

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mirjan ŠVAGELJ

**UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA
ROŽMARINA (*Rosmarinus officinalis* L.)
NA BAKTERIJAH *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ROSEMARY
EXTRACT (*Rosmarinus officinalis* L.) AGAINST *Escherichia coli***

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja za somentorico asist. dr. Polono Jamnik in za recenzentko doc. dr. Milico Kač.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentorica: asist. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: doc. dr. Milica Kač

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Milica KAČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mirjan Švigelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.26:547.9:582.949(043)=836
KG	mikroorganizmi/ <i>Escherichia coli</i> /kultivabilnost/metabolna aktivnost/ekstrakt rožmarina/ <i>Rosmarinus officinalis</i> L./ CellTiter-Blue/BacTiter-Glo
AV	ŠVAGELJ, Mirjan
SA	RASPOR, Peter (mentor) / JAMNIK, Polona (somentorica) / KAČ, Milica (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA ROŽMARINA (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) NA BAKTERIJAH <i>Escherichia coli</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 59 str., 20 pregl., 22. sl., 14 pril., 114 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preveriti, v kakšnih koncentracijah, če sploh, ekstrakt rožmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) vpliva na kultivabilnost bakterije <i>Escherichia coli</i> – ŽM 370, ter preveriti, kako se obneseta dva komercialno dostopna reagentna za določanje metabolne aktivnosti (živosti) mikroorganizmov. Ekstrakt rožmarina smo dodali hranljivemu bujonu in dodali inokulum bakterij <i>E. coli</i> . Po določenem času smo preverili kultivabilnost in preizkusili dve metodi določanja metabolne aktivnosti (živosti). Pri eni od metod se uporablja reagent CellTiter-Blue, ki temelji na redukciji resazurina do fluorescirajočega resorufina, slednji je posledica metabolne aktivnosti celic. Pri drugi metodi se uporablja reagent BacTiter-Glo, katerega osnova je tvorba luminiscence zaradi prisotnosti ATP, ki je prav tako značilen za metabolno aktivne celice. Rezultati so pokazali, da ekstrakt rožmarina v koncentracijah do 5 % (w/v) zmanjša kultivabilnost bakterije <i>E. coli</i> v primerjavi z negativno kontrolo, pri koncentraciji ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) pa nismo določili več nobene kultivabilne celice. Metoda, pri kateri se uporablja reagent CellTiter-Blue, je manj uporabna za določanje živosti, ko uporabljamo rastlinske ekstrakte, saj pride do interakcij med ekstraktom in reagentom, ki jih ne moremo kompenzirati. Metoda, pri kateri se uporablja reagent BacTiter-Glo, se nam zdi uporabna, za preverjanje vpliva enega ekstrakta pri velikem številu različnih koncentracij in/ali na več različnih mikroorganizmih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22+579.26:547.9:582.949(043)=836
CX microorganisms/*Escherichia coli*/culturability/metabolic activity/rosemary extract/*Rosmarinus officinalis* L./CellTiter-Blue/BacTiter-Glo
AU ŠVAGELJ, Mirjan
AA RASPOR, Peter (supervisor) / JAMNIK, Polona (co-advisor) / KAČ, Milica (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI DETERMINING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACT (*Rosmarinus officinalis* L.) AGAINST *Escherichia coli*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 59 p., 20 tab., 22. fig., 14 ann., 114 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of this research was to investigate whether and in which concentrations the extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) modifies the culturability of the bacterium *Escherichia coli* – ŽM 370 and to test two commercially available reagents for testing metabolic activity of microorganisms. The rosemary extract in liquid nutrient broth medium was added to a cell suspension of *E. coli*. The culturability and the two methods were tested after a fixed incubation period. The first method involves the use of a reagent (CellTiter-Blue) which is based on the reduction of resazurin to resorufin that can be detected with a fluorescence detector. The reduction of resazurin takes place because of the metabolic activity of cells. The second method involves the use of a reagent (BacTiter-Glo) which is based on the detection of ATP via the production of luminescence. The presence of ATP is also characteristic for metabolic active cells. The results obtained show that rosemary extract reduces the culturability of *E. coli* at concentrations lower than 5% (w/v) when compared to the negative control. At the concentration 5% (w/v) we did not detect any culturable cells. The reagent CellTiter-Blue is not suitable for the detection of metabolic active cells because it reacts with the extract. The reagent BacTiter-Glo seems to be suitable only if one has to test many different concentrations of a given plant extract and/or a wide spectrum of microorganisms.

KAZALO VSEBINE

KJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI	3
2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih ekstraktov	3
2.1.2 Uporaba rastlinskih ekstraktov	3
2.1.3 Rastlinski ekstrakti kot protimikrobna sredstva	4
2.1.4 Ovire pri uporabi rastlinskih ekstraktov kot protimikrobnih snovi	5
2.2 ROŽMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	5
2.2.1 Kemična sestava	6
2.2.2 Eterično olje rožmarina	6
2.2.3 Metanolni ekstrakt rožmarina	7
2.2.4 Rožmarinov ekstrakt pridobljen s pomočjo tekočinske ekstrakcije pod superkritičnimi pogoji	8
2.2.5 Uporaba	9
2.2.5.1 Uporaba v živilstvu	9
2.2.6 Toksičnost rožmarina	10
2.3 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV	10
2.3.1 Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 POTEK DELA	13
3.2 METODE	14
3.2.1 Določitev rastne krivulje za bakterijo <i>E. coli</i>	14
3.2.2 Priprava inokuluma z določeno koncentracijo bakterij <i>E. coli</i>	14
3.2.3 Priprava ekstrakta rožmarina	15
3.2.4 Inkubacija bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina	16
3.2.5 Določitev kultivabilnosti	16
3.2.6 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	17
3.2.7 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	20
3.2.8 Statistična obdelava rezultatov	22
3.2.8.1 Povprečna vrednost	22

3.2.8.2 Standardni odklon, koeficient variacije	22
3.3 MATERIALI	23
3.3.1 Mikroorganizem	23
3.3.2 Ekstrakt rožmarina	23
3.3.3 Gojišča	25
3.3.3.1 Hranljivi agar	25
3.3.3.2 Hranljivi bujon	25
3.3.3.3 Koncentriran hranljivi bujon in hranljivi bujon z dodatkom ekstrakta rožmarina	24
3.3.4 Reagenti, raztopine	24
3.3.4.1 Priprava fiziološke raztopine	24
3.3.4.2 Priprava raztopin antibiotikov	24
3.3.4.3 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	25
3.3.4.4 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	25
3.3.4.5 Priprava raztopine ATP z ekstrakcijo iz celic bakterij <i>E. coli</i>	25
3.3.4.6 Priprava raztopin ATP	25
3.3.5 Pribor in oprema	26
3.3.5.1 Priprava gojišč in raztopin	26
3.3.5.2 Priprava inokuluma z določeno koncentracijo bakterij <i>E. coli</i>	26
3.3.5.3 Inkubacija bakterij <i>E. coli</i> z rastlinskih ekstraktom	26
3.3.5.4 Določitev kultivabilnosti	27
3.3.5.5 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	27
3.3.5.6 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	27
4 REZULTATI	28
4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE BAKTERIJE <i>E. coli</i>	28
4.2 DOLOČITEV KULTIVABILNOSTI	29
4.3 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA CellTiter-Blue	30
4.3.1 Določitev optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina	30
4.3.2 Preizkus metode z antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin	31
4.3.3 Določitev živosti bakterij <i>E. coli</i> po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	32
4.4 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA BacTiter-Glo	34
4.4.1 Preizkus metode z antibiotikom eritromicin	34
4.4.2 Vpliv gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco	34
4.4.3 Stabilnost ATP v ekstraktu rožmarina	36
4.4.4 Vpliv gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na transmitanco	36
4.4.5 Določitev živosti bakterij <i>E. coli</i> po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 DOLOČITEV KULTIVABILNOSTI	41
5.2 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA CellTiter-Blue	42
5.2.1 Določitev optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina	42
5.2.2 Preizkus metode z antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin	42

5.2.3 Določitev živosti bakterij <i>E. coli</i> po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	43
5.3 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA BacTiter-Glo	45
5.3.1 Preizkus metode z antibiotikom eritromicin	45
5.3.2 Vpliv gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco	45
5.3.3 Določitev živosti bakterij <i>E. coli</i> po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	46
5.4 SKLEPI	49
6 POVZETEK	50
7 VIRI	51
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1.	Glavne skupine protimikrobnih snovi izoliranih iz rastlin (Cowan, 1999)	4
Preglednica 2.	Pregled glavnih komponent rožmarina (Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Rosemary, 2006)	6
Preglednica 3.	Glavne vrste kemijskih snovi eteričnega olja rožmarina (Angioni in sod., 2004: 3533)	7
Preglednica 4.	Pregled pojmov pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004: 228)	10
Preglednica 5.	Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov (Burt, 2004: 229)	11
Preglednica 6.	Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>	12
Preglednica 7.	Prikaz izseka mikrotitrne ploščice pri določanju živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue	18
Preglednica 8.	Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah uporabljenih za prenos v jamice mikrotitrne ploščice prikazane v preglednici 7	19
Preglednica 9.	Prikaz izseka mikrotitrne ploščice pri določanju živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo	20
Preglednica 10.	Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah uporabljenih za prenos v jamice mikrotitrne ploščice prikazane v preglednici 9	21
Preglednica 11.	Sestava hranljivega agarja	23
Preglednica 12.	Sestava hranljivega bujona	23
Preglednica 13.	Sestava koncentriranega hranljivega bujona	24
Preglednica 14.	Vizualna analiza vzorcev iz jamic na mikrotitrski ploščici po 15 urni inkubaciji z resazurinom	33
Preglednica 15.	Stopnje inhibicije luminiscence gojišča z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP	35
Preglednica 16.	Stopnje inhibicije luminiscence gojišča z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina po dodatku komercialno dostopnega ATP	36
Preglednica 17.	Določanje stabilnosti ATP v ekstraktu rožmarina. Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 ali 60 minut; T = 37 °C. Rezultati so predstavljeni kot vrednost ene ponovitve	36
Preglednica 18.	Primerjava stopnje inhibicije luminiscence in stopnje inhibicije transmitance	36
Preglednica 19.	Pregled faktorjev inhibicij pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina	38
Preglednica 20.	Korigirana luminiscenca vzorcev, ki smo jih pred dodatkom v jamico na mikrotitrski ploščici filtrirali čez filter s premerom por 0,2 µm in primerjava z luminiscenco vzorcev iz slike 19. Čas inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina: 50 minut; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min	40

KAZALO SLIK

Slika 1.	Rožmarin (Sasikumar, 2001: 243)	6
Slika 2.	Izolirane in identificirane snovi metanolnega ekstrakta rožmarina (Almela in sod., 2006: 6)	8
Slika 3.	Hodogram ugotavljanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijah <i>E. coli</i>	13
Slika 4.	Shematski prikaz hemacitometra (Hemocytometer: Bürker-Türk, 2006: 1)	15
Slika 5.	Shematski prikaz priprave izhodne raztopine ekstrakta rožmarina	16
Slika 6.	Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003: 1)	28
Slika 7.	Reakcija nastanka luminiscence (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006: 3)	20
Slika 8.	Določanje rastne krivulje za bakterijo <i>E. coli</i> v hranljivem bujonu ($V_D = 150$ mL, $T = 37$ °C, 250 obr./min)	28
Slika 9.	Določanje kultivabilnosti po enourni inkubaciji celic bakterij <i>E. coli</i> z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu ($T = 37$ °C, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL)	29
Slika 10.	Določanje optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina	30
Slika 11.	Določanje vpliva dveh različnih antibiotikov na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij <i>E. coli</i> . Čas inkubacije bakterij z antibiotikoma: 1 h; $T = 37$ °C; čas redukcije resazurina: 45 min	31
Slika 12.	Določanje vpliva ekstrakta rožmarina v različnih koncentracijah na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij <i>E. coli</i> . Čas inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina: 1 h; $T = 37$ °C; čas redukcije resazurina do 240 min	32
Slika 13.	Določanje vpliva ekstrakta rožmarina v različnih koncentracijah na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij <i>E. coli</i> . Čas inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina: 1 h; $T = 37$ °C; čas redukcije resazurina do 900 min	33
Slika 14.	Določanje vpliva inkubacije kulture celic bakterij <i>E. coli</i> z antibiotikom eritromicin v različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z antibiotikom: 1 h; $T = 37$ °C; čas inkubacije z reagentom BacTiter-Glo: 5 min	34
Slika 15.	Določanje vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP. Čas inkubacije ekstrakta z ekstrahiranim ATP: 5 min; $T = 37$ °C	34
Slika 16.	Določanje vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP - prikazano kot stopnja inhibicije luminiscence. Čas inkubacije ekstrakta z standardno količino ekstrahiranega ATP: 5 min; $T = 37$ °C	35

Slika 17.	Določanje vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco po dodatku ATP (ekstrahiranega in komercialno dostopnega) – prikazano kot stopnja inhibicije luminiscence. Koncentracijo ekstrahiranega ATP smo določili s pomočjo umeritvene krivulje in primerjavo stopenj inhibicije luminiscence (priloga D5). Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 min; T = 37 °C	35
Slika 18.	Primerjava stopnje inhibicije luminiscence in stopnje inhibicije transmitance	37
Slika 19.	Določanje vpliva inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min; koncentracija celic pred dodatkom reagenta BacTiter-Glo: 5×10^5 celic/mL	37
Slika 20.	Določanje vpliva inkubacije celic bakterij <i>E. coli</i> z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco; rezultati so prikazani z uporabo korekcije na stopnjo inhibicije luminiscence	38
Slika 21.	Relativna luminiscenca po enourni inkubaciji celic bakterije <i>E. coli</i> pri različnih koncentracijah ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu (T = 37 °C, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL)	39
Slika 22.	Korigirana relativna luminiscenca po enourni inkubaciji celic bakterije <i>E. coli</i> pri različnih koncentracijah ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu (T = 37 °C, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL)	39

KAZALO PRILOG

- Priloga A1** Povprečna vrednost OD₆₅₀ v odvisnosti od časa med kultivacijo bakterij *E. coli*. Začetna optična gostota: 0,1 za 150 mL hranljivega bujona. Delovni pogoji: T = 37 °C in 250 obr./min
- Priloga B1** Določanje kultivabilnosti po enourni inkubaciji bakterij *E. coli* z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu (T= 37 °C). Začetna koncentracija celic: 5 x 10⁵ celic/mL
- Priloga C1** Določanje optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina
- Priloga C2** Določanje vpliva dveh različnih antibiotikov v kulturah bakterij *E. coli* na redukcijsko sposobnost resazurina. Čas inkubacije bakterij z antibiotikoma: 1 h; T = 37 °C; čas redukcije resazurina: 45 min
- Priloga C3** Določanje vpliva različnih koncentracij ekstrakta rožmarina v kulturah bakterij *E. coli* na redukcijsko sposobnost resazurina. Čas inkubacije bakterij z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C
- Priloga C4** Inkubacija različnih rastlinskih ekstraktov in askorbinske kisline z resazurinom. Koncentracije ekstraktov in askorbinske kisline: 5 % (w/v)
- Priloga D1** Določanje vpliva različnih koncentracij eritromicina na luminiscenco kultur bakterij *E. coli*. Čas inkubacije z antibiotikom: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom BacTiter-Glo: 5 min
- Priloga D2** Določanje vpliva dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco hranljivega bujona po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP. Čas inkubacije ekstrakta rožmarina z standardno količino ekstrahiranega ATP: 5 min; T = 37 °C
- Priloga D3** Slika 15 korigirana s pomočjo faktorja inhibicije (Fi) pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina. S pomočjo tega faktorja uspešno izničimo inhibicijo luminiscence, ki je posledica ekstrakta rožmarina
- Priloga D4** Določanje vpliva ekstrakta rožmarina na luminiscenco hranljivega bujona po dodatku ATP (ekstrahiranega in komercialno dostopnega). Koncentracijo ekstrahiranega ATP smo določili s pomočjo umeritvene krivulje in primerjavo stopenj inhibicije luminiscence (priloga D5). Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 min; T = 37 °C
- Priloga D5** Umeritvena krivulja za določitev koncentracije ATP v hranljivem bujonu z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina
- Priloga D6** Določanje vpliva inkubacije kulture bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije bakterij (koncentracija celic 5 x 10⁵ celic/mL) z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min
- Priloga D7** Luminiscenca vzorcev, ki smo jih pred dodatkom na mikrotitrsko ploščico filtrirali čez filter s premerom por 0,2 µm in primerjava z luminiscenco vzorcev iz slike 19. Čas inkubacije bakterij z ekstraktom rožmarina: 50 minut; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min
- Priloga D8** Primerjava relativne luminiscence, korigirane relativne luminiscence in kultivabilnosti

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
EDTA	etilen diamin tetraetanojska kislina
Fi	faktor inhibicije
FI	fluorescenčna intenziteta
GC-MS	plinska kromatografija – masna spektroskopija
GC-RI	plinska kromatografija – retencijski indeks
GRAS	(angl. Generally Recognised As Safe)
KV	koeficient variiranja
M	molarnost (mol/L)
MBC	minimalna bakteriocidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
neg. kont.	negativna kontrola
nm	nanometer (10 ⁻⁹ m)
NMR	nuklearna magnetna resonanca
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
poz. kont.	pozitivna kontrola
RFU	(angl. relative fluorescence units)
RLU	(angl. relative luminiscense units)
SD	standardna deviacija
SIL	stopnja inhibicije luminiscence
SIT	stopnja inhibicije transmittance
t	čas
T	temperatura
V	volumen
V _D	delovni volumen
% w/v	g/100 mL

1 UVOD

Zahteve potrošnikov po vedno bolj varnih, pestrih in naravnih živilih, ki morajo imeti tudi funkcionalne lastnosti, silijo živilsko in verjetno v bližnji prihodnosti tudi farmacevtsko industrijo k raziskovanju in uporabi novih možnosti popestritve in ohranjanja kakovosti živil. 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).

Rastline in rastlinski ekstrakti imajo bogato zgodovino uporabe v zdravilstvu, prehrani, religiji in drugih namenih. Obstaja več načinov pridobivanja rastlinskih ekstraktov, ki se med seboj v glavnem razlikujejo po uporabi topil različnih polarnosti. Za pripravo ekstraktov lahko uporabimo cele rastline ali njihove posamezne dele, kot so cvetovi, plodovi, lubje ali korenine. Sestava rastlinskih ekstraktov je lahko zelo različna, na kar vplivajo izbira dela rastline, faza rasti, mikroklimatski pogoji, sezona pobiranja in način ekstrakcije (Cowan, 1999).

Uporaba rastlinskih ekstraktov kot protimikrobnih sredstev je še posebej zanimiva, saj jih ima večina status GRAS (angl. "Generally Recognized As Safe"), kar nam omogoča bolj naraven pristop h konzerviranju živil. Obstaja več različnih metod določanja protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov in uveljavljajo se predvsem hitre metode, ki omogočajo testiranje velikih količin ekstraktov na več izbranih mikroorganizmih hkrati (Burt, 2004).

Uporabnost rožmarina in ekstrakta rožmarina je dobro dokumentirana. Najbolj preučena je antioksidativna aktivnost rožmarina (Yanishlieva-Maslarova in Heinonen, 2001) a se zadnje čase vedno bolj raziskuje tudi protimikroben potencial ekstrakta rožmarina (Burt, 2004; Tassou in sod., 2001).

Protimikrobna aktivnost določene snovi je najbolj pogosto izražena kot minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). MIC je tista koncentracija snovi, ki je še zmožna inhibirati rast preizkušane mikroorganizma (Mann in Markham, 1998).

Reagent CellTiter-Blue, katerega glavna komponenta je resazurin, se uporablja pri hitri metodi določanja metabolne aktivnosti celic. Ima vrsto prednosti pred klasičnimi metodami določanja inhibicije mikroorganizmov (Kuda in Yano, 2003). Temelji na redukciji modro obarvanega rasazurina, ki ne fluorescira, v rožnato obarvan resorufin, ki fluorescira (CellTiter-Blue Cell Viability Assay, 2002; Mann in Markham, 1998).

Reagent BacTiter-Glo omogoča določitev metabolno aktivnih mikroorganizmov na osnovi določanja količine ATP. Glavni komponenti reagenta sta rekombinantna termostabilna luciferaza in reagent za ekstrakcijo ATP iz celic. Luminiscenca, ki je posledica reakcije, je proporcionalna vsebnosti ATP, ki pa je na drugi strani proporcionalna številu metabolno aktivnih celic v vzorcu (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006).

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj naloge je bil postaviti hitro metodo določanja živosti bakterije *Escherichia coli* po inkubaciji z rastlinskimi ekstrakti. Uporabili smo metodo določanja živosti s pomočjo merjenja fluorescence (CellTiter-Blue) in metodo določanja živosti s pomočjo merjenja luminiscence (BacTiter-Glo). Nadalje smo hoteli oceniti primernost hitre metode v primeru določanja živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z raztopino ekstrakta rožmarina v primerjavi z določanjem kultivabilnosti.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1

Raztopina ekstrakta rožmarina vpliva na živost bakterije *Escherichia coli*.

Hipoteza 2

Hitra metoda je enakovredna ali bolj uporabna za merjenje živosti bakterije *Escherichia coli*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI

2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih ekstraktov

Uporaba rastlin za lajšanje bolezni ima zelo bogato zgodovino in ljudje po vsem svetu poznajo lokalne rastline, njihove zdravilne lastnosti in posamezne specifične načine uporabe. Spoznanja o učinkovitosti so temeljila na empiričnih izkušnjah, zato je poleg lajšanja simptomov pogosto prihajalo tudi do zastrupitev (Cowan, 1999).

Prvi vrtovi z začimbami so se pojavili v Egiptu pred približno 4000 leti, kjer je bilo njihovo gojenje tesno povezano z rituali in čaščenjem bogov v templjih (Sasikumar, 2001). Hipokrat v 5. stol. pr. n. št. v svojih zapisih omenja 300 do 400 zdravilnih rastlin. Dioskorid je v 1. stol. n. št. napisal katalog zdravilnih rastlin, *De materia medica*, ki je postal prototip modernih farmakopej. Tudi Biblija opisuje približno 30 zdravilnih rastlin. Po propadu zahodnih civilizacij se je na žalost izgubilo ali uničilo veliko število dokumentov, ki so obravnavali to področje. Arabski in azijski civilizaciji pa sta svoje znanje o zdravilnih rastlinah še naprej razširjali in poglobljali. Z renesanso je tudi v evropskem svetu ponovno oživel zanimanje za zdravilne rastline (Cowan, 1999).

Po predvidevanjih obstaja na svetu 250.000 do 500.000 vrst različnih rastlin. Od teh jih ljudje in živali v prehrani uporabljajo zelo malo, po ocenah 1–10 %, v zdravstvene namene pa verjetno precej več (Cowan, 1999).

Trenutno ima 25 do 50 odstotkov vseh zdravil, ki jih izdajajo v Združenih državah Amerike, izvor v višjih rastlinah, ali pa so njihovi derivati. Zelo malo se jih uporablja kot protimikrobna sredstva, saj se od petdesetih let 20. stoletja uporablja predvsem antibiotike mikrobnega izvora (Cowan, 1999).

Moderna medicina je vedno bolj odprta do protimikrobnih učinkovin izoliranih iz rastlin. Temu botruje predvsem pojav odpornih sevov patogenih mikroorganizmov na tradicionalne antibiotike, ki so produkti metabolizma mikroorganizmov in/ali njihovi derivati. Prav tako je k povečanju zanimanja za rastlinske protimikrobne snovi pripomoglo dejstvo, da je v zadnjih dvajsetih letih izumrlo veliko število rastlinskih vrst.

Z izumiranjem rastlinskih vrst se tako zmanjšujejo možnosti odkrivanja novih naravnih protimikrobnih in drugih biološko pomembnih snovi (Cowan, 1999).

2.1.2 Uporaba rastlinskih ekstraktov

V človekovem življenju imajo zelišča in začimbe veliko vlogo kot dodatki k hrani ter alkoholnim in brezalkoholnim pijačam. Na veliko se uporabljajo kot osnove za dišave in barvila v kozmetični industriji. Prav tako je treba omeniti njihovo pomembno vlogo v zdravilstvu in medicini.

Pri hrani imajo zelišča in začimbe vlogo izboljšanja senzoričnih lastnosti, kot so okus, aroma in barva. Imajo tudi pomembne antioksidativne, protimikrobne in druge bioaktivne lastnosti ter lahko pomembno dopolnijo prehransko vrednost živil. Poleg naštetih lastnosti

lahko z uporabo zelišč in začimb dosežemo tudi zmanjšanje uporabe soli in sladkorja, izboljšamo teksturne lastnosti in preprečimo kvar živil (Sasikumar, 2001).

2.1.3 Rastlinski ekstrakti kot protimikrobna sredstva

Rastline so pomemben, a na žalost še ne dobro raziskan vir protimikrobnih snovi. Uporaba rastlin, njihovih eteričnih olj ali izoliranih aktivnih snovi za kontrolo kvara živil predstavlja dobro in zaželeno alternativo kemičnim konzervansom. Uporaba ekstrakta oziroma bolj ali manj čistih aktivnih snovi je lahko še posebej primerna, saj lahko le malo spremeni senzorične lastnosti živila, včasih pa nanje sploh ne vpliva (Sasikumar, 2001).

Rastline imajo sposobnost sintetizirati skoraj neomejeno število aromatičnih in drugih komponent, od katerih je večina fenolnih snovi in njihovih oksigeniranih derivatov. Večina teh snovi je sekundarnih metabolitov in do zdaj so jih izolirali že več kot 12.000. Po predvidevanjih naj bi bilo raziskanih le 10 % vseh rastlinskih snovi. V številnih primerih rastlinam služijo kot obrambne snovi proti mikroorganizmom, insektom in/ali rastlinojedim živalim. Veliko jih ima tudi zelene ali neželene senzorične lastnosti. V preglednici 1 so povzete glavne protimikrobne snovi, ki so bile izolirane iz rastlin (Cowan, 1999).

Preglednica 1: Glavne skupine protimikrobnih snovi izoliranih iz rastlin (Cowan, 1999)

skupina	podskupina	primer	mehanizem delovanja
fenoli	enostavni fenoli	katehol	deprivacija substrata
		epikatehin	razkroj membrane
	fenolne kisline	cimetna kislina	
	kinoni	hipericin	vezava na adhezine, tvorba kompleksov s celično steno, inaktivacija encimov
	flavonoidi	krisin	vezava na adhezine
	flavoni	abisinon	inaktivacija encimov, tvorba kompleksov s celično steno, inhibicija reverzne transkriptaze HIV
	flavonoli	totarol	neznan
	tanini	elagitanin	vezava na proteine, vezava na adhezine, inhibicija encimov, deprivacija substrata, tvorba kompleksov s celično steno, razkroj membrane, kelacija ionov
	kumarini	varfarin	interakcije z evkariontsko DNA (protivirusno delovanje)
terpeni, eterična olja		kapsaicin	razkroj membrane
alkaloidi		berberin, piperin	interkalacija v DNA in/ali v celično steno
lektini in polipeptidi		manoza-specifični aglutinin	preprečevanje adsorpcije virusov
		fabatin	tvorba disulfidnih mostičkov
poliacetileni		8S-heptadeka-2(Z),9(Z)-dien-4,6-diin-1,8-diol	neznan

Protimikrobno delovanje je prav tako dokazano tudi pri drugih rastlinskih snoveh, kot so poliamini, izotiocianati, tiosulfinati in glikozidi (Cowan, 1999).

V rastlinah najdemo tudi številne rastlinske snovi, kot so alkaloidi in glikozidi, ki so zaradi svoje biološke aktivnosti zelo zanimivi za farmakologe (Yanishlieva-Maslarova in Heinonen, 2001).

Poudariti je treba, da rastlinski ekstrakti niso enaki čistim izoliranim snovem in imajo lahko boljše (sinergistično) ali slabšo (antagonistično) protimikrobno delovanje kot njihova glavna protimikrobna snov. Tako je bilo dokazano sinergistično delovanje heterogene zmesi ekstrakta žajblja ter nekaterih vrst timijana in origana (Burt, 2004).

Sestava rastlinskih ekstraktov je lahko zelo različna, saj nanjo vplivajo številni dejavniki, npr. izbira dela rastline, faza rasti, mikroklimatski pogoji, sezona pobiranja in način ekstrakcije (Cowan, 1999).

2.1.4 Ovire pri uporabi rastlinskih ekstraktov kot protimikrobnih snovi

V preteklosti se začimbe in zelišča živloma z namenom konzerviranja niso dodajala zavestno, ampak je bil glavni razlog uporabe senzorična privlačnost. Čeprav ima večina eteričnih olj začimb in zelišč status GRAS (Kabara, 1991), je njihova uporabnost omejena, ker učinkovite protimikrobne koncentracije presegajo senzorično sprejemljivost. Tassou in sod. (2001) so postavili naslednja vprašanja, ki morajo biti odgovorjena za uspešno uporabo rastlinskih ekstraktov kot protimikrobnih sredstev v živilski industriji:

- Ali lahko inhibitorno delovanje ekstrakta (mešanica več komponent) pripišemo eni ali več ključnim komponentam?
- Ali ekstrakt kaže sinergistično delovanje, ki ga posamezne komponente ne kažejo?
- Kolikšna je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) aktivne snovi ekstrakta?
- Kakšno je obnašanje protimikrobne snovi v homogeni (tekočem, poltekočem) in heterogeni (emulzije, zmes tekočine trdnih delcev) strukturi živila?
- Ali se lahko učinkovitost izboljša s tradicionalnimi (soljenje, segrevanje, hlajenje, kisanje) in modernimi (vakuumsko pakiranje, pakiranje v modificirani atmosferi) metodami konzerviranja?

2.2 ROŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) izvira iz Mediterana in spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Rožmarin je gost, zimzelen in zelo aromatičen trajen grm, ki zraste do 2 m v višino in ima 2–4 cm dolge, kosmate, lepljive in ozke liste. Zgornja površina listov je temno zelene barve medtem ko je spodnja stran smolnata in bele barve.

Cvetovi so svetlo modri do svetlo vijoličasti in se razvijajo v skupinicah na zgornjih delih stebela. Cvetijo spomladi in zgodaj poleti. Iz listov, cvetov in stebel lahko pridobimo eterično olje in oleoresin, ki sta cenjena v aromaterapiji, tradicionalni in moderni medicini ter industriji arom in dišav. Prav tako ima rožmarin tudi zelo veliko kulinarično vrednost (Sasikumar, 2001).



Slika 1: Rožmarin (Sasikumar, 2001: 243)

2.2.1 Kemična sestava

Kemična sestava rožmarina je variabilna glede na sorto, klimo, sestavo tal in odvisna je tudi od letnega časa pobiranja ter od agrotehničnih ukrepov (Arnold in sod., 1997; Boutekedjiret in sod., 1999; Guazzi in sod., 2001; Moretti in sod., 1998; Ouahada, 2000; Porte in sod., 2000). Sestava in aktivnost ekstrakta pa je odvisna še od načina in pogojev ekstrakcije (Ibañez in sod., 1999).

Preglednica 2: Pregled glavnih komponent rožmarina (Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Rosemary, 2006)

skupina	vsebnost [ppm]
eterično olje	3300–25000
maščobe	134000–187418
ogljikovi hidrati	64000–704660
pepel	61900–75570
prehranska vlaknina	165420–206338
proteini	40700–62568
voda	77900–108300

2.2.2 Eterično olje rožmarina

Eterično olje je zmes različnih aromatičnih snovi, ki se v splošnem lahko razdeli na hlapno in nehlapno frakcijo. Hlapno frakcijo predstavljajo monoterpenski in seskviterpenski ogljikovodiki in njihovi oksigenirani derivati, vključno z alifatskimi aldehidi, alkoholi in estri. Nehlapno frakcijo predstavljajo različni ogljikovodiki, maščobne kisline, steroli, karotenoidi, voski, kumarini, psoraleni in flavonoidi (Luque de Castro in sod., 1999).

Pregled sestave eteričnega olja rožmarina glede na vrsto spojin je predstavljen v preglednici 3. Vsebnost komponent je zelo variabilna zaradi različnih lokacij vzorčenja rožmarina ter zaradi velikih variacij pri analizi.

Preglednica 3: Glavne vrste kemijskih snovi eteričnega olja rožmarina (Angioni in sod., 2004: 3533)

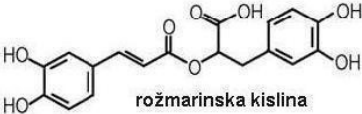

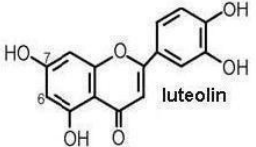
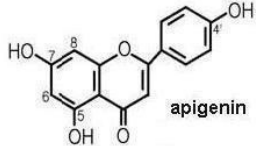
skupina	vsebnost [%]	glavni predstavniki
monoterpeni	42,7–64,1	α -pinen; α -tujen; (-) kamfen; verbenen; sabinen; mircen; α -fendren; α -terpinen; <i>p</i> -cimen; limonen; 1,8-cineol; terpinolen; β -fendren; δ -3-karen; γ -terpinen
alkoholi	9,6–32,8	linalool; gejerjen; verbenol; borneol; terpinen-4-ol; α -terpineol; geraniol
ketoni	9,7–21,3	kafra; <i>cis</i> -pinokanfon; verbenon
fenoli	0–0,2	karvakrol; timol
estri	4,3–22,8	bornilacetat
seskviterpeni	0–1,3	β -kariofilen; α -humulen

Pintore in sod. (2002) so s pomočjo določanja retencijskega indeksa s pomočjo plinske kromatografije (GC-RI "gas chromatography retention index"), plinske kromatografije – masne spektroskopije (GC-MS "gas chromatography mass spectroscopy") in nuklearne magnetne resonance ogljika (C-NMR "carbon nuclear magnetic resonance") določili 58 različnih snovi v eteričnem olju rožmarina iz Sardinije.

2.2.3 Metanolni ekstrakt rožmarina

Poleg eteričnega olja rožmarina so zanimive še druge snovi, ki so jih uspeli izolirati in karakterizirati v metanolnem ekstraktu rožmarina. Snovi lahko razvrstimo v tri skupine, kot je prikazano na sliki 2.

Karnosol in karnosolna kislina predstavljata največji delež med fenolnimi diterpeni v listih rožmarina, a ju ni mogoče določiti v eteričnem olju rožmarina (Munne-Bosch in sod., 2000). Karnosol in karnosolna kislina sta priznani kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem (Ibañez in sod., 2003).

vrsta snovi	strukturna formula	sorodne snovi
fenolne kisline	 rožmarinska kislina	
diterpeni	 karnosolna kislina	metil karnosat karnosol epiizorosmanol rosmanol epirosmanol epirosmanol-metil eter rosmadial
flavoni	 luteolin	6-hidroksiluteolin 7-glukozid
	 apigenin	
		genkvanin (7-metil eter) 4'-metoksitectokrisin (4',7'-dimetil eter) homoplantagin (6-metil eter, 7-glukozid) skutelarein (6-hidroksi) 4',5,7,8-tetrahidroksiflavon (8-OH-apigenin) cirsimaritin (6,7-dimetil eter)

Slika 2: Izolirane in identificirane snovi metanolnega ekstrakta rožmarina (Almela in sod., 2006: 6)

2.2.4 Rožmarinov ekstrakt pridobljen s pomočjo tekočinske ekstrakcije pod superkritičnimi pogoji

Kakovost, sestava in posledično tudi funkcionalne lastnosti ekstrakta pridobljenega s pomočjo tekočinske ekstrakcije pod superkritičnimi pogoji so odvisne od uporabljenih pogojev ekstrakcije kot so tlak, temperatura, oblika polnila, števila ekstrakcijskih posod in pretoka topila (Perrut in Clavier, 2003). Tako lahko s pomočjo tekočinske ekstrakcije pod superkritičnimi pogoji pridobimo ekstrakte z bolj ali manj poljubno sestavo.

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. Prav tako se pri ekstraktih pridobljenih s pomočjo etanola ali heksana ne moremo izogniti ekstrakciji klorofila, kar lahko močno omeji uporabo takšnega ekstrakta v živilstvu (Carvalho, 2005).

Ramírez in sod. (2006) so z uporabo preparativne tekočinske kromatografije pod superkritičnimi pogoji uspešno izolirali funkcionalne snovi iz rožmarina in jih ovrednotili glede na antioksidativno in protimikrobno delovanje. Prišli so do zaključkov, da lahko s pravilno izbiro delovnih pogojev dobijo frakcije brez arome rožmarina in z močno izboljšanimi antioksidativnimi ali protimikrobnimi lastnostmi glede izhoden nekromatografiran ekstrakt.

2.2.5 Uporaba

Rožmarin so uporabljali že stari Grki, kjer je bil posvečen Afroditi in je od nekdanj veljal za simbol ljubezni, zvestobe, zakonske sreče in neminljivosti. Uporabljali so ga na poročnih obredih in pozneje za zaščito domov pred nesrečo, otrok pred boleznimi, pa tudi umrlih pred peklom. V obmorskih krajih se ga pogosto sadi v žive meje, v hladnejših podnebjih pa uspeva le kot posodovka (Petauer, 1993).

2.2.5.1 Uporaba v živilstvu

Možnosti uporabe rožmarina in/ali ekstrakta rožmarina v živilstvu so precejšnje. Rožmarin se že od nekdanj uporablja kot začimba in se odlično prilega mesnim in ribjim jedem. Prav tako je pomemben tudi kot antioksidant in v novejšem času tudi kot sredstvo za omejevanje kvara živil.

Prva poročila o uporabnosti ekstrakta rožmarinovitih listov kot antioksidanta segajo v leto 1955 (Rac in Ostrič-Matijašević, 1955). Od takrat ja bila narejena še vrsta različnih raziskav, ki so preučevale antioksidativno delovanje rožmarina na različnih modelih. Yanishlieva-Maslarova in Heinonen (2001) sta objavila odličen pregled literature o antioksidativnem delovanju rožmarina in navajata, da rožmarinov ekstrakt deluje kot antioksidant za lipide, kelator kovinskih ionov in lovilce superoksidnih radikalov. Glavne snovi v rožmarinu, ki so odgovorne za antioksidativno delovanje, so karnosolna kislina, 12-metoksi karnosolna kislina, karnosol, epirosmarinol, izorosmanol, rosmaridifenol, rosmarikinon in rožmarinska kislina (Richheimer in sod., 1996).

Ekstrakt rožmarina je potencialno uporaben tudi kot naravni konzervans. V mnogih člankih je navedena možnost uporabe rožmarinovega in drugih ekstraktov kot naravnih konzervansov (Burt, 2004; Tassou in sod., 2001). Težava je v velikem številu laboratorijskih *in vitro* poskusov in zelo majhnem številu poskusov z živilom.

Pandit in Shelef (1994) sta preverila inhibitorno delovanje eteričnega olja rožmarina in sta določila, da koncentracije do 5 % inhibirajo razmnoževanje bakterije *Listeria monocytogenes* v klobasah iz prašičjih jeter.

Fernandez-Lopez in sod. (2005) so dokazali inhibitorno delovanje ekstrakta rožmarina na bakterijo *Listeria monocytogenes* v difuzijskem testu na agarju, ne pa tudi v aseptično pripravljenih mesnih kroglicah. To kaže na večjo kompleksnost pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja ekstraktov v živilih kot pri enostavnih in dobro definiranih *in vitro* pogojih.

Del Campo in sod. (2000) poročajo, da je mogoče protimikrobno aktivnost rožmarina pripisati fenolnim diterpenom, ki so glavna komponenta nepolarne frakcije ekstrakta rožmarina.

2.2.6 Toksičnost rožmarina

Za rožmarin splošno velja, da je varen in brez toksičnih stranskih učinkov, če se ga uporablja v priporočenih količinah. Obstajajo pa poročila o alergičnih reakcijah kot je npr. razdraženost kože. Uporabe rožmarina in rožmarinovitih pripravkov ne priporočajo nosečnicam, doječim materam in ljudem z epilepsijo. Rožmarinovo olje naj previdno uporabljajo ljudje, ki trpijo za nespečnostjo ali hipertenzijo. Zaužitje prevelike količine rožmarinovitih listov lahko povzroči komo, krče, bruhanje in v nekaterih primerih pljučni edem (Sasikumar, 2001).

2.3 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

Preglednica 4 prikazuje najbolj pogosto uporabljane pojme pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti. Večina avtorjev se strinja, da je najboljše merilo za določanje protimikrobne aktivnosti snovi t. i. minimalna inhibitorna koncentracija – MIC (Burt, 2004).

Preglednica 4: Pregled pojmov pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004: 228)

pojem	razlaga	reference
minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)	<ul style="list-style-type: none">- najmanjša koncentracija snovi, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost inokuluma- najmanjša koncentracija snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur- najmanjša koncentracija, ki prepreči vidno rast izbranega mikroorganizma- najmanjša koncentracija, ki povzroči značilno zmanjšanje živosti izbranega mikroorganizma (> 90 %)	(Carson in sod., 1995a) (Canillac in Mourey, 2001; Wan in sod., 1998) (Delaquis in sod., 2002; Hammer in sod., 1999; Karapinar in Aktug, 1987; Onawunmi, 1989) (Cosentino in sod., 1999)
minimalna baktericidna koncentracija (MBC)	<ul style="list-style-type: none">- koncentracija izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila inokuluma- najmanjša koncentracija, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti	(Canillac and Mourey, 2001; Carson in sod., 1995b; Cosentino in sod., 1999) (Onawunmi, 1989)
bakteristatična koncentracija	<ul style="list-style-type: none">- najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov, se pa razmnožujejo po precepljanju na sveže gojišče	(Smith-Palmer in sod., 1998)
baktericidna koncentracija	<ul style="list-style-type: none">- najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov in ti ne rastejo niti po precepljanju na sveže gojišče	(Smith-Palmer in sod., 1998)

In vitro metode določanja protimikrobne aktivnosti snovi lahko razdelimo v difuzijske, razredčevalne in bioavtografske (Burt, 2004). Preglednica 5 prikazuje različne metode določanja protimikrobne aktivnosti. Večina starejših metod uporablja difuzijsko metodo na

agarju, ki je zamudna in ne omogoča razlikovanja med inhibitornimi in mikrobicidnimi koncentracijami preiskovane snovi.

Preglednica 5: Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov (Burt, 2004: 229)

namen	metoda določanja	reference
preiskovanje vzorcev na protimikrobno aktivnost	difuzija raztopine iz filter papirja nanašanje raztopine v/na agar	(Aureli in sod., 1992; Burt in Reinders, 2003; Cimanga in sod., 2002; Elgayyar in sod., 2001; Faleiro in sod., 2002; Farag in sod., 1989; Firouzi in sod., 1998; Kim in sod., 1995a,b; Packiyasothy in Kyle, 2002; Renzini in sod., 1999; Senatore in sod., 2000; Sivropoulou in sod., 1996; Skandamis in sod., 2001; Wilkinson in sod., 2003) (Deans in Ritchie, 1987; Dorman in Deans, 2000; Ruberto in sod., 2000; Smith-Palmer in sod., 1998; Wan in sod., 1998)
določanje učinkovitosti protimikrobnih lastnosti	razredčevanje snovi v agarju razredčevanje v bujonu - določanje vidne rasti - turbidimetrično določanje - določanje absorbance - kolorimetrično /fluorimetrično - impedančno - štetje kolonij	(Farag in sod., 1989; Hammer in sod., 1999; Juven in sod., 1994; Karapinar in Aktug, 1987; Moleyar in Narasimham, 1992; Negi in sod., 1999; Ouattara in sod., 1997; Pandit in Shelef, 1994; Paster in sod., 1990; Pintore in sod., 2002; Prudent in sod., 1995; Stecchini in sod., 1993; Ting in Deibel, 1991; Wilkinson in sod., 2003) (Bassole in sod., 2003; Cosentino in sod., 1999; Delaquis in sod., 2002; Elgayyar in sod., 2001; Mourey in Canillac, 2002; Onawunmi, 1989) (Chaibi in sod., 1997; Ismaiel in Pierson, 1990; Kim in sod., 1995a; Lambert in sod., 2001; Pol in Smid, 1999; Shelef in sod., 1984; Sivropoulou in sod., 1995; Sivropoulou in sod., 1996; Skandamis in Nychas, 2001; Ultee in Smid, 2001; Ultee in sod., 1998) (Mejlholm in Dalgaard, 2002; Smith-Palmer in sod., 1998) (Burt in Reinders, 2003; Gill in sod., 2002) (Marino in sod., 1999; Marino in sod., 2001; Tassou in sod., 1995; Tassou in sod., 2000; Wan in sod., 1998) (Beuchat, 1976; Canillac in Mourey, 2001; Friedman in sod., 2002; Hammer in sod., 1999; Koidis in sod., 2000; Periago in Moezelaar, 2001; Periago in sod., 2001; Pol in Smid, 1999; Shelef in sod., 1984; Sivropoulou in sod., 1996; Skandamis in sod., 2000; Tassou in sod., 1995)
določanje hitrosti in časa učinkovanja protimikrobne snovi	določanje preživelosti, rastne krivulje	(Aureli in sod., 1992; Beuchat, 1976; Burt in Reinders, 2003; Cressy in sod., 2003; Mejlholm in Dalgaard, 2002; Periago in Moezelaar, 2001; Pintore in sod., 2002; Pol in Smid, 1999; Shelef in sod., 1984; Sivropoulou in sod., 1996; Skandamis in sod., 2001; Stecchini in sod., 1993; Tassou in sod., 1995; Ting in Deibel, 1991; Ultee in Smid, 2001; Ultee in sod., 1998; Wan in sod., 1998)
opazovanje sprememb morfologije pod vplivom protimikrobnih snovi	elektronska mikroskopija	(Burt in Reinders, 2003; Lambert in sod., 2001; Skandamis in sod., 2001)

2.3.1 Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli*

V preglednici 6 je prikazan pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti, ki so jih različni avtorji uporabili pri raziskovanju protimikrobnega delovanja ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli*.

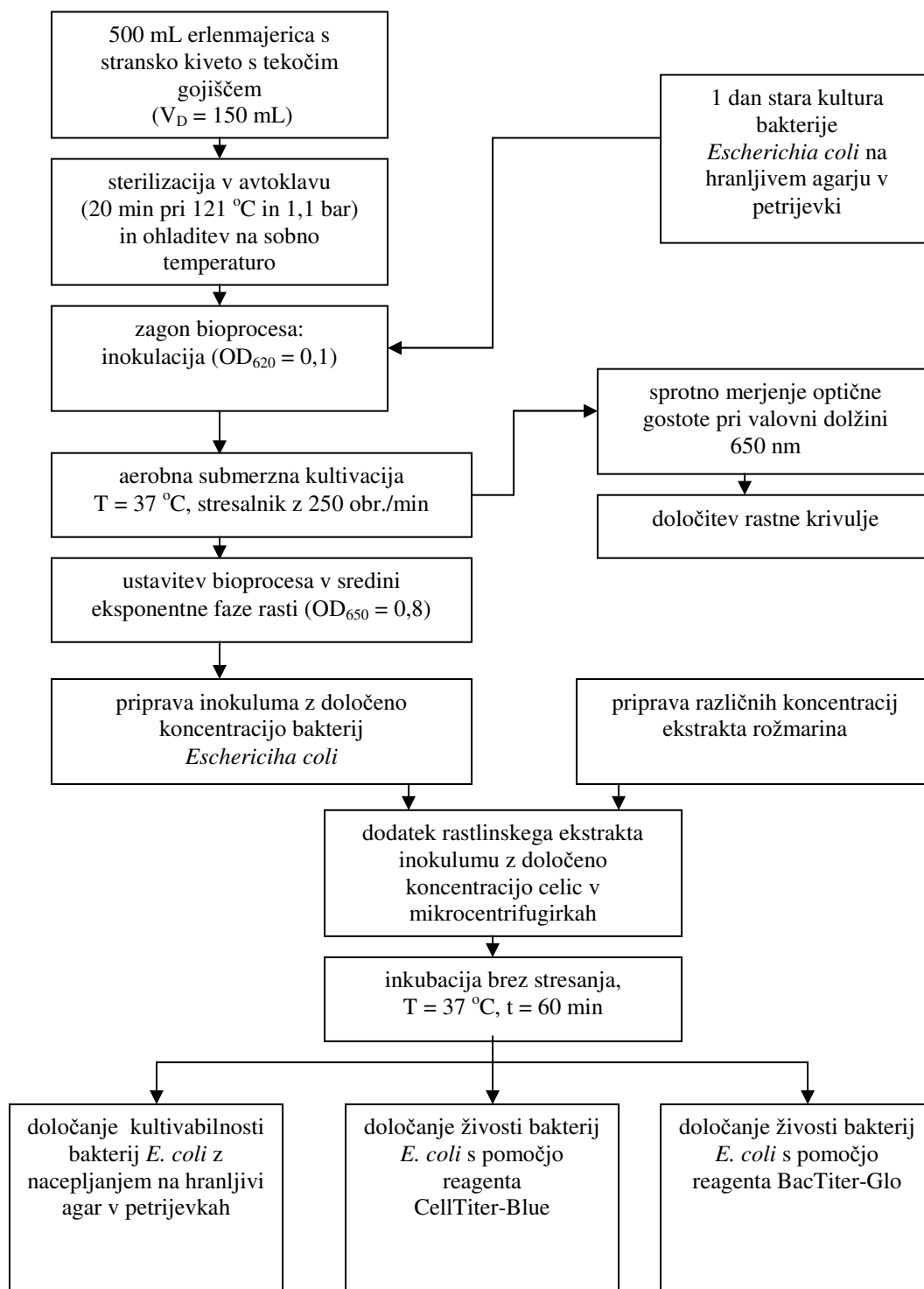
Preglednica 6: Pregled metod določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli*

metoda	reference
difuzija iz jamic v agarju	(Abu-Shanab in sod., 2004; Essawi in Srour, 2000; Schelz in sod., 2006)
difuzija iz filter papirja na agarju	(Celiktas in sod., 2005; Dulger in Gonuz, 2004; Essawi in Srour, 2000; Lopez in sod., 2005; Moreira in sod., 2005; Mounchid in sod., 2005; Nascimento in sod., 2000)
difuzija iz filter papirja brez direktnega stika z agarjem	(Lopez in sod., 2005)
razredčevanje v tekočem gojišču z določanjem vidne rasti in/ali štetjem kolonij	(Celiktas in sod., 2005; Hammer in sod., 1999; Nascimento in sod., 2000; Ramírez in sod., 2006; Schelz in sod., 2006)
razredčevanje v trdnem gojišču z opazovanjem vidne rasti	(Hammer in sod. 1999)

Kot je razvidno iz preglednice 6, še ni poročil o preverjanju protimikrobnega delovanja ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli* z uporabo resazurina ali na osnovi določanja vsebnosti ATP.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 3: Hodogram ugotavljanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina na bakterijah *E. coli*

3.2 METODE

3.2.1 Določitev rastne krivulje za bakterijo *E. coli*

V 500-mL erlenmajericah s stransko kiveto smo sterilizirali 150 mL sveže pripravljene hranljivega bujona in ga ohladili na sobno temperaturo. 1 dan staro kulturo bakterije *E. coli* na hranljivem agarju smo s cepilno zanko prenesli v 150 mL hranljivega bujona v erlenmajerici s stransko kiveto, dokler optične gostota pri valovni dolžini 650 nm ni dosegla vrednost 0,1.

Aerobna submerzna kultura je potekala na rotacijskem stresalniku pri temperaturi 37 °C in 250 obr./min. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm vsakih 30 minut. Bioproces smo zaključili, ko je kultura dosegla stacionarno fazo rasti.

Po določitvi rastne krivulje smo določili vrednost optične gostote, ki je ustrezala sredini eksponentne faze rasti in jo uporabili za nadaljnje poskuse.

3.2.2 Priprava inokuluma z določeno koncentracijo bakterij *E. coli*

V 500-mL erlenmajericah s stransko kiveto smo sterilizirali 150 mL sveže pripravljene hranljivega bujona in ga ohladili na sobno temperaturo. 1 dan staro kulturo bakterije *E. coli* na hranljivem agarju smo s cepilno zanko prenesli v 150 mL hranljivega bujona v erlenmajerici s stransko kiveto, dokler optična gostota pri valovni dolžini 650 nm ni dosegla vrednost 0,1.

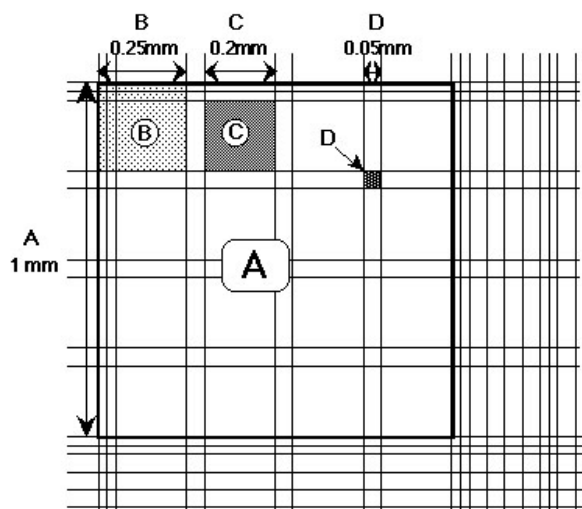
Aerobna submerzna kultura je potekala na rotacijskem stresalniku pri temperaturi 37 °C in 250 obr./min. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm.

Ko je optična gostota pri valovni dolžini 650 nm dosegla sredino eksponentne faze rasti ($OD_{650} = 0,8$), smo del brozge prelil v štiri steklene centrifugirke (4 x 9 mL) in centrifugirali 5 minut pri 4000 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant filtrirali čez filter s premerom por 0,2 µm in ga uporabili za pripravo inokuluma.

Za določitev števila celic v brozgi smo pripravil prvo (10^{-1}) razredčitev po Kochu v fiziološki raztopini in število celic na mililiter določili s pomočjo hemacitometra. Prešteli smo število celic v devetih kvadratih (označeni z D na sliki 3), znotraj večjega kvadrata (označenega z A na sliki 3). Po enačbi (1) smo izračunali povprečno število celic na kvadrata (\bar{N}). Z upoštevanjem povprečnega števila celic na kvadrata (\bar{N}), faktorja razredčitve ($R = 10$) in faktorja za določitev koncentracije celic (4×10^6), smo po enačbi (2) določili število celic v mililitru brozge.

$$\text{Povprečno število celic na kvadrata } (\bar{N}) = \frac{\text{število vseh celic}}{\text{število kvadratov}} \quad \dots (1)$$

$$\text{Število celic/mL} = \overline{N} \times 4 \times 10^6 \times 10 \quad \dots (2)$$



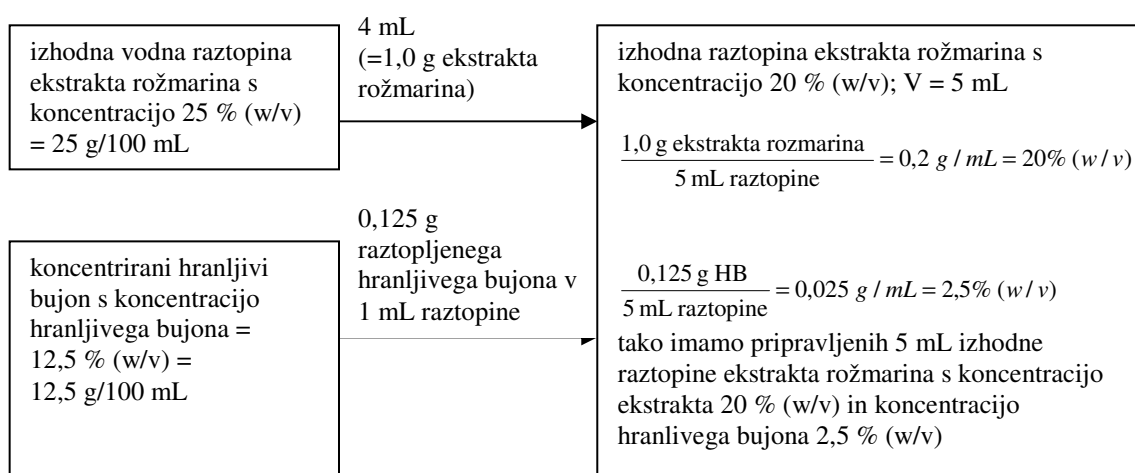
Slika 4: Shematski prikaz hemacitometra (Hemocytometer: Bürker-Türk, 2006: 1)

Ko smo določili število celic na mililiter brozge, smo iz izhodne brozge in mikrofiltriranega supernatanta pripravili izhodno suspenzijo bakterij *E. coli* s koncentracijo 1×10^6 celic/mL.

3.2.3 Priprava ekstrakta rožmarina

Ekstrakt rožmarina (1 g) smo zatehtali v stekleno centrifugirko, dodali bidestilirano vodo (4 mL) in mešali na stresalniku, dokler se ekstrakt ni popolnoma raztopil (kar je trajalo približno 1 do 2 minuti). Raztopino ekstrakta smo nato centrifugirali 5 minut pri 4000 obr./min. Po centrifugiranju smo s pomočjo injekcijske brizgalke odstranili supernatant in ga filtrirali čez filter s premerom por $0,2 \mu\text{m}$. Tako smo dobili izhodno vodno raztopino ekstrakta rožmarina s koncentracijo 25 % (w/v).

Za pridobitev izhodne 20 % (w/v) raztopine ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu smo zmešali izhodno vodno raztopino ekstrakta rožmarina (25 % (w/v)) s koncentriranim hranljivim bujonom v volumskem razmerju 4:1 (slika 5). Ostale koncentracije ekstrakta rožmarina (10, 5, 2, 1, 0,2 % (w/v)) smo dobili z razredčevanjem 20 % (w/v) raztopine ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s hranljivim bujonom.



Slika 5: Shematski prikaz priprave izhodne raztopine ekstrakta rožmarina

3.2.4 Inkubacija bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina

Inkubacija bakterij z ekstraktom rožmarina v različnih koncentracijah je potekala v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. V mikrocentrifugirko smo dodali pripravljen inokulum in raztopino ekstrakta rožmarina v tekočem gojišču v volumskem razmerju 1:1 (300 μ L) in premešali na stresalniku (5 s). Tako pripravljene vzorce smo nato inkubirali v inkubatorju pri 37 °C eno uro. Enako smo postopali z negativno, pozitivno, slepo ter drugimi kontrolami specifičnimi za določitev živosti bakterij *E. coli* z reagentoma CellTiter-Blue oz. BacTiter-Glo.

Negativna kontrola:

- inokulum bakterij *E. coli* s koncentracijo 1×10^6 celic/mL (300 μ L)
- hranljivi bujon (300 μ L)

Tako je bil pri negativni kontroli v mikrocentrifugirki volumen vzorca 600 μ L, koncentracija celic bakterije *E. coli* pa 5×10^5 celic/mL.

Pozitivna kontrola:

- inokulum bakterij *E. coli* s koncentracijo 1×10^6 celic/mL (300 μ L)
- hranljivi bujon z dodatkom antibiotika (ciprofloksacin in/ali eritromicin) s koncentracijo 1024 μ g/mL (300 μ L)

Tako je bil pri pozitivni kontroli v mikrocentrifugirki volumen vzorca 600 μ L, koncentracija antibiotika (ciprofloksacin in/ali eritromicin) 512 μ g/mL in koncentracija celic bakterije *E. coli* 5×10^5 celic/mL.

3.2.5 Določitev kultivabilnosti

Število živih oziroma za reprodukcijo sposobnih mikroorganizmov lahko določimo s štetjem kolonij na trdnih gojiščih (angl. "plate count" oz. "viable count"). V teh razmerah je število viabilnih celic enako številu kolonij (aproksimira (=se asimptotično približuje) številu enot, ki tvorijo kolonije; angl. "colony-forming units, CFU) (Kell in sod., 1998).

Po inkubaciji inokuluma bakterij *E. coli* z raztopino ekstrakta rožmarina smo iz mikrocentrifugirke odvzeli 100 µL vzorca in ga prenesli na petrijevko s hranljivim agarjem. Nato smo iz iste mikrocentrifugirke še enkrat odvzeli 100 µL vzorca in v fiziološki raztopini pripravili serijo razredčitev (do 10⁻⁶) po Kochu. Po stresanju smo iz vsake mikrocentrifugirke odvzeli 100 µL razredčenega vzorca in ga nacepili na petrijevke s hranljivim agarjem. Tekočino smo po površini hranljivega agarja razmazali s pomočjo steklenih kroglic.

Po 24 urni inkubaciji pri 37 °C v inkubatorju smo prešteli kolonije in izračunali kultivabilnost po enačbi (3).

$$N = \frac{\sum c}{(a + 0,1b)d} \quad \dots (3)$$

N CFU/mL

Σc vsota kolonij na vseh ploščah

a število plošč prve števnice razredčitve

b število plošč druge števnice razredčitve

d razredčitveni faktor (prve števnice razredčitve)

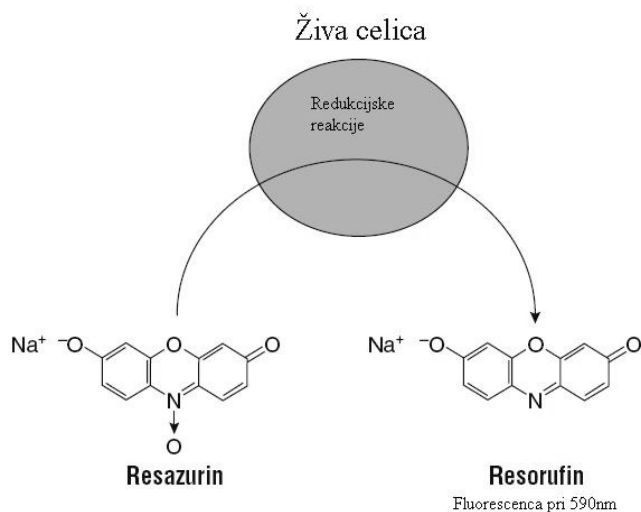
3.2.6 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue

Poskus z reagentom CellTiter-Blue temelji na uporabi resazurina kot kolorimetričnega in/ali fluorimetričnega indikatorja. Resazurin je modro obarvan reagent z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 605 nm, ki šibko fluorescira. Redukcija resazurina do rožnato obarvanega resorufina, ki močno fluorescira (Slika 6) je posledica metabolne aktivnosti celic. Rožnato obarvan resorufin se pod vplivom metabolne aktivnosti celic spremeni do brezbarvnega dihidroresorufina, ki ne fluorescira. Spremembo barve lahko spremljamo brez dodatne opreme, fluorescenco in/ali spremembo barve pa s pomočjo spektrofotometra. Priporoča se merjenje fluorescence z vzbujanjem pri valovni dolžini 579 nm in merjenjem emitirane fluorescence pri 584 nm zaradi močno povečane občutljivosti. Količina reduciranega resazurina je tako proporcionalna metabolni aktivnosti celic (Riss in Moravec, 2003).

Kuda in Yano (2003) navajata, da je redukcija resazurina v resorufin posledica kemične redukcije gojišča zaradi metabolne aktivnosti mikroorganizmov, priročnik za uporabo reagenta CellTiter-Blue pa navaja, da se resazurin reducira v celici in difundira v gojišče (Riss in Moravec, 2003), kar so potrdili tudi z elektronsko mikroskopijo.

Metodo je potrebno optimizirati (število oz. koncentracija celic, čas inkubacije, izbira gojišča itd.), saj celice reducirajo fluorescirajoč resorufin do dihidroresorufina, ki ni obarvan in ne fluorescira (CellTiter-Blue Cell Viability Assay, 2002).

Goranovič (2005) je določil optimalno valovno dolžino za vzbujanje in merjenje fluorescence resazurina. Tako smo v poskusih za vzbujanje uporabili valovno dolžino 550 nm in za merjenje emitirane fluorescence pri 595 nm.



Sika 6: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003: 1)

Po eni uri inkubacije bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina (točka 3.2.4) smo iz mikrocentrifugirke odpipetirali 150 μ L vzorca in ga prenesli v jamico črne mikrotitrnske ploščice z ravnim dnom. Nato smo dodali 30 μ L reagenta CellTiter-Blue in s pomočjo pipete premešali vsebino v jamici mikrotitrnske ploščice.

Preglednica 7 prikazuje izsek mikrotitrnske ploščice, kjer kvadratki, koordinirani z oznakami od A1 do H1, predstavljajo jamice na mikrotitrnski ploščici. Paralelke niso prikazane. Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah je podrobno opisan v preglednici 8.

Preglednica 7: Prikaz izseka mikrotitrnske ploščice pri določanju živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	R1	R5	R10	neg. kont.	poz. kont.	slepi vzorec R5	slepi vzorec HB	/

Fluorescenco smo spremljali s pomočjo čitalca mikrotitrnskih ploščic.

Pogoji merjenja so bili:

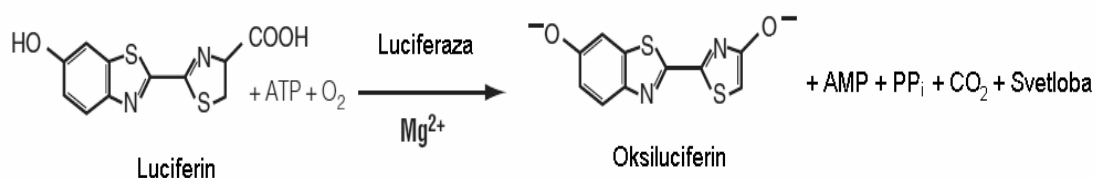
- valovna dolžina vzbujanja: 550 nm
- valovna dolžina merjenja emitirane fluorescence: 595 nm
- razmik med valovnimi dolžinami ("bandwidth"): 20 nm
- čas merjenja: 4 ure
- časovni interval med meritvami: 15 minut
- parametri za merjenje fluorescence na čitalcu mikrotitrnskih ploščic:
 - o gain: 38
 - o z-position: 8174 μ m

Preglednica 8: Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah uporabljenih za prenos v jamice mikrotitrne ploščice prikazane v preglednici 7

oznaka	volumen in opis prvega dodatka v mikrocentrifugirko	volumen in opis drugega dodatka v mikrocentrifugirko	končna koncentracija celic bakterij <i>E. coli</i>	končna koncentracija ekstrakta rožmarina	namen vzorca
R1	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 2 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	1 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
R5	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 10 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	5 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
R10	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 20 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	10 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
neg. kont.	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL hranljivega bujona	5×10^5 celic/mL	/	negativna kontrola
poz. kont.	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL hranljivega bujona z dodatkom ciprofloksacina s koncentracijo 1024 µg/mL	5×10^5 celic/mL	/	pozitivna kontrola
slepi vzorec R5	300 µL hranljivega bujona	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 10 % (v/w)	0	/	slepi vzorec za določanje vpliva ekstrakta rožmarina na fluorescenco
slepi vzorec HB	300 µL hranljivega bujona	300 µL hranljivega bujona	0	/	slepi vzorec za določanje vpliva hranljivega bujona na fluorescenco

3.2.7 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo

Metoda BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay nam omogoča določitev metabolno aktivnih mikroorganizmov na osnovi določanja količine ATP. Komercialni reagent BacTiter-Glo nam v enem koraku povzroči lizo celic in nastanek luminiscence, kar močno olajša delo v nasprotju z drugimi testi, ki temeljijo na principu določanja količine ATP. Glavni komponenti reagenta sta rekombinantna termostabilna luciferaza in reagent za ekstrakcijo ATP iz celic. Luminiscenca nastane zaradi reakcije, prikazane na sliki 7 in je proporcionalna količini ATP, ki pa je na drugi strani proporcionalna številu metabolno aktivnih celic v vzorcu. Signal, ki ga dobimo kot posledico reakcije, je zelo stabilen in ima razpolovni čas praviloma daljši od 30 minut (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006).



Slika 7: Reakcija nastanka luminiscence (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006: 3)

Metoda je bila uspešno uporabljena za določitev protimikrobnega delovanja številnih aktivnih snovi in za določitev bakterijske rasti s povečano občutljivostjo pri razponu števila celic čez šest logaritmskih stopenj. Po navodilih je treba biti pozoren na naslednje dejavnike, ki lahko vplivajo na stopnjo luminiscence: temperatura, gojišče, kemikalije, vrsta mikrotitrne ploščice, vsebnost ATP v celicah, mešanje vzorcev in prisotnost ATP v reagentu (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006).

Po eni uri inkubacije bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina (točka 3.2.4) smo iz mikrocentrifugirke odpipetirali 100 μL vzorca in ga prenesli v jamico bele mikrotitrne ploščice z ravnim dnom. Nato smo dodali 100 μL reagenta BacTiter-Glo. Mikrotitrsko ploščico smo s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic stresali eno minuto pri srednji jakosti mešanja. Po petih minutah inkubacije smo s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic izmerili intenziteto luminiscence.

Preglednica 9 prikazuje izsek mikrotitrne ploščice, kjer kvadratki, koordinirani z oznakami od A1 do H1, predstavljajo jamice na mikrotitrski ploščici. Paralelke niso prikazane. Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah je podrobno opisan v preglednici 10.

Preglednica 9: Prikaz izseka mikrotitrne ploščice pri določanju živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	R5	R1	R0,5	R0,1	neg. kont.	poz. kont.	slepi vzorec R5	slepi vzorec HB

Preglednica 10: Opis vzorcev pripravljenih v mikrocentrifugirkah uporabljenih za prenos v jamice mikrotitrne ploščice prikazane v preglednici 9

oznaka	volumen in opis prvega dodatka v mikrocentrifugirko	volumen in opis drugega dodatka v mikrocentrifugirko	končna koncentracija celic bakterij	končna koncentracija ekstrakta	namen vzorca
R5	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 10 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	5 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
R1	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 2 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	1 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
R0,5	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 1 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	0,5 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
R0,1	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 0,2 % (v/w)	5×10^5 celic/mL	0,1 % (w/v)	preverjanje vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo <i>E. coli</i>
neg. kont.	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL hranljivega bujona	5×10^5 celic/mL	/	negativna kontrola
poz. kont.	300 µL inokuluma bakterij <i>E. coli</i> s koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL	300 µL hranljivega bujona z dodatkom eritromicina s koncentracijo 1024 µg/mL	5×10^5 celic/mL	/	pozitivna kontrola
slepi vzorec R5	300 µL hranljivega bujona	300 µL ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu s koncentracijo 10 % (v/w)	0	5 % (w/v)	slepi vzorec za določanje vpliva hranljivega bujona z ekstraktom rožmarina na luminiscenco
slepi vzorec HB	300 µL hranljivega bujona	300 µL hranljivega bujona	0	/	slepi vzorec za določanje vpliva hranljivega bujona na luminiscenco

Pogoji merjenja so bili:

- integracijski čas: 1000 ms
- čas merjenja: 5 minut

Z negativno in pozitivno kontrolo ter s slepim vzorcem smo postopali na enak način kot z drugimi vzorci.

Z dodatkom raztopin z različnimi koncentracijami ATP smo določil vpliv hranljivega bujona z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco. Pripravili smo tudi umeritveno krivuljo in preverili, kako na luminiscenco vpliva permeat vzorcev po filtraciji čez filter s premerom por 0,2 µm.

Preverili smo tudi, če je prisoten ATP v ekstraktu rožmarina v hranljivem bujonu pri koncentracijah 0,1 % (w/v); 0,5 % (w/v); 1 % (w/v) in 5 % (w/v).

Preverili smo še lastno luminiscenco vzorcev brez dodatka reagenta BacTiter-Glo.

3.2.8 Statistična obdelava rezultatov

3.2.8.1 Povprečna vrednost

Pri štetju celic, določanju kultivabilnosti, določanju živosti s pomočjo merjenja fluorescence z reagentom CellTiter-Blue in določanju živosti s pomočjo merjenja luminiscence z reagentom BacTiter-Glo smo meritve izvedli v dveh ponovitvah.

Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost (\bar{X}), ki smo jo dobili s pomočjo enačbe (4) (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (4)$$

n število vzorcev

X_i vrednost i-te meritve

3.2.8.2 Standardni odklon, koeficient variacije

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV) po enačbah (5) in (6) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots (5)$$

$$KV[\%] = \frac{SD}{\bar{X}} 100 \quad \dots (6)$$

3.3 MATERIALI

3.3.1 Mikroorganizem

Uporabili smo bakterijo *Escherichia coli* – ŽM 370, ki nam jo je posredovala Katedra za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete.

Bakterijo smo gojili na petrijevih ploščah s hranljivim agarjem v inkubatorju pri temperaturi 37 °C. Vsaj tri dni pred izvedbo glavnega poskusa smo bakterijo vsak dan precepljali na svež hranljivi agar.

3.3.2 Ekstrakt rožmarina

Uporabili smo vodotopen ekstrakt rožmarina (ROS.ra), Vitiva d.o.o., Markovci.

3.3.3 Gojišča

3.3.3.1 Hranljivi agar

Hranljivi agar smo uporabljali za hranjenje, precepljanje in za določanje kultivabilnosti bakterij *E. coli*.

Preglednica 11: Sestava hranljivega agarja

sestavina	količina	koncentracija
hranljivi agar "Nutrient agar" (Oxoid)	28 g	2,8 % (w/v)
dH ₂ O	1000 mL	

Gojišče smo zaklejali v mikrovalovni pečici in ga nato sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga v laminariju razlili v petrijevke.

3.3.3.2 Hranljivi bujon

Hranljivi bujon smo uporabljali za aerobno submerzno kultivacijo bakterije *E. coli* ter za pripravo raztopin ekstrakta rožmarina, pripravo raztopin antibiotikov in za pripravo različnih kontrolnih in slepih vzorcev.

Preglednica 12: Sestava hranljivega bujona

sestavina	količina	koncentracija
hranljivi bujon "Nutrient broth" (Oxoid)	25 g	2,5 % (w/v)
dH ₂ O	1000 mL	

Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.3.3.3 Koncentriran hranljivi bujon in hranljivi bujon z dodatkom ekstrakta rožmarina

Koncentriran hranljivi bujon smo uporabili za pripravo izhodne 20 % (w/v) raztopine ekstrakta rožmarina (točka 3.2.3). Pripravo ostalih koncentracij raztopin ekstrakta rožmarina smo pripravili z razredčevanjem izhodne raztopine ekstrakta rožmarina s steriliziranim hranljivim bujonom.

Preglednica 13: Sestava koncentriranega hranljivega bujona

sestavina	količina	koncentracija
hranljivi bujon "Nutrient broth" (Oxoid)	12,5 g	12,5 % (w/v)
dH ₂ O	100 mL	

Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.3.4 Reagenti, raztopine

3.3.4.1 Priprava fiziološke raztopine

- izhodna raztopina KH₂PO₄
3,40 g KH₂PO₄ (Merck)
dodamo 50 mL dH₂O
uravnamo na pH 7,2 s 3 M vodno raztopino NaOH (Merck)
dodamo dH₂O do 100 mL
hranjenje: 3 mesece pri T = 4 °C
- raztopina KH₂PO₄
1,25 mL izhodne raztopine KH₂PO₄
dodamo dH₂O do 1000 mL
raztopino KH₂PO₄ smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar

3.3.4.2 Priprava raztopin antibiotikov

- izhodna raztopina antibiotika eritromicin s koncentracijo 5120 µg/mL

51,2 mg eritromicin (Sigma)
dodamo 10 mL absolutnega etanola (Merck)
filtracija čez filter s premerom por 0,2 µm
hranjenje pri T = 4 °C

Za pripravo drugih koncentracij antibiotika smo izhodno raztopino antibiotika razredčevali s hranljivim bujonom.

- izhodna raztopina antibiotika ciprofloksacin s koncentracijo 5120 µg/mL

51,2 mg ciprofloksacin (Fluka)
dodamo 1 mL 0,1 M raztopine NaOH (Merck)
dodamo 9 mL dH₂O
filtracija čez filter s premerom por 0,2 µm
hranjenje pri T = 4 °C

Za pripravo drugih koncentracij antibiotika smo izhodno raztopino antibiotika razredčevali s hranljivim bujonom.

3.3.4.3 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue

- reagent CellTiter-Blue (Promega)

3.3.4.4 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo

- reagent BacTiter-Glo (Promega)
- pufer Tris-HCl z dodatkom EDTA
6,06 g Tris (Merck)
0,372 g EDTA (Kemika)
300 mL dH₂O
uravnamo pH na 7,5 z uporabo koncentrirane HCl (Merck)
dopolnimo do 500 mL z dH₂O
- ATP (Sigma)

3.3.4.5 Priprava raztopine ATP z ekstrakcijo iz celic bakterij *E. coli*

1 mL brozge (v sredini eksponentne faze rasti (OD₆₅₀ = 0,8); točka 3.2.2) smo dodali 9 mL vrele raztopine pufera Tris-HCl z dodatkom EDTA. Po dodatku smo suspenzijo segrevali še 1 minuto, jo nato ohladili in filtrirali čez filter s premerom por 0,2 µm (Stanley, 1986). Tako pripravljeno raztopino ekstrahiranega ATP smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3.4.6 Priprava raztopin ATP

Raztopine različnih koncentracij ATP v hranljivem bujonu smo uporabili za določitev vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco ter za pripravo umeritvene krivulje.

Po protokolu (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006) smo pripravili različne koncentracije ATP v hranljivem bujonu. Iz izhodne raztopine ATP (100 µM) smo pripravil še dve serijski razredčitvi (10 µM in 1 µM). Po mešanju s hranljivim bujonom z dodatkom ekstrakta rožmarina so bile koncentracije ATP v mikrotitrski jamici 50, 5 in 0,5 µM.

3.3.5 Pribor in oprema

3.3.5.1 Priprava gojišč in raztopin

- 1,5-mL mikrocentrifugirke Eppendorf
- avtoklav Sutjeska
- avtomatske pipete Gilson
- centrifuga Tehnica Železniki Centric 322A
- injekcijske brizgalke
- injekcijske igle
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- magnetno mešalo Tehnica Železniki 550 M
- merilni valji kapacitet 50, 100, 500 in 1000 mL
- mikrovalovna pečica Sanyo
- petrijevke Golias
- pH meter Mettler Toledo SevenMulti
- steklene centrifugirke
- sterilni membranski filtri (premer por 0,2 µm) Sartorius
- tehnici: Sartorius-excelence, Sartorius-analytic
- vodna kopel Heto
- vrtinčnik Tehnica Železniki EV 100

3.3.5.2 Priprava inokuluma z določeno koncentracijo bakterij *E. coli*

- 500-mL erlenmajerice s stransko kiveto
- avtomatske pipete Gilson
- cepilna zanka
- centrifuga Tehnica Železniki Centric 322A
- inkubator Kambič
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- mikroskop Leica ATC 2000
- plinski gorilnik
- rotacijski stresalnik Tehnica Železniki VRVI-403
- spektrofotometer Iskra MA 9510
- steklene centrifugirke
- sterilni membranski filtri (premer por 0,2 µm) Sartorius
- števna poščica Bürker-Türk
- vrtinčnik Tehnica Železniki EV 100

3.3.5.3 Inkubacija bakterij *E. coli* z rastlinskih ekstraktom

- 1,5-mL mikrocentrifugirke Eppendorf
- avtomatske pipete Gilson
- inkubator Kambič
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- plinski gorilnik

- vrtinčnik Tehtnica Železniki EV 100

3.3.5.4 Določitev kultivabilnosti

- 1,5-mL mikrocentrifugirke Eppendorf
- avtomatske pipete Gilson
- inkubator Kambič
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- petrijevke Golias
- plinski gorilnik
- steklene kroglice
- vrtinčnik Tehtnica Železniki EV 100

3.3.5.5 Določitev živosti s pomočjo reagenta CellTiter-Blue

- avtomatske pipete Gilson
- čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2
- inkubator Kambič
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- črne mikrotitrške ploščice z ravnim dnom, Nunc
- plinski gorilnik
- računalnik, programski paket Magellan
- vrtinčnik Tehtnica Železniki EV 100

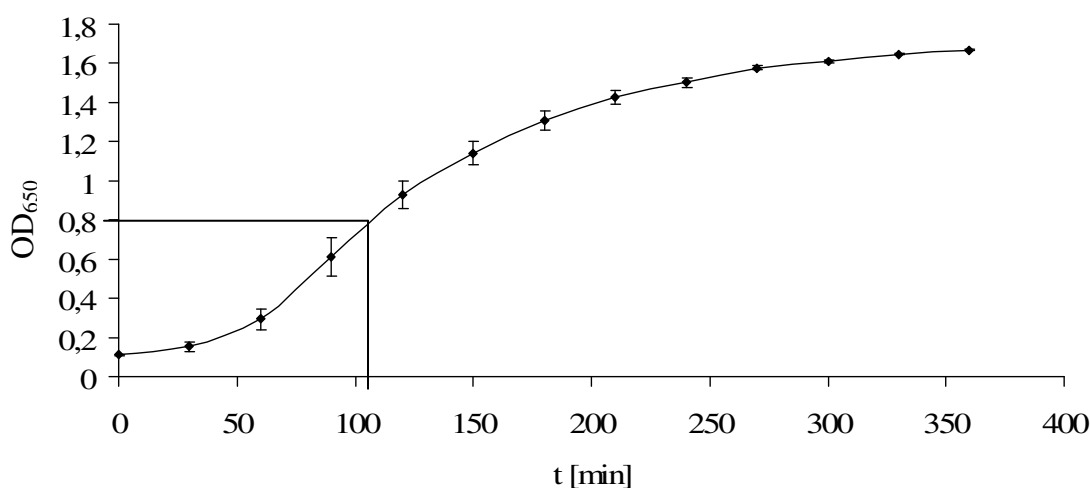
3.3.5.6 Določitev živosti s pomočjo reagenta BacTiter-Glo

- 12 kanalna pipeta Eppendorf
- avtomatske pipete Gilson
- čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2
- inkubator Kambič
- laminarij Iskra PIO LFVP122
- bele mikrotitrške ploščice z ravnim dnom, Nunc
- plinski gorilnik
- računalnik, programski paket Magellan
- spektrofotometer Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech
- vrtinčnik Tehtnica Železniki EV 100
- falkonke (20 mL)
- plastične kivete

4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v 330 urah laboratorijskega dela med novembrom 2005 in avgustom 2006. Skladno z delovnimi hipotezama smo poiskovali dokazati, da ekstrakt rožmarina vpliva na živost bakterij *E. coli*, ter da je hitra metoda enakovredna ali bolj uporabna za merjenje živosti bakterije *E. coli* v primerjavi s (klasičnim) določanjem kultivabilnosti (štetje kolonij). Najprej smo spremljali rastno krivuljo za bakterijo *E. coli* s pomočjo merjenja optične gostote. Nato smo določili kultivabilnost in živost po izpostavitvi kulture ekstraktu rožmarina z dvema različnima komercialno dostopnima reagentoma (CellTiter-Blue in BacTiter-Glo) ter rezultate statistično ovrednotili.

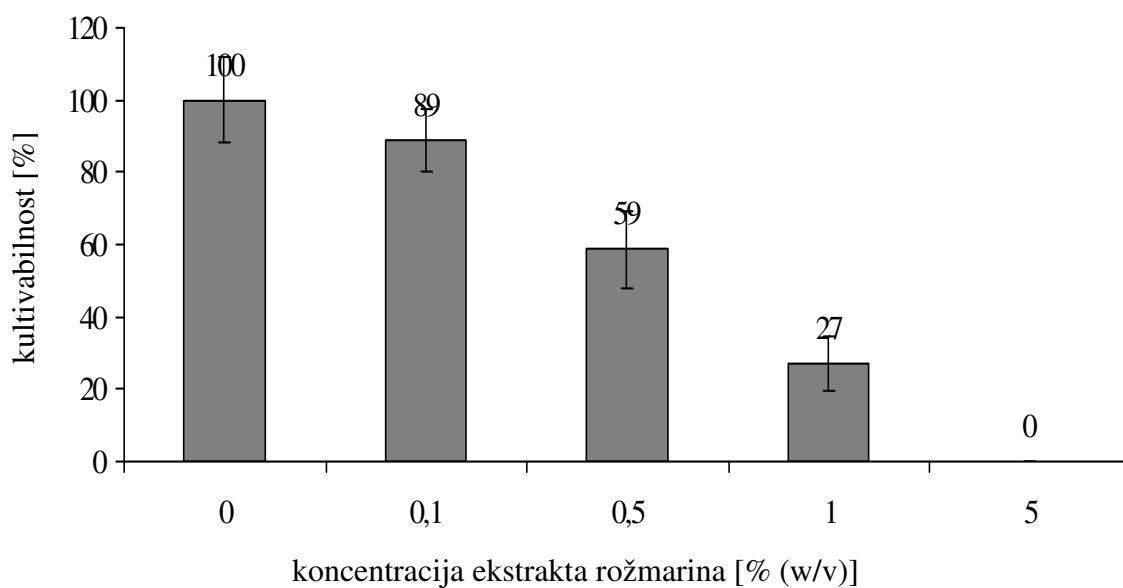
4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE BAKTERIJE *E. coli*



Slika 8: Določanje rastne krivulje za bakterijo *E. coli* v hranljivem bujonu ($V_D = 150$ mL, $T = 37$ °C, 250 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

Po določitvi rastne krivulje za bakterijo *E. coli* smo izbrali optično gostoto 0,8 pri valovni dolžini 650 nm, kar odgovarja sredini eksponentne faze rasti. Pri omenjeni optični gostoti smo bioproces zaključili in pripravili inokulum bakterij z določeno koncentracijo celic kot je opisano pod točko 3.2.2.

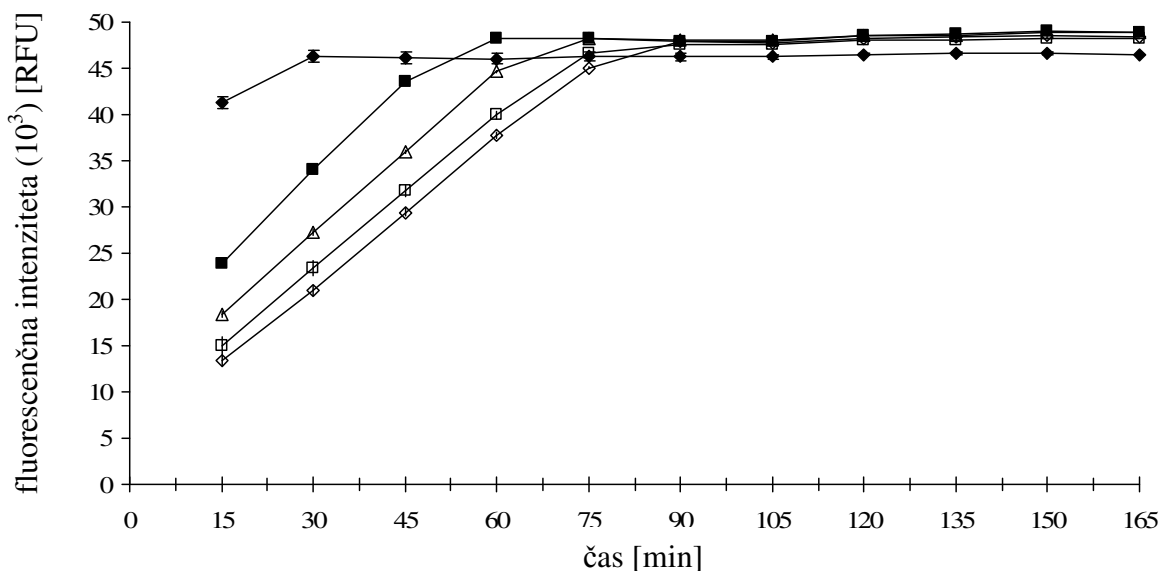
4.2 DOLOČITEV KULTIVABILNOSTI



Slika 9: Določanje kultivabilnosti po enourni inkubaciji celic bakterij *E. coli* z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

4.3 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA CellTiter-Blue

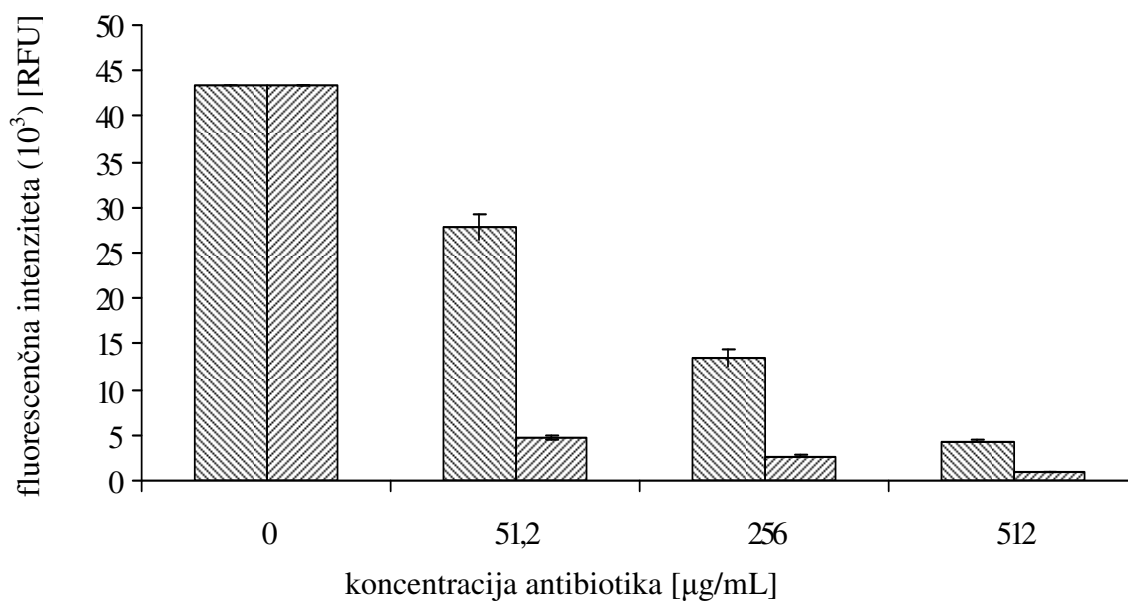
4.3.1 Določitev optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina



Slika 10: Določanje optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev, razen pri vzorcu z 1×10^8 celic/mL, kjer smo imeli le eno ponovitev

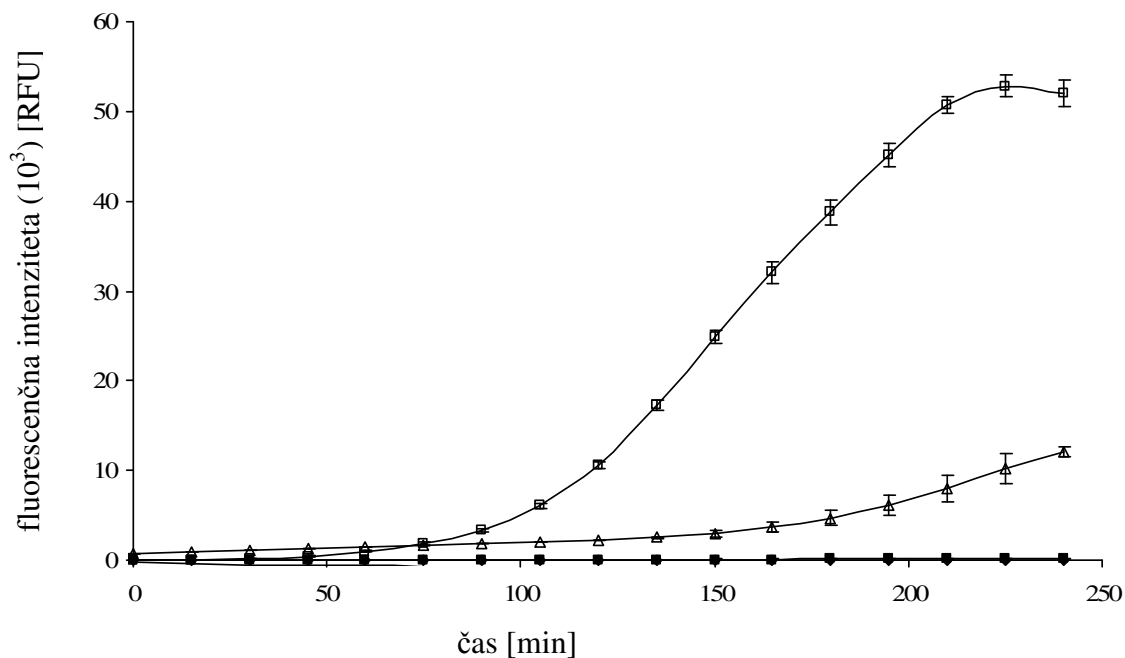
- ◆ - $7,8 \times 10^8$ celic/mL, ■ - 1×10^8 celic/mL, △ - 1×10^7 celic/mL, □ - 1×10^6 celic/mL,
- ◇ - 1×10^5 celic/mL

4.3.2 Preizkus metode z antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin



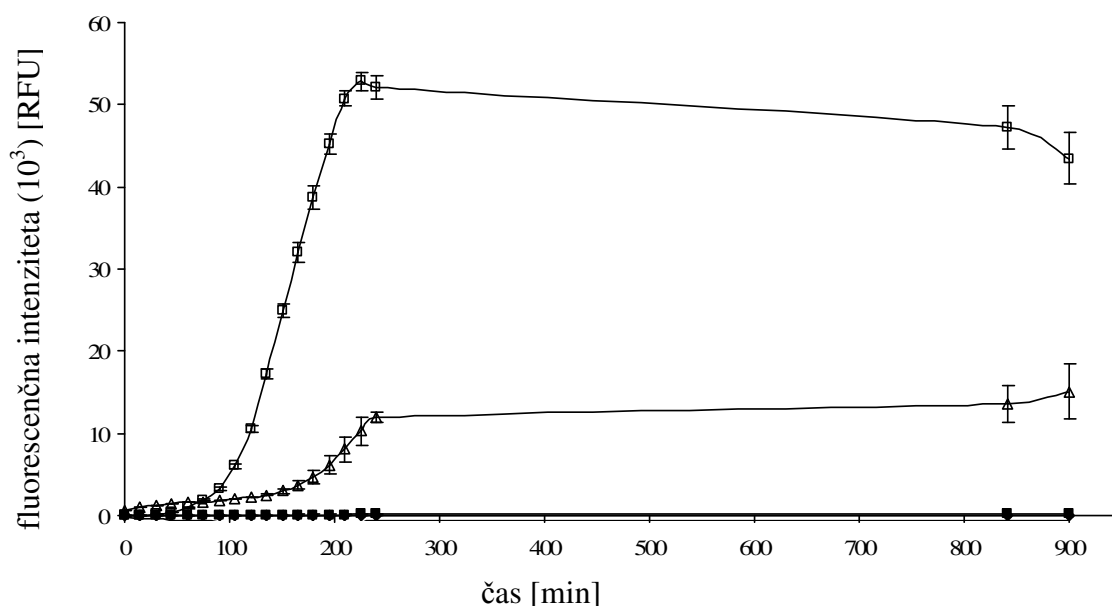
Slika 11: Določanje vpliva dveh različnih antibiotikov na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij *E. coli*. Čas inkubacije bakterij z antibiotikoma: 1 h; T = 37 °C; čas redukcije resazurina: 45 min. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev ▨ - ciprofloksacin, ▩ - eritromicin

4.3.3 Določitev živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta CellTiter-Blue



Slika 12: Določanje vpliva ekstrakta rožmarina v različnih koncentracijah na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij *E. coli*. Čas inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas redukcije resazurina do 240 min. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

♦ - R10, ■ - R5, Δ - R1, □ - neg. kont., ◇ - poz. kont. (Opomba: Vzorci R10, R5 in pozitivna kontrola so vsi na abscisni osi in se zaradi prekrivanja ne vidijo)



Slika 13: Določanje vpliva ekstrakta rožmarina v različnih koncentracijah na redukcijsko sposobnost resazurina bakterij *E. coli*. Čas inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas redukcije resazurina do 900 min. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± SD dveh ponovitev

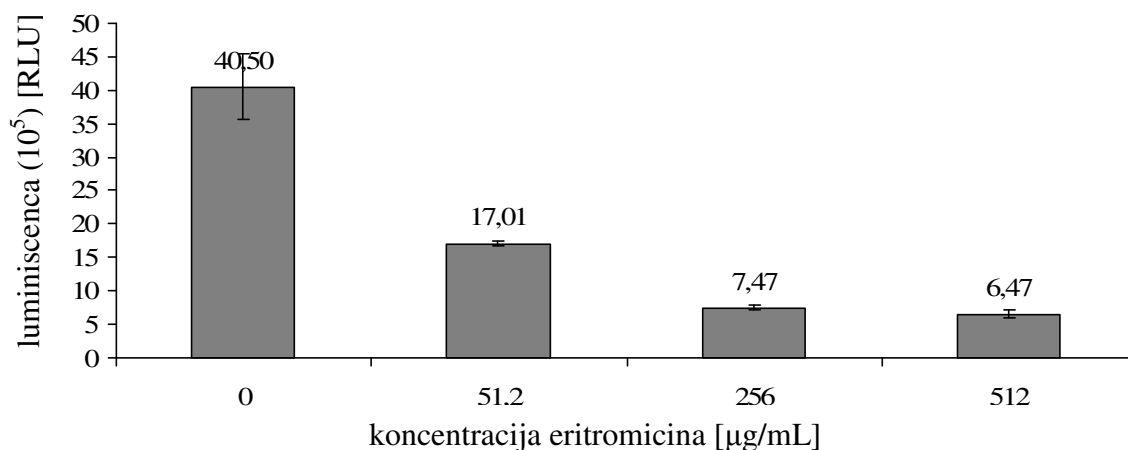
◆ - R10, ■ - R5, △ - R1, □ - neg. kont., ◇ - poz. kont. (Opomba: vzorci R10, R5 in pozitivna kontrola so vsi na abscisni osi in se zaradi prekrivanja ne vidijo)

Preglednica 14: Vizualna analiza vzorcev iz jamic na mikrotitrski ploščici po 15 urni inkubaciji z resazurinom

vzorec	barva
R10	temno rumeno
R5	svetlo rumeno
R1	rjavo
neg. kont.	rožnato
poz. kont.	modro
slepi vzorec s 5 % (w/v) ekstrakta rožmarina	rumeno
slepi vzorec (hranljivi bujon)	modro

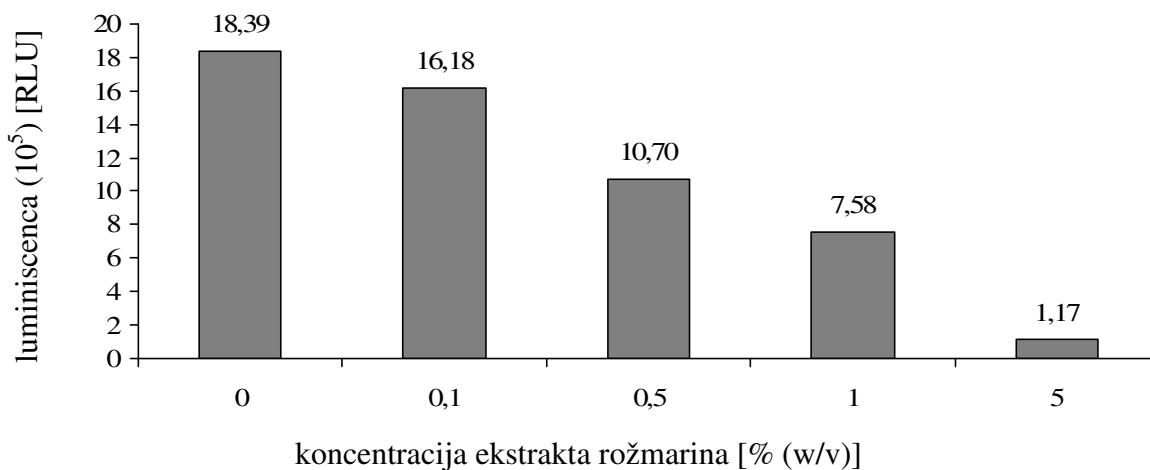
4.4 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA BacTiter-Glo

4.4.1 Preizkus metode z antibiotikom eritromicin



Slika 14: Določanje vpliva inkubacije kulture celic bakterij *E. coli* z antibiotikom eritromicin v različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije celic bakterij *E. coli* z antibiotikom: 1 h; $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$; čas inkubacije z reagentom BacTiter-Glo: 5 min. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

4.4.2 Vpliv gojišča z in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco



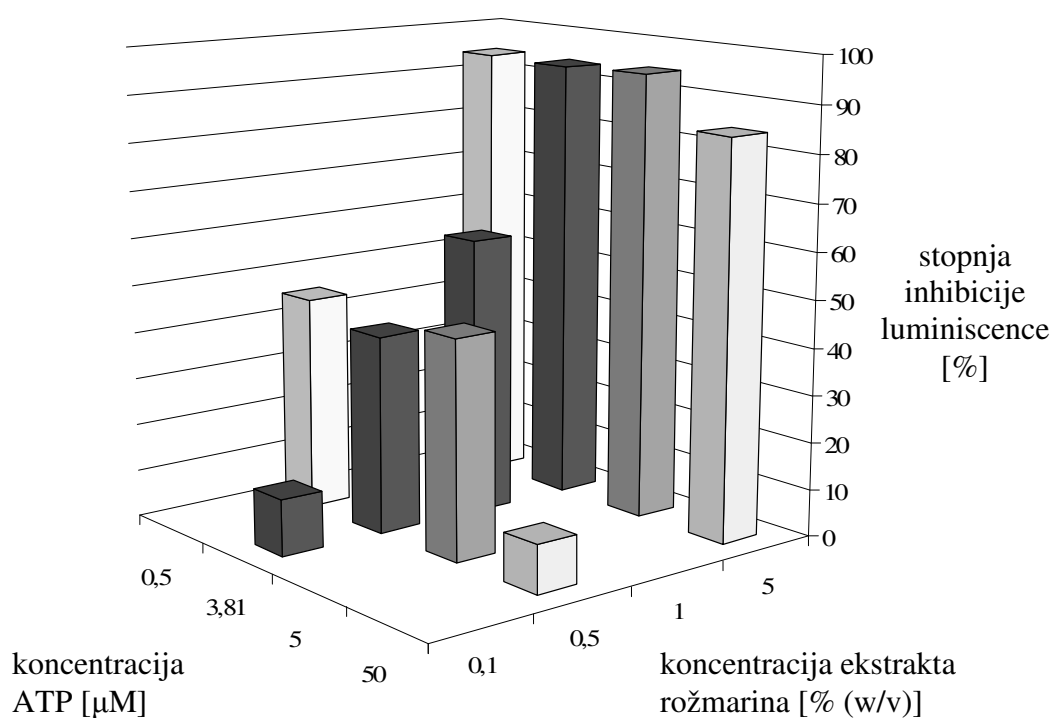
Slika 15: Določanje vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP. Čas inkubacije ekstrakta z ekstrahiranim ATP: 5 min; $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$. Rezultati so predstavljeni kot vrednosti ene ponovitve

Postavili smo enačbo (7) za določitev stopnje inhibicije luminiscence.

$$\text{stopnja inhibicije luminiscence [\%]} = 100 \% - \left(\frac{RLU(\text{vzorca})}{RLU(\text{hranljivega bujona})} * 100 \% \right) \dots (7)$$

Preglednica 15: Stopnja inhibicije luminiscence gojišča z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP

koncentracija ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu [% w/v]	stopnja inhibicije luminiscence [%]
5	93,65
1	58,79
0,5	41,85
0,1	12,02
brez dodatka ekstrakta rožmarina	0



Slika 17: Določanje vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco po dodatku ATP (ekstrahiranega in komercialno dostopnega) – prikazano kot stopnja inhibicije luminiscence. Koncentracijo ekstrahiranega ATP smo določili s pomočjo umeritvene krivulje in primerjavo stopenj inhibicije luminiscence (priloga D5). Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 min; T = 37 °C. Rezultati so predstavljeni kot vrednosti ene ponovitve

Preglednica 16: Stopnja inhibicije luminiscence gojišča z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina po dodatku komercialno dostopnega ATP

koncentracija ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu [% w/v]	stopnja inhibicije luminiscence [%]		
	končna koncentracija ATP 0,5 μ M	končna koncentracija ATP 5 μ M	končna koncentracija ATP 50 μ M
5	94,08	94,44	84,36
0,5	45,33	46,06	10,12
brez dodatka ekstrakta rožmarina	0	0	0

4.4.3 Stabilnost ATP v ekstraktu rožmarina

Preverili smo, če ATP ob prisotnosti ekstrakta rožmarina hidrolizira, kar bi lahko pojasnilo manjšo luminiscenco pri enakem dodatku ATP in različni koncentraciji ekstrakta rožmarina. Preglednica 17 prikazuje izmerjeno luminiscenco za dva različna časa in dve koncentraciji ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) in 0,5 % (w/v).

Preglednica 17: Določanje stabilnosti ATP v ekstraktu rožmarina. Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 ali 60 minut; T = 37 °C. Rezultati so predstavljeni kot vrednost ene ponovitve

čas [min]	5	60
koncentracija ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu [% w/v]	luminiscenca (10^5) [RLU]	
0,5	213	211
5	37	39

4.4.4 Vpliv gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na transmitanco

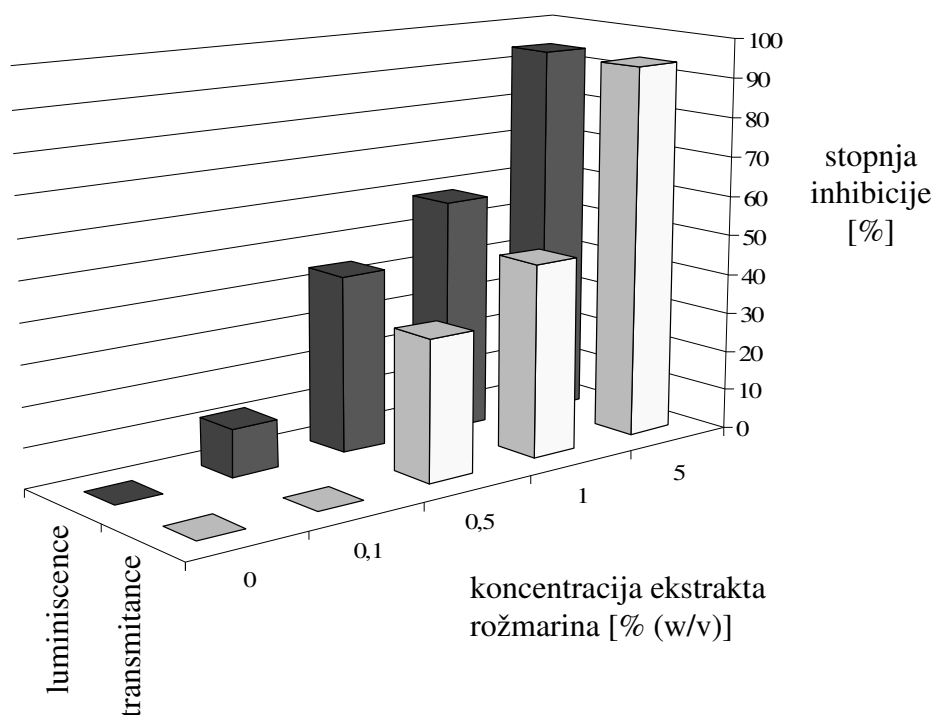
Ker se je pojavila inhibicija luminiscence pri enaki količini dodanega ATP, smo preverili kako hranljivi bujon z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina vpliva na transmitanco pri valovni dolžini 650 nm.

Postavili smo enačbo (8) za izračun stopnje inhibicije transmitance.

$$\text{Stopnja inhibicije transmitance [\%]} = 100 \% - \text{transmitanca (pri 650 nm)} \quad \dots (8)$$

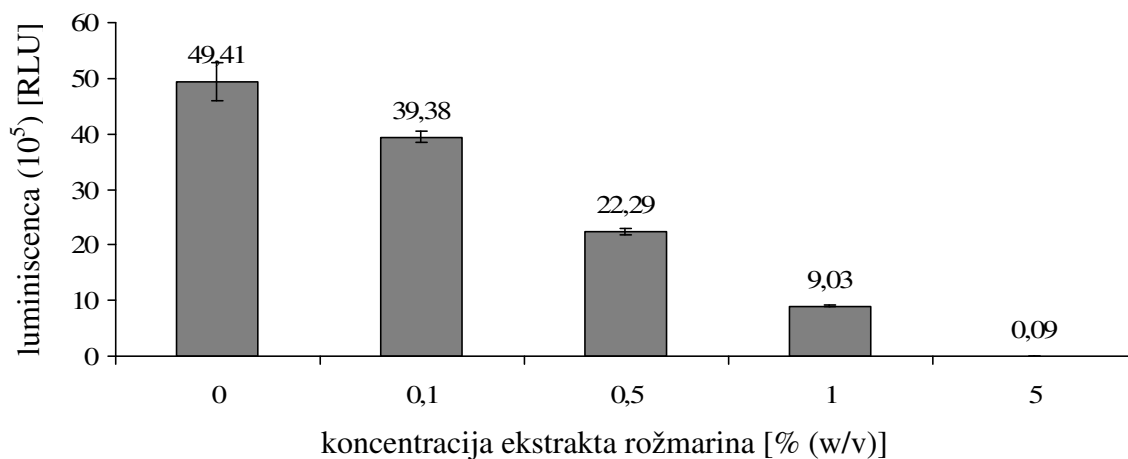
Preglednica 18: Primerjava stopnje inhibicije luminiscence in stopnje inhibicije transmitance

vzorec	stopnja inhibicije transmitance [%]	stopnja inhibicije luminiscence [%]
neg. kont.	0	0
R0,1	0	12,02
R0,5	35,3	44,41
R1	48,6	58,79
R5	93,7	94,06



Slika 18: Primerjava stopnje inhibicije luminescence in stopnje inhibicije transmittance

4.4.5 Določitev živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta BacTiter-Glo



Slika 19: Določanje vpliva inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min; koncentracija celic pred dodatkom reagenta BacTiter-Glo: 5×10^5 celic/mL. Vrednost negativne kontrole je $14,8 \times 10^5$ RLU. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

Za kompenzacijo inhibicije luminiscence smo uvedli t.i. faktor inhibicije pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina (F_i), kot ga definira enačba (9).

$$F_i = \frac{100 \%}{100 \% - \% \text{ stopnje inhibicije luminiscence (pri določeni koncentraciji ekstrakta)}} \dots (9)$$

Preglednica 19 prikazuje izračunane vrednosti faktorjev inhibicij pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu.

Preglednica 19: Pregled faktorjev inhibicij pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina

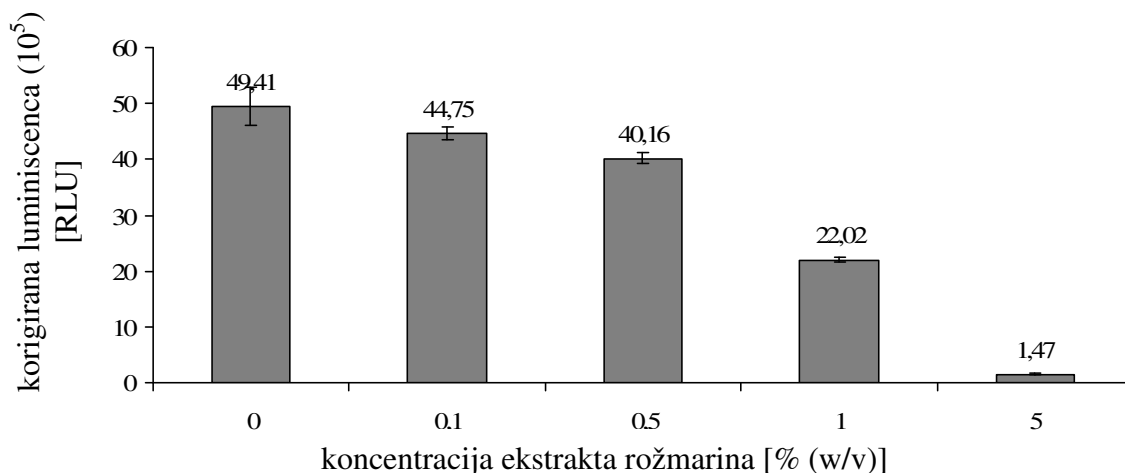
koncentracija ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu [% w/v]	stopnja inhibicije luminiscence [%]	faktor inhibicije (F_i)
5	94	16,67
1	59	2,44
0,5	45	1,80
0,1	12	1,14

S pomočjo faktorja inhibicije (F_i) smo nato izračunali t.i. korigirano luminiscenco po enačbi (10).

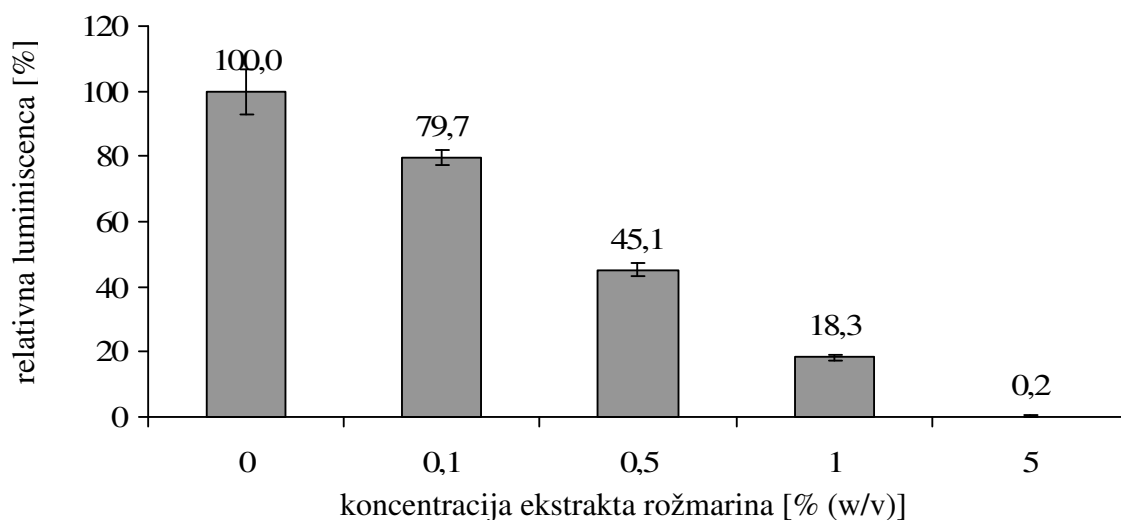
$$\text{korigirana luminiscenca [RLU]} = A \times B \dots (10)$$

A = luminiscenca pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina

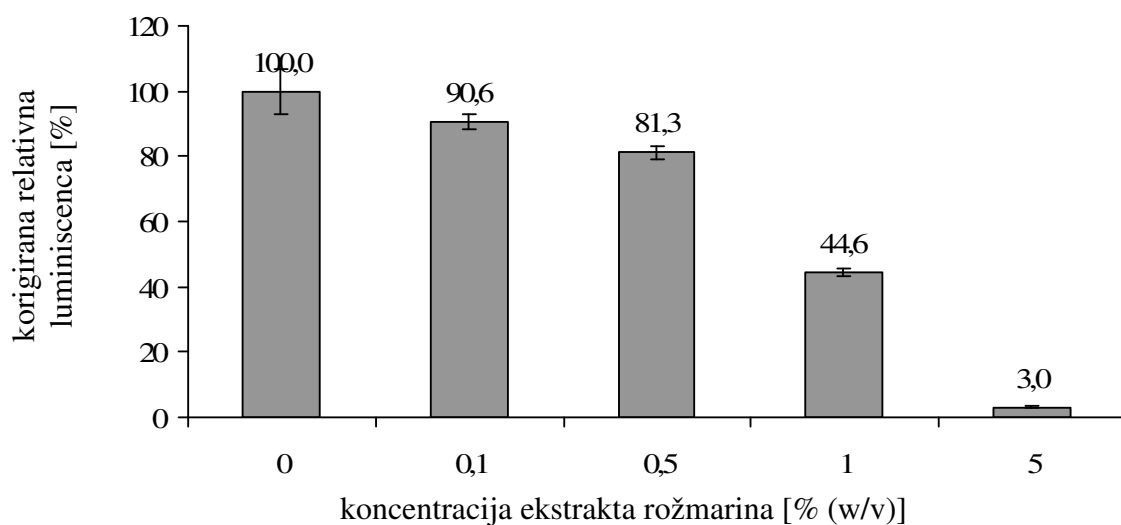
B = faktor inhibicije pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina



Slika 20: Določanje vpliva inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco; rezultati so prikazani z uporabo korekcije na stopnjo inhibicije luminiscence. Vrednost negativne kontrole je $14,8 \times 10^5$ RLU. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev



Slika 21: Relativna luminiscenca po enourni inkubaciji celic bakterije *E. coli* pri različnih koncentracijah ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev



Slika 22: Korigirana relativna luminiscenca po enourni inkubaciji celic bakterije *E. coli* pri različnih koncentracijah ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

Preglednica 20: Korigirana luminiscenca vzorcev, ki smo jih pred dodatkom v jamico na mikrotitrski ploščici filtrirali čez filter s premerom por 0,2 μm in primerjava z luminiscenco vzorcev s slike 19. Čas inkubacije celic bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina: 50 minut*; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min. Podatki za nefiltrirane vzorce so podani kot povprečne vrednosti dveh ponovitev (priloga D7), podatki za filtrirane vzorce so podani kot rezultat ene ponovitve

vzorec	korigirana luminiscenca (10^4) [RLU]	
	nefiltriran vzorec	vzorec filtriran čez filter s premerom por 0,2 μm
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane z ekstraktom rožmarina 5 % (w/v)	7,94 (100 %)	13,5 (170 %)
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane z ekstraktom rožmarina 0,5 % (w/v)	347 (100 %)	10,7 (3 %)
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane z eritromicinom s koncentracijo 512 $\mu\text{g/mL}$	78,6 (100 %)	6,93 (9 %)
negativna kontrola	572 (100 %)	9,74 (2 %)

* inkubacija 50 minut je posledica tega, ker smo morali vzorec razdeliti na dva dela, in en del filtrirati čez filter s premerom por 0,2 μm

Zaradi možnosti, da bi sam ekstrakt rožmarina lahko že vseboval določeno količino ATP, smo se odločili, da preverimo vse uporabljene koncentracije ekstrakta rožmarina na prisotnost ATP. Prisotnosti ATP v ekstraktu rožmarina nismo zaznali.

Preverili smo tudi možnost lastne luminiscence ekstrakta rožmarina v tekočem gojišču z dodatkom in brez dodatka inokuluma bakterij *E. coli*. To smo naredili tako, da smo vzorcem brez dodatka reagenta BacTiter-Glo izmerili luminiscenco. Lastne luminiscence nismo zaznali.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V skladu z delovnimi hipotezama smo skušali preveriti, ali in v kakšnih koncentracijah ekstrakt rožmarina vpliva na živost bakterije *Escherichia coli* – ŽM 370. Poskušali smo tudi postaviti hitro metodo za določanje živosti bakterije in jo primerjati s klasično metodo – z metodo določanja kultivabilnosti.

5.1 DOLOČITEV KULTIVABILNOSTI

Število živih oziroma za reprodukcijo sposobnih mikroorganizmov lahko določimo s štejetjem kolonij na trdnih gojiščih (angl. "plate count; viable count"). V teh razmerah je število viabilnih celic enako številu kolonij (aproximira (=se asimptotično približuje) številu enot, ki tvorijo kolonije; angl. "colony-forming units, CFU) (Kell in sod., 1998).

Kultivabilnost smo preverili na način, ki je opisan pod točko 3.2.5. Testirali smo naslednje koncentracije ekstrakta rožmarina: 0,1 % (w/v); 0,5 % (w/v); 1 % (w/v) in 5 % (w/v).

Po izpostavitvi bakterij ekstraktu rožmarina za eno uro smo pripravili ustrezne razredčitve in 100 μ L preiskovane raztopine prenesli na petrijevke s hranljivim agarjem. Po inkubaciji 24 ur pri 37 °C smo prešteli kolonije in določili kultivabilnost (Slika 9).

Glede na rezultate lahko trdimo, da ekstrakt rožmarina vpliva na kultivabilnost bakterije *E. coli*.

Vse koncentracije, ki smo jih preverili, upočasnijo razmnoževanje bakterije *E. coli* v primerjavi z negativno kontrolo. Koncentracija ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) pa je za bakterijo *E. coli* letalna.

Za podatek o minimalni inhibitorski koncentraciji, ki je po definiciji tista koncentracija protimikrobne snovi, ki prepreči vidno rast izbranega mikroorganizma (Delaquis in sod., 2002; Hammer in sod., 1999; Karapinar in Aktug, 1987; Onawunmi, 1989), bi potrebovali še podatek o kultivabilnosti negativne kontrole oz. inokuluma ob času nič. Tako bi lahko določili, če je v vzorcih z ekstraktom rožmarina prišlo do inhibicije rasti, upočasnitve rasti ali odmiranja. Če pa predpostavimo, da je število kultivabilnih celic enako številu celic določenemu pod hemacitometrom (t.j. 5×10^5 celic/mL), lahko trdimo, da je minimalna inhibitorska koncentracija ekstrakta rožmarina med 0,5 in 1 % (w/v), saj smo pri vzorcu s koncentracijo ekstrakta rožmarina 1 % (w/v) določili $4,53 \times 10^5$ kultivabilnih celic/mL (Priloga B1).

Za določanje protimikrobne aktivnosti velikega območja koncentracij ekstrakta ali testiranja velikega števila različnih mikroorganizmov, bi porabili veliko časa in materiala in menimo, da bodo to metodo hitro izpodrinile hitre metode, ki omogočajo lažje določanje protimikrobne aktivnosti. Še vedno pa je metoda nepogrešljiva pri določanju minimalne mikrobicidne koncentracije (Onawunmi, 1989).

5.2 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA CellTiter-Blue

5.2.1 Določitev optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina

Pred merjenjem smo morali določiti optimalno koncentracijo celic za redukcijo resazurina, ki je glavna komponenta reagenta CellTiter-Blue. Glede na protokol (CellTiter-Blue Cell Viability Assay, 2002) je pomembno, da izberemo pravilno koncentracijo celic za redukcijo resazurina. Če je koncentracija celic prevelika in/ali so celice zelo metabolno aktivne, se resazurin zelo hitro pretvori do resorufina in naprej do dihidroresorufina, kar lahko vidimo kot prehod iz modre (resazurin) v rožnato (resorufin) in nazadnje v brezbarvno (dihidroresorufin) raztopino. Da ne bi prišlo do prehajanja resorufina v dihidroresorufin, proizvajalec priporoča takšno koncentracijo celic, pri kateri ob času meritve še ne pride do redukcije resorufina v dihidroresorufin.

Za ugotovitev ustrezne koncentracije celic smo pripravili suspenzije celic bakterije *E. coli* s koncentracijami celic $7,8 \times 10^8$ celic/mL; 1×10^8 celic/mL; 1×10^7 celic/mL; 1×10^6 celic/mL in 1×10^5 celic/mL. Vzorce smo obravnavali na enak način kot kasneje pri merjenju vpliva ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli* (točka 3.2.6), izmerili fluorescenčno intenziteto ter iz podatkov izrisali graf (Slika 10). Tukaj je potrebno omeniti, da smo storili napako, ker smo pri pripravi inokuluma uporabili nefiltriran supernatant. Razliko pri fluorescenčni intenziteti lahko vidimo, če primerjamo sliki 10 in 12. V nefiltriranem supernatantu je namreč še precej celic. Ta napaka se je zgodila le pri prvi pripravi inokuluma za določitev optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina. Za vse naslednje poskuse smo uporabili koncentracijo celic 1×10^6 celic/mL oz. po dodatku ekstrakta rožmarina/raztopine antibiotika/hranljivega bujona je bila koncentracija celic vedno 5×10^5 celic/mL.

Za določitev vpliva ekstrakta rožmarina na inokulum bakterij bi fluorescenčno intenziteto vzorca morali izmeriti po določenem času ("end point" meritev) in jo primerjati z negativno in s pozitivno kontrolo. Po številnih poskusih smo spoznali, da je fluorescenčno intenziteto po dodatku reagenta najbolje spremljati ves čas, saj bi enkratna meritev fluorescenčne intenzitete lahko privedla do napačnih sklepov.

Kot se je še izkazalo, bakterija *E. coli* ni sposobna nadaljnje redukcije rožnatega resorufina v brezbarvni dihidroresorufin, kot je to sposobna kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* (Goranovič, 2005). Po pregledu literature smo ugotovili, da tudi bakterija *Salmonella typhimurium* ni sposobna takšne redukcije resorufina (Shiloh in sod., 1997).

5.2.2 Preizkus metode z antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin

Za preizkus metode smo preverili, kako se metoda obnese pri antibiotikih ciprofloksacin in eritromicin. Preverili smo koncentracije antibiotikov $51,2 \mu\text{g/mL}$; $102,4 \mu\text{g/mL}$ in $512 \mu\text{g/mL}$ pri koncentraciji celic 5×10^5 celic/mL (točka 3.2.6).

Fluorescenčno intenziteto smo spremljali več časa, za oceno primernosti metode pa smo primerjali rezultate merjenja fluorescenc po 45 minutah inkubacije vzorca z reagentom CellTiter-Blue (Slika 11).

Antibiotik ciprofloksacin se že pri koncentraciji 51,2 µg/mL izkaže kot zelo učinkovit pri preprečevanju redukcije resazurina v resorufin, saj je fluorescenčna intenziteta manj kot 5000 RFU. Če primerjamo fluorescenčno intenziteto negativne kontrole in fluorescenčno intenziteto vzorca s koncentracijo ciprofloksacina 51,2 µg/mL, ugotovimo, da predstavlja slednja dobrih 10 % fluorescenčne intenzitete negativne kontrole. Vzorec s koncentracijo ciprofloksacina 512 µg/mL predstavlja 2 % fluorescenčne intenzitete negativne kontrole. Antibiotik eritromicin kaže slabše delovanje in je pri največji koncentraciji (512 µg/mL) antibiotika primerljiv z najmanjšo koncentracijo (51,2 µg/mL) ciprofloksacina, kar ustreza 10 % fluorescenčne intenzitete negativne kontrole.

Razliko je mogoče pojasniti z različnima načinoma delovanja antibiotikov.

Ciprofloksacin spada v skupino fluorokinolonskih antibiotikov s širokim spektrom delovanja. Ciprofloksacin inhibira encim DNK girazo in deluje batericidno tako v eksponentni kot v stacionarni fazi rasti (CIPRO® package insert, 2006).

Eritromicin spada v skupino makrolidnih antibiotikov. Z vezavo na 50S podenoto bakterijskega ribosoma vpliva na sintezo proteinov. Odvisno od koncentracije deluje bakteristatično ali batericidno (ERYC® package insert, 2006).

Za vse nadaljnje poskuse, ki smo jih opravili z reagentom CellTiter-Blue, smo kot pozitivno kontrolo izbrali raztopino antibiotika ciprofloksacin s koncentracijo 512 µg/mL. Ustreznost izbire smo potrdili tudi z vizualno kontrolo (Preglednica 14), saj je pozitivna kontrola ostala modre barve (nereduciran resazurin) tudi po inkubaciji vzorca čez noč.

5.2.3 Določitev živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta CellTiter-Blue

Burt in Reinders (2003) ter Mann in Markham (1998) so s pomočjo resazurina preverili, kako eterična olja začimb vplivajo na bakterijo *E. coli*. Redukcijo resazurina v resorufin so spremljali vizualno. Metodo so uspešno in brez težav uporabili za testiranje protimikrobne aktivnosti in za določanje minimalne inhibitorne koncentracije eteričnih olj čajevca (*Melaleuca alternifolia*), timijana (*Thymus vulgaris*), origana (*Origanum vulgare*) in drugih eteričnih olj.

Salvat in sod. (2001), ki so s podobno metodo preverili protimikrobno delovanje metanolnih ekstraktov velikega števila rastlin iz severne Argentine, pa poročajo o težavah glede vizualizacije resorufina pri zelo obarvanih ekstraktih.

Preverili smo, kako se opisana metoda izkaže, če namesto antibiotika uporabimo ekstrakt rožmarina. Preverili smo koncentracije ekstrakta rožmarina 10 % (w/v), 5 % (w/v) in 1 % (w/v). Po merjenju fluorescenčne intenzitete in sprotne pregledu rezultatov (Slika 12) smo se odločili, da izmerimo fluorescenčno intenziteto po hranjenju mikrotitrne ploščice čez noč (15 ur) (Slika 13). Potem ko smo drugi dan dvakrat izmerili fluorescenčno intenziteto, smo vzorce prenesli na stekleno petrijevko na beli podlagi in jih še vizualno ocenili (Preglednica 14).

Pri negativni kontroli se je graf fluorescenčne intenzitete obnašal po pričakovanjih. Vizualna analiza vzorca naslednji dan je pokazala prisotnost resorufina (rožnata barva). V tem času torej ni prišlo do opazne redukcije resorufina v dihidroresorufin.

Pri pozitivni kontroli je bila fluorescenčna intenziteta ostala enaka ves čas analize in tudi vizualna analiza ni pokazala, da bi se resazurin reduciral tudi po 15 urah inkubacije bakterij *E. coli* z antibiotikom (modra barva). Celice torej niso bile metabolno aktivne oz. žive.

Pri vzorcu, kjer smo preverili vpliv ekstrakta rožmarina s koncentracijo 1 % (w/v) na bakterijo *E. coli*, je opazen zamik v ukrivljenosti krivulje, ki opisuje odvisnost intenzivnosti fluorescence od časa, kakor tudi manjša končna intenziteta fluorescence (Slika 13). Shiloh in sod. (1997) poročajo, da zamik pri večanju fluorescence pomeni manjše število metabolno aktivnih celic. Nepričakovano se je pojavila manjša končna fluorescenčna intenziteta, ki je bila po 240 minutah inkubacije z resazurinom le 23 % fluorescenčne intenzitete negativne kontrole. Po 900 minutah (torej naslednji dan) pa je bila ta vrednost 28 % fluorescenčne intenzitete negativne kontrole.

Vzroke za zmanjšano končno fluorescenčno intenziteto (pri vzorcu s koncentracijo ekstrakta rožmarina 1 % (w/v)) pri določanju živosti z reagentom CellTiter-Blue lahko pojasnimo, kot sledi:

- fluorescenčna intenziteta je manjša zaradi kombiniranega učinka manjšega vzbujanja resorufina in nato tudi zmanjšane intenzivnosti fluorescence (zaradi manjše transmitance v vzorcu z ekstraktom rožmarina, točka 4.4.3);
- predhodni poskusi z drugimi rastlinskimi ekstrakti ter z askorbinsko kislino so pokazali, da je resazurin zelo nestabilen in se ne glede na prisotnost celic reducira do resorufina oz. dihidroresorufina (Priloga C4). Torej ne moremo izključiti možnosti, da se je pri vzorcu s koncentracijo ekstrakta rožmarina 1 % (w/v) del resazurina reduciral do dihidroresorufina, drugi del resazurina pa je bil na voljo celicam, da so ga delno reducirale do resazurina.

Pri vzorcih, kjer smo preverjali vpliv ekstrakta rožmarina na bakterije *E. coli* s koncentracijo 10 % (w/v) in 5 % (w/v), nismo določili povečane fluorescenčne intenzitete v celotnem času trajanja analize. Pri vizualni analizi se ni dalo natančno določiti modre ali rožnate barve (negativen ali pozitiven rezultat). Tako brez podatka o kultivabilnosti celic pri koncentraciji ekstrakta 5 % (w/v), ne bi mogli z gotovostjo trditi, da je nespreminjanje fluorescence posledica dejstva, da vzorec ne vsebuje metabolno aktivnih celic.

Da je metoda uporabna za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov, so dokazali že številni avtorji (Burt in Reinders, 2003; Gill in sod., 2002; Mann in Markham, 1998; Salvat in sod., 2001). Pri naših poskusih se je pokazalo, da pride do interakcij med ekstraktom rožmarina in reagentom. Tako pri koncentracijah ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) in 10 % (w/v) brez podatka o kultivabilnosti, ne moremo potrditi pozitivnega rezultata. Menimo, da je uporaba te metode lahko problematična, če ne poznamo interakcij med reagentom in rastlinskim ekstraktom.

5.3 DOLOČITEV ŽIVOSTI S POMOČJO REAGENTA BacTiter-Glo

Zaradi težav, na katere smo naleteli pri določanju živosti bakterij *E. coli* z reagentom CellTiter-Blue po izpostavitvi ekstraktu rožmarina, smo se odločili, da preizkusimo drugo hitro metodo, ki temelji na merjenju luminiscence (točka 3.2.7).

5.3.1 Preizkus metode z antibiotikom eritromicin

Metodo smo preizkusili tako, da smo preverili kako se metoda obnese pri antibiotiku eritromicin. Preverili smo koncentracije antibiotika 51,2 µg/mL; 102,4 µg/mL in 512 µg/mL pri koncentraciji celic 5×10^5 celic/mL (točka 3.2.6).

Po enourni inkubaciji bakterij *E. coli* z raztopino eritromicina s koncentracijo 512 µg/mL in izpostavitvi reagentu BacTiter-Glo za 5 minut smo izmerili luminiscenco (Slika 14).

Luminiscenca izmerjena pri vzorcu s koncentracijo eritromicina 512 µg/mL je znašala 16 % vrednosti luminiscence izmerjene pri negativni kontroli, kar kaže na prisotnost ATP. Nadaljnji poskusi so pokazali, da je le slabih 10 % luminiscence pozitivne kontrole posledica ATP sproščenega iz celic v gojišče (Preglednica 20).

Za vse nadaljnje poskuse, ki smo jih opravili z reagentom BacTiter-Blue, smo kot pozitivno kontrolo izbrali raztopino antibiotika eritromicin s koncentracijo 512 µg/mL.

5.3.2 Vpliv gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco

Zaradi težav, na katere smo naleteli pri rastlinskih ekstraktih pri določanju njihovega vpliva na bakterije *E. coli* z reagentom CellTiter-Blue, smo se odločili da preverimo kako na luminiscenco vpliva ekstrakt rožmarina v hranljivem bujonu (točka 4.4.2).

Po pripravi ekstrakta ATP (točka 3.3.4.5), ki smo ga v enaki količini dodali vsem vzorcem, smo po dodatku reagenta izmerili luminiscenco (Slika 15). Rezultati kažejo, da pride do inhibicije luminiscence, čeprav bi glede na to, da smo dodali enako količino ATP, morali pri vseh vzorcih dobiti enako intenziteto luminiscence.

Predvideli smo dva možna vzroka za inhibicijo luminiscence.

Najprej smo preverili ali ekstrakt rožmarina povzroči hidrolizo ATP in ali je to vzrok za znižano luminiscenco pri večji koncentraciji ekstrakta rožmarina. Rezultati kažejo, da je ATP stabilen v hranljivem bujonu z dodatkom ekstrakta rožmarina (Preglednica 17).

Naslednja možnost, ki bi lahko botrovala inhibiciji luminiscence, je zmanjšana prepustnost vzorca za svetlobo. Preverili smo transmitanco vzorca s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 650 nm. Rezultati kažejo, da se stopnja inhibicije transmittance dobro ujema s stopnjo inhibicije luminiscence (Preglednica 18 in Slika 18). Razlika v stopnji inhibicije luminiscence in transmittance bi lahko bila posledica tega, da smo pri transmittanci uporabili točno določeno valovno dolžino (650 nm), ne poznamo pa razpona valovnih dolžin, pri katerih se meri luminiscenca.

Da bi pri nadaljnjih poskusih (točka 5.3.3) prišli do realnih podatkov, smo poskušali uvesti korekcijske faktorje, ki bi nam pomagali premostiti problem inhibicije luminiscence.

Različno intenziteto luminiscence smo prvič opazili, ko smo gojiščem z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina dodali enako količino ekstrahiranega ATP (Slika 15). Tem podatkom (vrednosti luminiscence) smo s pomočjo enačbe (7) določili stopnjo inhibicije luminiscence (Preglednica 15 in Slika 16).

Ko smo dobili čisti ATP (Sigma), smo poskus ponovili in ponovno določili stopnje inhibicije luminiscence pri raztopinah ATP (koncentracije: 50 μM , 5 μM in 0,5 μM) v hranljivem bujonu z dodatkom ali brez dodatka ekstrakta rožmarina (Preglednica 16). Iz dobljenih podatkov smo določili tudi umeritveno krivuljo in določili koncentracijo ATP v raztopini, ki smo jo uporabili za določitev vpliva gojišča z dodatkom in brez dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco (Priloga D5). Iz vseh podatkov smo izrisali graf, ki prikazuje stopnjo inhibicije luminiscence v odvisnosti od koncentracije ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu in od koncentracije ATP v hranljivem bujonu (Slika 17).

Podatke o stopnjah inhibicije luminiscence smo uporabili za korekcijo luminiscence, ki smo jo izmerili pri določanju živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta BacTiter-Glo (točka 5.3.3).

5.3.3 Določitev živosti bakterij *E. coli* po inkubaciji z ekstraktom rožmarina s pomočjo reagenta BacTiter-Glo

Določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov s pomočjo luminiscence je manj razširjeno.

V priročniku za reagent BacTiter-Glo je opisano, da so reagent uspešno uporabili za določitev protimikrobnih spojin iz zbirke 80 različnih farmakološko aktivnih spojin (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, 2006).

Shawar in sod. (1997) so uporabili zelo zanimiv način merjenja luminiscence za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov. Gene za luciferazo so klonirali v *Mycobacterium bovis* in *Mycobacterium intracellulare*. Po določenem času inkubacije bakterij z rastlinskimi ekstrakti, so dodali luciferin in izmerili luminiscenco. Poročajo, da ima metoda velik potencial za testiranje rastlinskih ekstraktov *in vitro*.

Vesterlund in sod. (2004) pa so v indikatorske organizme klonirali vse potrebne gene za nastanek luminiscence in prav tako uspešno uporabili transformirane mikroorganizme za določane protimikrobne aktivnosti.

Preverili smo delovanje metode (točka 3.2.7), tako da smo inkubirali bakterije *E. coli* s koncentracijo celic 5×10^5 celic/mL z ekstraktom rožmarina v koncentracijah 5 % (w/v); 1 % (w/v); 0,5 % (w/v) in 0,1 % (w/v) eno uro.

Z merjenjem luminiscence smo dobili rezultate (Slika 19), ki bi jih brez predhodnega znanja o vplivu ekstrakta na luminiscenco lahko napačno interpretirali (primerjava slike 15

in slike 19). Predstavitev relativnih vrednosti luminiscence z uporabo nekorigiranih rezultatov je prikazana na sliki 21.

Da bi dobili bolj realne podatke o vrednostih luminiscence zaradi inhibicije luminiscence z ekstraktom rožmarina, smo se odločili za korekcijo. Uvedli smo faktor inhibicije pri določeni koncentraciji ekstrakta, ki je odvisen od stopnje inhibicije luminiscence pri določeni koncentraciji ekstrakta.

Najprej smo določili vrednost stopnje inhibicije luminiscence pri vsaki koncentraciji ekstrakta rožmarina. To smo naredili tako, da smo upoštevali povprečje stopenj inhibicij luminiscence pri koncentracijah ATP 0,5 μM , 3,81 μM in 5 μM . Zaradi velikega odstopanja stopenj inhibicij luminiscence pri koncentraciji ATP 50 μM teh vrednosti nismo upoštevali (to lahko naredimo, saj je koncentracija ATP v negativni kontroli manjša od 5 μM (Priloga D4)). Podatki za stopnje inhibicije luminiscence pri določeni koncentraciji ekstrakta so prikazani v preglednici 19. Iz podatkov o stopnjah inhibicij luminiscence pri določenih koncentracijah ekstrakta smo s pomočjo enačbe (9) izračunali faktor inhibicije pri določeni koncentraciji ekstrakta (F_i). Faktor inhibicije omogoča izenačitev vpliva inhibicije luminiscence, zaradi ekstrakta rožmarina. Če s pomočjo faktorja inhibicije (F_i) transformiramo vrednosti luminiscence na sliki 15, dobimo drugačno sliko (Priloga D3) in ugotovimo, da smo uspešno izničili vpliv inhibicije luminiscence zaradi ekstrakta rožmarina. Po pomnožitvi vrednosti luminiscence smo tako dobili novo, korigirano vrednost luminiscence.

Faktor inhibicije smo uporabili na podatkih, ki smo jih dobili pri merjenju luminiscence pri določanju živosti bakterij *E. coli* inkubiranih z ekstraktom rožmarina. Tako smo dobili bolj realne vrednosti luminiscence pri vplivu ekstrakta rožmarina na bakterijo *E. coli* (Slika 20). Predstavitev relativnih vrednosti z uporabo korigiranih rezultatov je prikazana na sliki 22.

Če primerjamo izvirne relativne rezultate (Slika 21) in korigirane relativne rezultate (Slika 22), ki smo jih dobili pri merjenju luminiscence, lahko ugotovimo, da so korigirane vrednosti veliko večje od nekorigiranih. Primerjava teh podatkov s kultivabilnostjo pokaže, da ne moremo dobro primerjati vseh rezultatov (Priloga D8).

Dobro bi bilo preveriti, kako bi se metoda in primerjava s kultivabilnostjo obnesla, če bi čas inkubacije podaljšali (na primer za 24 ur), saj smo pri vzorcu s koncentracijo ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) določili 3 % korigirane luminiscence negativne kontrole, nismo pa določili nobene kultivabilne celice. Iz tega bi za lahko sklepali naslednje:

- celice so še metabolno aktivne, a nesposobne razmnoževanja (VBNC);
- celice so ob času merjenja luminiscence še žive, a zaradi daljšega kontakta z ekstraktom rožmarina na površini hranljivega agarja odmrejo (to bi bilo mogoče preveriti s filtriranjem vzorca, spiranjem s fiziološko raztopino ter prenosom filtra na hranljivi agar);
- celice niso več žive in v vzorcu je preostanek nehidroliziranega ATP.

Preverili smo tudi, koliko ATP preide iz celic v gojišče. To smo izvedli tako, da smo vzorce razdelili na dva dela in enemu delu odstranili celice s filtracijo čez filter s premerom por 0,2 μm . Obema vzorcema smo dodali reagent BacTiter-Glo in izmerili luminiscenco. Rezultate smo korigirali s pomočjo faktorja inhibicije in tako dobili korigirano vrednost luminiscence. Rezultati so predstavljeni v preglednici 20 (nekorigirani podatki so v prilogi D7). Rezultati kažejo, da v gojišče preide velika količina ATP pri vzorcu s koncentracijo ekstrakta rožmarina 5 % (w/v). Luminiscenca je celo večja kot pri nefiltriranem vzorcu (za 70 %), kar bi lahko pojasnili s časovnim zamikom med filtracijo vzorca in merjenjem luminiscence obeh delov vzorca.

Metoda z uporabo reagenta BacTiter-Glo, ki smo jo uporabili za določanje živosti bakterij *E. coli*, se je izkazala kot zelo dobra za določanje inhibitornega vpliva ekstrakta rožmarina. V primerjavi z določanjem kultivabilnosti, imamo s to metodo veliko manj dela in lahko v zelo kratkem času preverimo zelo širok razpon koncentracij in/ali veliko število različnih mikroorganizmov. Avtomatizirano odčitavanje rezultatov na čitalcu mikrotitrskih ploščic pa to metodo vsekakor uvršča v "high throuput" kategorijo analiz.

Problem metode oz. reagenta BacTiter-Glo pa je, da lahko ekstrakti, ki sami po sebi inhibirajo luminiscenco (kot je to v našem primeru), dajo rezultate, ki potencialno privedejo do napačnih sklepov. Tako bi pri uporabi metode na ekstraktu, ki inhibira luminiscenco, ne vpliva pa na živost izbranega mikroorganizma, lahko napačno sklepali na inhibitorno delovanje ekstrakta na mikroorganizem. V diplomskem delu smo pokazali, kako lahko z uporabo faktorja inhibicije (F_i) kompenziramo zmanjšano luminiscenco in dobimo bolj točne oz. bolj realne podatke.

5.4 SKLEPI

- Ekstrakt rožmarina vpliva na živost bakterij *Escherichia coli*. Koncentracije ekstrakta manjše od 5 % (w/v) in kontaktnim časom 1 uro upočasnijo razmnoževanje bakterij v primerjavi z negativno kontrolo. Pri koncentraciji ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) pa pri enakih pogojih nismo določili nobene kultivabilne celice.
- Metoda z uporabo reagenta CellTiter-Blue se je pri rastlinskih ekstraktih izkazala za praktično neuporabno, saj nismo mogli izničiti vpliva ekstrakta na rezazurin.
- Pri metodi, ki uporablja reagent BacTiter-Glo, smo naleteli na težave zaradi vpliva ekstrakta na luminiscenco. Vpliv ekstrakta na luminiscenco smo lahko kompenzirali z upoštevanjem faktorja inhibicije, ki smo ga določili z merjenjem luminiscence vzorcev z ekstraktom rožmarina in z dodanim ATP. Metoda ni najbolj primerna za testiranje večjega števila ekstraktov, za katere sumimo, da bi lahko vplivali na luminiscenco, lahko pa je zelo primerna, če hočemo preveriti vpliv enega ekstrakta v več različnih koncentracijah in/ali na več različnih mikroorganizmih.

6 POVZETEK

Rastline so pomemben, a na žalost še ne dobro raziskan vir protimikrobnih snovi. Uporaba rastlin, njihovih eteričnih olj ali izoliranih aktivnih snovi za kontrolo kvara živil predstavlja dobro in zaželeno alternativo kemičnim konzervansom, saj jih ima večina status GRAS. Pri hrani imajo zelišča in začimbe predvsem vlogo izboljšanja senzoričnih lastnosti, kot so okus, aroma in barva. Imajo tudi pomembne antioksidativne in druge bioaktivne lastnosti ter lahko pomembno dopolnijo prehransko vrednost živil.

Določanje protimikrobne aktivnosti je precej težavno in težave se pojavljajo že pri osnovni definiciji in uporabljenih pojmi. Večina avtorjev pa se vendarle strinja, da sta najboljši merili za določanje protimikrobne aktivnosti minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), tj. tista koncentracija snovi, ki inhibira razmnoževanje bakterij. Za določanje protimikrobne aktivnosti se uporablja več metod in vedno bolj se uveljavljajo hitre metode določanja protimikrobne aktivnosti, ki temeljijo na določanju metabolne aktivnosti mikroorganizmov. Prednost teh metod je krajši čas analiz, manjša količina dela in možnost določanja ter razlikovanja mikrobicidnih in inhibitornih koncentracij.

V nalogi smo preizkusili, ali in v kakšnih koncentracijah ekstrakt rožmarina vpliva na bakterije *Escherichia coli* – ŽM 370. Preverili smo, kako uporabni sta hitri metodi določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina za bakterije *E. coli*. Metodi smo primerjali z metodo določanja kultivabilnosti.

Kultivabilnost smo določili tako, da smo bakterije izpostavili ekstraktu rožmarina za določen čas, naredili potrebne razredčitve, jih nato prenesli na hranljivi agar in inkubirali pri 37 °C za 24 ur. Rezultati so pokazali, da ekstrakt rožmarina vpliva na bakterije *E. coli*. Pri koncentraciji ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) nismo določili nobene kultivabilne celice. Pri koncentracijah od 0,1 % (w/v) do 5 % (w/v) pa smo določili manjše število kultivabilnih celic kot v negativni kontroli, kar kaže na inhibitorno delovanje ekstrakta rožmarina. Minimalne inhibitorne oz. baktericidne koncentracije nismo določili.

Metoda z uporabo reagenta CellTiter-Blue temelji na redukciji resazurina v fluorescirajoč resorufin. Po podatkih proizvajalca reagenta je redukcija posledica metabolne aktivnosti celic. V naših poskusih smo ugotovili, da reagent ni primeren za določanje živosti bakterij, saj pride do interakcije med ekstraktom rožmarina in reagentom, ki je nismo mogli točno določiti oz. kompenzirati. Pri koncentraciji ekstrakta rožmarina 1 % (w/v) smo lahko opazili inhibitoren vpliv ekstrakta na bakterijo *E. coli*, ki se je kazal kot zamik v ukrivljenosti krivulje, ki kaže odvisnost intenzitete fluorescence od časa (fluorescenca začne kasneje naraščati).

Metoda z uporabo reagenta BacTiter-Glo temelji na encimski reakciji pretvorbe luciferina do oksiluciferina. Luminiscenca, ki je posledica reakcije, je odvisna od količine prisotnega ATP. V naših poskusih smo ugotovili, da pride do inhibicije luminiscence (verjetno zaradi zmanjšane transmitance svetlobe), a smo pokazali, kako lahko ta vpliv izničimo. Metoda je pokazala, da vse preizkušene koncentracije ekstrakta rožmarina inhibirajo rast bakterije *E. coli*. Metoda verjetno ni najbolj primerna za testiranje večjega števila ekstraktov, za katere sumimo, da bi lahko vplivali na luminiscenco, lahko pa je zelo primerna, če hočemo preveriti vpliv enega ekstrakta v več različnih koncentracijah in/ali na več različnih mikroorganizmih.

7 VIRI

- Abu-Shanab B., Adwan G., Abu-Safiya D., Jarrar N., Adwan K. 2004. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*, 28: 99-102.
- Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J.A., Roca M.J., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120, 1-2: 221-229.
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.-D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P.J. 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*, 54: 3530-3535.
- Arnold N., Valentini G., Bellomaria B., Hocine L. 1997. Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *Journal of Essential Oil Research*, 9, 2: 167-175.
- Aureli P., Costantini A., Zolea S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 55, 5: 344-348.
- BacTiter-Glo microbial cell viability assay. 2006. Madison, Promega Corporation. Technical bulletin TB 337: 17 str.
- Bassole I.H.N., Ouattara A.S., Nebie R., Ouattara C.A.T., Kabore Z.I., Traore S.A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, 62: 209-212.
- Beuchat L.R. 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food Science*, 41: 899-902.
- Boutekdjiret C., Belabbes R., Bentahar F., Bessiere J. M. 1999. Study of *R. officinalis* L. essential oil yield and composition as a function of the plant life cycle. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 2: 238-240.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 3: 223-253.
- Burt S.A., Reinders R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 3: 162-167.
- Canillac 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.

Carson C.F., Cookson B.D., Farrelly H.D., Riley T.V. 1995a. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 421–424.

Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. 1995b. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82: 181–185.

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, 3: 197-204.

Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T., Baser K.H.C. 2005. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 2: 553-559.

CellTiter-Blue cell viability assay. 2002. Madison, Promega Corporation. Technical bulletin TB 317: 12 str.

Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K., Boucetta S., Busta F.F. 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, 14: 161–174.

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213–220.

CIPRO® package insert. 2006. Leverkusen, Bayer Pharma (junij 2006)
[http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20C\)/CIPRO.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20C)/CIPRO.html) (junij 2006): 1 str.

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.

Cressy H.K., Jerrett A.R., Osborne C.M., Bremer P.J. 2003. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of Food Protection*, 66, 3: 390–395.

Deans S.G., Ritchie G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 165–180.

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

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.

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.

Dulger B., Gonuz A. 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3, 1: 104-107.

Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., Mount J.R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 7: 1019–1024.

ERYC® package insert. 2006. New York, Pfizer (junij 2006)
[http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20E\)/ERYC.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20E)/ERYC.html) (junij 2006): 1 str.

Essawi T., Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 3: 343-349.

Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. 2002. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 35–40.

Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52, 9: 665–667.

Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J.A., Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 3: 371-380.

Firouzi R., Azadbakht M., Nabinedjad A. 1998. Anti-listerial activity of essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research*, 14: 75–80.

Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 10: 1545–1560.

Gill A.O., Delaquis P., Russo P., Holley R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 83–92.

Goranovič D. 2005. Vpliv matičnega mlečka na vitalnost kvasovke. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.

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 Oil Research*, 13, 4: 231–233.

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 6: 985-990.

Hemacytometer: Bürker-Türk. 2006. Tokyo, The University of Tokyo, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology. http://biochem2.umin.jp/contents/Manuals/manual95/B_Turk_P.jpg (15. jun. 2006): 1 str.

Ibañez 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.

Ibañez E., Kubátová A., Señoráns 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, 2: 375 -382.

Ismail A.A., Pierson M.D. 1990. Effect of sodium nitrite and oregano oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection*, 53, 11: 958–960.

Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626–631.

Kabara J.J. 1991. Phenols and chelators. V: Food preservatives. Russell N.J., Gould G.W. (eds.). Glasgow & London, Blackie: 200–214.

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

Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 169-187.

Kim J., Marshall M.R., Wei C.-I. 1995a. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839–2845.

Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston J.F., Wei C.I. 1995b. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* on culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 60, 6: 1364–1374.

Koidis P., Iossifidou E., Abraham A., Ambrosiadis I. 2000. The effectiveness of different spices as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in nutrient broth stored at 4 °C or 12 °C. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51, 6: 129–152.

Košmelj K. 2001. *Uporabna statistika*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Kuda T., Yano T. 2003. Colorimetric almarBlue assay as a bacterial concentration and spoilage index of marine foods. *Food Control*, 14: 455-461.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.-J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453–462.

Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 17: 6939-6946.

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, 11: 708-716.

Mann C.M., Markham J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 4: 538-544.

Marino M., Bersani C., Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*, 62, 9: 1017–1023.

Marino M., Bersani C., Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 187–195.

Mejlholm O., Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 27–31.

Moleyar V., Narasimham P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16: 337–342.

Moreira M. R., Ponce A. G., del Valle C. E., Roura S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie - Food Science and Technology*, 38, 5: 565-570.

Moretti M.D.L., Peana A.T., Passino G.S., Solinas V. 1998. Effect of soil properties on yield and composition of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 3: 261-267.

Mouchid K., Bourjilat F., Dersi N., Aboussaouira T., Rachidai A., Tantaoui-Elaraki A., Alaoui-Ismaili M. 2005. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus*. *African Journal of Biotechnology*, 4, 10: 1175-1176.

Mourey A., Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oil components of conifers. *Food Control*, 13: 289-292.

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

Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 4: 247-256.

Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jagan Rao Mohan L., Sakariah K.K. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4297-4300.

Onawunmi G.O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9: 105-108.

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

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

Packiyasothy E.V., Kyle S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*, 54, 9: 384-387.

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

Paster N., Juven B.J., Shaaya E., Menasherov M., Nitzan R., Weisslowicz H., Ravid U. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 33-37.

Periago P.M., Moezelaar R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 68: 141-148.

Perrut M., Clavier J.Y. 2003. Supercritical fluid formulation: process choice and scale-up. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42, 25: 6375-6383.

Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.

Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Rosemary. 2006. Fulton, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service. (May 2006)
<http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html> (1.5.2006): 9 str.

Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 1: 15-19.

Pol I.E., Smid E.J. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 166–170.

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.

Prudent D., Perineau F., Bessiere J.M., Michel G.M., Baccou J.C. 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) - evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7: 165–173.

Rac M., Ostrič-Matijašević B. 1955. Les proprietes antioxygenes du romarin. *Revue Francaise des Corps Gras*, 2: 796-803.

Ramírez P., García-Risco M.R., Santoyo S., Señoráns F.J., Ibáñez E., Reglero G. 2006. Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, on-line junij 2006.

Renzini G., Scazzocchio F., Lu M., Mazzanti G., Salvatore G. 1999. Antibacterial and cytotoxic activity of *Hyssopus officinalis* L. oils. *Journal of Essential Oil Research*, 11: 649–654.

Richheimer S.L., Bernart M.W., King G.A., Kent M.C., Bailey D.T. 1996. Antioxidant activity of lipid soluble diterpenes from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, 4: 507-514.

Riss T., Moravec R. 2003. Introducing the CellTiter-Blue cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13.

Ruberto G., Baratta M.T., Deans S.G., Dorman H.J.D. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica*, 66: 687–693.

Salvat A., Antonnacci L., Fortunato R.H., Suarez E.Y., Godoy H.M. 2001. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 5: 293-297.

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

Sasikumar B. 2001. Rosemary. V: Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243–255.

Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 4: 279-285.

Senatore F., Napolitano F., Ozcan M. 2000. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (*Apiaceae*) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15: 186–189.

Shawar R.M., Humble D.J., Van Daltsen J.M., Stover C.K., Hickey M.J., Steele S., Mitscher L.A., Baker W. 1997. Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 3: 570-574.

Shelef L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6: 29–44.

Shelef L.A., Jyothi E.K., Bulgarelli M.A. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science*, 49, 737–740: 809.

Shiloh M.U., Ruan J., Nathan C. 1997. Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with fluorescence-based microplate assay. *Infection and Immunity*, 65, 8: 3193-3198.

Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2384–2388.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1202–1205.

Skandamis P.N., Nychas G.-J.E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1646–1653.

Skandamis P.N., Nychas G.-J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1011–1022.

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.

Stanley P.E., Marlene A.D. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in Enzymology*, 133: 14–22.

Stecchini M.L., Sarais I., Giavedoni P. 1993. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*, 56, 5: 406–409.

Tassou C., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 593–600.

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

Tassou C.C., Nychas G.-J. E., Skandamis P.N. 2001. Herbs and spices and antimicrobials. V:Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 22–41.

Ting W.T.E., Deibel K.E. 1991. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. *Journal of Food Safety*, 12: 129–137.

Ultee A., Smid E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 373–378.

Ultee A., Gorris L.G., Smid E.J. 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 211–218.

Vesterlund S., Paltta J., Lauková A., Karp M., Ouwenhand A.C. 2004. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *Journal of Microbiological Methods*, 57: 23–31.

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.

Wilkinson J.M., Hipwell M., Ryan T., Cavanagh H.M.A. 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 76–81.

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.

ZAHVALA

Somentorici dr. Poloni Jamnik za odlično sodelovanje pri projektu "Mirjanovo diplomsko delo". Hvala za vse.

Mentorju prof. dr. Petru Rasporju za hiter pregled diplomskega dela in visoke standarde tekom študija.

Doc. dr. Milici Kač se zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge. Bog z Vami!

Sestri Maji, ki si je vselej vzela čas za strokoven in temeljit pregled mojih besedil. Vielen Dank!

Sošolcem in Katji. Brez vas študij ne bi bil enak.

Dragici Markovič, ker si je vedno vzela čas za pomoč pri administrativnih zadevah.

Vsem sodelavcem Katedre za biotehnologijo, še posebej Mateju Šerganu za pomoč.

Ivici Hočevar se zahvaljujem za pregled in urejanje literaturnih virov.

Mami Nadi in babici Aranki za vzpodbudo čez vsa študijska leta in očetu Tonetu za vedno zanimive modre misli.

Teti Idi in razširjeni družini za prijetne konce tednov v deževni Ljubljani.

PRILOGE

Priloga A1: Povprečna vrednost OD₆₅₀ v odvisnosti od časa med kultivacijo bakterij *E. coli*. Začetna optična gostota: 0,1 za 150 mL hranljivega bujona. Delovni pogoji: T = 37 °C in 250 obr./min

čas [min]	povprečna vrednost	SD	KV [%]
0	0,1097	0,0066	3,00
30	0,1527	0,0462	15,12
60	0,2925	0,1025	17,53
90	0,6120	0,2008	16,41
120	0,9275	0,1450	7,81
150	1,1425	0,1138	4,98
180	1,3085	0,1039	3,97
210	1,4265	0,0658	2,31
240	1,5023	0,0456	1,52
270	1,5767	0,0236	0,75
300	1,6130	0,0141	0,44
330	1,6475	0,0035	0,11
360	1,6685	0,0035	0,11

Priloga B1: Določanje kultivabilnosti po enourni inkubaciji bakterij *E. coli* z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina v hranljivem bujonu (T = 37 °C). Začetna koncentracija celic: 5×10^5 celic/mL

koncentracija ekstrakta rožmarina [% w/v]	povprečno število kultivabilnih celic (10^5) [cfu/mL]	SD (10^4)	KV [%]	kultivabilnost [%]
0	16,7	1,97	11,79	100,0
0,1	14,9	14,1	9,45	88,8
0,5	9,80	18,0	18,37	58,6
1	4,53	12,3	27,23	27,1
5	0	0	/	0

Priloga C1: Določanje optimalne koncentracije celic za redukcijo resazurina

povprečna vrednost fluorescence [RFU]					
čas [min]	koncentracija celic [celic/mL]				
	$7,84 \times 10^8$	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
15	41305	23897	18394	15010	13338
30	46309	33974	27223,5	23364	21017
45	46159,5	43609	35954,5	31745	29418,5
60	46043,5	48169	44602,5	39973,5	37743,5
75	46342	48289	48300,5	46565	45003,5
90	46227	47885	48046	47576	47849
105	46239	47963	48080,5	47505,5	47782
120	46493,5	48535	48561	48019,5	48297
135	46653,5	48728	48620,5	48116,5	48426
150	46607	49082	48931,5	48286	48552
165	46454	48869	48840	48195	48408,5

SD					
čas [min]	koncentracija celic [celic/mL]				
	$7,84 \times 10^8$	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
15	2238,7	0	661,8519	1431,184	1132,785
30	1376,03	0	758,7256	1829,992	1016,82
45	1255,115	0	583,3631	1646,145	1021,769
60	1269,257	0	286,3782	1324,411	717,7134
75	1040,861	0	60,10408	821,6581	576,292
90	968,7363	0	110,3087	100,4092	156,9777
105	712,7636	0	37,47666	37,47666	193,7473
120	566,3925	0	309,7128	101,1163	178,1909
135	183,1407	0	368,4026	185,9691	138,5929
150	257,3869	0	297,692	209,3036	104,6518
165	196,5757	0	295,5706	197,9899	58,68986

KV [%]					
čas [min]	koncentracija celic [celic/mL]				
	$7,84 \times 10^8$	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
15	5,42	0	3,60	9,53	8,49
30	2,97	0	2,79	7,83	4,84
45	2,72	0	1,62	5,19	3,47
60	2,76	0	0,64	3,31	1,90
75	2,25	0	0,14	1,76	1,28
90	2,10	0	0,23	0,21	0,33
105	1,54	0	0,08	0,08	0,41
120	1,22	0	0,63	0,21	0,37
135	0,39	0	0,76	0,39	0,29
150	0,55	0	0,61	0,43	0,22
165	0,42	0	0,61	0,41	0,12

Priloga C2: Določanje vpliva dveh različnih antibiotikov v kulturah bakterij *E. coli* na redukcijsko sposobnost resazurina. Čas inkubacije bakterij z antibiotikoma: 1 h; T = 37 °C; čas redukcije resazurina: 45 minut

koncentracija eritromicina [µg/mL]	povprečna vrednost fluorescenčne intenzitete (10³) [RFU]	SD (10²)	KV [%]
512	4,36	2,15	5
256	13,4	9,52	7
51,2	27,9	15,0	5
0	43,4	0	0

koncentracija ciprofloksacina [µg/mL]	povprečna vrednost fluorescenčne intenzitete (10³) [RFU]	SD	KV [%]
512	0,91	37	4
256	2,69	75	3
51,2	4,74	172	4
0	43,4	0	0

Priloga C3: Določanje vpliva različnih koncentracij ekstrakta rožmarina v kulturah bakterij *E. coli* na redukcijsko sposobnost resazurina. Čas inkubacije bakterij z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C

povprečna vrednost fluorescence [RFU]						
čas [min]	0	15	30	45	60	75
R10	15	5	3	2	2	1
R5	1	8	21	32	42	51
R1	695	953	1178	1374	1549	1719
neg. kont.	48	3	160	461	974	1859
poz. kont.	221	357	473	566	643	705

povprečna vrednost fluorescence [RFU]						
čas [min]	90	105	120	135	150	165
R10	0	1	1	1	0	1
R5	60	68	74	80	85	89
R1	1885	2060	2251	2513	2960	3690
neg. kont.	3293	6044	10586	17277	24890	32093
poz. kont.	748	784	811	830	828,5	821

povprečna vrednost fluorescence [RFU]							
čas [min]	180	195	210	225	240	840	900
R10	0	1	1	1	1	1	8
R5	94	97	100	102	104	124	210
R1	4728	6134	8016	10259	11999	13529	15054
neg. kont.	38776	45212	50697	52811	52061	47277	43416
poz. kont.	804	791	766	728	682	581	533

SD						
čas [min]	0	15	30	45	60	75
R10	1	1	1	0	1	1
R5	8	3	6	6	8	9
R1	11	4	5	6	8	9
neg. kont.	10	11	18	34	68	131
poz. kont.	1	6	5	2	4	4

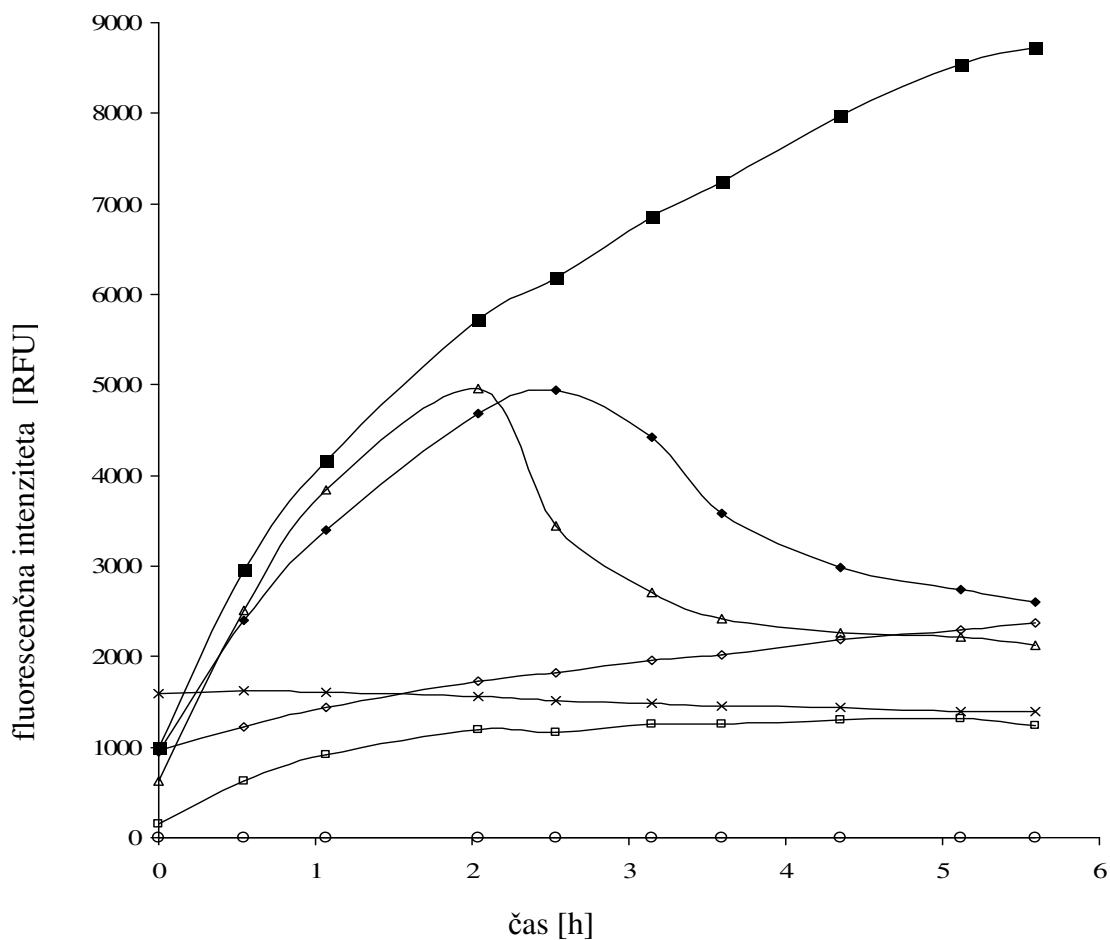
SD						
čas [min]	90	105	120	135	150	165
R10	1	1	1	2	2	2
R5	10	11	11	13	14	14
R1	16	26	45	123	309	528
neg. kont.	190	295	409	586	790	1211
poz. kont.	13	11	14	17	18	30

SD							
čas [min]	180	195	210	225	240	840	900
R10	3	3	4	4	5	9	12
R5	14	14	15	16	16	22	33
R1	810	1153	1504	1693	573	2261	3377
neg. kont.	1402	1305	892	1181	1483	2647	3114
poz. kont.	37	39	46	47	53	122	91

KV [%]						
čas [min]	0	15	30	45	60	75
R10	/	/	/	/	/	/
R5	/	/	/	/	/	/
R1	1,52	0,44	0,39	0,44	0,48	0,54
neg. kont.	19,87	413,07	11,02	7,30	6,96	7,04
poz. kont.	0,64	1,79	1,05	0,38	0,55	0,50

KV [%]						
čas [min]	90	105	120	135	150	165
R10	/	/	/	/	/	/
R5	/	/	/	/	/	/
R1	0,85	1,28	2,00	4,91	10,45	14,32
neg. kont.	5,77	4,88	3,86	3,39	3,18	3,77
poz. kont.	1,70	1,44	1,74	2,04	2,13	3,62

KV [%]							
čas [min]	180	195	210	225	240	840	900
R10	/	/	/	/	/	/	/
R5	/	/	/	/	/	/	/
R1	17,14	18,80	18,76	16,50	4,77	16,71	22,43
neg. kont.	3,62	2,89	1,76	2,24	2,85	5,60	7,17
poz. kont.	4,66	4,92	6,00	6,41	7,78	20,93	17,13



Priloga C4: Inkubacija različnih rastlinskih ekstraktov in askorbinske kisline** z rezazurinom. Koncentracije ekstraktov in askorbinske kisline: 5 % (w/v)

○ - askorbinska kislina, ◆ - ekstrakt čebule, ◇ - ekstrakt česna, ■ - ekstrakt čilija,
□ - ekstrakt melise, △ - ekstrakt rdeče pese, × - destilirana voda (kontrolni vzorec)

**Pri vzorcu z askorbinsko kislino smo ob dodatku reagenta CellTiter-Blue v nastavku pipete opazili prehod iz modre v rožnato barvo raztopine in nato v manj kot sekundi v brezbarvno raztopino.

Priloga D1: Določanje vpliva različnih koncentracij eritromicina na luminiscenco kultur bakterij *E. coli*. Čas inkubacije z antibiotikom: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom BacTiter-Glo: 5 minut

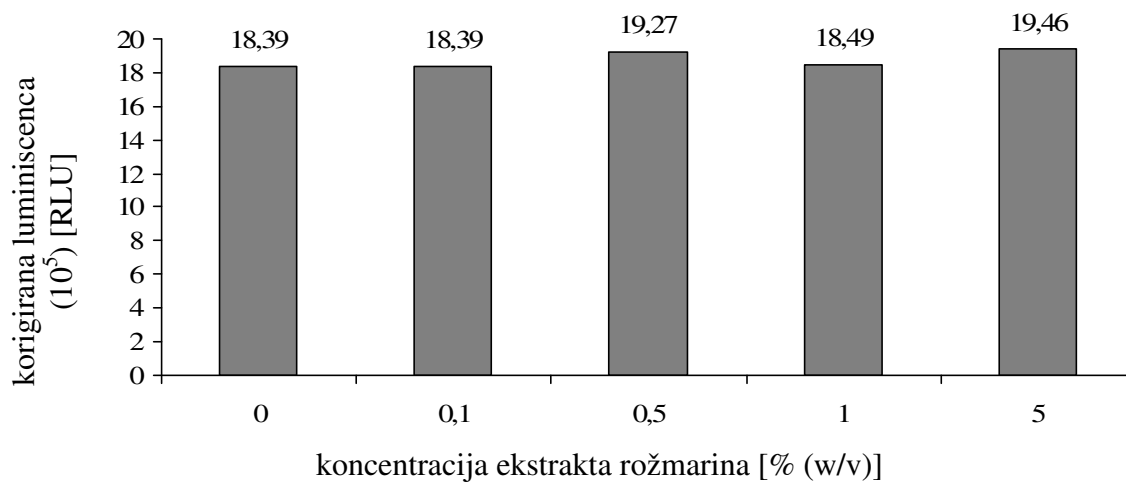
vzorec	povprečna vrednost luminiscence (10⁵) [RLU]
eritromicin s koncentracijo 512 µg/mL	6,47
eritromicin s koncentracijo 256 µg/mL	7,47
eritromicin s koncentracijo 51,2 µg/mL	17,0
negativna kontrola	40,5

vzorec	SD (10⁴)
eritromicin s koncentracijo 512 µg/mL	5,97
eritromicin s koncentracijo 256 µg/mL	3,98
eritromicin s koncentracijo 51,2 µg/mL	3,67
negativna kontrola	48,5

vzorec	KV [%]
eritromicin s koncentracijo 512 µg/mL	9,23
eritromicin s koncentracijo 256 µg/mL	5,33
eritromicin s koncentracijo 51,2 µg/mL	2,16
negativna kontrola	11,97

Priloga D2: Določanje vpliva dodatka ekstrakta rožmarina na luminiscenco hranljivega bujona po dodatku enake količine ekstrahiranega ATP. Čas inkubacije ekstrakta rožmarina z standardno količino ekstrahiranega ATP: 5 minut; T = 37 °C

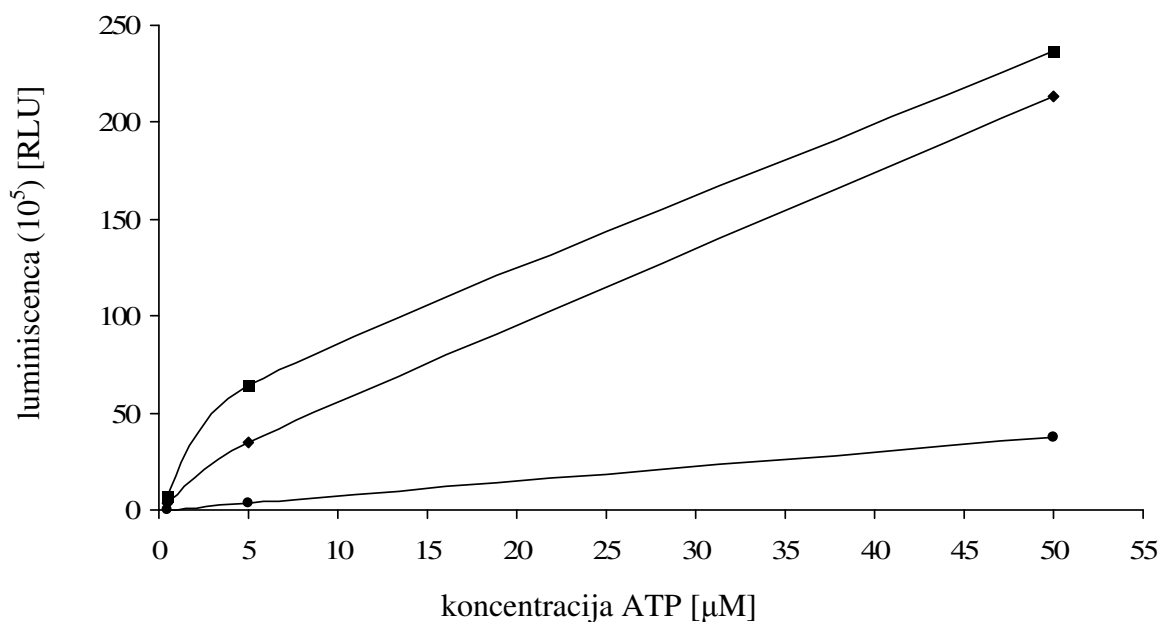
vzorec	luminiscenca (10⁵) [RLU]
hranljivi bujon s 5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek standardne količine ekstrahiranega ATP	1,17
hranljivi bujon z 1 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek standardne količine ekstrahiranega ATP	7,58
hranljivi bujon z 0,5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek standardne količine ekstrahiranega ATP	10,7
hranljivi bujon z 0,1 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek standardne količine ekstrahiranega ATP	16,2
hranljivi bujon z dodatkom standardne količine ekstrahiranega ATP	18,4



Priloga D3: Slika 15 korigirana s pomočjo faktorja inhibicije (F_i) pri določeni koncentraciji ekstrakta rožmarina. S pomočjo tega faktorja uspešno izničimo inhibicijo luminiscence, ki je posledica ekstrakta rožmarina

Priloga D4: Določanje vpliva ekstrakta rožmarina na luminiscenco hranljivega bujona po dodatku ATP (ekstrahiranega in komercialno dostopnega). Koncentracijo ekstrahiranega ATP smo določili s pomočjo umeritvene krivulje in primerjavo stopenj inhibicije luminiscence (priloga D5). Čas inkubacije ekstrakta z ATP: 5 minut; T = 37 °C

vzorec	luminiscenca (10⁴) [RLU]
hranljivi bujon s 5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 50 µM)	371
hranljivi bujon s 5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 5 µM)	35,7
hranljivi bujon s 5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 0,5 µM)	4,13
hranljivi bujon z 0,5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 50 µM)	2131
hranljivi bujon z 0,5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 5 µM)	347
hranljivi bujon z 0,5 % (w/v) ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 0,5 µM)	38
hranljivi bujon brez ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 50 µM)	2371
hranljivi bujon brez ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 5 µM)	642
hranljivi bujon brez ekstrakta rožmarina in dodatek ATP (končna koncentracija ATP 0,5 µM)	70



Priloga D5: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije ATP v hranljivem bujonu z različnimi koncentracijami ekstrakta rožmarina

- koncentracija ekstrakta rožmarina 5 % (w/v) ($y = 74246x - 4579$; $R^2 = 1$)
- - koncentracija ekstrakta rožmarina 0,5 % (w/v) ($y = 412161x + 760494$; $R^2 = 0,997$)
- ◆ brez dodatka ekstrakta rožmarina ($y = 432160x + 2 \times 10^6$; $R^2 = 0,9749$)

Priloga D6: Določanje vpliva inkubacije kulture bakterij *E. coli* z ekstraktom rožmarina pri različnih koncentracijah na luminiscenco. Čas inkubacije bakterij (koncentracija celic 5×10^5 celic/mL) z ekstraktom rožmarina: 1 h; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 min

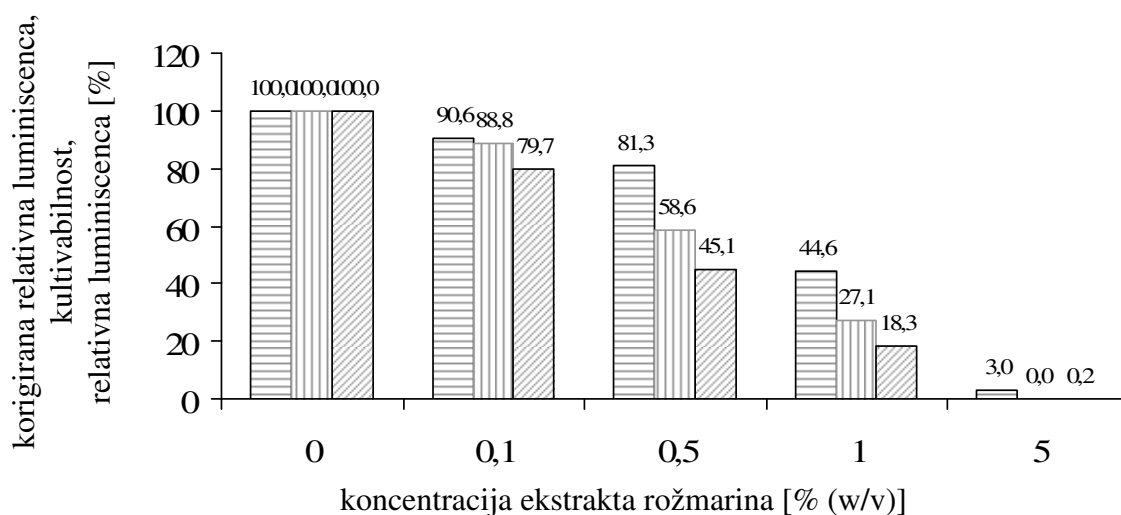
vzorec	povprečna vrednost luminiscence (10³) [RLU]
R5	8,84
R1	903
R0,5	2229
R0,1	3938
pozitivna kontrola	1488
negativna kontrola	4941

vzorec	SD (10³)
R5	1
R1	21
R0,5	57
R0,1	103
pozitivna kontrola	64
negativna kontrola	338

vzorec	KV [%]
R5	10,83
R1	2,37
R0,5	2,57
R0,1	2,62
pozitivna kontrola	4,30
negativna kontrola	6,84

Priloga D7: Luminiscenca vzorcev, ki smo jih pred dodatkom na mikrotitrsko ploščico filtrirali čez filter s premerom por 0,2 μm in primerjava z luminiscenco vzorcev iz slike 19. Čas inkubacije bakterij z ekstraktom rožmarina: 50 minut; T = 37 °C; čas inkubacije z reagentom: 5 minut. Ti podatki so v poglavju 4.4.4 preračunani in predstavljeni kot korigirana luminiscenca

vzorec	luminiscenca (10^3) [RLU]	
	normalen vzorec	filtriran čez filter s premerom por 0,2 μm
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane s 5 % w/v ekstraktom rožmarina v hranljivem bujonu	4,76	8,10
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane z 0,5 % w/v ekstraktom rožmarina v hranljivem bujonu	1928	59,6
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane z eritromicinom (512 $\mu\text{g/mL}$) v hranljivem bujonu (pozitivna kontrola)	785	69,3
bakterije <i>E. coli</i> inkubirane v hranljivem bujonu (negativna kontrola)	5722	97,4



Priloga D8: Primerjava relativne luminiscence, korigirane relativne luminiscence in kultivabilnosti

▨ - korigirana relativna luminiscenca, ▤ - kultivabilnost, ▩ - relativna luminiscenca