (Luque de Castro in sod., 1999). V večjem delu pa ga sestavljajo: 1,8-cineol (30 – 40%), kamfor (15 – 25 %), borneol (16 – 20 %), bornil acetat (do 7 %), α -pinen (25 %) kot tudi β -pinen, ki so hlapne komponente odgovorne za aromo (Sasikumar, 2001).

Rožmarinova eterična olja navadno pridobivajo s pomočjo destilacije s paro, vodo in v zadnjem času se vse več uporablja tudi superkritična tekočinska ekstrakcija z uporabo CO₂ kot topilom (Del Campo in sod., 2000; Sasikumar, 2001). Večino olja (90 %) pridobijo v prvih 60 minutah destilacije. Destilacija se kljub temu nadaljuje še približno 120 minut, v katerih se pridobi še 10 % preostalega olja. Olje pridobljeno iz listov oz. zgornjih cvetov je boljše kakovosti kot olje pridobljeno iz celotne rastline (Sasikumar, 2001).

Za ekstrakcijo ostalih aktivnih komponent rožmarina se uporablja konvencionalna solventna ekstrakcija, kjer se uporabljajo organska topila kot so heksan, benzen, etilen, kloroform, dioksan in metanol, destilacija in superkritična tekočinska ekstrakcija z uporabo CO₂. Slednja je kakovostnejša, saj omogoča pridobivanje maksimalno čiste oblike karnozolne kisline (Sasikumar, 2001).

Ekstrakti rožmarina pridobljeni s pomočjo tekočinske ekstrakcije pod superkritičnimi pogoji so boljši v pogledu antioksidativnega potenciala od ekstraktov rožmarina pridobljenih s pomočjo etanola ali heksana, saj se z milejšimi pogoji izognemo oksidaciji oz. degradaciji željenih fenolnih komponent. Prav tako se pri ekstrakciji s pomočjo heksana in etanola ne moremo izogniti ekstrakciji klorofila, kar lahko močno omeji uporabo takšnega ekstrakta v živilstvu (Ramirez in sod., 2004; Carvalho, 2005).

Svež rožmarinov list vsebuje približno 1 % olja, medtem ko listom, ki so bili predhodno posušeni v senci, naraste vsebnost olja tudi do 3 %. Tako na en hektar zemlje pridelajo približno od 10 do 12 t zelišč letno, kar prinese od 25 do 100 kg olja (Sasikumar, 2001).

2.6.1.2 Druge sestavine rožmarinskih ekstraktov

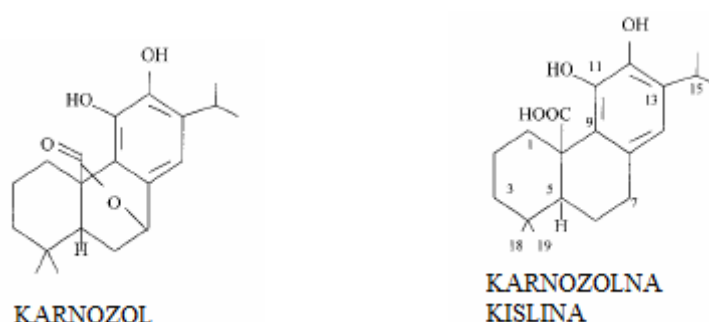
Poleg eteričnega olja rožmarina so zanimive tudi druge snovi. Cuvelier in sod. (1996) so na podlagi raziskav, v katere so vključili 24 različnih ekstraktov rožmarina, razvrstili fenolne spojine v tri skupine glede na polarnost:

- **Fenolni diterpeni** (karnozolna kislina, karnozol, metil karnozat, epiizorožmanol, rožmanol, epirožmanol, epirožmanol-metil eter, rožmadial)

Karnozol in karnozolna kislina predstavljata največji delež med fenolnimi diterpeni v listih rožmarina in sta najpomembnejši komponenti v rožmarinskem ekstraktu. Diterpeni so v celici locirani v kloroplastu, endoplazmatskem retikulumu, golgijevem aparatu in plazmalemi in imajo v rastlini vlogo regulatorjev, ki delujejo kot odgovor na različne poškodbe, vlogo fotosintetskih pigmentov, hormonov (giberelini) in protimikrobno delujočih spojin. V eteričnem olju karnozola in karnozolne kisline ni mogoče določiti (Munne-Bosch in sod.,

2000; Munne-Bosch in Alegre, 2001). Topna sta v polarnih topilih, kot so metanol, etanol in aceton, deloma tudi v vodi. Karnozolna kislina se v polarnih topilih oksidira v druge fenolne komponente, med katerimi so najpomembnejše karnozol, rožmanol, epirožmanol, 7-metilepirožmanol in metil karnozat (Del Bano in sod., 2003). Tako je karnozol poznan kot lakton karnozolne kisline s podobnim delovanjem, vendar pa ima kot samostojna komponenta manjši protimikrobni učinek (Del Campo in sod., 2000).

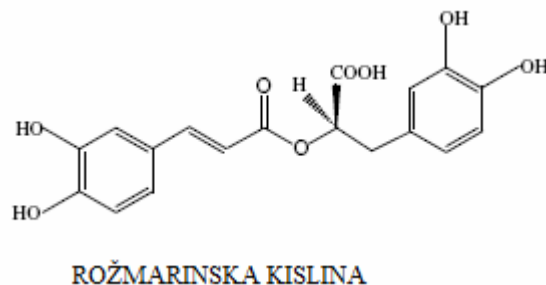
Poleg dokazanega protimikrobnega učinka sta karnozol in karnozolna kislina priznana tudi kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem, saj imata sposobnost vezave prostih radikalov (Ibanez in sod., 2003). 90 % antioksidativne aktivnosti so pripisali karnozolu in karnozolni kislini, ki so ju ekstrahirali iz listov rožmarina (Lo in sod., 2002). Poleg tega delujeta antikancerogeno in antimutageno (ščitita pred kromosomskimi poškodbami, ki jih povzročajo γ -žarki) (Del Bano in sod., 2006).



Slika 2-5: Strukturna formula karnozolne kisline in karnozola (Munne-Bosch in Alegre, 2001)

- **Fenolne kisline** (rožmarinska kislina in kavna kislina)

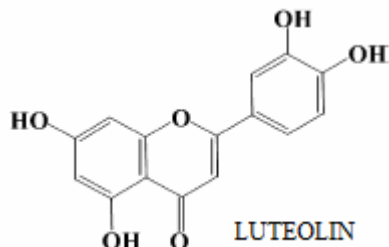
Rožmarinska kislina je fenolna spojina, ki jo ekstrahiramo iz rožmarina. Ker je vodotopna sestavina, jo pridobivamo s pomočjo vodne ekstrakcije. Zgrajena je iz dveh fenolnih obročev, med katerima sta karbonilna in karboksilna skupina. Vsak obroč vsebuje tudi po dve hidroksilni skupini. Je značilna fenolna kislina, ki je poleg karnozolne kisline in karnozola odgovorna za protimikrobno delovanje (Shetty in Lin, 2006; Tepe in sod., 2006).



Slika 2-6: Strukturna formula rožmarinske kisline (Baskan in sod., 2007)

- **Flavonoidi** (apigenin, rutin, diosmin, genkvanin, luteolin in derivati)

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15-C atomov. Do sedaj poznamo že več kot 5000 različnih flavonoidov. V rastlinah so rdeči, beli, rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin in jih uvrščamo med antioksidante. So grenkega okusa, zato odganjajo parazite. Zaradi zmožnosti absorpcije UV-svetlobe, delujejo kot zaščita rastlin pred vplivi UV-žarkov (Abram, 2000; Korošec, 2000).



Slika 2-7: Strukturna formula luteolina (Zhang in sod., 2007a)

2.6.2 Protimikrobno delovanje rožmarina

Rožmarin je v zadnjem obdobju zanimiv predvsem zaradi bogatega vira fenolnih komponent, ki imajo visoko antioksidativno in protimikrobno delovanje. Moreno in sod. (2006) poročajo, da ekstrakcija z metanolom ali acetonom vpliva na visoko protimikrobno aktivnost proti Gram pozitivnim kot tudi Gram negativnim bakterijam in kvasovkam, saj ekstrakt vsebuje veliko koncentracijo karnozolne kisline in karnozola. Na drugi strani pa vodna ekstrakcija, s katero pridobivamo samo rožmarinsko kislino, kaže na nizko protimikrobno delovanje predvsem na Gram negativne bakterije. Rezultati so pokazali, da so karnozolna kislina in njeni derivati glavne komponente ekstrakta rožmarina s protimikrobnim delovanjem.

Protimikroben učinek rastlinskih olj oz. ekstraktov je pričakovano odvisen od kemijske sestave prisotnih komponent, razmerja komponent in interakcije med njimi. Zato prihaja do različnih učinkov, ki imajo lahko boljše (sinergistično) ali slabšo (antagonistično) protimikrobno delovanje kot njihova glavna protimikrobna snov. Rastlinski ekstrakti torej niso enaki čistim izoliranim snovem (Burt, 2004).

Možni sinergizmi z rastlinskimi ekstrakti so nizek pH, nizka a_w vrednost, manjša koncentracija kisika, povišana temperatura, povečan tlak. Tako je bilo dokazano sinergistično delovanje heterogene zmesi ekstrakta žajblja ter nekaterih vrst timijana in origana (Burt, 2004).

2.6.3 Uporaba v živilstvu

Rožmarin je eden izmed najbolj učinkovitih zelišč, s široko uporabo v prehranbeni industriji. Že od nekdaj se uporablja kot začimba, ki se odlično poda k mesnim in ribjim jedem, v novejšem času, pa se pogosto uporablja tudi kot antioksidant in kot sredstvo, ki preprečuje prezgodnje kvarjenje živil (Sasikumar, 2001).

Žal pa je uporaba rožmarina kot antioksidativno in protimikrobno sredstvo v živilih pogosto omejena zaradi organoleptičnih sprememb, ki jih povzroča in je tako najpogosteje vezan na uporabo v mesnih izdelkih (Pandit in Shelef, 1994).

Fernandez-Lopez in sod. (2005) so dokazali inhibitorno delovanje ekstrakta rožmarina na bakterije vrste *L. monocytogenes* z metodo difuzije v trdno gojišče, ne pa tudi v aseptično pripravljenih mesnih kroglicah. Do sedaj je bilo opravljeno veliko število laboratorijskih *in vitro* poskusov, in žal zelo majhno število poskusov v živilih (Sasikumar, 2001; Burt, 2004).

2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

In vitro metode določanja protimikrobne aktivnosti snovi lahko razdelimo med difuzijske, razredčevalne in bioavtografske (Burt, 2004). Izbira metode je odvisna od mnogih zahtev, kot so občutljivost metode, enostavnost izvedbe, možnost avtomatizacije metode, fleksibilnost (Woods in Washington, 1999). Na končni rezultat testa pa vplivajo mnogi drugi dejavniki: vrsta ekstrakta, metode ekstrakcije protimikrobnih snovi, volumen inokuluma, faza rasti, uporabljeno gojišče, pH gojišča, čas inkubacije in temperatura (Burt, 2004).

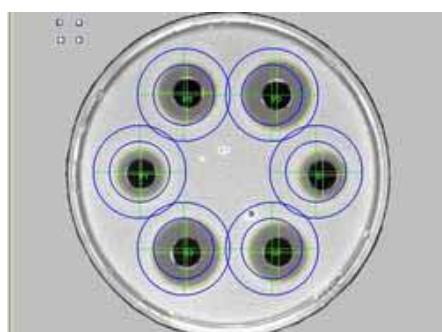
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je navadno najpogosteje uporabljeno merilo v raziskavah za določanje protimikrobnega učinka snovi. Definicija MIC se med avtorji nekoliko razlikuje, zato je rezultate različnih raziskav težko primerjati med seboj (preglednica 2-2). V nekaterih primerih za določanje protimikrobne aktivnosti snovi uporabljajo tudi minimalno baktericidno koncentracijo (MBC) ali bakteristatično koncentracijo. Oba izraza sta določena blizu vrednosti MIC (Burt, 2004).

Preglednica 2-2: Pregled pojmov pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004)

POJEM	RAZLAGA	referenca
Minimalna inhibitorna koncentracija - MIC	<p>1. najmanjša koncentracija snovi, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost inokuluma</p> <p>2. najmanjša koncentracija snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur</p> <p>3. najmanjša koncentracija, ki prepreči vidno rast izbranega mikroorganizma</p> <p>4. najmanjša koncentracija, ki povzroči značilno zmanjšanje živosti izbranega mikroorganizma (> 90 %)</p>	<p>(Carson in sod., 1995)</p> <p>(Cannilac in Mourey, 2001; Wan in sod., 1998)</p> <p>(Delaquis in sod., 2002; Hammer in sod., 1999; Karapinar in Aktug, 1987; Onawunmi, 1989)</p> <p>(Cosentino in sod., 1999)</p>
Minimalna baktericidna koncentracija - MBC	<p>1. koncentracija izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila inokuluma</p> <p>2. najmanjša koncentracija, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti</p>	<p>(Cannilac in Mourey, 2001; Carson in sod., 1995; Cosentino in sod., 1999)</p> <p>(Onawunmi, 1989)</p>
Bakteristatična koncentracija	1. najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov, se pa razmnožujejo po precepljanju na sveže gojišče	(Smith-Palmer in sod., 1998)
Baktericidna koncentracija	1. najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov in ti ne rastejo niti po precepljanju na sveže gojišče	(Smith-Palmer in sod., 1998)

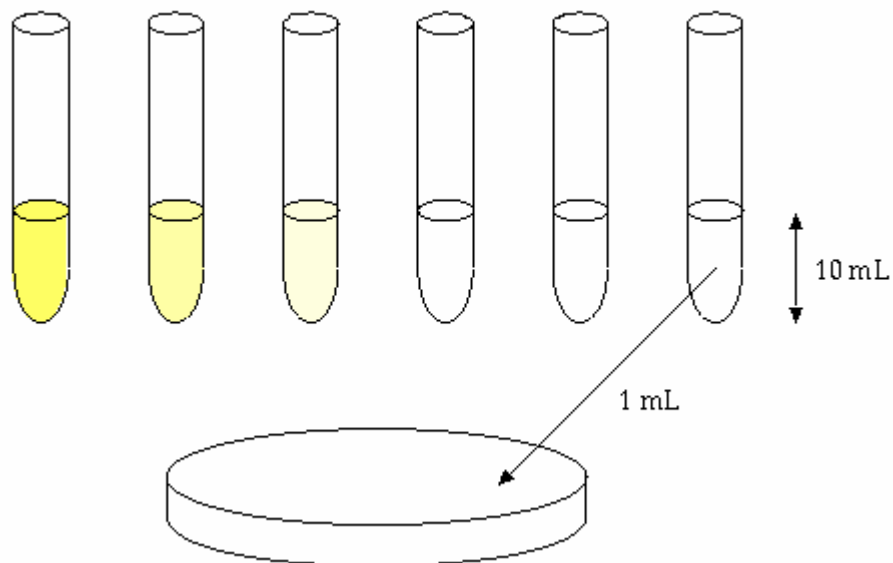
Legenda: krepko sta označeni tisti razlagi, ki smo ju v raziskovalnem delu uporabili za definicijo.

Odkar obstaja direktna povezava med izmerjeno inhibicijsko cono in MIC, je najpogosteje uporabljena metoda za preiskovanje vzorcev na protimikrobno aktivnost, metoda difuzije v agarju, ki je izvedljiva z diski ali luknjicami (Woods and Washington, 1999). V predhodno inokulirani agar naredimo luknjico oz. položimo papirnati disk, kamor naneseemo ustrezno količino protimikrobnega sredstva, ki tekom inkubacije pri ustrezni temperaturi difundira v agar. Z naraščanjem nastale inhibicijske cone, narašča protimikrobna učinkovitost dodane snovi. Metoda je tehnično lahko izvedljiva in dobro ponovljiva (Woods and Washington, 1999; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005b).



Slika 2-8: Prikaz inhibicijskih con nastalih pri metodi difuzije v agarju (VMT Vision Machine Technic, 2007)

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je široko uporabna in zanesljiva referenčna metoda za določanje učinkovitosti protimikrobnih snovi. Podobno kot difuzijska metoda v agarju je lahko izvedljiva, fleksibilna, z dobro ponovljivostjo. Rast spremljamo v tekočem gojišču. Iz vzorcev, v katerih ni vidne rasti (ni motnosti), prenesemo 1 ml na petrijeve plošče in prelijemo z neselektivnim gojiščem. Ta metoda nam omogoča določitev MBC, ki jo definiramo kot tisto koncentracijo, pri kateri preživi samo 0,1 % testnih organizmov (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005b).

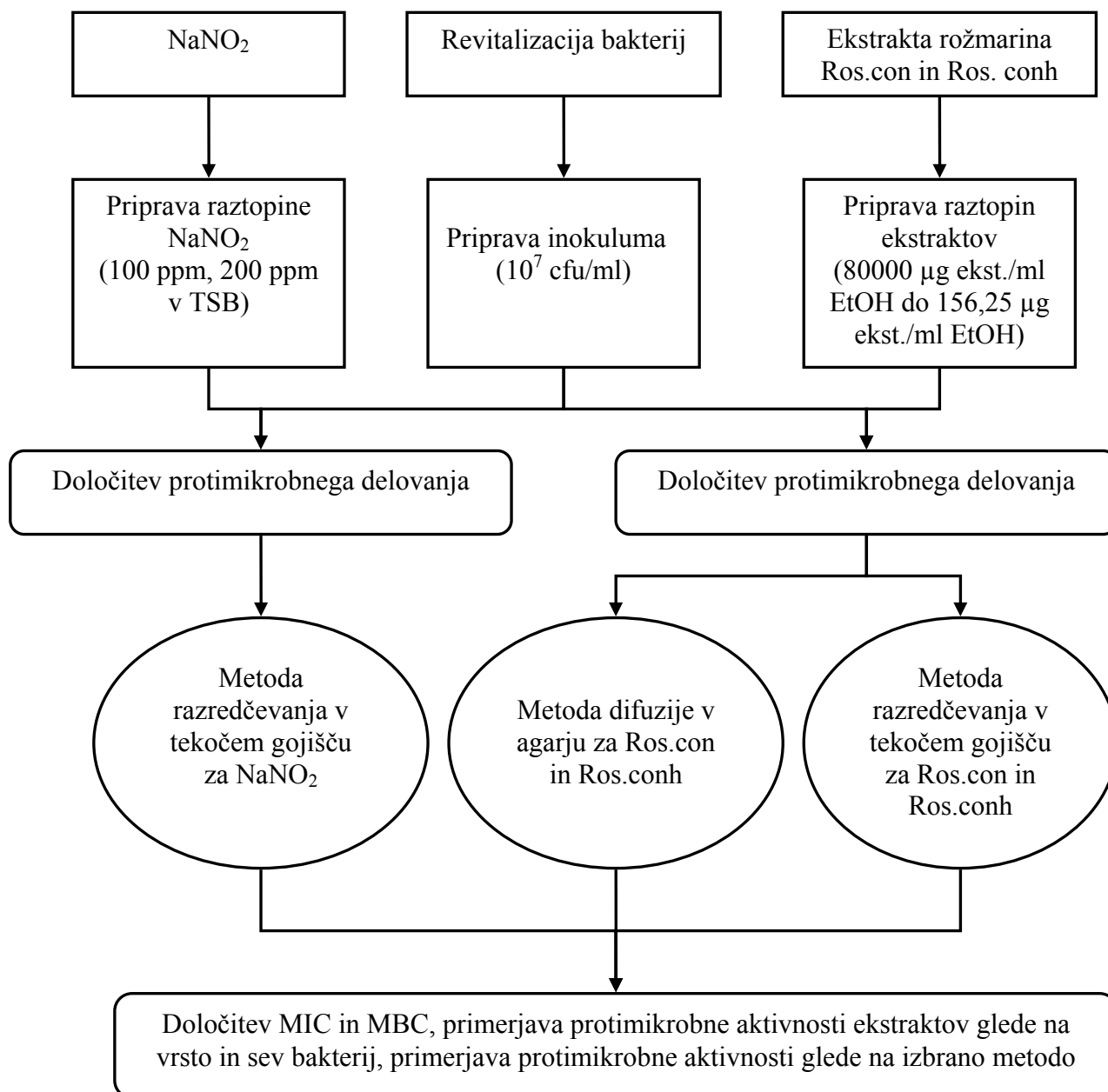


Slika 2-9: Prikaz postopka metode razredčevanja v tekočem gojišču

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil proučiti protimikrobno učinkovitost ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh ter raztopine NaNO₂ na izbrane vrste bakterij v rodu *Listeria* in bakterije vrst *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ter seva *Salmonella* Infantis. Potek raziskovalnega dela je shematsko prikazan na sliki 3-1.



Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela

Legenda: **ekst**: ekstrakt; **MIC**: minimalna inhibitorna koncentracija; **MBC**: minimalna baktericidna koncentracija

Preizkusili smo dve različni metodi ugotavljanja protimikrobne aktivnosti ekstraktov in NaNO₂ in ju uporabili za določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) in minimalne baktericidne koncentracije (MBC).

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 11 sevov bakterij rodu *Listeria* in po 1 sev bakterij *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Salmonella* Infantis (preglednica 3-1).

Preglednica 3-1: Bakterijski sevi

OZNAKA SEVA	VIR SEVA
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ91	S1 (R2S)
<i>Listeria grayi</i> ŽM66	nemški referenčni sev
<i>Listeria innocua</i> ŽM68	pečenica
<i>Listeria ivanovii</i> ŽM65	nemški referenčni sev 5
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM51	nemški referenčni sev 1/2a
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM52	nemški referenčni sev 1/2b
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM53	nemški referenčni sev 1/2c
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58	nemški referenčni sev 4b
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM80	humani izolat
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM92	piščančja solata
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM108	pašteta
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM115	tatarski biftek
<i>Salmonella</i> Infantis ŽM9	piščančje meso
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATCC 25923

Legenda: **ATCC**: tipski sev zbirke American Type Culture Collection; **ŽM**: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete; **ŽMJ**: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Selektivna gojišča

Gojišče ALOA

Sestavine:

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

Priprava:

35,3 g gojišča ALOA raztopimo v 500 ml destilirane vode, dobro premešamo in steriliziramo v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji ohladimo gojišče na 45 °C, dodamo selektivni dodatek ALOA ter 5 ml 96 % etanola in sterilne destilirane vode v razmerju 1:1. Tako pripravljeno gojišče razlijemo v sterilne petrijevke.

Gojišče Bacillus cereus

Sestavine:

- Bacillus cereus agar base (PEMBA) (Biolife, 4011122, Italija)
- Dodatek Egg yolk emulsion, 50 % (Biolife, 42111601, Italija)
- Antibiotik Bacillus cereus ant. suppl. (Biolife, 4240001, Italija)

Priprava:

20,5 g gojišča Bacillus cereus agar raztopimo v 470 ml destilirane vode, dobro premešamo in steriliziramo v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji ohladimo gojišče na 45 °C, dodamo 25 ml jajčne emulzije (50 %) in 5 ml antibiotika Bacillus cereus. Tako pripravljeno gojišče razlijemo v sterilne petrijevke.

Gojišče XLD

Sestavine:

- XLD agar

Priprava:

28 g gojišča XLD agar raztopimo v 500 ml destilirane vode. Mešanico segrevamo 15 minut pri temperaturi 100 °C.

Gojišče BP

Sestavine:

- Baird-Parker agar base (Biolife, 4011162, Italija)
- Dodatek Egg yolk tellurite emulsion, 50 % (Biolife, 42111602, Italija)

Priprava:

29 g gojišča raztopimo v 475 ml destilirane vode, dobro premešamo in steriliziramo v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji ohladimo gojišče na 45 °C in dodamo 25 ml jajčnega dodatka.

3.2.2.2 Neselektivna gojišča

Gojišče TSA

Sestavine:

- triptični soja agar (TSA) (Oxoid, CM0131, Anglija)
- di-kalij-hidrogenfosfat (K_2HPO_4) (Kemika, 0705007, Hrvaška)
- D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška)
- Kvasni ekstrakt (Biolife, 412220, Italija)

Priprava:

V 1000 ml steklenico zatehtamo 1,25 g K_2HPO_4 , 1,25 g D-(+)- glukoze in 3 g gojišča TSA. Mešanico raztopimo v 500 ml destilirane vode. Sledi 20 minutna sterilizacija pri temperaturi

121 °C. Tako pripravljeno gojišče do uporabe hranimo v inkubatorju na temperaturi 45 °C ali pa aseptično razlijemo v sterilne petrijevke in ga hranimo v hladilniku.

Gojišče TSB

Sestavine:

- Triptični soja bujon (TSB) (Oxoid, CM0129, Anglija)

Priprava:

V 1000 ml steklenico zatehtamo 15 g gojišča TSB. Dodamo 500 ml destilirane vode in dobro premešamo. Steriliziramo 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Gojišče BHI

Sestavine:

- Brain Heart Infusion broth (BHI) (Merck, 1.10493.0500, Nemčija)

Priprava:

V 1000 ml steklenico zatehtamo 19 g gojišča BHI in dodamo 500 ml destilirane vode in dobro premešamo. Steriliziramo 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- KH_2PO_4 (Kemika, 11161, Hrvaška)

Priprava:

3,4 g KH_2PO_4 raztopimo v 100 ml destilirane vode (pH = 7,2). 1,25 ml te raztopine razredčimo v 1000 ml destilirane vode. Dobro premešamo in steriliziramo v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem

3.2.3.1 Ekstrakti rožmarina

Sestavine:

- Ekstrakt rožmarina Ros.con, ki vsebuje 22,04 % karnozolne kisline (Vitiva, Slovenija)
- Ekstrakt rožmarina Ros.conh, ki vsebuje 40,49 % karnozolne kisline (Vitiva, Slovenija)
- Absolutni etanol (Merck, 2.00983.1000, Nemčija)

Priprava:

Osnovno 16 % raztopino ekstraktov Ros.con in Ros.conh smo pripravili tako, da smo v epruveto zatehtali 0,320 g ustreznega ekstrakta in mu dodali 2 ml absolutnega etanola in mešali na vrtničnem mešalu dve do tri minute, dokler se ekstrakt v etanolu ni popolnoma raztopil. Osnovno raztopino smo uporabili za nadaljne razredčitve. Pripravljene 16 % raztopine ekstraktov Ros.con in Ros.conh sta vsebovali 3,526 % in 6,478 % karnozolne kisline.

3.2.3.2 Natrijev nitrit

Sestavine:

- NaNO_2 (Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover, 31443, Nemčija)

Pripravili smo naslednje raztopine NaNO₂:

- 0,004 g NaNO₂/ml destilirane vode

V 100 ml bučko smo zatehtali 0,4 g NaNO₂ in dodali destilirano vodo do oznake. Vsebino smo dobro premešali, tako da se je nitrit v vodi popolnoma raztopil. 0,5 ml vzorca smo prenesli v tekoče gojišče TSB (9 ml) in tako dosegli končno koncentracijo 200 ppm (200 µg NaNO₂/ml TSB).

- 0,002 g NaNO₂/ml destilirane vode

V 100 ml bučko smo zatehtali 0,2 g NaNO₂ in dodali destilirano vodo do oznake. Vsebino smo dobro premešali, tako da se je nitrit v vodi popolnoma raztopil. 0,5 ml vzorca smo prenesli v tekoče gojišče TSB (9 ml) in tako dosegli končno koncentracijo 100 ppm (100 µg NaNO₂/ml TSB).

3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- Etanol 96 % - EtOH (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)
- Absolutni etanol – EtOH (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)
- Glicerol (Kemika, 0711901, Hrvaška)
- Raztopina oksitetraciklina - OTC (Krka, 743054, Slovenija)
- Filtri za enkratno uporabo s porami velikosti 0,2 µm (Sartorius, 16534, Nemčija)
- Diski premera 6 mm (BD, 231039, Francija)

3.2.5 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu, so navedene v preglednici 3-2.

Preglednica 3-2: Laboratorijska oprema

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Avtomatske pipete in nastavki	P10, P100, P1000 (10 µl, 100 µl, 1000 µl) Labsystems, 4500 (5 ml)	Gilson, Francija Finnpipete
Tehtnica	Sartorius analytic	Nemčija
Digitalna tehtnica	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Zmrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Vrtinčno mešalo	Vibromix 104EV	Tehtnica, Slovenija
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Spektrofotometer	PU 8620	Philips, Nizozemska
Plinski gorilnik	/	/
Optični čitalec	ScanPrisa 1240 UT	Acer, Tajvan
Injekcijske brizgalke	DVR - 5000	Syrgine, Belgija

Poleg aparaturne opreme, ki so navedene v preglednici 3-2, smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: cepilne zanke, Eppendorfove mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija), petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice – 100 ml, 250 ml, 1000 ml (Duran, Nemčija), merilni valji (Plastibrand, Nemčija), pipetor (Eppendorf, easypet, Nemčija), parafilm (PM 992, American National Can), pincete, steklovino in programsko opremo: Microsoft Office, Corel Draw (verzija 12).

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Izolati bakterij so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kot suspenzije glicerola (0,15 ml) in kulture (0,85 ml v bujonu BHI). Vsak izolat smo prenesli v 9 ml bujona BHI in vsebino premešali na vrtničnem mešalu. Sledila je 24-urna inkubacija na stresalniku (100 obratov/minuto) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Priprava inokuluma

En ml 24-urne bakterijske kulture rodu *Listeria* v bujonu BHI (točka 3.3.1) smo prenesli v sterilno petrijevo ploščo, prelili s selektivnim gojiščem ALOA in gojišče 24 ur inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na gojišču ALOA so zrastle za listerije značilno modro zeleno obarvane kolonije. V svež sterilen bujon BHI (9 ml) smo nato s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz gojišča ALOA, vsebino smo premešali na vrtničnem mešalniku in suspenzijo 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubaciji smo 1 ml kulture prenesli v prazno, sterilno petrijevko in dodali 15 ml stopljenega in na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohlajenega gojišča TSA. Kulturo smo vmešali v gojišče in petrijevke 24 ur inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo eno zrastle kolonije iz gojišča TSA prenesli v bujon TSB (9 ml), premešali na vrtničnem mešalu in 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava inokuluma bakterij rodu *Salmonella* in bakterijskih vrst *B. cereus* in *Staph. aureus* se je od priprave inokuluma listerij razlikovala v izbiri selektivnega gojišča. Za pripravo čiste kulture salmonel smo uporabili gojišče XLD, za bakterije vrste *B. cereus* gojišče BC in za bakterije vrste *Staph. aureus* gojišče BP.

Tako smo pripravili vse čiste kulture bakterij v bujonu TSB. Predvidevali smo, da so bakterije zrastle do koncentracije 10^8 cfu/ml. Za določitev točnega števila celic smo uporabili metodo štetja kolonij na trdem gojišču (poglavje 3.3.5).

Bakterijske kulture smo tekom raziskovalnega dela vsak teden znova precepili na novo gojišče TSA, inkubirali 24 ur pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter nato kulturo na gojišču hranili v hladilniku.

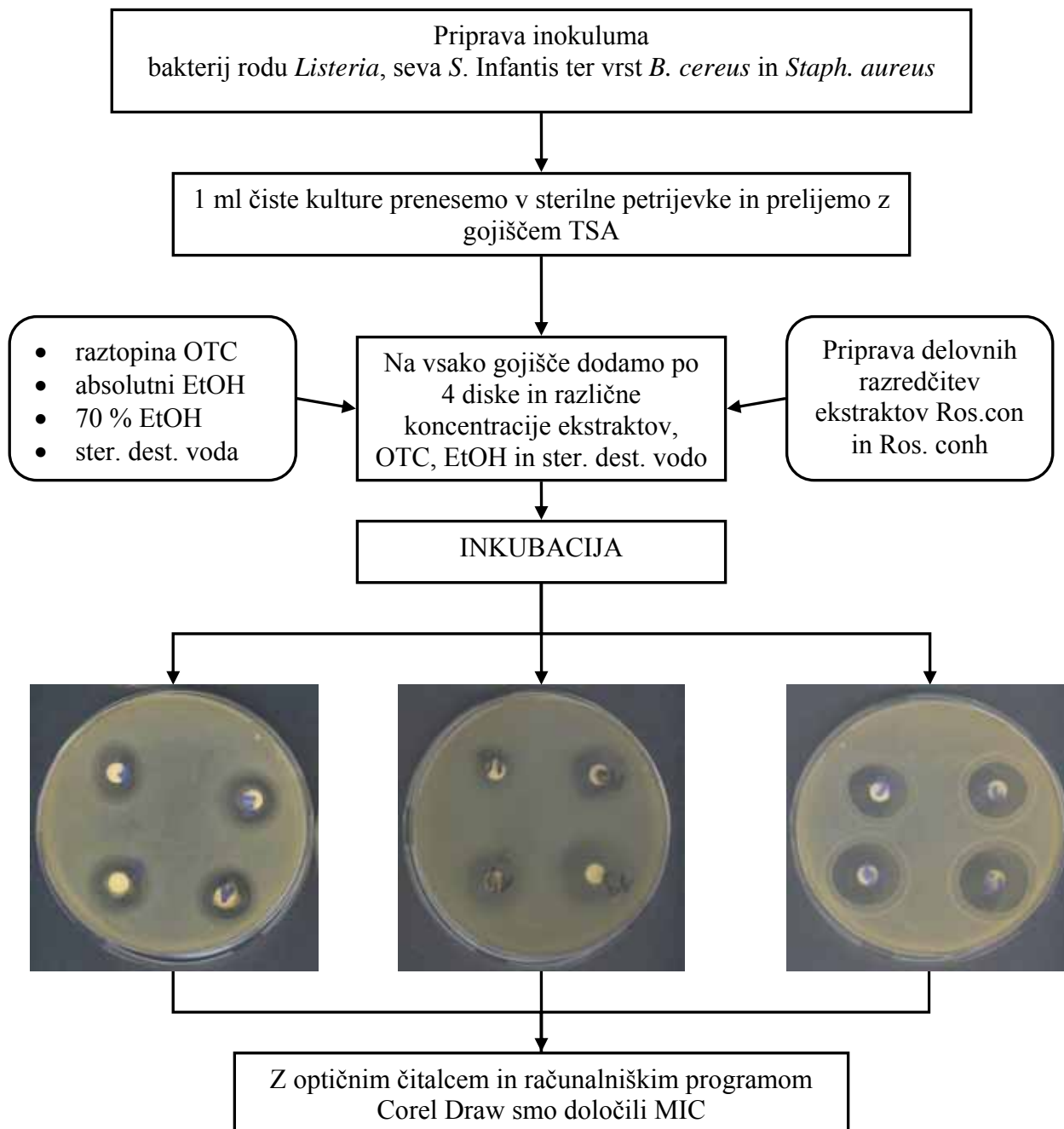
3.3.3 Metoda difuzije v gojišču TSA

3.3.3.1 Uporabljen material

- Triptični soja agar TSA
- Etanol 70 %
- Absolutni etanol
- Oksitetraciklin (OTC)
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije ekstraktov rožmarina
- Čista kultura bakterij
- Fiziološka raztopina

3.3.3.2 Izvedba metode

Z metodo difuzije v gojišču TSA smo hoteli preveriti protimikrobni učinek ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh na bakterije rodu *Listeria* ter na bakterije vrst *B. cereus*, *Staph. aureus* in seva *S. Infantis*. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-2.



Slika 3-2: Shema določanja MIC z metodo difuzije v gojišču TSA

Legenda: **EtOH**: etanol; **OTC**: oksitetraciklin; **inkubacija**: 24-urna inkubacija pri temperaturi 37°C; **MIC**: minimalna inhibitorna koncentracija; **ster. dest. voda**: sterilna destilirana voda

Iz osnovne 16 % raztopine ekstraktov Ros.con in Ros.conh smo pripravili seriji desetkratnih razredčitev ekstraktov v absolutnem etanolu do koncentracije 0,0156 %.

En ml inokuluma čiste kulture smo inokulirali v sterilno petrijevko, prelili s stopljenim in na 45 °C ohlajenim gojiščem TSA in previdno premešali. Ko se je gojišče strdilo, smo v obliki kvadrata v primernih presledkih namestili po štiri diske na eno gojišče. Na vsak disk smo dodali 10 µl delovnih koncentracij ekstraktov rožmarina. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili antibiotik OTC, kot negativno kontrolo pa sterilno destilirano vodo, preverili pa smo tudi učinek absolutnega etanola in 70 % etanola. Petrijeve plošče smo 24 ur inkubirali pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo odčitali cone inhibicije rasti tako, da smo z optičnim čitalcem izgled gojišča z diski prenesli v digitalno obliko in z računalniškim programom Corel Draw natančno izmerili polmere inhibicijskih con. Rezultate meritev smo uporabili kot merilo za določitev protimikrobne aktivnosti posamezne koncentracije ekstrakta in za določitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC). Vse poskuse smo izvajali v dveh paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje le teh.

3.3.4 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB

3.3.4.1 Uporabljen material

- Triptični soja bujon TSB
- Triptični soja agar TSA
- Čista kultura bakterij (*L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM115)
- Različne koncentracije ekstraktov rožmarina
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Sterilna destilirana voda

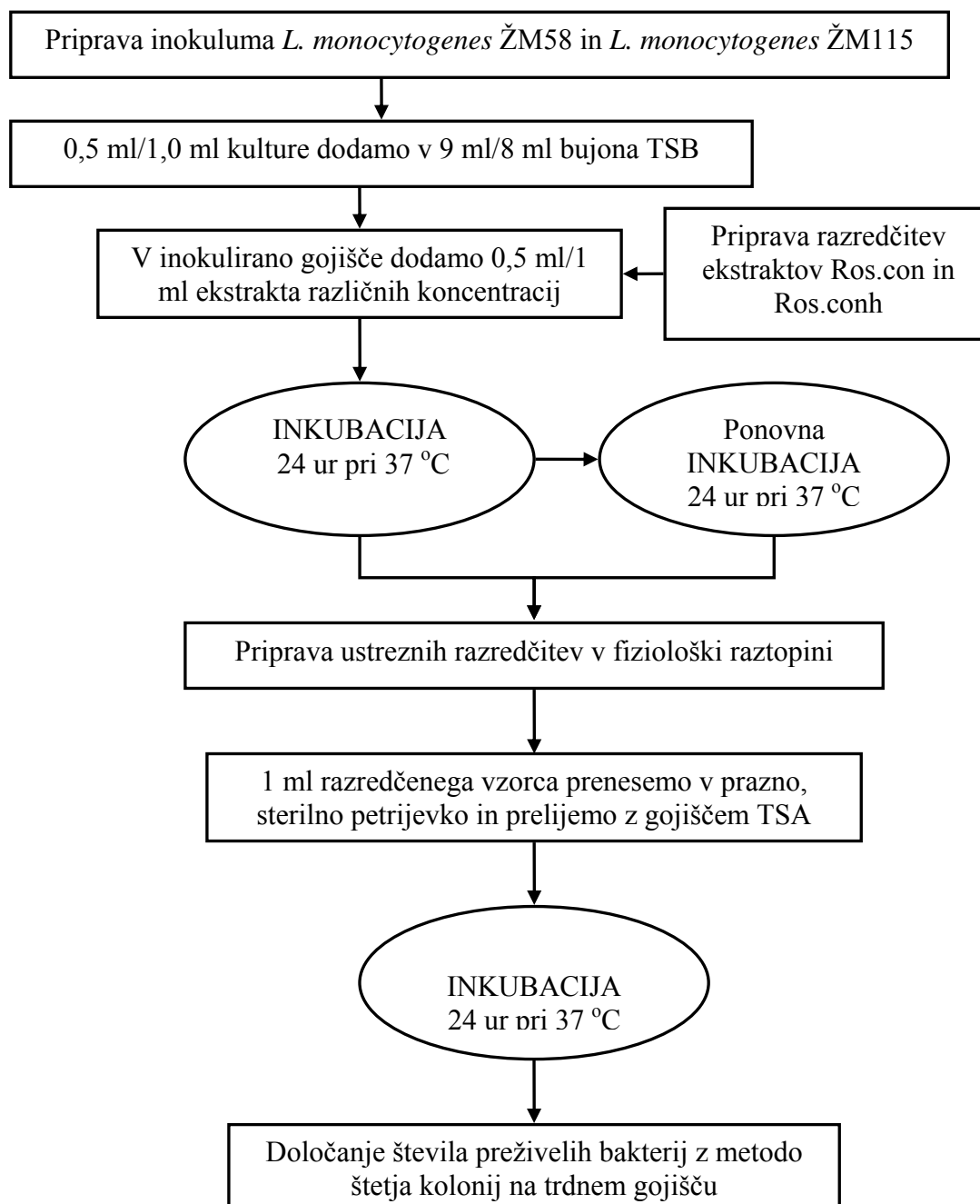
3.3.4.2 Izvedba metode

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo določili minimalno baktericidno koncentracijo (MBC) ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije sevov *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM115. Glede na rezultate prvega dela eksperimentov smo ugotovili, da imata omenjena ekstrakta različen protimikrobni učinek na izbrana seva bakterij vrste *L. monocytogenes*. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-3.

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo izvedli v štirih različicah:

- 24-urna inkubacija z 10 vol. % dodatkov: gojišču TSB smo dodali določen volumen pripravljenega ekstrakta in določen volumen pripravljene bakterijske kulture – skupno 10 vol. % dodatkov – in suspenzijo inkubirali 24 ur;
- 24-urna inkubacija z 20 vol. % dodatkov: gojišču TSB smo dodali določen volumen pripravljenega ekstrakta in določen volumen pripravljene bakterijske kulture – skupno 20 vol. % dodatkov – in suspenzijo inkubirali 24 ur;
- 48-urna inkubacija z 10 vol. % dodatkov: gojišču TSB smo dodali določen volumen pripravljenega ekstrakta in določen volumen pripravljene bakterijske kulture – skupno 10 vol. % dodatkov – in suspenzijo inkubirali 48 ur.

- 48-urna inkubacija z 20 vol. % dodatkov: gojišču TSB smo dodali določen volumen pripravljene ekstrakta in določen volumen pripravljene bakterijske kulture – skupno 20 vol. % dodatkov – in suspenzijo inkubirali 48 ur.



Slika 3-3: Shema določanja preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku različnih koncentracij ekstraktov rožmarina z metodo razredčevanja v tekočem gojišču

- **24-urna inkubacija z 10 vol. % dodatkov:**

Iz osnovne 16 % raztopine ekstraktov Ros.con in Ros.conh smo pripravili seriji desetkratnih razredčitev ekstraktov v absolutnem etanolu do koncentracije 0,0156 %.

Po 0,5 ml inokuluma čiste kulture *L. monocytogenes* (ŽM58 in ŽM115) smo prenesli v 20 epruvet, ki so vsebovale 9 ml sterilnega gojišča TSB. V vsako epruveto smo dodali še 0,5 ml ekstrakta Ros.con ali Ros.conh v koncentracijah od 8 % do 0,0156 %. Kot kontrolo smo namesto ekstrakta dodali destilirano vodo. Vsebino smo dobro premešali na vrtničnem mešalu in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo število preživelih bakterij določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

- **24-urna inkubacija z 20 vol. % dodatkov**

Po 1 ml inokuluma čiste kulture *L. monocytogenes* ŽM115 smo prenesli v 20 epruvet, ki so vsebovale 8 ml TSB gojišča. V vsako epruveto smo dodali 1 ml ustrezne delovne koncentracije ekstraktov Ros.con ali Ros.conh v koncentracijah od 8 % do 0,0156 %. Vsebino smo dobro premešali na vrtničnem mešalu. Inkubacija in nadaljni postopek metode je enak kot pri 24-urni inkubaciji z 10 vol. % dodatkov.

- **48-urna inkubacija z 10 vol. % dodatkov**

Z 48-urno inkubacijo smo testirali preživelost bakterij sevov *L. monocytogenes* ŽM115 in *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z dodanim ekstraktom rožmarina. Zato smo po 24-urni inkubaciji odvzeli 1 ml vzorca za določitev preživelih bakterij, ostalo suspenzijo pa smo ponovno inkubirali 24 ur pri 37 °C. Določanje začetnega števila in števila preživelih bakterij v vzorcu smo ugotavljali po enakem postopku kot pri 24-urni inkubaciji.

- **48-urna inkubacija z 20 vol. % dodatkov**

S 48-urno inkubacijo in 20 vol. % dodatkov smo testirali preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB z dodanim ekstraktom rožmarina. Postopek izvedbe metode in inkubacije je bil enak kot pri 48-urni inkubaciji z 10 vol. % dodatkov.

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

Za določitev števila bakterij smo uporabili metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Po 24 oziroma 48-urni inkubaciji pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo v 9 ml fiziološke raztopine dodali 1 ml vzorca, v katerem smo določali število bakterij in vsebino premešali na vrtničnem mešalniku. Razredčevanje vzorca smo ponovili po enakem postopku. En ml razredčenega vzorca (po dve paralelki) smo inokulirali v sterilno petrijevko, prelili s stopljenim in na 45 °C ohlajenim gojiščem TSA in previdno premešali. Gojišče smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo na gojišču prešteli zrasle kolonije in izračunali število preživelih bakterij (N).

Za gojišča z od 15 do 300 prešteti kolonij smo uporabili enačbo 3.1:

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

Legenda: $\sum C$: seštevek vseh kolonij na števni plošči; n_1 : število petrijevk pri prvi razredčitvi; n_2 : število petrijevk pri drugi razredčitvi; d : faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi; N : število preživelih bakterij v cfu/ml

3.3.6 Določanje preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB z dodanim NaNO₂ z metodo razredčevanja

3.3.6.1 Uporabljen material

- triptični soja bujon TSB
- triptični soja agar TSA
- priprava inokuluma *L. monocytogenes* ŽM58
- priprava raztopin NaNO₂ (100 ppm in 200 ppm)
- injekcijska brizgalka
- filter za filtrno sterilizacijo (0,2 µm)
- nitritni reagent SA + NEDA (sulfanilamid + naftiletildiamin)
- standardna raztopina (1 µg NaNO₂/ml vzorca)
- fiziološka raztopina
- sterilna destilirana voda
- spektrofotometer (Philips, PU 8620, Nizozemska)

3.3.6.2 Določanje vsebnosti NaNO₂ dodanega v gojišče TSB

Za pripravo 1. raztopine NaNO₂ smo v 100 ml bučko zatehtali 0,4 g NaNO₂, dodali destilirano vodo do oznake in vsebino dobro premešali, da se je NaNO₂ v vodi popolnoma raztopil. Za pripravo 2. raztopine NaNO₂ smo v novo 100 ml bučko zatehtali 0,2 g NaNO₂, dodali destilirano vodo do oznake in ponovno dobro premešali. Tako pripravljene raztopine NaNO₂ smo dodali gojišču TSB:

- Pred sterilizacijo gojišča TSB v avtoklavu: Iz vsake bučke smo prenesli po 0,5 ml raztopine NaNO₂ v predhodno pripravljene epruvete, ki sta vsebovali po 9 ml nesterilnega gojišča TSB. Tako smo v prvem primeru dobili 2,00 mg NaNO₂ / 10 ml TSB (200 ppm), v drugem primeru pa 1,00 mg NaNO₂ / 10 ml TSB (100 ppm). Obe gojišči TSB z dodanim NaNO₂ smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo vsebnost NaNO₂ v vzorcih gojišč določali spektrofotometrično.
- Po sterilizaciji gojišča TSB v avtoklavu: Obe raztopini NaNO₂ smo sterilizirali tako, da smo jih filtrirali preko filtra za filtrno sterilizacijo z velikostjo por 0,2 µm. Nato smo iz vsake bučke prenesli po 0,5 ml raztopine NaNO₂ v predhodno pripravljene epruvete, ki sta vsebovali po 9 ml sterilnega gojišča TSB. Tako smo v prvem primeru dobili 2,00 mg NaNO₂ / 10 ml TSB (200 ppm), v drugem primeru pa 1,00 mg NaNO₂ / 10 ml TSB (100 ppm). Vsebnost NaNO₂ v vzorcih gojišč smo določali spektrofotometrično.

3.3.6.3 Spektrofotometrično določanje NaNO₂

V epruveto smo odmerili 1 ml vzorca (ali manj (X)); odvisno od koncentracije NaNO₂, 3 ml sterilne destilirane vode (ali 3 ml + (1-X); če smo vzeli manj vzorca kot 1 ml) in 1 ml reagenta SA + NEDA. Za standard smo odmerili 1 ml standardne raztopine NaNO₂ (0,6 mg/l), 3 ml sterilne destilirane vode in 1 ml reagenta SA + NEDA. Za slepi vzorec pa smo

odmerili 4 ml sterilne destilirane vode in 1 ml reagenta SA + NEDA. Suspenzije z vzorci smo premešali na vrtničnem mešalu in jih pustili stati 20 minut. Sledilo je merjenje absorbance pri 540 nm (Čadež in Mahne, 2005).

3.3.6.4 Izvedba metode

Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* smo določili v gojišču TSB s 200 ppm in 100 ppm NaNO₂. NaNO₂ smo dodali v gojišče TSB v prvem delu eksperimenta pred toplotno sterilizacijo; v drugem delu eksperimenta smo NaNO₂ dodali sterilnemu gojišču TSB. Kot kontrolne vzorce smo uporabili gojišče TSB, ki smo mu namesto raztopine NaNO₂ dodali 0,5 ml destilirane vode.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* v TSB z dodanim NaNO₂ pred toplotno sterilizacijo**

V gojišča TSB z dodanim NaNO₂ pred sterilizacijo smo dodali 0,5 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 in jih 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

- **Preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* v TSB z dodanim NaNO₂ po toplotni sterilizaciji**

V gojišča TSB z dodanim NaNO₂ po sterilizaciji smo dodali 0,5 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 in jih 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo določili število preživelih bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču.

3.3.7 Statistična analiza

Rezultate določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh pridobljene z metodo difuzije v agarju smo pripravili in uredili v računalniškem programu Microsoft Office Excel 2003. Tako urejene podatke smo statistično analizirali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) s proceduro GLM (ang. General Linear Models).

Za primerjavo rezultatov smo uporabili 4 statistične modele, ki so opisani v nadaljevanju, in so bili izračunani z uporabo Duncanovega testa pri 5 % tveganju.

Statistični model za primerjavo velikosti inhibicijskih con določenih pri bakterijah z metodo difuzije v gojišču TSA je vključeval vpliv vrste ekstrakta (model 3.2).

$$Y_{ij} = \mu + E_i + e_{ij} \quad \dots(3.2)$$

Legenda: Y_{ij} : ij – to opazovanje; μ : povprečna vrednost; E_i : vpliv različnega ekstrakta ($i = 1$: Ros.con; $i = 2$: Ros.conh); e_{ij} : ostanek

Statistični model za primerjavo velikosti inhibicijskih con določenih pri bakterijah z metodo difuzije v gojišču TSA je vključeval vpliv koncentracije ekstrakta (model 3.3).

$$Y_{ij} = \mu + K_i + e_{ij} \quad \dots(3.3)$$

Legenda: Y_{ij} : ij – to opazovanje; μ : povprečna vrednost; K_i : vpliv različne koncentracije ekstrakta ($i = 1$: 8 %; $i = 2$: 4 %; $i = 3$: 2 %; $i = 4$: 1 %; $i = 5$: 0,5 %; $i = 6$: 0,25 %; $i = 7$: 0,125 %; $j = 8$: 0,0625 %; $i = 9$: 0,03125 %; $i = 10$: 0,0156 %); e_{ij} : ostanek

Statistični model za primerjavo velikosti inhibicijskih con določenih pri bakterijah z metodo difuzije v gojišču TSA je vključeval vplive vrste bakterij (model 3.4).

$$Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij} \quad \dots(3.4)$$

Legenda: Y_{ij} : ij – to opazovanje; μ : povprečna vrednost; B_i : vpliv različnih vrst bakterij ($i = 1$: *B. cereus*; $i = 2$: *Staph. aureus*; $i = 3$: *L. monocytogenes*; $i = 4$: *L. ivanovii*; $i = 5$: *L. grayi*; $i = 6$: *L. innocua*; $i = 7$: *S. Infantis*); e_{ij} : ostanek

Statistični model za primerjavo velikosti inhibicijskih con določenih pri bakterijah z metodo difuzije v gojišču TSA je vključeval vpliv vrste seva bakterij vrste *L. monocytogenes* (model 3.5).

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots(3.5)$$

Legenda: Y_{ij} : ij – to opazovanje; μ : povprečna vrednost; S_i : vpliv različnega seva bakterij vrste *L. monocytogenes* ($i = 1$: *L. monocytogenes* ŽM51; $i = 2$: *L. monocytogenes* ŽM52; $i = 3$: *L. monocytogenes* ŽM53; $i = 4$: *L. monocytogenes* ŽM58; $i = 5$: *L. monocytogenes* ŽM80; $i = 6$: *L. monocytogenes* ŽM92; $i = 7$: *L. monocytogenes* ŽM108; $i = 8$: *L. monocytogenes* ŽM115); e_{ij} : ostanek

4 REZULTATI

Predpostavili smo, da bodo imeli ekstrakti rožmarina protimikroben učinek na bakterije rodu *Listeria*. Da bi ugotovili koncentracije ekstraktov, ki inhibirajo rast in razmnoževanje teh bakterij smo uporabili metodo difuzije v gojišču TSA in metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB. Primerjalno smo metodo difuzije v gojišču TSA uporabili tudi za določitev protimikrobnega učinka ekstraktov rožmarina na Gram pozitivne bakterije vrst *Bacillus cereus* ter *Staphylococcus aureus* in Gram negativne bakterije rodu *Salmonella*.

Ko smo ugotovili protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Listeria*, smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB želeli preveriti tudi protimikroben učinek NaNO_2 , saj je končen namen uporabe ekstraktov rožmarina v različnih mesnih izdelkih, ki lahko vsebujejo NaNO_2 .

4.1 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA Ros.con in Ros.conh DOLOČEN Z METODO DIFUZIJE V GOJIŠČU TSA

4.1.1 Velikosti inhibicijskih con pri različnih bakterijskih sevih

V prvem delu poskusa smo z metodo difuzije v gojišču TSA določali protimikrobni učinek dveh ekstraktov rožmarina. Uporabili smo 11 sevov bakterij rodu *Listeria* in po 1 sev bakterij *S. Infantis*, *Staph. aureus* in *B. cereus*. Primerjali smo razliko v protimikrobni učinkovitosti ekstraktov Ros.con (22,04 % karnozolne kisline) in Ros.conh (40,49 % karnozolne kisline) med posameznimi bakterijskimi vrstami (7) in znotraj vrste *L. monocytogenes* (8) ter določali minimalno inhibitorno koncentracijo posameznega ekstrakta. Za vsak sev smo uporabili 10 koncentracij vsakega ekstrakta (0,0156 % - 8 %), rezultati meritev so podani v prilogah A8-1 do A8-14.

Iz prilog A8-1 do A8-14 je razvidno, da imata ekstrakta rožmarina na vse izbrane Gram pozitivne bakterije protimikrobni učinek, medtem ko nimata protimikrobnega učinka na bakterije rodu *Salmonella*, saj pri nobeni od testiranih koncentracij ekstraktov ni bilo inhibicije rasti.

Vrednost MIC smo definirali kot najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi, ki inhibira rast bakterij na gojišču TSA z dodano protimikrobno snovjo po 24-urni inkubaciji na 37 °C (Cannilac in Mourey, 2003). Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina Ros.con in Ros.conh za 11 bakterijskih sevov so določene iz rezultatov v prilogah A8-1 do A8-14 in kot povzetek prikazane v preglednici 4-1.

Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.con za različne bakterije se gibljejo od 625 µg ekstrakta/ml EtOH do 5000 µg ekstrakta/ml EtOH, MIC ekstrakta Ros.conh pa v območju od 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH do 2500 µg ekstrakta/ml EtOH. Iz prilog od A8-1 do A8-14 je razvidno, da je bilo v povprečju za inhibicijo rasti testnih bakterij potrebna manjša količina ekstrakta Ros.conh, ki je vseboval 40,49 % karnozolne kisline, kot ekstrakta Ros.con, ki je vseboval 22,04 % karnozolne kisline.

Inhibicijo rasti pri bakterijah sevov *B. cereus* ŽMJ91 in *L. monocytogenes* ŽM92 smo dosegli že pri zelo nizkih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh (625 µg ekstrakta/ml EtOH), medtem ko ekstrakta na bakterije seva *S. Infantis* nista imela inhibitornega vpliva. Med bakterijami sevov *B. cereus* ŽMJ91, *L. monocytogenes* ŽM92, *L. monocytogenes* ŽM108 in *L. ivanovii* ŽM65 ni bilo opazne razlike v MIC med obema ekstraktoma.

Preglednica 4-1: Minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina določene za različne bakterije z metodo difuzije v gojišču TSA

Sev bakterij	MIC (µg ekstrakta/ml EtOH)	
	Ros.con	Ros.conh
<i>S. Infantis</i> ŽM9	Ni inhibicije do 80000	Ni inhibicije do 80000
<i>B. cereus</i> ŽMJ91	625	625
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	5000	2500
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	2500	625
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	2500	1250
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	1250	625
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	2500	1250
<i>L. monocytogenes</i> ŽM80	2500	1250
<i>L. monocytogenes</i> ŽM92	625	625
<i>L. monocytogenes</i> ŽM108	2500	2500
<i>L. monocytogenes</i> ŽM115	1250	312,5
<i>L. ivanovii</i> ŽM65	1250	1250
<i>L. grayi</i> ŽM66	5000	1250
<i>L. innocua</i> ŽM68	2500	1250

4.1.2 Določitev vplivov na velikost inhibicijskih con

4.1.2.1 Vpliv vrste ekstrakta

S statistično primerjavo rezultatov določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh (Duncanov test pri 5 % tveganju; po modelu 3.2) smo ugotovili, da vrsta uporabljenega ekstrakta vpliva na velikost inhibicijske cone (preglednica 4-2).

Preglednica 4-2: Vpliv vrste ekstrakta rožmarina na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA

Vrsta ekstrakta	Povprečna inhibicijska cona (mm)	n	Skupina
Ros.con	6,69	280	A
Ros.conh	4,68	280	B
Vrednost P - značilnost vpliva vrste ekstrakta ≤ 0,05			

Legenda: Ekstrakti z enako črko v skupini se med seboj statistično ne razlikujejo; **P**: značilnost vpliva; **P ≤ 0,05**: statistično značilen vpliv; **n**: število statističnih primerjav

4.1.2.2 Vpliv koncentracije ekstrakta

S statistično primerjavo rezultatov določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh (Duncanov test pri 5 % tveganju; po modelu 3.3) smo ugotovili, da koncentracija ekstrakta rožmarina vpliva na velikost inhibicijske cone (preglednica 4-3).

Preglednica 4-3: Vpliv koncentracije ekstrakta na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA

Oznaka koncentracije	C (μg ekstrakta/ml EtOH)	Povprečna inhibicijska cona (mm)	n	Skupina
1	80000	10,48	56	A
2	40000	10,25	56	AB
3	20000	9,40	56	B
4	10000	8,37	56	C
5	5000	7,31	56	D
6	2500	5,72	56	E
7	1250	3,56	56	F
8	625	1,51	56	G
9	312,5	0,26	56	H
10	156,25	0,00	56	H
Vrednost P - značilnost vpliva koncentracije ekstrakta $\leq 0,05$				

Legenda: Koncentracije z enako črko v skupini, se med seboj statistično ne razlikujejo; **P**: značilnost vpliva; **P $\leq 0,05$** : statistično značilen vpliv; **n**: število statističnih primerjav

Iz preglednice 4-3 je razvidno, da koncentracija ekstrakta rožmarina vpliva na velikost inhibicijske cone nastale pri metodi difuzije v gojišču TSA in s tem na protimikroben učinek. Koncentracije ekstraktov pod oznako 4, 5, 6, 7 in 8 spadajo vsaka v svojo skupino, kar pomeni, da se po povprečni inhibicijski coni ločijo od vseh ostalih koncentracij in med seboj. Druge koncentracije ekstraktov si delijo isto skupino z vsaj še eno koncentracijo, tako sta koncentraciji z oznako 1 in 2 med seboj statistično primerljivi glede na velikost inhibicijske cone, prav tako koncentracije ekstraktov z oznakami 2 in 3 ter 9 in 10.

4.1.2.3 Vpliv vrste bakterij

S statistično primerjavo rezultatov določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh (Duncanov test pri 5 % tveganju; po modelu 3.4) smo ugotovili, da se velikosti inhibicijskih con statistično značilno razlikujejo pri posamezni vrsti bakterij (preglednica 4-4). Različne vrste bakterijskih izolatov smo glede na povprečne inhibicijske cone grupirali v skupine in jih označili kot A, B, BC, C in D.

Na velikost povprečne inhibicijske cone nastale pri metodi difuzije v gojišču TSA vpliva vrsta bakterij oziroma protimikroben učinek ekstraktov rožmarina je različen za različne bakterijske vrste. Bakterije vrste *B. cereus* in seva *S. Infantis* so razvrščene vsaka v svojo skupino (skupini A in D), kar pomeni, da se po povprečni inhibicijski coni ločijo med seboj in od vseh drugih bakterijskih vrst. Drugih pet vrst bakterij si deli isto skupino z vsaj še eno vrsto testnih

bakterij: protimikroben učinek glede na povprečno inhibicijsko cono je podoben za vrste *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *Staph. aureus* in *L. innocua*.

Preglednica 4-4: Vpliv vrste bakterij na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA

Vrsta bakterij	Povprečna inhibicijska cona (mm)	n	Skupina
<i>Bacillus cereus</i>	8,20	40	A
<i>Listeria ivanovii</i>	6,94	40	B
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,01	320	BC
<i>Listeria grayi</i>	5,97	40	BC
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,40	40	C
<i>Listeria innocua</i>	5,02	40	C
<i>Salmonella Infantis</i>	0,00	40	D
Vrednost P - značilnost vpliva vrste bakterij $\leq 0,05$			

Legenda: Vrste bakterij z enako črko v skupini, se med seboj statistično ne razlikujejo; **P**: značilnost vpliva; **P $\leq 0,05$** : statistično značilen vpliv; **n**: število statističnih primerjav

4.1.2.4 Vpliv vrste seva bakterij vrste *L. monocytogenes*

S statistično primerjavo rezultatov določanja protimikrobnega učinka ekstraktov Ros.con in Ros.conh (Duncanov test pri 5 % tveganju; po modelu 3.5) smo ugotovili, da se velikosti inhibicijskih con statistično značilno razlikujejo glede na sev bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 4-5). Seve smo grupirali glede na povprečne inhibicijske cone v skupine in jih označili kot A, AB in B.

Preglednica 4-5: Vpliv vrste seva bakterij vrste *L. monocytogenes* na povprečno velikost inhibicijskih con dobljenih pri metodi difuzije v gojišču TSA

Sev <i>L. monocytogenes</i>	Povprečna inhibicijska cona (mm)	n	Skupina
<i>L. monocytogenes</i> ŽM115	8,01	40	A
<i>L. monocytogenes</i> ŽM92	7,43	40	A
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	7,10	40	A
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	6,25	40	A
<i>L. monocytogenes</i> ŽM108	5,83	40	AB
<i>L. monocytogenes</i> ŽM80	5,77	40	AB
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	3,93	40	B
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	3,77	40	B
Vrednost P - značilnost vpliva vrste seva <i>L. monocytogenes</i> $\leq 0,05$			

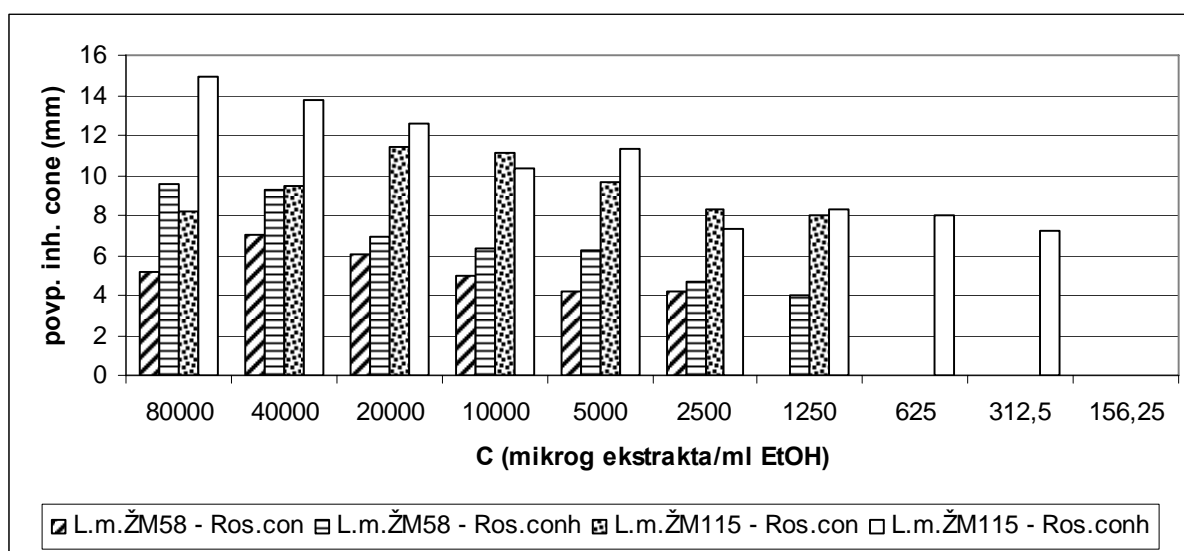
Legenda: Krepko sta označena seva, ki sta bila izbrana za nadaljne poskuse; sevi bakterij *L. monocytogenes* z enako črko v skupini, se med seboj statistično ne razlikujejo; **P**: značilnost vpliva; **P $\leq 0,05$** : statistično značilen vpliv; **n**: število statističnih primerjav

Povprečne inhibicijske cone pri sevih *L. monocytogenes* ŽM115, *L. monocytogenes* ŽM92 in *L. monocytogenes* ŽM51 se ne ločijo med seboj oziroma ekstrakti rožmarina imajo na te seve enak protimikrobni učinek. Enako velja za seva *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes*

ŽM53. Povprečne inhibicijske cone pri sevih *L. monocytogenes* ŽM108 in *L. monocytogenes* ŽM80 se od drugih testiranih sevov ne razlikujejo.

Za nadaljne poskuse smo izbirali dva seva bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki sta se po velikosti inhibicijskih con kar najbolj razlikovala: in sicer *L. monocytogenes* ŽM115 kot sev pri katerem je bil določen največji protimikrobni učinek ekstrakta rožmarina in sev *L. monocytogenes* ŽM58 kot sev, ki se je glede na velikost inhibicijske cone razlikoval od prvo izbranega seva in kot sev, na katerega je imel ekstrakt rožmarina manjši protimikrobni učinek.

Primerjavo protimikrobnega učinka različnih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterijska seva *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM115 prikazuje slika 4-1.



Slika 4-1: Povprečne inhibicijske cone za bakterije sevov *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM115 pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh

Legenda: **povp. inh. cone:** povprečne inhibicijske cone; **L.m:** *Listeria monocytogenes*;

4.2 PROTIMIKROBEN UČINEK EKSTRAKTOV ROŽMARINA Ros.con in Ros.conh DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB

Inhibicijo rasti oziroma bakteriostatično delovanje dodatka ekstrakta rožmarina v tekočem gojišču TSB smo opazovali med 24 in 48-urno inkubacijo bakterij sevov *L. monocytogenes* ŽM115 in *L. monocytogenes* ŽM58. Delovne koncentracije ekstraktov smo izbrali na osnovi predhodno določenih MIC z metodo difuzije v gojišču TSA. Primerjali smo protimikrobno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh z določanjem minimalne baktericidne koncentracije - MBC. Potek metode je opisan v poglavju 3.3.4.2. MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi, pri kateri po 24-urni (ali po 48-urni) inkubaciji preživi 0,1 % bakterij (Cannilac in Mourey, 2003).

4.2.1 Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115

4.2.1.1 Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB z 20 vol. % dodatkov po 24 in 48-urni inkubaciji

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo izvedli z 20 vol. % dodatki – v 8 ml gojišča TSB smo dodali 1 ml čiste 24-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 z začetnim številom 10^7 cfu/ml in 1 ml ekstrakta rožmarina. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-6. Poleg podatkov o koncentracijah ekstraktov v gojišču TSB so prikazana števila bakterij vrste *L. monocytogenes* po 24 in 48-urni inkubaciji teh gojišč.

Preglednica 4-6: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh po 24 in 48-urni inkubaciji (20 vol. % dodatkov)

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija		48-urna inkubacija
			Ros.con	Ros.conh	Ros.con
	C ₁ (µg/ml EtOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	N ₁ (cfu/ml)	N ₂ (cfu/ml)	N ₃ (cfu/ml)
5	5000	500	<1,00 x 10 ¹	/	5,90 x 10 ¹
6	2500	250	5,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	7,80 x 10 ¹
7	1250	125	9,80 x 10 ²	<1,00 x 10 ¹	3,08 x 10 ²
8	625	62,5	<1,00 x 10 ³	<1,00 x 10 ¹	6,46 x 10 ³
9	312,5	31,25	<1,00 x 10 ³	<1,00 x 10 ¹	1,10 x 10 ⁴
10	156,3	15,63	<1,00 x 10 ⁴	/	1,32 x 10 ⁵
Ster.dest.voda	0,00	0,00	7,10 x 10 ⁷	9,82 x 10 ⁸	1,10 x 10 ⁷
Ab. EtOH	0,00	0,00	<1,00 x 10 ⁴	/	1,70 x 10 ³

Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji ekstrakta ni bil izveden; C₁: koncentracija ekstrakta kot µg/ml EtOH; C₂: koncentracija ekstrakta kot µg/ml TSB; N₁, N₂, N₃: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; **Ster.dest.voda**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni etanol

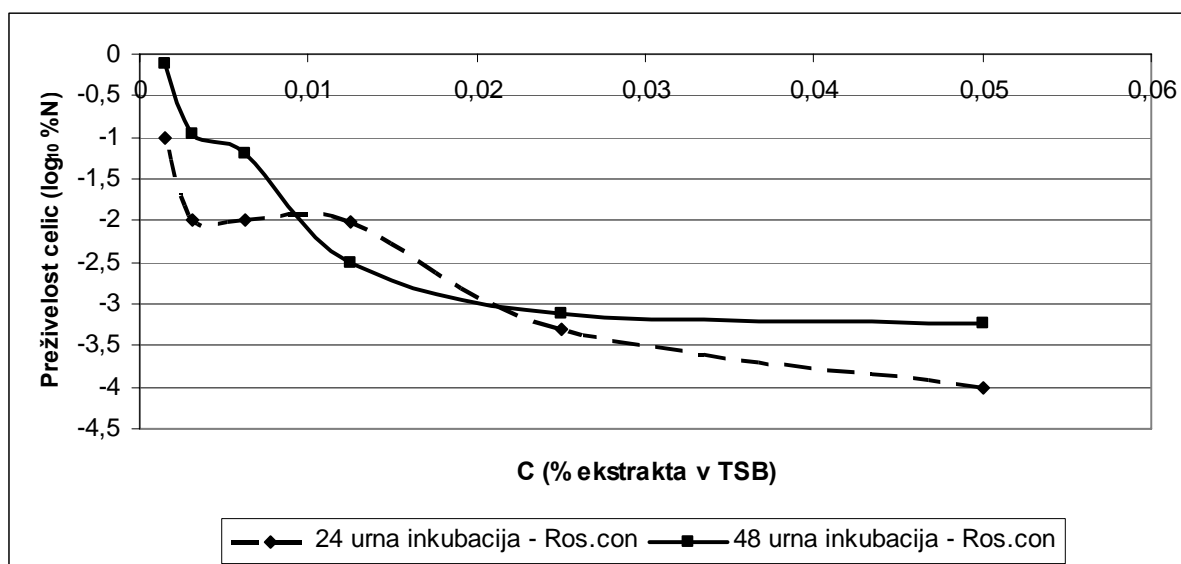
Da bi določili MBC smo podatke iz preglednice 4-6 najprej preračunali v % preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (preglednica 4-7) kot navajata Canillac in Mourey (2003).

Preglednica 4-7: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB z 20 vol. % dodatkov

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija	48-urna inkubacija
	C ₁ (µg/ml TSB)	C ₂ (% v TSB)	log ₁₀ % N ₁ (% preživelih)	log ₁₀ % N ₃ (% preživelih)
5	500	0,05	-4,05	- 3,23
6	250	0,025	- 3,30	- 3,11
7	125	0,0125	- 2,01	- 2,51
8	62,5	0,00625	- 2,00	- 1,19
9	31,25	0,003125	- 2,00	- 0,96
10	15,63	0,001563	- 1,00	- 0,12

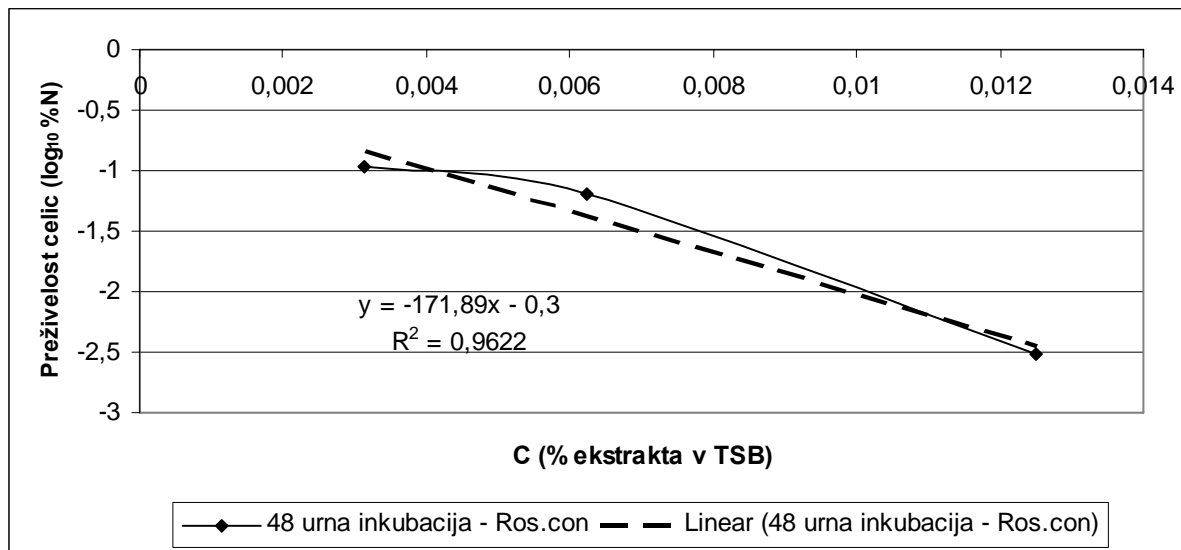
Legenda: **log₁₀ % N₁**: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji; **log₁₀ % N₃**: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 48-urni inkubaciji; **C (%)**: utežni odstotki ekstrakta v gojišču TSB

Vrednost MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con dodanega v gojišče TSB, pri kateri preživi 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 (log₁₀ 0,1 = -1) po 24 in 48-urni inkubaciji (slika 4-2).



Slika 4-2: Preživelost bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115 po 24 in 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (20 vol. % dodatek)

Iz preglednice 4-7 in slike 4-2 je razvidno, da je MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM115 pri 20 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji določena pri 0,00156 % ekstrakta Ros.con v TSB oz. pri 15,63 µg/ml TSB. Po 48-urni inkubaciji je MBC med 15,63 µg/ml TSB in 31,25 µg/ml TSB. Za natančnejšo določitev MBC smo izračunali enačbo premice (slika 4-3) in računsko določili MBC.



Slika 4-3: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (20 vol. % dodatek)

$$-1 = -171,89 \times \text{MBC} - 0,3$$

$$\text{MBC} = 0,00407 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$

MBC ekstrakta Ros.con za sev *L. monocytogenes* ŽM115 pri 20 vol. % dodatkov po 48-urni inkubaciji je 0,00407 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 40,7 µg ekstrakta/ml TSB.

Iz preglednice 4-6 je razvidno, da ob dodatku ekstrakta Ros.conh, po 48-urni inkubaciji pri najnižji testirani koncentraciji (31,25 µg ekstrakta/ml TSB) ni bilo preživelih bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115, zato nismo mogli določiti MBC.

4.2.1.2 Protimikroben učinek ekstrakta Ros.con na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24 in 48-urni inkubaciji

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo se odločili v tekoče gojišče TSB dodati 10 vol. % dodatkov, kar pomeni, da smo v 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml čiste 24-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 s koncentracijo 10^7 cfu/ml in 0,5 ml ekstrakta rožmarina. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-8. Poleg podatkov o raztopinah so prikazana števila bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB po 24 in 48-urni inkubaciji.

Preglednica 4-8: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24 in 48-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija	48-urna inkubacija
	C ₁ (µg/ml EtOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	Ros.con N ₁ (cfu/ml)	Ros.con N ₂ (cfu/ml)
4	10000	500	6,20 x 10 ³	<1,00 x 10 ¹
5	5000	250	1,91 x 10 ⁴	1,06 x 10 ⁴
6	2500	125	5,25 x 10 ⁴	1,60 x 10 ⁴
7	1250	62,5	1,08 x 10 ⁵	1,20 x 10 ⁵
8	625	31,25	2,34 x 10 ⁶	2,10 x 10 ⁵
9	312,5	15,60	5,00 x 10 ⁷	1,71 x 10 ⁸
10	156,3	7,80	/	/
Ster.dest.voda	0,00	0,00	3,05 x 10 ⁸	2,05 x 10 ⁸
Ab. EtOH	0,00	0,00	4,15 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁶

Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; C₁: koncentracija ekstrakta kot µg/ml EtOH; C₂: koncentracija ekstrakta kot µg/ml TSB; N₁, N₂: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; **Ster.dest.voda**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni etanol

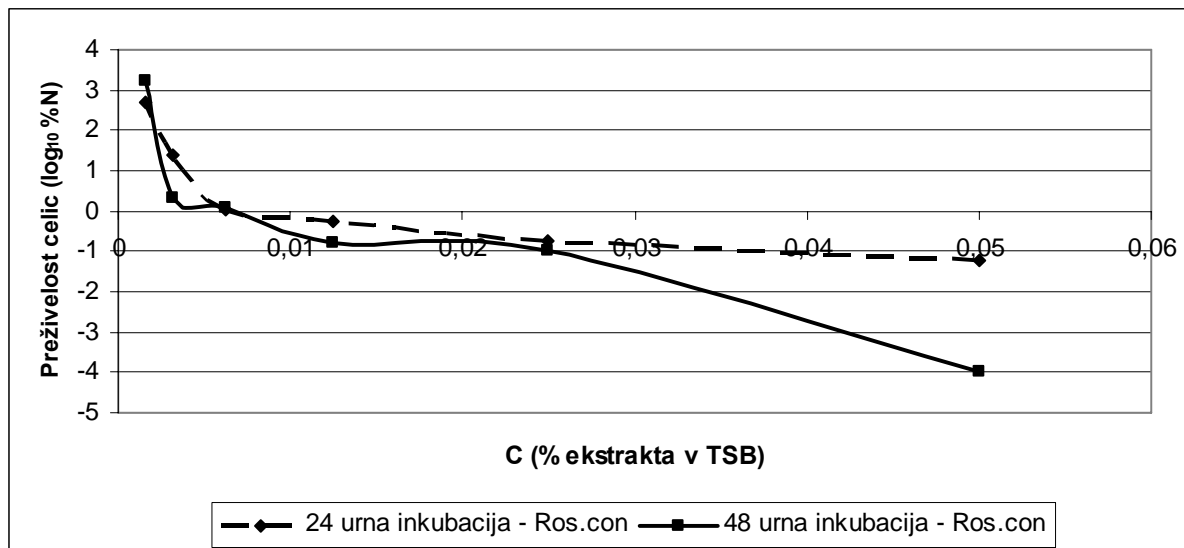
Da bi določili MBC smo podatke iz preglednice 4-8 najprej preračunali v % preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (preglednica 4-9) kot navajata Canillac in Mourey (2003).

Preglednica 4-9: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija	48-urna inkubacija
	C ₁ (µg/ml TSB)	C ₂ (% ekstrakta v TSB)	log ₁₀ % N ₁ (% preživelih)	log ₁₀ % N ₂ (% preživelih)
4	500	0,05	-1,21	-4,05
5	250	0,025	-0,72	-0,97
6	125	0,0125	-0,28	-0,80
7	62,5	0,00625	0,03	0,08
8	31,25	0,003125	1,37	0,32
9	15,60	0,001563	2,70	3,23
10	7,80	0,000781	/	/

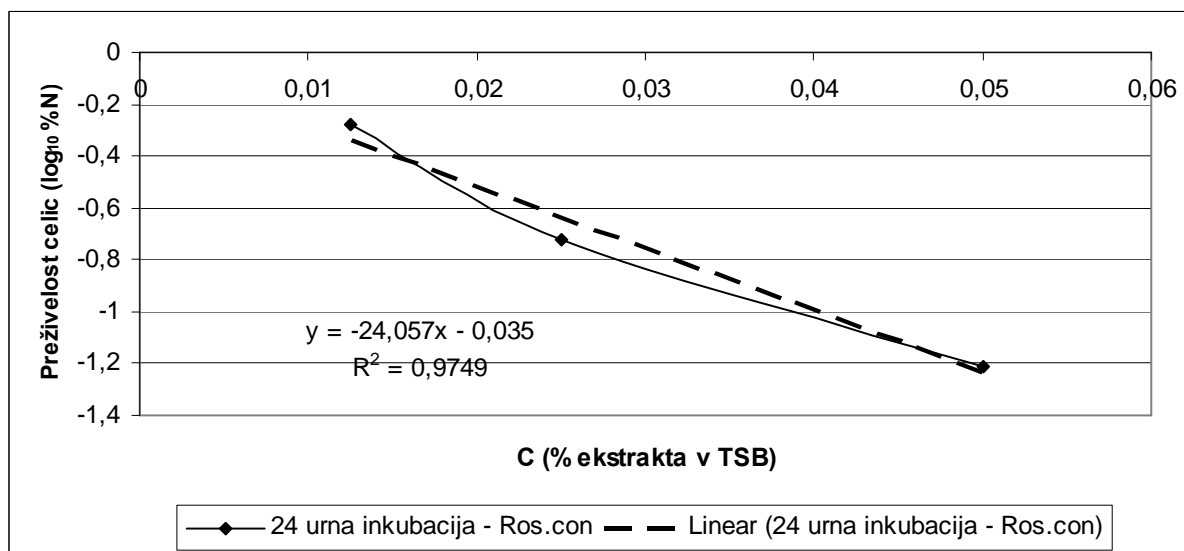
Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; **log₁₀ %N₁**: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji; **log₁₀ %N₂**: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 48-urni inkubaciji; **C (%)**: utežni odstotki ekstrakta v gojišču TSB

Vrednost MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con dodanega v gojišče TSB, pri kateri preživi 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 ($\log_{10} 0,1 = -1$) po 24 in 48-urni inkubaciji (slika 4-4).



Slika 4-4: Preživelost bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115 po 24 in 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (10 vol. % dodatek)

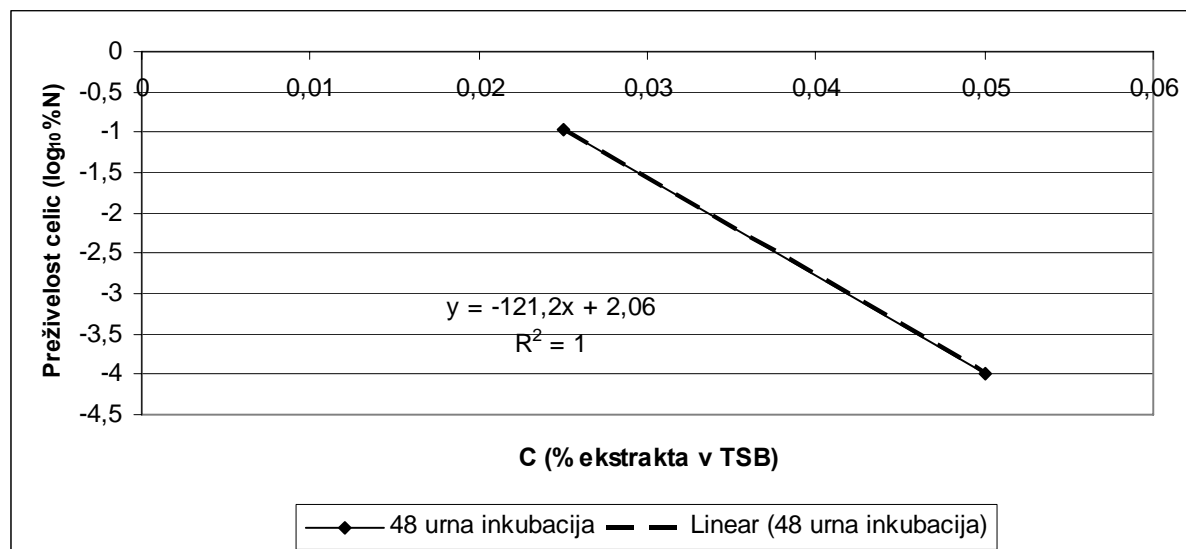
Iz preglednice 4-9 in slike 4-4 je razvidno, da je MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM115 pri 10 vol. % dodatkov po 24 in 48-urni inkubaciji določena med 0,025 in 0,05 % ekstrakta Ros.con v TSB oz. med 250 in 500 µg/ml TSB. Za natančnejšo določitev MBC smo izračunali enačbi premic (sliki 4-5 in 4-6) in računsko določili MBC.



Slika 4-5: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -24,057 \times \text{MBC} - 0,035$$

$$\text{MBC} = 0,0401 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$



Slika 4-6: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -121,2 \times \text{MBC} + 2,06$$

$$\text{MBC} = 0,02525 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$

MBC ekstrakta Ros.con za sev *L. monocytogenes* ŽM115 pri 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji je 0,0401 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 401 µg ekstrakta/ml TSB, po 48-urni inkubaciji pa pri 0,02525 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 252,5 µg ekstrakta/ml TSB.

4.2.1.3 Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.con na različne koncentracije bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115

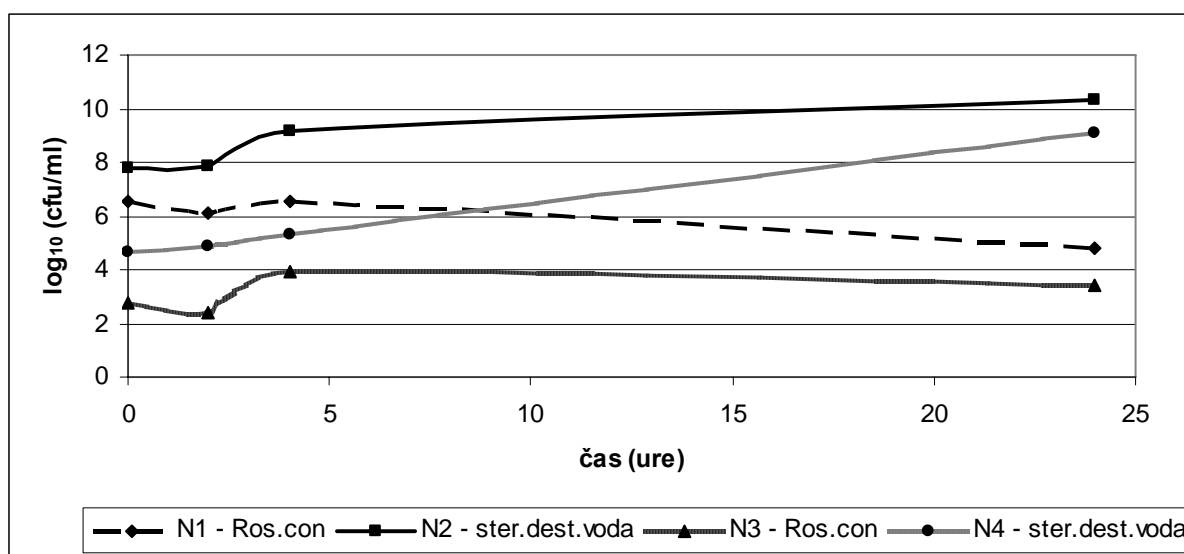
V tem delu poskusov smo želeli določiti, kakšen vpliv ima ekstrakt Ros.con na različne koncentracije bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115. Poskus smo izvedli z 10 vol. % dodatkov, kar pomeni, da smo v 18 ml gojišča TSB dodali 1 ml čiste kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM115 z različnimi začetnimi koncentracijami celic in 1 ml ekstrakta Ros.con tako, da smo dobili koncentracijo 500 µg/ml TSB. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-10.

Preglednica 4-10: Vpliv dodatka ekstrakta Ros.con (500 µg ekstrakta/ml TSB) na rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115

Čas (ure)	N ₁ (cfu/ml) Ros.con	N ₂ (cfu/ml) ster. dest. voda	N ₃ (cfu/ml) Ros.con	N ₄ (cfu/ml) ster. dest. voda
0	3,70 x 10 ⁶	6,09 x 10 ⁷	5,75 x 10 ²	4,30 x 10 ⁴
2	1,27 x 10 ⁶	7,66 x 10 ⁷	2,70 x 10 ²	7,70 x 10 ⁴
4	3,37 x 10 ⁶	1,48 x 10 ⁹	8,10 x 10 ³	2,10 x 10 ⁵
24	6,70 x 10 ⁴	2,28 x 10 ¹⁰	2,60 x 10 ³	1,30 x 10 ⁹

Legenda: N₁: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku ekstrakta Ros.con s koncentracijo 500 µg/ml TSB; N₂: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku sterilne destilirane vode; N₃: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku ekstrakta Ros.con s koncentracijo 500 µg/ml TSB; N₄: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku sterilne destilirane vode; **Ster.dest.voda**: sterilna destilirana voda

Na sliki 4-7 je razvidno, da je v vzorcu, ki vsebuje ekstrakt Ros.con in višjo začetno koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* (N₁) inhibicija rasti za eno logaritemsko stopnjo večja od vzorca, ki je vseboval ekstrakt Ros.con in nižjo začetno koncentracijo bakterij (N₃).



Slika 4-7: Vpliv dodatka ekstrakta Ros.con (500 µg ekstrakta/ml TSB) na rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115

Legenda: N₁: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku ekstrakta Ros.con s koncentracijo 500 µg/ml TSB; N₂: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku sterilne destilirane vode; N₃: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku ekstrakta Ros.con s koncentracijo 500 µg/ml TSB; N₄: koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* ob dodatku sterilne destilirane vode

4.2.2 Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58

Rezultati meritev, ki smo jih dobili z metodo difuzije v gojišču TSA so pokazali, da so bile povprečne inhibicijske cone ob dodatku ekstrakta Ros.con pri bakterijah sevov *L. monocytogenes* ŽM115 in *L. monocytogenes* ŽM58 različne. Zato smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB testirali tudi bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58.

4.2.2.1 Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.con na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji

Eksperimentalno delo smo izvajali z 10 vol. % dodatkov, kar pomeni, da smo v 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml čiste 24-urne kulture bakterij *L. monocytogenes* ŽM58 s koncentracijo 10⁷

cfu/ml in 0,5 ml ekstrakta rožmarina. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk (1. in 2. ponovitev) v preglednici 4.11. Poleg podatkov o raztopinah so prikazane koncentracije bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB po 24-urni inkubaciji.

Preglednica 4-11: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija			
	C ₁ (µg/ml EtOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	N ₁ (cfu/ml)	N ₂ (cfu/ml)	N _p (cfu/ml)	SD
2	40000	2000	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
3	20000	1000	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
4	10000	500	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
5	5000	250	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
6	2500	125	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
7	1250	62,5	1,20 x 10 ⁴	1,69 x 10 ³	6,84 x 10 ³	7,29 x 10 ³
8	625	31,25	2,45 x 10 ⁴	4,30 x 10 ³	1,44 x 10 ⁴	1,43 x 10 ⁴
9	312,5	15,6	1,25 x 10 ⁵	3,05 x 10 ⁶	1,59 x 10 ⁶	2,07 x 10 ⁶
10	156,3	7,8	/	/	/	/
Ster.dest.voda	0,00	0,00	8,30 x 10 ⁸	8,70 x 10 ⁸	8,50 x 10 ⁸	2,83 x 10 ⁷
Ab. EtOH	0,00	0,00	/	3,95 x 10 ⁶	3,95 x 10 ⁶	/

Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; C₁: koncentracija ekstrakta kot µg/ml EtOH; C₂: koncentracija ekstrakta kot µg/ml TSB; <10^x; N₁, N₂: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; N_p: povprečna vrednost števila bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; SD: standardna deviacija; Ster.dest.voda: sterilna destilirana voda; Ab. EtOH: absolutni etanol

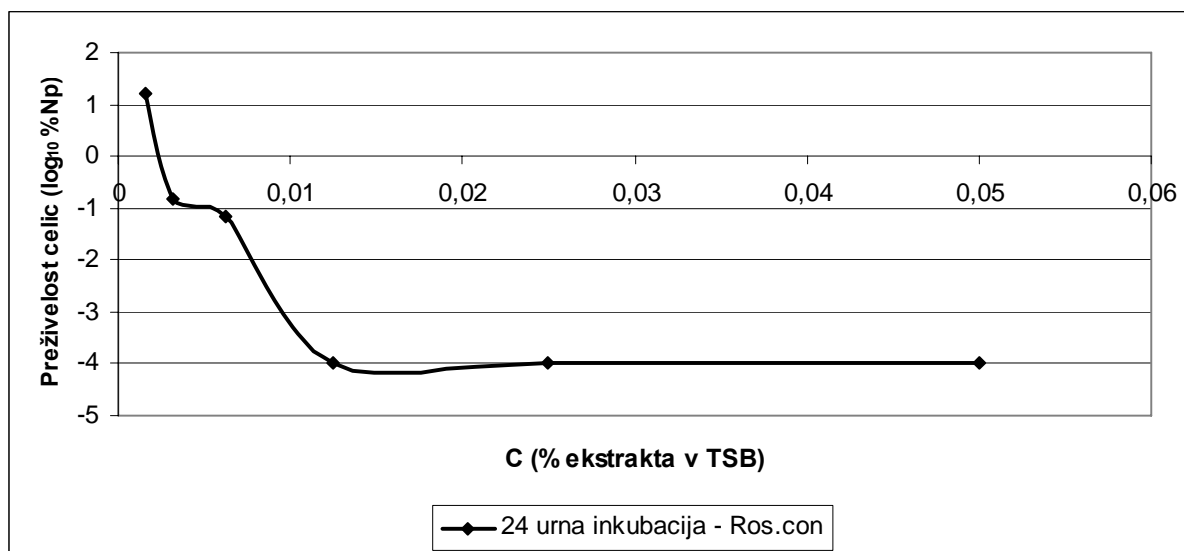
Da bi določili MBC smo podatke iz preglednice 4-11 najprej preračunali v % preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (preglednica 4-12) kot navajata Canillac in Mourey (2003).

Preglednica 4-12: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija
	C ₁ (µg/ml TSB)	C ₂ (% v TSB)	log ₁₀ % N _p (% preživelih)
2	2000	0,2	-4,05
3	1000	0,1	-4,05
4	500	0,05	-4,05
5	250	0,025	-4,05
6	125	0,0125	-4,05
7	62,5	0,00625	-1,16
8	31,25	0,003125	-0,84
9	15,6	0,00156	1,20
10	7,8	0,000781	/

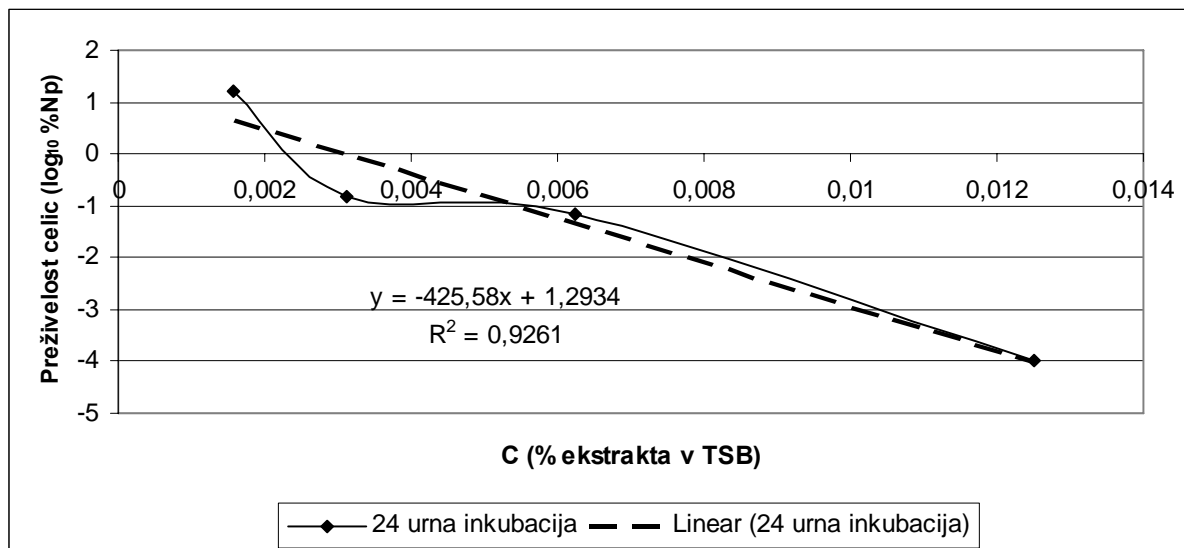
Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; log₁₀ %N_p: logaritmirani povprečni odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 24-urni inkubaciji; C (%): utežni odstotki ekstrakta v gojišču TSB

Vrednost MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con dodanega v gojišče TSB, pri kateri preživi 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 (log₁₀ 0,1 = -1) po 24-urni inkubaciji (slika 4-8).



Slika 4-8: Preživelost bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 24 inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con (10 vol. % dodatek)

Iz preglednice 4-12 in slike 4-8 je razvidno, da smo MBC ekstrakta Ros.con za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji določili med 0,003125 in 0,00625 % ekstrakta Ros.con v TSB oz. med 31,25 in 62,5 µg/ml TSB. Za natančnejšo določitev MBC smo izračunali enačbo premice (slika 4-9) in računsko določili MBC.



Slika 4-9: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -425,58 \times \text{MBC} + 1,2934$$
$$\text{MBC} = 0,00539 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$

MBC ekstrakta Ros.con za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji je 0,00539 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 53,9 µg ekstrakta/ml TSB.

4.2.2.2 Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.conh na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji

Nadaljevali smo z ekstraktom rožmarina Ros.conh in bakterijo vrste *L. monocytogenes* ŽM58. Eksperimentalno delo smo izvajali z 10 vol. % dodatkov, kar pomeni, da smo v 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml čiste 24-urne kulture bakterij s koncentracijo 10^7 cfu/ml in 0,5 ml ekstrakta rožmarina. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk (1., 2. in 3. ponovitev) v preglednici 4-13. Poleg podatkov o raztopinah, so prikazane koncentracije bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB po 24-urni inkubaciji.

Preglednica 4-13: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh po 24-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija				
	C ₁ (µg/ml EtOH)	C ₂ (µg/ml TSB)	N ₁ (cfu/ml)	N ₂ (cfu/ml)	N ₃ (cfu/ml)	N _p (cfu/ml)	SD
2	40000	2000	<1,00 x 10 ¹	/	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
3	20000	1000	<1,00 x 10 ¹	/	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
4	10000	500	<1,00 x 10 ¹	/	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
5	5000	250	<1,00 x 10 ¹	/	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
6	2500	125	<1,00 x 10 ¹	/	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	0,00
7	1250	62,5	6,00 x 10 ²	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹	2,07 x 10 ²	3,41 x 10 ²
8	625	31,25	1,48 x 10 ⁵	1,48 x 10 ⁵	2,57 x 10 ⁴	1,07 x 10 ⁵	7,06 x 10 ⁴
9	312,5	15,6	8,90 x 10 ⁵	/	4,40 x 10 ⁴	4,67 x 10 ⁵	5,98 x 10 ⁵
10	156,3	7,8	2,54 x 10 ⁶	/	/	2,54 x 10 ⁶	0,00
Ster.dest. voda	0,00	0,00	1,20 x 10 ⁹	3,85 x 10 ⁸	2,45 x 10 ⁸	6,10 x 10 ⁸	5,16 x 10 ⁸
Ab. EtOH	0,00	0,00	/	1,35 x 10 ⁵	2,85 x 10 ⁵	2,10 x 10 ⁵	1,06 x 10 ⁵

Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; C₁: koncentracija ekstrakta kot µg/ml EtOH; C₂: koncentracija ekstrakta kot µg/ml TSB; N₁, N₂, N₃: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; N_p: povprečna vrednost števila bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; SD: standardna deviacija; **Ster.dest.voda**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni etanol

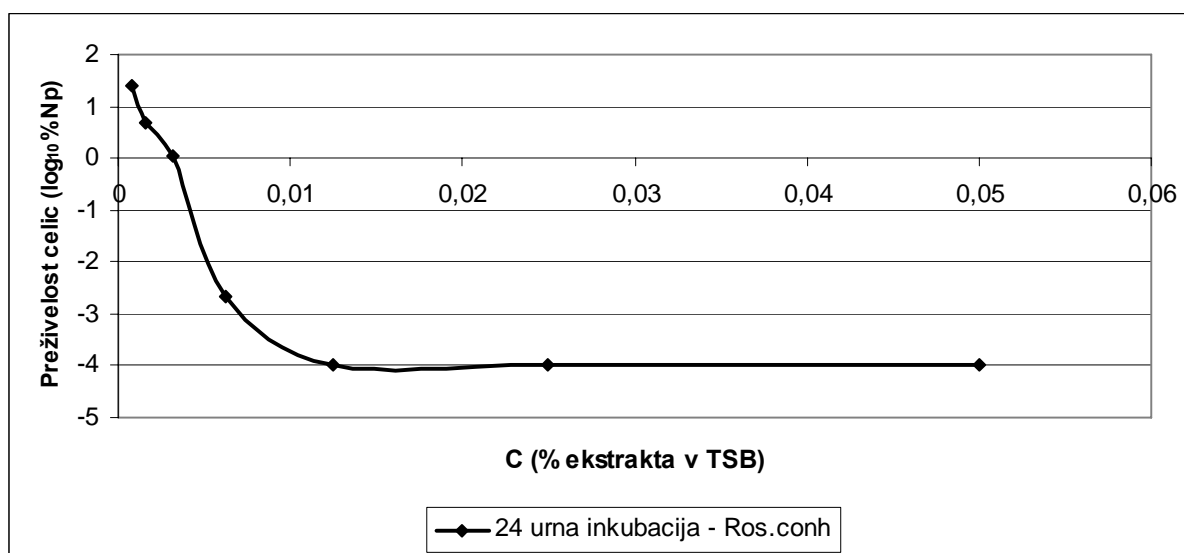
Da bi določili MBC smo podatke iz preglednice 4-13 najprej preračunali v % preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (preglednica 4-14) kot navajata Canillac in Mourey (2003).

Preglednica 4-14: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		24-urna inkubacija
	C ₁ (µg /ml TSB)	C ₂ (% v TSB)	log ₁₀ % N _p (% preživelih)
1	4000	0,4	/
2	2000	0,2	-4,05
3	1000	0,1	-4,05
4	500	0,05	-4,05
5	250	0,025	-4,05
6	125	0,0125	-4,05
7	62,5	0,00625	-2,68
8	31,25	0,003125	0,03
9	15,6	0,00156	0,67
10	7,8	0,000781	1,40

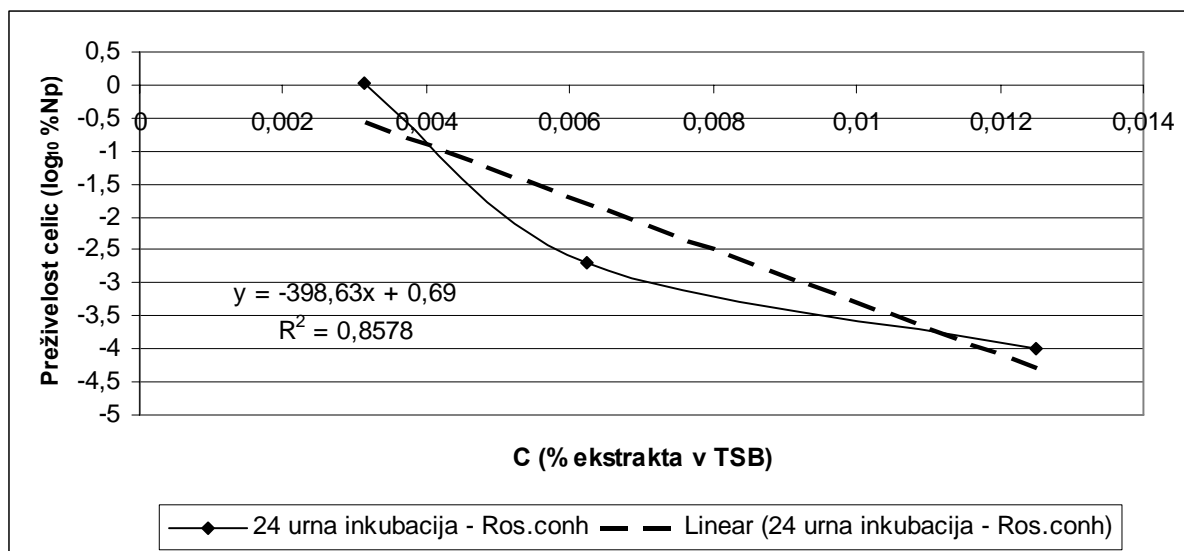
Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; log₁₀ %N_p: logaritmirani povprečni odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh po 24-urni inkubaciji; C (%): utežni odstotki ekstrakta v gojišču TSB

Vrednost MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.conh dodanega v gojišče TSB, pri kateri preživi 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 (log₁₀ 0,1 = -1) po 24-urni inkubaciji (slika 4-10).



Slika 4-10: Preživelost bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 24 inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh (10 vol. % dodatek)

Iz preglednice 4-14 in slike 4-10 je razvidno, da je MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji določena med 0,003125 in 0,00625 % ekstrakta Ros.conh v TSB oz. med 31,25 in 62,5 µg ekstrakta/ml TSB. Za natančnejšo določitev MBC smo izračunali enačbo premice (slika 4-11) in računsko določili MBC.



Slika 4-11: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 24-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -398,63 \times \text{MBC} + 0,69$$

$$\text{MBC} = 0,00424 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$

MBC ekstrakta Ros.conh za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 24-urni inkubaciji je 0,00424 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 42,4 µg ekstrakta/ml TSB.

4.2.2.3 Protimikroben učinek ekstraktov Ros.con in Ros.conh na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov po 48-urni inkubaciji

V zadnjem delu eksperimentalnega dela smo primerjali protimikrobni učinek obeh ekstraktov Ros.con in Ros.conh med seboj po 48-urni inkubaciji. Kot testne bakterije smo izbrali bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM58. Uporabili smo tekoče gojišče z 10 vol. % dodatki, kar pomeni, da smo v 9 ml gojišča TSB dodali 0,5 ml čiste 24-urne kulture bakterij s koncentracijo 10^7 cfu/ml in 0,5 ml ekstrakta rožmarina. Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje paralelk v preglednici 4-15. Poleg podatkov o raztopinah, so prikazane koncentracije bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB po 48-urni inkubaciji.

Preglednica 4-15: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh po 48-urni inkubaciji (10 vol. % dodatkov)

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		48-urna inkubacija	
	C ₁ (µg /ml EtOH)	C ₂ (µg /ml TSB)	Ros.con N ₁ (cfu/ml),	Ros.conh N ₂ (cfu/ml),
2	40000	2000	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹
3	20000	1000	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹
4	10000	500	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹
5	5000	250	<1,00 x 10 ¹	<1,00 x 10 ¹
6	2500	125	3,25 x 10 ³	2,27 x 10 ²
7	1250	62,5	4,90 x 10 ⁴	4,45 x 10 ³
8	625	31,25	5,80 x 10 ⁴	2,13 x 10 ⁵
9	312,5	15,60	7,70 x 10 ⁶	1,73 x 10 ⁷
10	156,3	7,80	/	7,16 x 10 ⁷
Ster.dest.voda	0,00	0,00	2,10 x 10 ⁷	4,4 x 10 ⁷
Ab. EtOH	0,00	0,00	/	/

Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; C₁: koncentracija ekstrakta kot µg/ml EtOH; C₂: koncentracija ekstrakta kot µg/ml TSB; N₁, N₂: število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB; **Ster.dest.voda**: sterilna destilirana voda; **Ab. EtOH**: absolutni etanol

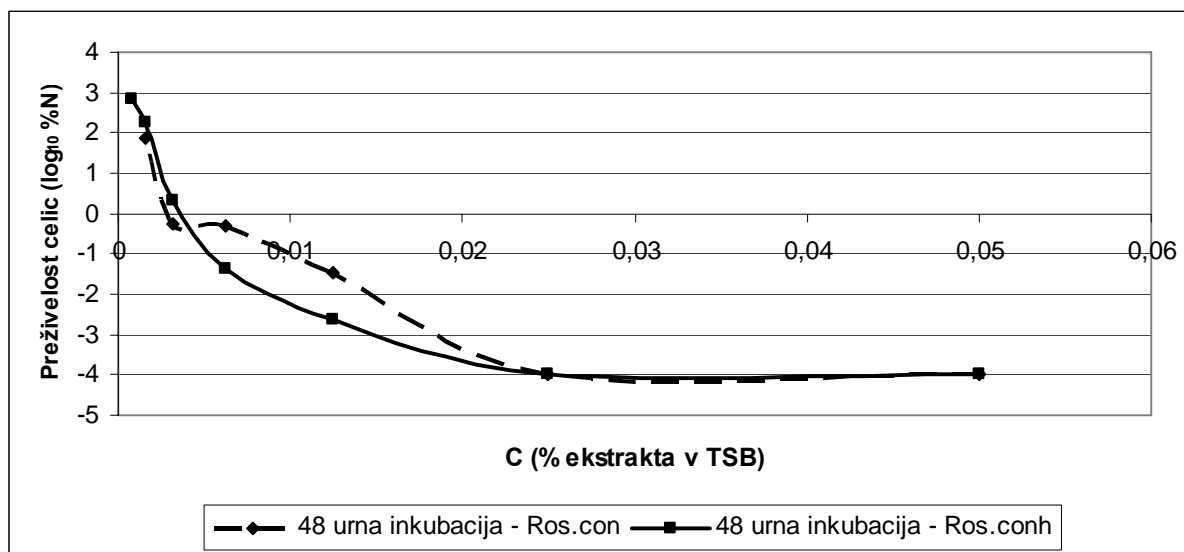
Da bi določili MBC smo podatke iz preglednice 4-15 najprej preračunali v % preživelih bakterij in nato izračunane vrednosti še logaritmirali (preglednica 4-16) kot navajata Canillac in Mourey (2003).

Preglednica 4-16: Določitev MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB z 10 vol. % dodatkov

Oznaka raztopine	Koncentracija ekstrakta		48-urna inkubacija	
	C ₁ (µg /ml TSB)	C ₂ (% v TSB)	log ₁₀ % N ₁ (% preživelih)	log ₁₀ % N ₂ (% preživelih)
1	4000	0,4	/	/
2	2000	0,2	-4,05	-4,05
3	1000	0,1	-4,05	-4,05
4	500	0,05	-4,05	-4,05
5	250	0,025	-4,05	-4,05
6	125	0,0125	-1,49	-2,64
7	62,5	0,00625	-0,31	-1,35
8	31,25	0,003125	-0,24	0,33
9	15,60	0,001563	1,89	2,24
10	7,80	0,000781	/	2,85

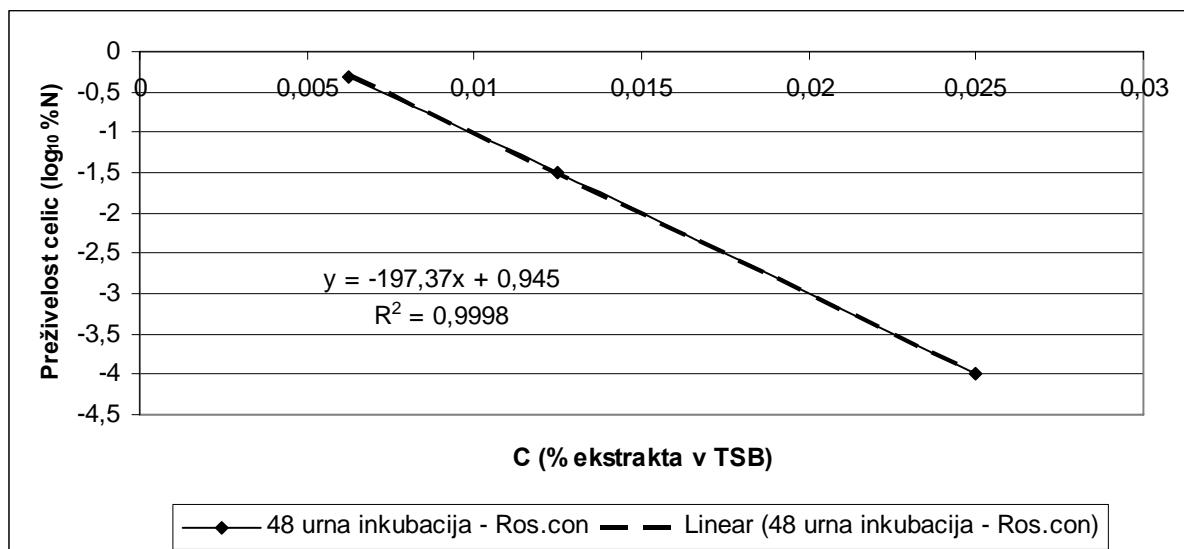
Legenda: /: poskus pri izbrani koncentraciji raztopine ni bil izveden; $\log_{10} \%N_1$: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.con po 48-urni inkubaciji; $\log_{10} \%N_2$: logaritmirani odstotki preživelosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču TSB pri različnih koncentracijah ekstrakta Ros.conh po 48-urni inkubaciji; C (%): utežni odstotki ekstrakta v gojišču TSB

Vrednost MBC smo določili kot najmanjšo koncentracijo ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh dodanega v gojišče TSB, pri kateri preživi 0,1 % bakterij vrste *L. monocytogenes* ŽM58 ($\log_{10} 0,1 = -1$) po 48-urni inkubaciji (slika 4-12).



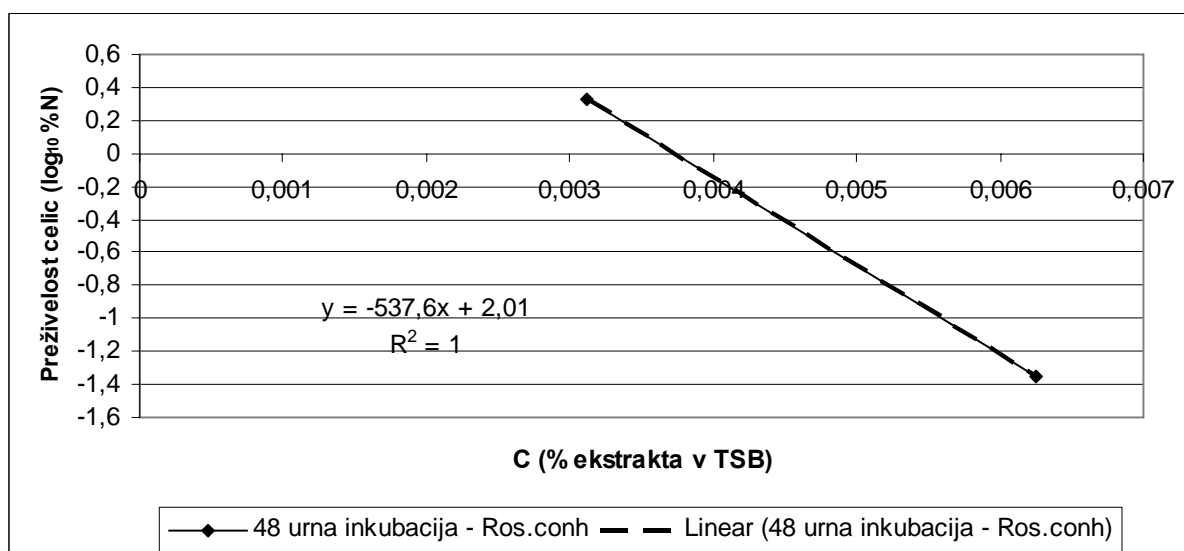
Slika 4-12: Preživelost bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 48-urni inkubaciji v TSB pri različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh (10 vol. % dodatek)

Iz preglednice 4-16 in slike 4-12 je razvidno, da je MBC ekstrakta Ros.con za bakterije vrste *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov in po 48-urni inkubaciji določena med 0,00625 in 0,0125 % ekstrakta Ros.con v TSB oz. med 62,5 in 125 $\mu\text{g/ml}$ TSB. MBC ekstrakta Ros.conh za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov in po 48-urni inkubaciji pa je določena med 0,00625 in 0,003125 % ekstrakta Ros.conh v TSB oz. med 31,25 in 62,5 $\mu\text{g/ml}$ TSB. Za natančnejšo določitev MBC smo izračunali premici (sliki 4-13 in 4-14) in računsko določili MBC.



Slika 4-13: Določitev MBC ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -197,37 \times \text{MBC} + 0,945$$
$$\text{MBC} = 0,00985 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$



Slika 4-14: Določitev MBC ekstrakta Ros.conh za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 48-urni inkubaciji v gojišču TSB (10 vol. % dodatek)

$$-1 = -537,6 \times \text{MBC} + 2,01$$
$$\text{MBC} = 0,00560 \text{ \% ekstrakta v TSB}$$

MBC ekstrakta Ros.con za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 48-urni inkubaciji je 0,00985 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 98,5 µg ekstrakta/ml TSB. MBC ekstrakta Ros.conh za sev *L. monocytogenes* ŽM58 pri 10 vol. % dodatkov po 48-urni inkubaciji je 0,00560 % dodanega ekstrakta v TSB oziroma 56 µg ekstrakta/ml TSB.

Preglednica 4-17: MBC ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije sevov *L. monocytogenes* ŽM115 in *L. monocytogenes* ŽM58

Opis:	MBC ($\mu\text{g} / \text{ml TSB}$)							
	Ros.con				Ros.conh			
Vrsta ekstrakta	10 vol. %		20 vol. %		10 vol. %		20 vol. %	
Količina dodatkov	10 vol. %	20 vol. %	10 vol. %	20 vol. %	10 vol. %	20 vol. %	10 vol. %	20 vol. %
Čas inkubacije	24 ur	48 ur	24 ur	48 ur	24 ur	48 ur	24 ur	48 ur
<i>L. monocytogenes</i> ŽM115	401,0	252,5	15,63	40,7	/	/	< 31,25	/
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	53,9	98,5	/	/	42,4	56,0	/	/

4.3 PROTIMIKROBEN UČINEK NaNO_2 DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU TSB

Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 smo določali ob dodatku NaNO_2 z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB na dva načina:

- v prvem primeru smo NaNO_2 v gojišče TSB dodali pred toplotno sterilizacijo,
- v drugem primeru pa smo ga dodali po toplotni sterilizaciji gojišča TSB z uporabo filtrne sterilizacije. Postopek je opisan v poglavju 3.3.5.

Vse poskuse smo izvajali v paralelkah. Vsebnost NaNO_2 dodanega v gojišče TSB pred in po toplotni sterilizaciji gojišča smo določili spektrofotometrično (poglavje 3.3.6.3).

Preglednica 4-18: Rast bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58 v gojišču TSB pri različnih koncentracijah NaNO_2 po 24-urni inkubaciji

NaNO_2 dodan v TSB pred sterilizacijo				NaNO_2 dodan v TSB po sterilizaciji			
C_1 ($\mu\text{gNaNO}_2 / \text{ml TSB}$)	N_1 (cfu/ml)	N_2 (cfu/ml)	C_2 ($\mu\text{gNaNO}_2 / \text{ml TSB}$)	N_3 (cfu/ml)	N_4 (cfu/ml)	N_5 (cfu/ml)	C_3 ($\mu\text{gNaNO}_2 / \text{ml TSB}$)
0	$7,75 \times 10^8$	$8,00 \times 10^8$	0	$7,3 \times 10^8$	$3,45 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	0
50	0	0	/	/	/	/	/
100	0	0	98	$7,95 \times 10^6$	$1,71 \times 10^6$	$1,54 \times 10^6$	123
200	0	0	172,5	$5,15 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	221

Legenda: C_1 : koncentracija NaNO_2 dodanega v gojišče TSB pred sterilizacijo gojišča; C_2 : spektrofotometrično določena koncentracija NaNO_2 v gojišču TSB po sterilizaciji gojišča; C_3 : spektrofotometrično določena koncentracija NaNO_2 v gojišču TSB; N_1, N_2 : število bakterij vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču TSB pri različnih koncentracijah NaNO_2 dodanega v gojišče pred sterilizacijo – dve paralelki N_3, N_4, N_5 : število bakterij vrste *L. monocytogenes* v tekočem gojišču TSB pri različnih koncentracijah NaNO_2 dodanega v gojišče po sterilizaciji – tri paralelke

Iz preglednice 4-18 je razvidno, da je koncentracija NaNO_2 v gojiščih TSB, katerim smo dodali NaNO_2 pred toplotno sterilizacijo gojišča TSB, po sterilizaciji malo nižja, vendar pa po 24-urni inkubaciji ni bilo preživelih bakterij vrste *L. monocytogenes*. V drugem primeru, ko smo NaNO_2 dodali v gojišče TSB po sterilizaciji smo spektrofotometrično določili višje vrednosti Na.-nitrita, vendar so bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji preživele tudi v gojišču, ki mu je bilo dodano $200 \mu\text{g NaNO}_2$.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovnimi hipotezami smo preverili, ali in v kakšnih koncentracijah ekstrakta rožmarina Ros.con in Ros.conh, ki sta vsebovala različno koncentracijo karnozolne kisline, vplivata na živost bakterij rodu *Listeria* in primerjalno tudi na bakterije *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*, ki so prav tako kot listerije po Gramu pozitivne bakterije. Hkrati pa nas je zanimalo ali bo imel ekstrakt rožmarina vpliv na bakterije rodu *Salmonella*, ki so po Gramu negativne bakterije in zaradi tega manj občutljive na protimikrobna sredstva. Vstop v celico namreč otežuje kompleksna celična ovojnica z lipopolisaharidno zunanjo membrano, ki je Gram pozitivne bakterije nimajo (Moreno in sod., 2006).

Fenolne spojine, med katere spada tudi karnozolna kislina, so glavne komponente v ekstraktih rožmarina, ki so odgovorne za protimikrobno delovanje. Ekstrakta, ki smo ju uporabili v eksperimentalnem delu, sta vsebovala 22,04 % karnozolne kisline (Ros.con) in 40,49 % karnozolne kisline (Ros.conh). Nismo pa imeli podatkov o ostalih kemijskih spojinah prisotnih v ekstraktih, kot so na primer karnozol, metil karnozat, rožmarinska kislina, rožmanol, epirožmanol, epirožmanol metil eter, itd., ki imajo lahko kot minorne komponente prisotne v ekstraktu, ključno vlogo pri protimikrobnem delovanju (Burt, 2004). Tudi primerjava protimikrobne aktivnosti z ostalimi avtorji je precej težavna, saj se težave pojavijo že pri osnovni definiciji MIC in ostalih uporabljenih pojmov. Poleg tega se rezultati razlikujejo tudi zaradi različnih načinov izvedbe ekstrakcije oziroma pridobivanja ekstraktov, pomembno je iz katerih delov rastline je bil ekstrakt pripravljen, letnega časa pobiranja, klimatskih pogojev, sestave tal, itd (Ibanez in sod., 1999).

Ker se rožmarin v živilstvu večinoma uporablja pri pripravi mesa in mesnih izdelkov, smo preverili tudi protimikrobno delovanje NaNO_2 na bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM58, saj ima NaNO_2 poleg soli in začimb še vedno največji praktičen pomen za inhibicijo mikroorganizmov v mesu (Smole Možina in Bem, 2003).

Poskus smo izvedli z dvema različnima *in vitro* metodama za ugotavljanje bakterijske občutljivosti na protimikrobna sredstva: metodo difuzije v agarju in metodo razredčevanja v tekočem gojišču.

5.1.1 Metoda difuzije v gojišču TSA

Metoda difuzije v agarju je rutinska metoda, ki je relativno enostavna in se uporablja za ugotavljanje občutljivosti bakterijskih sevov, še posebej za določanje protimikrobnega delovanja novih protimikrobnih sredstev. Ena izmed največjih omejitev te sicer enostavne metode je, da ekstrakt včasih težje difundira v agar (Dorman in Deans, 2000).

5.1.1.1 Vpliv vrste ekstrakta

Iz preglednice 4-1 in prilog od A8-1 do A8-14 je razvidno, da je bila v povprečju za inhibicijo rasti testnih bakterij potrebna manjša količina ekstrakta Ros.conh, ki je vseboval 40,49 % karnozolne kisline, kot ekstrakta Ros.con, ki je vseboval 22,04% karnozolne kisline. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je karnozolna kislina komponenta v ekstraktu, ki je imela največji vpliv na inhibicijo rasti. Med bakterijami sevov *B. cereus* ŽMJ91, *L. monocytogenes* ŽM92, *L. monocytogenes* ŽM108 in *L. ivanovii* ŽM65 pa se je pokazalo, da ni bilo opazne razlike v MIC med obema ekstraktoma, zato sklepamo, da na inhibicijo rasti vplivajo tudi druge kemijske komponente, ki so prisotne v ekstraktu in imajo lahko skupaj s karnozolno kislino ali drugimi dejavniki okolja sinergistično oziroma antagonistično delovanje na izbrane testne bakterije (Burt, 2004; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005a).

5.1.1.2 Vpliv koncentracije ekstrakta

Iz preglednice 4-3 in prilog A8-1 do A8-14 je razvidno, da različne koncentracije ekstraktov po pričakovanju vplivajo na velikost inhibicijskih con. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.con za različne bakterije se gibljejo od 625 µg ekstrakta/ml EtOH do 5000 µg ekstrakta/ml EtOH, MIC ekstrakta Ros.conh pa v območju od 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH do 2500 µg ekstrakta/ml EtOH. Le zadnja, najnižja testirana koncentracija (156,25 µg ekstrakta/ml EtOH) ni imela inhibitornega učinka na nobeno od testiranih bakterij, koncentracija 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH pa le na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115.

Inhibicijo rasti pri bakterijah sevov *B. cereus* ŽMJ91 in *L. monocytogenes* ŽM92 smo dosegli že pri zelo nizkih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh (625 µg ekstrakta/ml EtOH). Iz preglednice 4-3 je razvidno, da koncentracija ekstrakta rožmarina vpliva na velikost inhibicijske cone nastale pri metodi difuzije v gojišču TSA in s tem na protimikrobni učinek. Tako velja, da nižja kot je koncentracija ekstrakta (µg ekstrakta/ml EtOH), manjša je povprečna izmerjena inhibicijska cona za izbrane testne bakterije.

5.1.1.3 Vpliv vrste bakterij

Iz preglednice 4-4 in prilog A8-1 do A8-14 je razvidno, da imata ekstrakta rožmarina na vse izbrane Gram pozitivne bakterije protimikrobni učinek, medtem ko nimata protimikrobnega učinka na bakterije rodu *Salmonella*, saj pri nobeni od testiranih koncentracij ekstraktov ni bilo inhibicije rasti. Razlog, da ekstrakta rožmarina nista imela protimikrobnega delovanja na bakterije rodu *Salmonella*, lahko pripišemo lipopolisaharidni zunanji membrani, ki omejuje difuzijo hidrofobnih komponent v notranjost celice (Burt, 2004; Davidson in Branen, 2005).

V povprečju so bile tako najbolj odporne bakterije rodu *Salmonella*, na katere ekstrakt ni imel protimikrobnega učinka, sledile pa so bakterije vrste *L. innocua*, *Staph. aureus*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* in na koncu kot najmanj odporna bakterijska vrsta *B. cereus*, ki spada med Gram pozitivne, sporogene bakterije. Kljub temu smo vse testirane bakterijske seve glede na velikost inhibicijskih con razvrstili v štiri skupine, znotraj katerih so bakterijski sevi glede na izmerjene povprečne inhibicijske cone med seboj primerljivi: bakterije vrste *B. cereus* in sev *S. Infantis* so razvrščene vsaka v svojo skupino, ostalih pet vrst bakterij pa si deli isto skupino z vsaj še eno vrsto testnih bakterij, tako je protimikroben učinek glede na

izmerjeno povprečno inhibicijsko cono podoben za vrste *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *Staph. aureus* in *L. innocua*.

Glede velikosti inhibicijskih con iztopa bakterijska vrsta *B. cereus* z izmerjenimi conami tudi do 17,19 mm in 16, 52 mm (priloga A8-2).

Rezultati nas pripeljejo do sklepa, da na protimikrobno delovanje uporabljenega ekstrakta vpliva vrsta testiranega mikroorganizma, še posebej je opazna razlika v učinku, ko gre za primerjavo med Gram pozitivnimi in Gram negativnimi bakterijami. Vzrok za različno izmerjene povprečne inhibicijske cone pripisujemo različni naravni oziroma prirojeni odpornosti, ki je vedno značilna za določeno bakterijsko skupino, rod, vrsto (Berce in sod., 2004).

5.1.1.4 Vpliv vrste seva bakterij vrste *L. monocytogenes*

Osem sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* smo grupirali na podlagi izmerjenih povprečnih inhibicijskih con (preglednica 4-5). Glede na rezultate smo dobili dve skupini, znotraj katerih so povprečne inhibicijske cone med seboj primerljive. V prvo skupino spadajo *L. monocytogenes* ŽM115, *L. monocytogenes* ŽM92 in *L. monocytogenes* ŽM51 in v drugo *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM53. Povprečne inhibicijske cone pri sevih *L. monocytogenes* ŽM108 in *L. monocytogenes* ŽM80 so primerljive z vsemi testiranimi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes*. V povprečju je bil tako najbolj odporen bakterijski sev z oznako ŽM53, sledili pa so sevi z oznakami ŽM58, ŽM80, ŽM108, ŽM52, ŽM51, ŽM92 in na koncu kot najmanj odporni bakterijski sev z oznako ŽM115. Menimo, da je do razlik v odpornosti med posameznimi sevi znotraj bakterij vrste *L. monocytogenes* prišlo zaradi različne pridobljene odpornosti, ki je rezultat spremenjene celične fiziologije in strukture in je nastala zaradi genetskih sprememb mikroorganizma, do katerih je lahko prišlo zaradi mutacij kromosomskega ali plazmidnega gena (Berce in sod., 2004).

5.1.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču TSB

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je široko uporabna in zanesljiva metoda za določanje učinkovitosti protimikrobnih lastnosti, s katero smo primerjali protimikrobno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh z določanjem minimalne baktericidne koncentracije (MBC). V metodo smo vključili dva seva *L. monocytogenes* ŽM58 in *L. monocytogenes* ŽM115, ki smo ju izbrali na osnovi predhodno določenih MIC z metodo difuzije v gojišču TSA.

Vrednosti minimalnih baktericidnih koncentracij se glede na izbrani sev, količino vseh dodatkov v gojišče, vrsto ekstrakta in časa inkubacije razlikujejo in so podane v preglednici 4-17.

Ugotovili smo, da je bilo za določitev MBC pri 10 vol. % dodatkov, ne glede na izbrani bakterijski sev in čas inkubacije potrebno dodati nižjo koncentracijo ekstrakta Ros.conh v primerjavi z ekstraktom Ros.con, kar je razumljivo, saj je Ros.conh vseboval skoraj dvakratno koncentracijo glavne protimikrobne učinkovine – karnozolne kisline v primerjavi z ekstraktom Ros.con. Kljub dvakratni koncentraciji karnozolne kisline pri ekstraktu Ros.conh

(40,49 % karnozolne kisline) v primerjavi z Ros.con (22,04% karnozolne kisline), pa vrednosti MBC pri slednjem niso za polovico večje kot bi sicer pričakovali, če bi upoštevali le vsebnost karnozolne kisline v ekstraktu. Torej, da razlike vrednosti MBC med obema ekstraktoma niso še večje, verjetno obstaja dejstvo, da so tudi ostale komponente ekstrakta, ki so lahko tudi fenolne spojine, protimikrobno aktivne (Burt, 2004).

MBC je bila za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 po 24-urni inkubaciji, pri 10 vol. % dodatkov v gojišče TSB in ekstraktu Ros.con določena pri vrednosti 53,9 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB, za sev *L. monocytogenes* ŽM115 pri enakih pogojih in dodatkih pa pri vrednosti 401 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB. Precej višjo MBC določeno za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 si lahko razlagamo tudi z drugačnim obrambnim mehanizmom, kot posledico pridobljene odpornosti. Bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM115 je bil namreč izoliran iz živila (tatarski biftek), kjer predvidevamo je bil izpostavljen številnim stresom (sprememba T, pH vrednosti, itd.) kar zaporedno vodi k povečanju lastne odpornosti. Ker sev *L. monocytogenes* ŽM58 (nemški referenčni sev) ni bil izoliran iz podobnega okolja, smo pričakovali, da bo pokazal manjšo odpornost na izbrana ekstrakta v primerjavi z bakterijskim sevom *L. monocytogenes* ŽM115, kar so potrdili tudi rezultati.

Pri preučevanju morebitne povezave med 10 vol. % in 20 vol. % dodatkov za bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM115 smo ugotovili, da je bila MBC pri 10 % dodatkov določena pri 401 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB po 24-urni inkubaciji in pri 252,5 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB po 48-urni inkubaciji. MBC pri 20 vol. % dodatkov, ravno tako za bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM115, pa je bila določena pri 15,63 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB po 24-urni inkubaciji in pri 40,07 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB po 48-urni inkubaciji. Ker so rezultati pokazali, da večja količina dodatkov v tekoče gojišče TSB precej zniža MBC sklepamo, da večje količine dodatkov, posledično povzročajo večje spremembe v sestavi samega gojišča (Canillac in Mourey, 2003).

Pri pregledu časa inkubacije, v enakih drugih razmerah (bakterijski sev, ekstrakt in količina dodatkov), je iz preglednice 4-17 razvidno, da je bila v večini primerov MBC po 48-urni inkubaciji pri temperaturi 37 °C določena pri višjih vrednostih, v primerjavi s 24-urno inkubacijo pri 37 °C. Trditev pa ne velja, za bakterijski sev *L. monocytogenes* ŽM115 pri 10 vol. % dodatkov. V tem primeru je MBC po 24-urni inkubaciji pri 37 °C določena pri vrednosti 401 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB in po 48-urni inkubaciji pri 37 °C 252,5 µg ekstrakta Ros.con/ml TSB. Tako pri proučevanju morebitne povezave med časom inkubacije, bakterijskim sevom in količini dodatkov nismo ugotovili direktne povezave.

5.1.3 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstrakta rožmarina Ros.con na različne koncentracije bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115

Protimikroben učinek ekstrakta rožmarina Ros.con na različne koncentracije bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM115 smo podali v obliki krivulj (slika 4-7), ki se pogosto uporabljajo za ovrednotenje protimikrobnega delovanja sredstev proti bakterijam in drugim mikroorganizmom. Na ta način dobimo rezultate večjega števila vzorčenj, ki so bolj informativni kot rezultati metod s končno točko merjenja (Canillac in Mourey, 2003). Meritve koncentracij mikrobnih celic smo izvedli v neselektivnem gojišču TSB, kateremu smo dodali samo eno koncentracijo protimikrobnega sredstva (500 µg/ml TSB) in različne koncentracije

inokuluma testiranega mikroorganizma. Koncentracijo protimikrobnega sredstva, v tem delu eksperimentalnega dela, smo izbrali na osnovi rezultatov difuzijske metode v agarju.

Ugotovili smo, da se krivulji inhibicije, ki predstavljata vzorca z različno začetno koncentracijo celic, tekom 24-urne inkubaciji pri temperaturi 37 °C v zadnji točki merjenja (po 24 urah) med seboj že zelo približujeta. Podobno velja tudi za krivulji rasti, kjer smo namesto ekstrakta Ros.con dodali sterilno destilirano vodo. V zadnji točki merjenja (po 24 urah), se krivulji, ki sta imeli različno začetno koncentracijo celic, ravnatoko že zelo približata. S tem poskusom smo potrdili našo domnevo, da manjše razlike v začetni koncentraciji inokuluma po 24-urni inkubaciji, ne vplivajo na končni rezultat protimikrobnega delovanja ekstraktov.

5.1.4 Protimikroben učinek NaNO₂ določen z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB

Poleg ekstraktov rožmarina smo zgolj informativno preverili tudi protimikrobno delovanje NaNO₂ na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58. NaNO₂ smo v neselektivno gojišče TSB dodajali pred toplotno sterilizacijo in po toplotni sterilizaciji gojišča z uporabo filtrne sterilizacije in na ta način preverjali njegovo učinkovitost. Koncentracije, ki smo jih v eksperimentalnem delu uporabili (50 ppm, 100 ppm in 200 ppm), so koncentracije, ki se tudi običajno dodajajo kot sredstvo za inhibicijo mikroorganizmov v meso in mesne izdelke.

Rezultati so bili kljub izvedenim ponovitvam vedno znova presenetljivi, saj je že zelo nizka koncentracija dodanega NaNO₂ v gojišče TSB pred toplotno sterilizacijo (50 ppm) povzročila popolno uničenje bakterijskih celic seva *L. monocytogenes* ŽM58. Ko pa smo NaNO₂ v gojišče dodali po toplotni sterilizaciji z uporabo filtrne sterilizacije, je bil njegov učinek precej manjši, in smo preživelost celic ocenili na 10⁶ cfu/ml, v kontrolnem vzorcu z uporabo sterilne destilirane vode namesto raztopine NaNO₂ pa na 10⁸ cfu/ml ravno tako bakterij seva *L. monocytogenes* ŽM58. Ker se je pri tem pojavil dvom o korektnosti rezultatov, saj naj bi nitrit pri temperaturi sterilizacije popolnoma razpadel (Cammack in sod., 1999), smo se odločili, da dejansko koncentracijo NaNO₂ v tekočem gojišču TSB določimo spektrofotometrično, po navodilih za določanje vsebnosti NaNO₂ v vzorcih (Čadež in Mahne, 2005). Izmerjene koncentracije NaNO₂ so podane v prilogi A8-15 in so bile zelo podobne koncentracijam, ki smo jih tudi dejansko dodali v gojišče. Kot primer lahko navedem, da smo pred toplotno sterilizacijo dodali 100 µg NaNO₂/1 ml gojišča TSB (100 ppm). Spektrofotometrično smo v istem vzorcu določili 98 µg NaNO₂/1 ml gojišča TSB. V gojišču z dodanimi 100 µg NaNO₂/1 ml gojišča TSB (100 ppm) z uporabo filtrne sterilizacije, pa je spektrofotometer pri valovni dolžini 540 nm določil 123 µg NaNO₂/1 ml gojišča TSB. Naš dvom se je tako še poglobil, saj literatura navaja (Cammack in sod., 1999), da nitrit pri temperaturi sterilizacije popolnoma razpade. Ker proučevanje delovanja NaNO₂ ni bil osnovni namen našega dela, smo se odločili, da v tem poglavju raziskovalno delo zaključimo.

5.2 SKLEPI

- Potrdili smo protimikrobno delovanje ekstraktov Ros.con in Ros.conh na različne vrste bakterij rodu *Listeria* in tudi na druge Gram pozitivne bakterije kot so bakterije vrst *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*. Bolj učinkovit je bil ekstrakt Ros.conh z večjo vsebnostjo karnozolne kisline, vendar razlike v MIC in MBC med ekstraktoma niso bile velike, zato sklepamo, da k učinkovitosti prispevajo tudi druge sestavine ekstraktov.
- Protimikrobnega učinka nismo določili pri Gram negativnih bakterijah rodu *Salmonella*.
- Vrednosti MIC in MBC, ki smo jih pridobili z metodo difuzije v trdno gojišče in z metodo razredčevanja v tekočem gojišču se med seboj razlikujejo, kar pripisujemo različni metodiki določitve MIC in MBC.
- Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina je odvisen od: vrste ekstrakta, koncentracije ekstrakta, vrste bakterij in seva bakterij vrste *L. monocytogenes*.
- Minimalne baktericidne koncentracije ekstrakta Ros.con za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 so višje (401 in 252,5 µg/ml TSB po 24 in 48-urni inkubaciji) v primerjavi z MBC določene za bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 (53,9 in 98,5 µg/ml TSB po 24 in 48-urni inkubaciji) kar potrjuje hipotezo, da je protimikroben učinek odvisen od seva bakterij vrste *L. monocytogenes*.

PREDLOGI ZA NADALJNO DELO:

Dobro bi bilo ponovno preveriti protimikrobni učinek in stabilnost NaNO₂ dodanega v gojišče TSB pred toplotno sterilizacijo oziroma po toplotni sterilizaciji z uporabo filtrne sterilizacije. Glede na to, da smo vse poskuse izvedli v *in vitro* razmerah, predlagamo, da se preveri učinek izbranih ekstraktov na bakterije rodu *Listeria* tudi v živilih, predvsem v mesu in mesnih izdelkih in v kombinaciji z ostalimi protimikrobnimi sredstvi.

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Listeria* so kratke, Gram pozitivne, paličaste bakterije, ki so pogosto prisotne v človeškem okolju. Za človeka patogene so bakterije vrste *L. monocytogenes* in *L. ivanovii*, vendar so humani primeri listerioze, ki jih povzroča *L. ivanovii* zelo redki. Glavni vir listerij za človeka je hrana kontaminirana z bakterijami *L. monocytogenes*, za katere je značilno, da preživijo niz tehnoloških operacij, saj tolerirajo visoke koncentracije soli, relativno nizko vrednost pH, še posebej velik problem pa predstavlja njihova rast v živilih pri temperaturah hladilnika. Humana listerioza, ki jo povzročajo bakterije vrste *L. monocytogenes* je prav tako redka bolezen, zaskrbljujoče pa je dejstvo, da je smrtnost zelo visoka.

Mikrobna kontaminacija živil in oksidacija sta tako odločilna dejavnika, ki vplivata na kakovost živil in njihovo obstojnost. V zadnjem času se pojavlja vedno večje zanimanje za naravna protimikrobna sredstva, saj kupci dajejo prednost živilom brez kemijskih konzervansov, z manjšo koncentracijo soli in sladkorja ter brez ekstremnih načinov konzerviranja. Ena od možnosti je uporaba naravnih rastlinskih aditivov, med katere spada tudi rožmarin, ki imajo lahko tako antioksidativne kot tudi protimikrobne značilnosti, a so na žalost še ne dobro raziskani vir protimikrobnih snovi. Uporaba rastlin, njihovih eteričnih olj ali izoliranih aktivnih snovi za kontrolo kvara živil tako predstavlja zaželeno alternativo kemičnim konzervansom. Poleg tega imajo zelišča in začimbe pomembno vlogo pri izboljšanju senzoričnih lastnosti in lahko dopolnijo prehransko vrednost živil.

Določanje protimikrobne aktivnosti je precej težavno, saj se težave pojavijo že pri osnovni definiciji minimalne inhibicijske koncentracije (MIC), ki je najpogosteje uporabljeno merilo v raziskavah za določanje protimikrobnega učinka snovi. Za določanje protimikrobne aktivnosti se uporablja več metod, v diplomski nalogi pa smo ugotavljali protimikrobno aktivnost na bakterije rodu *Listeria* in primerjalno tudi na bakterije *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Salmonella* Infantis z dvema različnima metodama in uporabo dveh ekstraktov rožmarina z različno vsebnostjo karnozolne kisline. Ekstrakt Ros.con je vseboval 22,04 % karnozolne kisline, Ros.conh pa 40,49 % karnozolne kisline. Najprej smo uporabili metodo difuzije v trdno gojišče, s katero smo želeli določiti minimalne inhibitorne koncentracije obeh ekstraktov in hkrati preveriti, ali se te koncentracije z vrsto oziroma sevom med seboj razlikujejo. Kot vrednost MIC smo šteli tisto koncentracijo, pri kateri ni bilo vidne rasti bakterij na gojišču. Z metodo razredčevanja v tekoče gojišče, pa smo določali minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije sevov *L. monocytogenes* ŽM115 in *L. monocytogenes* ŽM58. Kot vrednost MBC smo šteli tisto koncentracijo, pri kateri preživi 0,1 % testiranih bakterij.

Pri metodi difuzije v trdno gojišče smo za vse testirane Gram pozitivne bakterije določili MIC v območju med 625 µg ekstrakta/ml EtOH do 5000 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.con in med 312,5 µg ekstrakta/ml EtOH do 2500 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt Ros.conh in hkrati potrdili domnevo, da je odpornost listerij proti ekstraktom rožmarina odvisna od vrste in seva. Ekstrakta rožmarina nista imela protimikrobnega učinka na bakterije rodu *Salmonella*. Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je potrdila, da je preživelost bakterij vrste *L. monocytogenes* sevno specifična. Vrednosti MBC smo v večini poskusov določili med 15,63 µg/ml TSB in 98,5 µg/ml TSB za oba uporabljena ekstrakta.

Vrednosti MIC in MBC so bile skoraj v vseh primerih višje pri uporabi ekstrakta Ros.conh, kar je razumljivo, saj je vseboval skoraj dvakratno koncentracijo glavne protimikrobne

učinkovine – karnozolne kisline. Ne preseneča pa dejstvo, da razlike povprečnih vrednosti MIC in MBC med obema ekstraktoma niso še večje, saj so tudi ostale komponente ekstrakta, ki verjetno prav tako spadajo med fenolne spojine, protimikrobno aktivne.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktobra 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-46

Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J.A., Roca M., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic – mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extracts from different raw material. *Journal Chromatography A*, 1120: 221-229

Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3530-3535

Araujo C., Sousa M.J., Ferreira M.F., Leao C. 2003. Activity of essential oils from mediterranean *Lamiceae* species against food spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, 66: 625-632

Baskan S., Oztekin N., Erim B. 2007. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 101: 1748-1752

Berce I., Sarjanović L., Smole Možina S. 2004. Naraščajoča odpornost proti antibiotikom pri mikroorganizmih v prehranski verigi. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111-129

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

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

Cannilac N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18: 261-268

Cannilac N., Mourey A. 2003. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 95-103

Carrasco E., Valero A., Perez-Rodriguez F., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G. 2006. Management of microbiological modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 221-226

Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 421-424

Carvalho J.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

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

Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130-135

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

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

Čadež P., Mahne I. 2005. *Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov (1. del)*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31-34

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

Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 101-109

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 Bano M.J., Castillo J., Benavente - Garcia O., Lorente J., Martin – 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 Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 10: 1359-1368

Donnelly C.W. 1999. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 225-260

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

Duxbury D. 2004. Keeping tabs on *Listeria*. *Food Technology*, 58: 74-80

El-Shenawy M.A., Marth E.H. 1988. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *Journal of Food Protection*, 51: 842-847

Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J.A., Kuri V. 2004. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380

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

George S.M., Lund B.M., Brocklehurst T.F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters Applied Microbiology*, 6: 153-156

Guazzi E., Maccioni S., Monti G., Flamini G., Cioni P.L., Morelli I. 2001. *Rosmarinus officinalis* in the gravine of Palagianello, Taranto, South Italy. *Journal of Essential Research*, 13, 4: 231-233

Guerra M.M., McLauchlin J., Bernardo F.A. 2001. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 18: 423-429

Hakkinen S.H., Karenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkanen H.M., Torronen A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2274-2279

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990

Ibanez E., Aranzazu O., Gonzalo M., Lopez-Sebastian S., Tabera J., Reglero G. 1999. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1400-1404

Ibanez E., Kubatova A., Senorans F.J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S.B. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 375-382

Jeršek B. 2006. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-20

Karapinar M., Aktug S.E. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 161-166

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktober. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Kuhn M., Goebel W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 2nd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 97-130

Kunkel D. 2004. Kailua, EHA Consulting Group
<http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/images/Listeria-monocytogenes-C.jpg>
(23.06.2007): 1. str

Lado B.H., Yousef A.E. 2007. Characteristic of *Listeria monocytogenes* important to food processors. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc.: 157-214

Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23: 983-991

Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Alzamora S.M. 2005a. 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

Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Parish M.E., Davidson P.M. 2005b. Methods for activity assay and evaluation of results. V: *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 659-680

Lou Y., Yousef A.E. 1999. Characteristic of *Listeria monocytogenes* important to food processors. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 2nd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 131-224

Luque de Castro M.D., Jimenez-Carmona M.M., Fernandez Perez V. 1999. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 18: 708-716

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall, 147: 70-76

Manzano M., Cocolin L., Ferroni P., Cantoni C., Comi G. 1997. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74: 25-30

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

Microorganisms in foods 5: Microbiological specifications of food pathogens. 1996. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. (eds.). London, ICMSF, Blackie Academic & Professional: 141-182

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

Munne-Bosch S., Alegre L., Schwarz K. 2000. The formation of phenolic diterpens 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

Nussdorfer N. 1991. V kraljestvu začimb. Ljubljana, 108-109

Onawunmi G.O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9: 4297-43000

Ouahada S. 2000. Tunisian rosemary oil. *Perfumer & Flavorist*, 25, 6: 24-25

Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.-P., Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 155-162

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

Pandit V.A., Shelef L.A. 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). *Food microbiology*, 11: 57-63

Pantić-Starič N. 1985. Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*). V: *Začimbe in dišavnice: (ščepec vonja in okusa)*. Pantić-Starič N (ur.). Ljubljana, Naša žena, Kmečki glas, 62-63

Porte A., Godoy R.L.D., Lopes D., Koketsu M., Goncalves S.L., Torquillo H.S. 2000. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) from Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Essential Oil Research*, 12, 5: 577-580

Quintiliani R., Sahm D.F., Courvalin P. 1999. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. V: *Manual of clinical microbiology*. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover R.H. (eds.). Washington, ASM: 1505-1525

Ranirez P., Senorans F.J., Ibanez E., Reglero G. 2004. Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 1057: 241-245

Rocourt J., Buchrieser C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc.: 1-20

Sasikumar B. 2001. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243-297

SAT Group. 2006. Essential Oil.in. Delhi, SAT Group
http://www.essentialoil.in/rosemary_oil.html (27.06.2007): 1. str

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

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

Shetty K., Lin Y.T. 2006. Phenolic antimicrobials from plants for control of bacterial pathogens. V: Food biotechnology. 2nd ed. Shetty K. (ed.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group: 1479-1483

Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Food Microbiology, 26: 118-122

Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-86

Smole Možina S., Lenček A., Jeršek B. 2005. Vrednotenje metode PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* v živilih. Acta Agriculturae Slovenica, 85-2: 187-197

Tauxe R.V. 2002. Emerging foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 78: 31-34

Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H.A., Aydin E. 2006. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freynt & Bornm.) Bornm. Food Chemistry, 100: 985-989

Vazquez-Boland J., Dominguez-Bernal G., Gonzalez-Zorn B., Kreft J., Goebel W. 2001. Pathogenical islands and virulence evolution in *Listeria*. Microbes and Infection, 3: 571-584

VMT Vision Machine Technic. 2007. Weinheim, VMT
<http://www.vmt-gmbh.com/t3/typo3temp/5ca720305f.jpg> (28.6.2007): 1. str.

Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Applied Microbiology, 84: 152-158

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

Yang P., Yuqin L., Xia L., Shengxiang J. 2007. Determination of free isomeric oleanolic acid and ursolic acid in *Pterocephalus hookeri* by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1331-1334

Yanishlieva-Maslarova N.V., Heininen I.M. 2001. Rosemary and sage as antioxidants. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 1. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 269-275

Zhang Q., Chao J.L., Sun W., Zhang Z., Cheng W. 2007a. A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteolin in *Flos Chrysanthemi Indici* suppository. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 753-757

Zhang Y., Yeh E., Hall G., Cripe J., Bhagwat A.A., Meng J. 2007b. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 47-53

8 ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Barbari Jeršek se najlepše zahvaljujem za odlično strokovno pomoč, vodenje in podporo pri samem delu in pisanju naloge, za koristne nasvete ter za natančen in poglobljen pregled teksta. Hkrati se vam zahvaljujem tudi za stalno dosegljivost in vedno dobro voljo. Torej, hvala za odlično mentorstvo!

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

Iskrena hvala tudi gospe Jani Avbelj za vso pomoč, nasvete in vzpodbudo pri delu v laboratoriju.

Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem doc. dr. Lei Gašperlin.

Za pregled naloge se zahvaljujem univ. dipl. ing. Ivici Hočevnar, za pomoč pri iskanju in zbiranju literature pa univ. dipl. bibl. Barbari Slemenik.

Nenazadnje najlepša hvala mojim staršem, Aljoši in prijateljem za vso podporo in razumevanje. HVALA, KER STE VERJELI VAME...

Hvala sošolcem za nepozabna leta študija!!!

Še enkrat hvala vsem imenovanim in tudi tistim, ki jih nisem omenila, pa ste mi kadarkoli pomagali.

9 PRILOGE

Priloga A 9-1: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *S. Infantis* ŽM9 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	40000	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	20000	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	10000	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	5000	0,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	2500	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			/	/	/	/				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **/**: poskus pri izbrani raztopini ni bil izveden; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-2: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *B. cereus* ŽMJ91 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	8,99	9,47	9,23	0,34	17,19	16,52	16,86	0,47
2	40000	4	10,05	11,46	10,76	1,00	16,53	16,74	16,64	0,15
3	20000	2	11,24	11,90	11,57	0,47	14,87	13,18	14,03	1,20
4	10000	1	10,38	9,03	9,71	0,95	11,24	13,00	12,12	1,24
5	5000	0,5	10,57	9,69	10,13	0,62	9,03	11,01	10,02	1,40
6	2500	0,25	7,05	7,49	7,27	0,31	7,71	7,93	7,82	0,16
7	1250	0,125	6,23	6,72	6,48	0,35	8,20	8,69	8,45	0,35
8	625	0,0625	6,04	6,06	6,05	0,01	6,35	7,27	6,81	0,65
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			5,00	5,00	5,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-3: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *Staph. aureus* ŽMJ72 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	9,25	8,66	8,96	0,42	16,96	15,60	16,28	0,96
2	40000	4	8,59	7,55	8,07	0,74	14,10	13,48	13,79	0,44
3	20000	2	9,82	9,63	9,73	0,13	12,56	12,43	12,50	0,09
4	10000	1	6,86	6,42	6,64	0,31	11,68	9,25	10,47	1,72
5	5000	0,5	5,73	5,55	5,64	0,13	9,25	9,25	9,25	0,00
6	2500	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	7,40	6,08	6,74	0,93
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			7,00	7,00	7,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-4: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM51 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	10,25	11,10	10,68	0,60	14,54	15,01	14,78	0,33
2	40000	4	10,58	10,84	10,71	0,18	14,24	14,44	14,34	0,14
3	20000	2	8,26	9,31	8,79	0,74	13,88	13,75	13,82	0,09
4	10000	1	8,91	9,25	9,08	0,24	12,47	11,10	11,79	0,97
5	5000	0,5	7,60	8,88	8,24	0,91	11,20	11,80	11,50	0,42
6	2500	0,25	7,16	8,20	7,68	0,74	7,24	6,87	7,06	0,26
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	7,25	7,20	7,23	0,04
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	6,33	6,19	6,26	0,10
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			7,00	7,00	7,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-5: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM52 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	9,49	9,25	9,37	0,17	13,66	13,88	13,77	0,16
2	40000	4	9,69	8,99	9,34	0,49	13,00	13,44	13,22	0,31
3	20000	2	9,02	9,03	9,03	0,01	13,22	12,78	13,00	0,31
4	10000	1	10,24	11,41	10,83	0,83	11,54	8,81	10,18	1,93
5	5000	0,5	9,05	8,59	8,82	0,33	9,03	8,69	8,86	0,24
6	2500	0,25	6,43	6,83	6,63	0,28	9,21	7,49	8,35	1,22
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	7,15	0,00	3,58	5,06
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			7,00	7,00	7,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-6: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM53 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	6,48	5,99	6,24	0,35	6,40	5,99	6,20	0,29
2	40000	4	5,42	5,58	5,50	0,11	7,14	6,20	6,67	0,66
3	20000	2	5,85	5,44	5,65	0,29	6,61	6,93	6,77	0,23
4	10000	1	5,85	6,32	6,09	0,33	5,16	5,11	5,14	0,04
5	5000	0,5	4,10	3,97	4,04	0,09	6,28	5,29	5,79	0,70
6	2500	0,25	3,57	2,94	3,26	0,45	3,41	4,26	3,84	0,60
7	1250	0,125	3,17	2,89	3,03	0,20	3,63	3,97	3,80	0,24
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	3,57	3,11	3,34	0,33
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			5,00	6,00	5,50	0,71				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-7: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM58 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	5,58	4,79	5,19	0,56	10,16	8,92	9,54	0,88
2	40000	4	6,76	7,27	7,02	0,36	9,40	9,09	9,25	0,22
3	20000	2	6,61	5,45	6,03	0,82	7,49	6,44	6,97	0,74
4	10000	1	5,32	4,69	5,01	0,45	7,05	5,62	6,34	1,01
5	5000	0,5	4,23	4,13	4,18	0,07	7,20	5,29	6,25	1,35
6	2500	0,25	3,67	4,63	4,15	0,68	5,14	4,13	4,64	0,71
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	4,26	3,82	4,04	0,31
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			6,00	7,00	6,50	0,71				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-8: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM80 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	10,01	10,13	10,07	0,08	14,10	14,10	14,10	0,00
2	40000	4	9,91	9,87	9,89	0,03	13,54	13,66	13,60	0,08
3	20000	2	9,25	9,22	9,24	0,02	8,81	8,37	8,59	0,31
4	10000	1	9,33	9,53	9,43	0,14	8,37	7,83	8,10	0,38
5	5000	0,5	7,49	6,63	7,06	0,61	7,71	6,89	7,30	0,58
6	2500	0,25	6,61	6,21	6,41	0,28	6,17	6,54	6,36	0,26
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	5,32	5,01	5,17	0,22
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			6,00	6,00	6,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-9: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM92 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	9,09	10,13	9,61	0,74	16,96	16,64	16,80	0,23
2	40000	4	8,87	9,69	9,28	0,58	14,98	14,54	14,76	0,31
3	20000	2	8,99	9,68	9,34	0,49	12,12	11,68	11,90	0,31
4	10000	1	9,82	9,25	9,54	0,40	9,47	9,25	9,36	0,16
5	5000	0,5	8,83	7,93	8,38	0,64	8,81	7,89	8,35	0,65
6	2500	0,25	8,68	8,37	8,53	0,22	7,60	7,27	7,44	0,23
7	1250	0,125	7,05	7,27	7,16	0,16	6,35	6,59	6,47	0,17
8	625	0,0625	6,17	5,85	6,01	0,23	6,08	5,28	5,68	0,57
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			7,00	7,00	7,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-10: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM108 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	9,36	9,74	9,55	0,27	15,86	14,92	15,39	0,66
2	40000	4	8,71	7,73	8,22	0,69	13,23	13,56	13,40	0,23
3	20000	2	8,37	7,62	8,00	0,53	12,33	12,97	12,65	0,45
4	10000	1	8,81	7,83	8,32	0,69	10,80	9,47	10,14	0,94
5	5000	0,5	7,74	6,82	7,28	0,65	9,80	7,49	8,65	1,63
6	2500	0,25	7,17	6,77	6,97	0,28	8,81	7,29	8,05	1,07
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			6,00	6,00	6,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-11: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. monocytogenes* ŽM115 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg/ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	8,40	8,04	8,22	0,25	14,54	15,38	14,96	0,59
2	40000	4	9,25	9,69	9,47	0,31	13,66	13,90	13,78	0,17
3	20000	2	12,96	9,96	11,46	2,12	12,56	12,69	12,63	0,09
4	10000	1	12,06	10,24	11,15	1,29	10,84	9,92	10,38	0,65
5	5000	0,5	10,13	9,22	9,68	0,64	10,51	12,20	11,36	1,20
6	2500	0,25	7,93	8,59	8,26	0,47	7,17	7,41	7,29	0,17
7	1250	0,125	7,27	8,70	7,99	1,01	8,17	8,38	8,28	0,15
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	8,09	7,93	8,01	0,11
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	7,36	7,16	7,26	0,14
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			6,00	7,00	6,50	0,71				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-12: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. ivanovii* ŽM65 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	8,86	9,52	9,19	0,47	15,34	17,05	16,20	1,21
2	40000	4	9,65	9,84	9,75	0,13	14,54	15,39	14,97	0,60
3	20000	2	9,12	8,91	9,02	0,15	10,70	12,03	11,37	0,94
4	10000	1	8,58	8,44	8,51	0,10	10,58	10,05	10,32	0,37
5	5000	0,5	8,73	7,94	8,34	0,56	9,78	10,31	10,05	0,37
6	2500	0,25	8,20	7,40	7,80	0,57	7,93	8,06	8,00	0,09
7	1250	0,125	7,40	7,40	7,40	0,00	7,40	8,49	7,95	0,77
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			5,50	5,50	5,50	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-13: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. grayi* ŽM66 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	8,50	8,19	8,35	0,22	16,24	15,60	15,92	0,45
2	40000	4	11,33	11,37	11,35	0,03	15,92	15,91	15,92	0,01
3	20000	2	8,87	9,05	8,96	0,13	14,54	14,81	14,68	0,19
4	10000	1	7,55	7,67	7,61	0,08	12,16	12,16	12,16	0,00
5	5000	0,5	4,53	5,93	5,23	0,99	7,40	6,87	7,14	0,37
6	2500	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	5,68	5,95	5,82	0,19
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	6,12	6,61	6,37	0,35
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			7,00	7,00	7,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-14: Protimikroben učinek ekstraktov rožmarina na bakterije seva *L. innocua* ŽM68 določen z metodo difuzije v gojišču TSA

Raztopine ekstraktov			Inhibicijska cona (mm)							
			pri Ros.con				pri Ros.conh			
Oznake	C (µg /ml EtOH)	%	R ₁	R ₂	R _p	SD	R ₁	R ₂	R _p	SD
1	80000	8	5,23	5,73	5,48	0,35	12,69	12,56	12,63	0,09
2	40000	4	5,29	5,61	5,45	0,23	12,43	11,46	11,95	0,69
3	20000	2	6,08	7,01	6,55	0,66	10,58	11,24	10,91	0,47
4	10000	1	5,98	5,73	5,86	0,18	10,31	10,22	10,27	0,06
5	5000	0,5	5,62	5,39	5,51	0,16	7,67	7,93	7,80	0,18
6	2500	0,25	5,55	5,95	5,75	0,28	5,82	6,17	6,00	0,25
7	1250	0,125	0,00	0,00	0,00	0,00	5,99	6,39	6,19	0,28
8	625	0,0625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	312,5	0,03125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	156,25	0,015625	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Inhibicijske cone pri kontrolnih raztopinah (mm)										
Raztopina			R ₁	R ₂	R _p	SD				
70 % EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Absolutni EtOH			0,00	0,00	0,00	0,00				
Sterilna destilirana H ₂ O			0,00	0,00	0,00	0,00				
OTC (0,03 g/ml)			3,00	3,00	3,00	0,00				

Legenda: **R₁**: velikost inhibicijske cone pri prvi ponovitvi; **R₂**: velikost inhibicijske cone pri drugi ponovitvi; **R_p**: povprečna velikost inhibicijske cone; **SD**: standardna deviacija; **OTC**: oksitetraciklin; **EtOH**: etanol; **H₂O**: voda

Priloga A 9-15: Spektrofotometrično določanje vsebnosti NaNO₂ v vzorcu pri valovni dolžini 540 nm

	µg NaNO ₂ /ml TSB pred toplotno sterilizacijo			µg NaNO ₂ /ml TSB s filtrno sterilizacijo		
količina dodanega NaNO ₂	0	100	200	0	100	200
količina izmerjenega NaNO ₂	0	98	172,5	0	123	221

Legenda: **NaNO₂**: natrijev nitrit; **Konc**: koncentracija