

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Bojana KESER

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV LISTJA IN
GROZDNIH KOŽIC VINSKE TRTE (*Vitis vinifera* L.) NA PATOGENE
BAKTERIJE ŽIVIL**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM LEAVES AND
GRAPE SKINS OF GRAPEVINE VARIETIES (*Vitis vinifera* L.)
AGAINST FOOD-BORNE PATHOGENS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija živilstva na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilstva je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Petra Rasporja.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Bojana Keser

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.24:547.9(043)=163.6
KG	protimikrobne snovi/rastlinski izvlečki/fenolne spojine/izvlečki listja vinske trte/izvlečki grozdnih kožic/vinska trta/ <i>Vitis vinifera</i> L./patogene bakterije/ <i>Bacillus cereus</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Salmonella</i> Infantis/ <i>Staphylococcus aureus</i> /minimalna inhibitorna koncentracija/MIC
AV	KESER, Bojana
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2010
IN	PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV LISTJA IN GROZDNIH KOŽIC VINSKE TRTE (<i>Vitis vinifera</i> L.) NA PATOGENE BAKTERIJE ŽIVIL
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 63 str., 12 pregl., 23 sl., 5 pril., 72 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preučiti vpliv fenolnih izvlečkov listja in grozdnih kožic različnih sort vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.) na patogene bakterije, izolirane iz hrane: Gram pozitivne bakterije <i>Bacillus cereus</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> , ter na Gram negativne bakterije <i>Escherichia coli</i> in <i>Salmonella</i> Infantis. Organizme smo inkubirali aerobno 24 ur pri temperaturi 37°C v tekočem gojišču MHB ali BHI. Protimikrobno aktivnost smo določali fenolnim izvlečkom, ki so bili pridobljeni iz listja šestih sort vinske trte, obranega v treh različnih mesecih, ter izvlečkom, ki so bili pridobljeni iz grozdnih kožic štirinajstih sort vinske trte (sedem rdečih in sedem belih sort). Določali smo jo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici po 24 urah ob dodatku bakterijskega ravnega indikatorja TTC ali INT. Z metodo smo določili najnižjo koncentracijo protimikrobne snovi (MIC), pri kateri se ohrani ali zmanjša začetna koncentracija mikrobne kulture. Rezultati so pokazali, da so izvlečki iz listja in grozdnih kožic vinske trte <i>Vitis vinifera</i> L. dober vir fenolnih spojin s protimikrobnim delovanjem, saj so imeli inhibitorno delovanje na vse testirane mikroorganizme. Vrednosti MIC za izvlečke iz listja se gibljejo med 0,38 – 2,24 mg GAE/ml (izraženo v mg skupnih fenolnih spojin oz. njihovem ekvivalentu galne kisline v ml gojišča). Vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic so znašale od 0,10 do 0,67 mg GAE/ml. Izvlečki iz listja vinske trte so delovali bolj inhibitorno na Gram pozitivne bakterije in manj inhibitorno na Gram negativne bakterije. Izvlečki grozdnih kožic belih sort so delovali najbolj inhibitorno na bakterije vrste <i>S. Infantis</i> , izvlečki rdečih sort pa na bakterije vrste <i>B. cereus</i> . Izvlečki grozdnih kožic belih sort so imeli boljše protimikrobno delovanje kot izvlečki iz rdečih sort vinske trte, kar sicer nismo pričakovali. Potrdili smo tudi hipotezo, da vegetativna doba listja vinske trte vpliva na protimikrobno delovanje njihovih fenolnih izvlečkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.22+579.24:547.56(043)=163.6
- CX antimicrobials/plant extracts/phenolics/extracts of grape leaves/extracts of grape skins/grapevine/*Vitis vinifera* L./pathogenes/*Bacillus cereus*/*Escherichia coli*/*Salmonella* Infantis/*Staphylococcus aureus*./minimum inhibitory concentration/MIC
- AU KESER, Bojana
- AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/RASPOR, Peter (reviewer)
- PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2010
- TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM LEAVES AND GRAPE SKINS OF GRAPEVINE VARIETIES (*Vitis vinifera* L.) AGAINST FOOD-BORNE PATHOGENS
- DT Graduation Thesis
- NO XII, 63 p., 12 tab., 23 fig., 5 ann., 72 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB Purpose of the study was to examine the influence of phenolic extracts of leaves and grape skins of different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) to pathogenic bacteria isolated from food: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Infantis. Microorganisms were incubated aerobically for 24 hours at a temperature of 37 °C in liquid media MHB or BHI. Antimicrobial activity was determined for phenolic extracts from leaves of six vine varieties harvested in three different months, and for grape skin extracts of fourteen different vine varieties (seven red and seven white varieties). We determined antimicrobial activity by microdilution in a microtitre plate after 24 hours with the addition of dye TTC or INT. We determined the lowest concentration of antimicrobial substances (minimum inhibitory concentration, MIC) at which microbial growth was inhibited, e.g. the initial concentration of microbial culture was maintained or reduced. The results showed that the extracts of leaves and grape skins of *Vitis vinifera* L. are good source of phenolic compounds with antimicrobial activity, which had inhibitory activity against all tested microorganisms. MIC values of extracts from the leaves, ranged from 0.38 to 2.24 mg GAE/ml (expressed in mg of total phenolics, as the equivalents of galic acid, per ml of the medium). MIC values of the extracts from grape skins ranged from 0.10 to 0.67 mg GAE/ml. Extracts from the leaves showed better results against Gram-positive bacteria than to Gram-negative bacteria. The extracts from grape skins of white grapes showed the best inhibitory activity against *S. Infantis*, but the extracts of red varieties showed the best inhibitory activity against *B. cereus*. The extracts from grape skins of white grapes had better antimicrobial activity than the extracts from red grape varieties, which was unexpected result. We also confirmed the hypothesis that the vegetative period of the harvest of vine leaves affected antimicrobial activity of their phenolic extracts.

KAZALO VSEBINE

KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	IX
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RASTLINSKI IZVLEČKI	3
2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih izvlečkov	3
2.1.2 Protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov	4
2.2 FENOLNE SPOJINE	5
2.2.1 Flavonoidi	5
2.2.1.1 Antocianidini	6
2.2.1.2 Flavanoli	6
2.2.2 Neflavonoidi	7
2.2.2.1 Fenolne kisline.....	7
2.2.2.1.1. Hidroksibenzojske kisline	7
2.2.2.1.2. Hidroksicimetne kisline.....	8
2.2.2.2 Hlapni fenoli	8
2.2.2.3 Stilbeni.....	8
2.3 GROZDNE KOŽICE	9
2.3.1 Sestava grozdne kožice	9
2.3.2 Protimikrobno delovanje grozdnih kožic	11
2.3.3 Uporaba grozdnih kožic.....	11
2.4 LISTI VINSKE TRTE.....	12
2.4.1 Kemijska sestava listov vinske trte	12
2.4.2 Protimikrobno delovanje izvlečkov listov vinske trte	12
2.4.3 Uporaba listov vinske trte.....	12
2.5 BAKTERIJE VRSTE <i>Bacillus cereus</i>	13
2.6 BAKTERIJE VRSTE <i>Escherichia coli</i>	14

2.7	BAKTERIJE RODU <i>Salmonella</i>	15
2.8	BAKTERIJE VRSTE <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.9	OBČUTLJIVOST PATOGENIH BAKTERIJ NA RASTLINSKE FENOLNE IZVLEČKE.....	17
2.10	<i>In vitro</i> METODE UGOTAVLJANJA BAKTERIJSKE OBČUTLJIVOSTI	18
2.10.1	Difuzijske metode	18
2.10.2	Dilucijske metode.....	19
2.10.3	Metode spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja	19
2.10.4	Vrednotenje protimikrobnega delovanja	20
3	MATERIALI IN METODE	21
3.1	POTEK DELA.....	21
3.2	MATERIALI	22
3.2.1	Mikroorganizmi.....	22
3.2.2	Mikrobiološka gojišča	22
3.2.2.1	Tekoče gojišče BHI	22
3.2.2.2	Tekoče gojišče MHB	22
3.2.2.3	Tekoče gojišče TSB.....	23
3.2.2.4	Trdno gojišče MHA.....	23
3.2.2.5	Trdo gojišče TSA	24
3.2.2.6	Puferska raztopina PBS	24
3.2.3	Snovi s protimikrobnim delovanjem	25
3.2.4	Druge kemikalije in dodatki	26
3.2.5	Laboratorijska oprema	26
3.3	METODE	27
3.3.1	Priprava in ohranjanje kultur.....	27
3.3.2	Priprava inokuluma	27
3.3.3	Določanje koncentracije celic v inokulumu	27
3.3.3.1	Metoda štetja kolonij na trdem gojišču.....	27
3.3.3.2	Določanje koncentracije celic na osnovi motnosti	28
3.3.4	Mikrodilucija v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z bakterijskim rastnim indikatorjem INT	28
3.3.5	Mikrodilucija v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z bakterijskim rastnim indikatorjem TTC	28
3.3.6	Statistična obdelava podatkov.....	29
4	REZULTATI.....	31
4.1	PROTIMIKROBNO DELOVANJE FENOLNIH IZVLEČKOV IZ LISTOV VINSKE TRTE	31
4.1.1	Primerjava MIC izvlečkov, določenih z mikrodilucijo v tekočem gojišču z dvema različnima indikatorjema INT in TTC	31
4.1.2	MIC izvlečkov, testiranih na štiri patogene bakterije z mikrodilucijo v tekočem gojišču z rastnim indikatorjem INT	36
4.1.2.1	Vpliv vrste bakterije na protimikrobno delovanje izvlečkov iz listov vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.)	40

4.1.2.2	Vpliv vegetativne dobe na protimikrobno delovanje izvlečkov iz listov vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.)	40
	PROTIMIKROBNO DELOVANJE FENOLNIH IZVLEČKOV IZ GROZDNIH KOŽIC VINSKE TRTE	41
4.1.3	Vpliv vrste bakterije na protimikrobno delovanje izvlečkov grozdnih kožic vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.)	42
4.1.4	Vpliv vrste izvlečka (bele ali rdeče sorte) na protimikrobno delovanje izvlečkov iz grozdnih kožic vinske trte (<i>Vitis vinifera</i> L.)	43
4.2	PROTIMIKROBNO DELOVANJE METANOLA	43
4.3	PROTIMIKROBNO DELOVANJE GALNE KISLINE	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	RAZPRAVA.....	45
5.1.1	Metoda mikrodilucije v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici	45
5.1.1.1	Primerjava dveh bakterijskih rastnih indikatorjev INT in TTC	46
5.1.2	Vpliv vrste bakterij.....	46
5.1.3	Vpliv vegetativne dobe surovine za pripravo izvlečka	47
5.1.4	Vpliv izvlečka iz belih in rdečih grozdnih kožic	48
5.1.5	Primerjava protimikrobnega učinka naravnih izvlečkov s protimikrobnim učinkom komercialno pripravljene galne kisline.....	48
5.1.6	Vpliv metanola na protimikrobni učinek izvlečkov	49
5.2	SKLEPI.....	50
6	POVZETEK.....	51
7	VIRI	52

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po Goodwinu in Mercerju (Goodwin in Mercer, 1983).....	5
Preglednica 2: Strukture hidroksibenzojskih kislin v vinu (Rentzsch in sod., 2009).	7
Preglednica 3: Karakteristike dveh tipov bolezni, ki jih povzroča <i>B. cereus</i> (Granum in Lundu, 1997).	13
Preglednica 4: Načini izražanja protimikrobnega delovanja (Burt, 2004).....	20
Preglednica 5: Bakterijski sevi	22
Preglednica 6: Izvlečki listov vinske trte, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.	25
Preglednica 7: Izvlečki grozdnih kožic, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu	25
Preglednica 8: Primer odčitavanja dobljenih rezultatov za sliko A.	32
Preglednica 9: Primer odčitavanja dobljenih rezultatov za sliko B.	32
Preglednica 10: Vpliv protimikrobnega delovanja metanola na protimikrobno delovanje izvlečkov iz listja vinske trte.	43
Preglednica 11: Vpliv protimikrobnega delovanja metanola na protimikrobno delovanje izvlečkov iz grozdnih kožic.	44
Preglednica 12: Prikaz protimikrobnega delovanja galne kisline.	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997).....	6
Slika 2: Splošna strukturna formula antocianidinov (Vrhovšek, 1996).....	6
Slika 3: Osnovna struktura hidrobenzojskih kislin (Rentzsch in sod., 2009).....	7
Slika 4: Različni sloji grozdne kožice (Pinelo in sod., 2006).....	9
Slika 5: Fenolne spojine v kožici rdeče grozdne jagode (Pinelo in sod., 2006).....	10
Slika 6: Metode določanja protimikrobnega delovanja (Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009).....	18
Slika 7: Hodogram poteka eksperimentalnega dela.....	21
Slika 8: Prikaz razlivanja gojišča MHA v sterilne petrijevke.....	23
Slika 9: Prikaz rezultatov mikrodilucije v mikrotitrski ploščici za pet testiranih izvlečkov v dveh paralelkah na bakterijo <i>S. aureus</i> ; A: uporabljen bakterijski rastni indikator INT, B: uporabljen bakterijski rastni indikator TTC.....	31
Slika 10: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Lasin.....	33
Slika 11: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Maraština.....	33
Slika 12: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Merlot.....	34
Slika 13: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Pošip.....	34
Slika 14: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Syrah.....	35
Slika 15: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Vranac.....	35
Slika 16: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Lasin, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	37
Slika 17: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Maraština, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	37
Slika 18: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Merlot, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	38
Slika 19: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Pošip, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	38
Slika 20: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Syrah, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	39
Slika 21: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Vranac, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	39
Slika 22: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov grozdnih kožic, pridobljenih iz belih sort vinske trte, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	41
Slika 23: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov grozdnih kožic, pridobljenih iz rdečih sort vinske trte, testiranih na štiri patogene mikroorganizme.....	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil <i>S. aureus</i>	59
Priloga B: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom TTC. Testni mikroorganizem je bil <i>S. aureus</i>	60
Priloga C: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil <i>B. cereus</i>	61
Priloga D: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil <i>S. Infantis</i>	62
Priloga E: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil <i>E. coli</i>	63

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ATCC	oznaka sevov iz zbirke American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	gojišče (angl. Brain Heart Infusion)
CFU	kolonijska enota (angl. colony forming unit)
dH ₂ O	enkrat destilirana voda
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
EHEC	enterohemoragična <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivna <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogena <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoksigena <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GAE	galna kislina
GRAS	oznaka za snovi, ki se dodajajo hrani in so splošno sprejete kot varne (angl. generally recognized as safe)
INT	bakterijski rastni indikator: p-iodo-nitro-tetrazolium violet
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
mg GAE/ml	mg fenolnih spojin, izraženih kot ekvivalent galne kisline, na ml gojišča
MHA	gojišče (angl. Mueller Hinton agar)
MHB	gojišče (angl. Mueller Hinton broth)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Infantis</i>	<i>Salmonella</i> Infantis
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	standardna deviacija
TSA	gojišče (angl. Tryptone Soya agar)
TSB	gojišče (angl. Tryptone Soya broth)
TTC	bakterijski rastni indikator: 2,3,5 trifenil-tetrazolijev klorid

WSBC oznaka sevov iz zbirke Weihenstephan *B. cereus* Culture Collection
ŽMJ oznaka sevov iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo,
Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku
za živilstvo, Biotehniške fakultete

1 UVOD

Kljub modernim izboljšavam procesnih tehnologij v živilstvu so varna živila zelo pomembna tema. Vsako leto veliko ljudi v industrializiranih državah trpi zaradi bolezni, ki se prenašajo s hrano. Tako je še zmeraj potreba po novih načinih, ki bi zmanjšali ali odpravili bolezni, ki jih povzročajo patogeni mikroorganizmi v hrani, po možnosti v kombinaciji z že obstoječimi metodami (Burt, 2004). Potrošniki želimo hrano brez ali z minimalno vsebnostjo kemijskih konzervansov. Prav zato narašča zanimanje za naravna protimikrobna sredstva, ki so lahko rastlinskega porekla, kot na primer začimbe in eterična olja (De Souza in sod., 2005). Istočasno pa se razvija trend zelenega potrošništva, ki si želi zmanjšati sintetične prehranske aditive in jih nadomestiti z naravnimi, ki imajo manjši vpliv na zdravje in okolje. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je že pozvala na svetovno redukcijo potrošnje soli, da bi zmanjšala pojav srčno-žilnih bolezni (Burt, 2004). Tudi tradicionalna medicina je vedno bolj dovzetna za uporabo protimikrobnih učinkovin, izoliranih iz rastlin, kajti do sedaj uporabljeni antibiotiki postajajo vse bolj neučinkoviti proti novim odpornim sevom patogenih bakterij (Cowan, 1999).

Rastlinska eterična olja in rastlinski izvlečki so spojine, ki se že dolgo uporabljajo v parfumeriji, aromaterapiji, kozmetiki, v proizvodnji hrane in pijač, vedno bolj pa tudi v medicinske namene in za konzerviranje hrane. Njihove glavne sestavine so splošno priznane kot varne (GRAS) in so zaradi svoje raznolike biološke aktivnosti glavna tema bioloških študij, ki iščejo alternative za nadzor bakterij, gliv in virusov v živilih, saj so se izkazale za dober vir antimikrobnih sredstev. To še posebej velja za zaviranje patogenih bakterij, ki se prenašajo s hrano. Torej protimikrobne snovi iz rastlin lahko nadomestijo kemične konzervanse v živilih, podaljšajo rok uporabnosti živil in prispevajo k večji varnosti živil (Tsao in Zhou, 2007).

Vinska trta daje grozdje, ki je svetovno in ekonomsko pomembno sadje, katerega večinoma (> 80 %) uporabijo za proizvodnjo vina. Vinska trta je bogat vir flavonolov, antocianov, proantocianidov, katehinov in drugih fenolnih spojin. Vendar se fenolna sestava spreminja glede na kultivar, okoljske dejavnike, čas obiranja in na del grozdja, ki se uporablja za pridobivanje izvlečka. Na splošno rdeče sorte grozdja vsebujejo višjo koncentracijo fenolnih spojin kot pa bele sorte (Thimother in sod., 2007).

Bacillus cereus je sporogena patogena bakterija, ki je razširjena v naravi in pogosto izolirana iz obratov za predelavo hrane. Spore so odporne na mnoge toplotne obdelave, npr. pasterizacijo, ki jo uporablja živilska industrija. Nekatere spore so sposobne preživetja in kaljenja pri temperaturah shranjevanja hrane. Pogosto se poroča, da spore in vegetativne celice kontaminirajo linije za predelavo hrane. Obe obliki kažeta tudi visoko odpornost na številne postopke čiščenja. Spore imajo sposobnost pritrjevanja na različne materiale, ki se uporabljajo v živilstvu. Vegetativne celice pa se lahko vgradijo v mešane biofilme. Zaradi svojega patogenega značaja, odpornosti na visoke temperature in na različne postopke čiščenja *B. cereus* predstavlja veliko tveganje za zdravje ljudi (Tauveron in sod., 2006).

Bakterije *Escherichia coli* so za salmonelami in kampilobaktri tretji najpogostejši bakterijski povzročitelji diarej (IVZ, 2009). *E. coli* je naravna prebivalka črevesnega trakta ljudi in toplokrvnih živali. Običajno so bakterije neškodljive, čeprav so določeni sevi

patogeni in so odgovorni za klinične okužbe kot so črevesna vnetja, okužbe sečil, sepsa in meningitis. Patogeni mehanizmi *E. coli* vključujejo številne virulentne dejavnike, in sicer adhezivnost, invazivnost, toksičnost, sekrecijske sisteme. Na podlagi virulence in kliničnih simptomov so bili patogeni sevi *E. coli* razdeljeni v številne skupine. Med njimi prevladujejo enterohemoragične *E. coli* (Holko in sod., 2006).

Salmonella predstavlja tveganje v živilski industriji, saj je v mnogih državah še vedno najpogostejši povzročitelj črevesnih obolenj, čeprav njena pogostost izolacije iz živil v razvitih državah pada. S salmonelami se okužijo ljudje z zaužitjem kontaminirane vode ali hrane. Perutnina in perutninski proizvodi so glavni vir okužbe v mnogih razvitih državah. (Xia in sod., 2009). Incidenca salmoneloz v letu 2008 je na osnovi prijav v Sloveniji znašala 54 primerov na 100.000 prebivalcev. Za salmoneloze je značilno sezonsko pojavljanje z vrhom števila obolenj v toplejših mesecih (IVZ. 2009).

Staphylococcus aureus velja za enega najpomebnejših mikroorganizmov, ki povzročajo zastrupitve s hrano po vsem svetu. Primarni habitat bakterije sta sluznica in koža ljudi in živali. Mikroorganizem je zmožen obstajati kot trajen ali prehodni član normalne mikroflore, ne da bi pri tem povzročil simptome obolenja pri ljudeh. Bakterije *S. aureus* so v živilih pogosto prisotne zaradi nepravilne manipulacije s hrano (Accoa in sod., 2003).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj te diplomske naloge je bil določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) fenolnih izvlečkov listov in grozdnih kožic belih in rdečih sort vinske trte: za Gram pozitivne bakterije vrste *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*, ter za Gram negativne bakterije vrste *Escherichia coli* in *Salmonella* Infantis, z namenom:

- primerjati občutljivost Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij na testne protimikrobne snovi.
- primerjati učinkovitost izvlečkov listja glede na obiralni čas (5., 8., 9., mesec obiranja listja);
- primerjati učinkovitost izvlečkov grozdnih kožic belih in rdečih sort.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Izvlečki listov in grozdnih kožic vinske trte (*Vitis Vinifera* L.) so dober vir fenolnih spojin. Predpostavili smo:

- da imajo fenolni izvlečki boljši protimikrobni učinek na Gram pozitivne bakterije kot na Gram negativne bakterije;
- da ima vegetativna doba pomemben vpliv na protimikrobni učinek;
- da so protimikrobno bolj učinkoviti izvlečki rdečih sort.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKI IZVLEČKI

2.1.1 Zgodovina uporabe rastlinskih izvlečkov

Raba naravnih izdelkov s terapevtskimi lastnostmi je stara že toliko kot človeška civilizacija sama, saj so dolgo časa naravni živalski in rastlinski produkti predstavljali glavni vir zdravilnih snovi (Rates, 2001). Zapisi velikih civilizacij, kot so antična Kitajska, Indija, Severna Afrika, Grčija, dokazujejo iznajdljivost človeka pri uporabi rastlin za zdravljenje (Phillipson, 2001). Hipokrat je že v 5. stol. pr. n. št. v svojih zapisih opisal 300 - 400 zdravilnih rastlin. Diskord je v 1. stol. n. št. napisal katalog zdravilnih rastlin – De Materia Medica, ki je postal prototip moderne farmakopije. Tudi Biblija opisuje približno 30 zdravilnih rastlin (Cowan, 1999).

Z industrijsko revolucijo in razvojem organske kemije so začeli dobivati prednost za farmakološko zdravljenje sintetični izdelki, saj so to bile čiste spojine, ki se jih je dalo z lahkoto pridobiti. S strukturnimi modifikacijami se je dalo pridobiti tudi potencialno bolj aktivne in varne snovi. Tako je ekonomska moč farmacevtskih podjetij začela naraščati. Poleg tega je uporaba naravnih produktov imela magično-verski pomen, kar pa se je križalo z nazori takratnega življenjskega sloga. Naravno zdravljenje je pomenilo praznoverje in so ga pripisovali neizobraženim in revnim ljudem (Rates, 2001).

V zadnjih letih pa je prišlo do vse večjega zanimanja za alternativno terapijo in terapevtsko uporabo naravnih izdelkov, zlasti tistih, ki so pridobljeni iz rastlin. Razlogov je več: Običajna (konvencionalna) medicina je lahko neučinkovita, ker se pojavljajo stranski učinki zaradi nepravilne uporabe oziroma zlorabe sintetičnih zdravil. Poleg tega pa obstaja velik del populacije, ki nima dostopa do običajnega zdravljenja (Rates, 2001). Tudi tradicionalna medicina je vedno bolj dozzetna za uporabo protimikrobnih učinkovin, izoliranih iz rastlin, kajti do sedaj uporabljeni antibiotiki postajajo vse bolj neučinkoviti proti novim odpornim sevom patogenih bakterij (Cowan, 1999). Istočasno pa se razvija trend zelenega potrošništva, ki si želi zmanjšati sintetične prehranske aditive in jih nadomestiti z naravnimi, ki imajo manjši vpliv na okolje (Burt, 2004).

2.1.2 Protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov

Dejavniki, ki vplivajo na protimikrobno aktivnost izvlečkov so: botanični vir, čas trgatve, klima, stopnja razvoja rastline, sestava in struktura rastline ter način ekstrakcije za pridobitev izvlečka. Najboljše protimikrobno delovanje imajo fenolne spojine (Tiwari in sod., 2009).

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih sestavin, med katerimi je največ fenolnih spojin in njihovih oksigeniranih derivatov. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinskih celicah in so jih do sedaj izolirali vsaj 12.000. Za rastlino so posebnega pomena, tako s fiziološkega kot z morfološkega stališča. Pomembni so za rast in reprodukcijo. Akumulirajo se predvsem v epidermalnem tkivu rastline in sodelujejo v zaščiti pred zunanjimi stresnimi dejavniki (UV, mikrobi, insekti). Učinkujejo kot vizualni markerji v cvetovih in sadežih ter vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živilskih izdelkov. V celici so bodisi v vakuoli ali vezani na strukturne elemente celične stene (Abramovič in sod., 2008).

Možni načini protimikrobnega delovanja fenolnih spojin so bili že preverjeni, vendar pa natančen mehanizem delovanja še ni jasn. Učinek fenolnih spojin je odvisen od koncentracije le teh. Pri nizki koncentraciji fenoli vplivajo na aktivnost encimov, zlasti tistih, ki so povezani s proizvodnjo energije, hkrati pa v velikih koncentracijah povzročajo denaturacije proteinov. Fenolne spojine zaradi svoje zmožnosti, da prodrejo v mikrobno celico, lahko povzročijo izgubo makromolekul iz notranjosti (na primer riboze in natrijevega glutamata). Fenolne spojine lahko vplivajo na membransko funkcijo (elektronskega transporta, privzema hranil, sintezo beljakovin in nukleinskih kislin, ter delovanje encimov) in interakcije z membranskimi proteini ter s tem povzročajo deformacije v strukturi in funkcionalnosti. Fenolne spojine imajo močno antibakterijsko delovanje, ki ga lahko pojasnimo kot rezultat alkilne zamenjave v fenolnem jedru (Tiwari in sod., 2009).

Večina raziskav, povezanih s protimikrobno učinkovitostjo izvlečkov, je bila izvedena *in vitro* z uporabo mikrobioloških medijev. Ko se uporabljajo v kompleksnih sistemih hrane, se učinkovitost izvlečka zmanjša zaradi interakcije s sestavinami v živilu (Tiwari in sod., 2009). Odvisna je od vsebnosti maščob, proteinov, vode, strukture živila, pH, soli in drugih dodatkov v živilu ter okoljskih (temperature, pakiranja, skladiščenja) in drugih dejavnikov (lastnosti mikroorganizmov) (Tassou in sod., 1995). Na splošno velja, da so potrebne višje koncentracije izvlečka v živilih kot v laboratoriju, da zmanjšamo rast tarčnega mikroorganizma. Pri previsokih koncentracijah izvlečka pa bi le ta vplival na senzorične lastnosti živila (Tiwari in sod., 2009).

2.2 FENOLNE SPOJINE

Polifenoli imajo pomemben učinek na oksidativno in mikrobiološko stabilnost živil. Izraz fenoli oz. polifenoli je kemijsko definiran kot substanca, ki ima na aromatičen obroč vezano eno ali več hidroksilnih spojin, vključno s funkcionalnimi derivati (estri, metil etri in glikozidi) (Ho, 1992). Fenolne spojine nastajajo iz aminokislina fenilalanin ali njenega prekursorja šikimske kisline (Abram, 2000).

Pri poimenovanju fenolnih spojin je v literaturi dokajšnja zmeda, zato se priporoča uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli (Goodwin in Mercer, 1983).

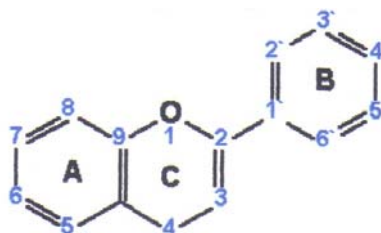
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin po Goodwinu in Mercerju (Goodwin in Mercer, 1983).

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C ₆	Fenoli
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	Fenilacetne kisline
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	C ₆ C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni Antrakinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani Neolignani
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi
N	(C ₆ C ₃) _n	Lignini
N	(C ₆) _n	Melanini
N	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	Kondenzirani tanini

Fenolne spojine so Rentsch in sod. (2009) razdelili glede na osnovno kemijsko strukturo na flavonoide in neflavonoide.

2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so ubikvitarne spojine v fotosintetskih celicah. Imajo različno fiziološko in farmakološko delovanje, kot je: estrogensko, antitumorno, antimikrobno, antialergijsko, protivnetno. So dobro znani antioksidanti. Pozitivno vplivajo na zdravje ljudi vključno s tem, da varujejo pred srčno-žilnimi boleznimi in različnimi oblikami raka. Osnovna struktura flavonoidov vsebuje 15 ogljikovih atomov, ki tvorijo C₆-C₃-C₆ strukturo (Ho, 1992).

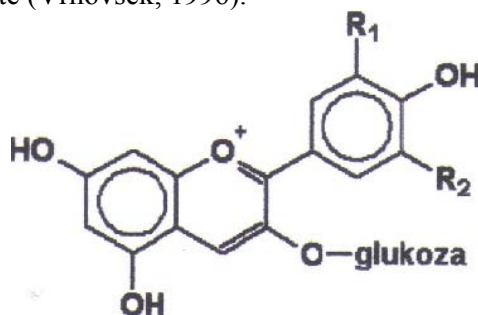


Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997).

Med flavonoide spadajo spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega obroča kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B, in C. Zato ne preseneča podatek, da je do sedaj poznanih več kot 5000 različnih flavonoidov. V naravi so običajno glikolizirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukozo, galaktozo, arbinozo, ramnozo) ali daljše verige na obroč. Največkrat je sladkor vezan na C₃, lahko pa tudi na C₅ ali C₇ atom. Le redki imajo sladkor vezan na B obroč (Abram in Simčič, 1997). Flavonoidi so prisotni kot glikozidi v vakuolah rastlin, listov, semen, stebel in korenin. V rastlinah od flavonoidov najpogosteje najdemo: kalkone, flavone, flavonole, flavanone, katehine, izoflavone, izoflavanone (Das in Rosazza, 2005), antocianidine in proantocianidine (Ho, 1992).

2.2.1.1 Antocianidini

To so vodotopne spojine, ki tvorijo modre, rdeče in vijolične pigmente večine rastlin. Antocianidinov poznamo 23 vrst, od teh so najbolj pogosti delfinidin, pelargonidin in cianidin. Večina antocianidinov se nahaja v obliki mono- in diglikozidov, tako jih imenujemo antociani. Posamezni glavni tipi antocianov se ločijo le po številu OH skupin na aromatskem obroču B (Abram in Simčič, 1997). Antocianidini so pomembne komponente v rdečih vinih, ker so barvila, ki so odgovorna za rdečo barvo vin. Koncentracija skupnih antocianidinov v grozdu se giblje med 40 – 1300 mg/L in je odvisna predvsem od sorte (Vrhovšek, 1996).



Slika 2: Splošna strukturna formula antocianidinov (Vrhovšek, 1996).

2.2.1.2 Flavanoli

Za flavanole je značilna nasičena C₃ veriga s hidroksilnimi skupinami. Sem spadajo flavan-3,4-dioli in flavan-3-oli. Monomeri flavan-3,4-dioli se imenujejo levkoantociani in so v sadju redko prisotni. Flavan-3-oli so monomerne enote kondenziranih taninov in so najpomembnejši fenoli v rdečih vinih. Najbolj pogosti so katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin (Murkovic, 2003).

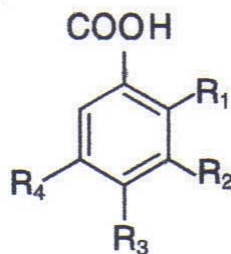
2.2.2 Neflavonoidi

Ne-flavonoidne fenolne spojine v vinu se delijo na fenolne kisline (hidroksibenzojske kisline in hidroksicimetne kisline), hlapne fenole, stilbene in razne spojine (npr. lignani in kumarini). Čeprav niso obarvane, je za ne-flavonoidne spojine znano, da povečujejo in stabilizirajo barvo rdečih vin in z intra- in intermolekulskimi reakcijami. Ob tem pa prispevajo k okusu vina (hlapne fenolne kisline) in nekatere od njih (npr. resveratrol) kažejo močno biološko aktivnost (Rentsch in sod., 2009).

2.2.2.1 Fenolne kisline

2.2.2.1.1 Hidroksibenzojske kisline - HBK

Za HBK je značilna C₆-C₁ struktura, saj so derivati benzojske kisline. Najpogostejši derivati, ki jih najdemo v vinu, so galna kislina, gentiska kislina, p-hidroksibenzojska kislina, protokatehujaska kislina, siringinska kislina, salicilna kislina in vanilinska kislina. V vinu lahko različne hidroksibenzojske kisline v glavnem najdemo v prosti obliki. Vsebnost HBK v vinu variira, odvisno od sorte grozdja in rastnih pogojev (Rentsch in sod., 2009).



Slika 3: Osnovna struktura hidrobenzojskih kislin (Rentsch in sod., 2009).

Preglednica 2: Strukture hidroksibenzojskih kislin v vinu (Rentsch in sod., 2009).

HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE	R₁	R₂	R₃	R₄
Galna kislina	H	OH	OH	OH
Gentiska kislina	OH	H	H	OH
p-Hidroksibenzojska kislina	H	H	OH	H
Protokatehujaska kislina	H	OH	OH	H
Salicilna kislina	OH	H	H	H
Siringinska kislina	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanilinska kislina	H	OCH ₃	OH	H

Galna kislina

Galna kislina (3,4,5-trihidroksi benzojska kislina) in njeni derivati so biološko aktivne spojine, ki so v širokem spektru prisotne v sadju in zelenjavi. Galat estri so v Evropski skupnosti odobreni aditivi za živila (Spigno in sod., 2010). Galna kislina ima antioksidativno in antiglivično delovanje (Yilmaz in Toledo, 2004). Galna kislina je izmed HBK v vinu prisotna v najvišji koncentraciji. Ne izvira samo iz grozdja, temveč se tudi

formira s hidrolizo hidroliziranih in kondenziranih taninov, to so estri galne kisline in flavan-3-olov (Rentsch in sod., 2009).

Galna kislina je v največjem deležu zastopana v fenolnem delu odpadnih vod in v drugih stranskih proizvodih industrijske proizvodnje hrane in s tem prispeva k škodljivim vplivom na okolje. Zato bi bilo še toliko pomembneje te snovi izolirati iz stranskih proizvodov in odpadov in jih uporabljati za proizvodnjo spojin z visoko dodano vrednostjo. V večini analitskih metod so skupni polifenoli izraženi kot ekvivalent galne kisline (Spigno in sod., 2010).

2.2.2.1.2 Hidroksicimetne kisline - HCK

Hidroksicimetne kisline imajo C₆-C₃ skelet in formalno spadajo med fenilpropanoide. V vinu so v glavnem prisotni kot derivati hidroksicimetnih kislin: kavne kisline, p-kumarne kisline, ferulne kislina in sinapinske kisline. Derivati so lahko prisotni v *cis* ali *trans* konfiguracyjski obliki, medtem ko je *trans* oblika bolj stabilna in bolj razširjena. V vinu so HCK v majhni količini prisotne v prosti obliki, večinoma so prisotne v esterski obliki, tako imenovani estri L-(+)-vinske kisline. V vinu pa niso našli ubikvitarne klorogenske kisline (Rentsch in sod., 2009).

2.2.2.2 Hlapni fenoli

Hlapni fenoli so izmed vseh fenolnih spojin v vinu prisotni v najnižji koncentraciji. Imajo pa velik vpliv na senzorične lastnosti vina. Vinil in etil fenol igrata najpomembnejšo vlogo (Rentsch in sod., 2009).

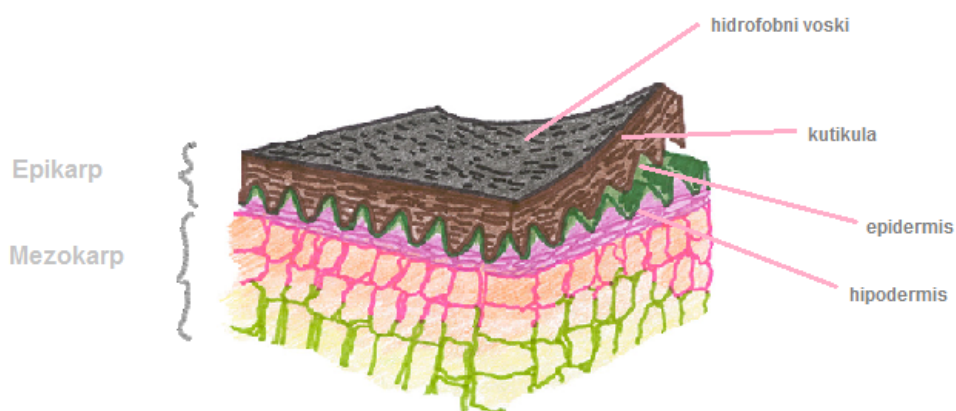
2.2.2.3 Stilbeni

Stilbeni so podrazred fenolnih spojin prisotni v mnogih rastlinah, vendar sta grozdje in vino najbolj pomembna prehranska vira teh spojin. Stilbeni se lahko sintetizirajo v vinski trti kot obrambni mehanizem na stres, kot so mikrobiološke okužbe ali UV sevanje. Med predelavo v vinarstvu se prenesejo v mošt in vino. Osrednjo vlogo v prehrani imajo zaradi antioksidativnega, antikarcinogenega in antimutagenega delovanja. Eden najpomembnejših in obširno proučevanih stilbenov je *trans-resveratrol* (3,5,4-trihidroksi-stilben), fitoaleksin, ki ga vinska trta proizvede v odgovor na glivične okužbe, še posebej na glivo *Botrytis cinerea*. Sinteza resveratrola poteka v glavnem v grozdnih kožicah in ga je malo ali nič v sadnem mesu. V naravi resveratrol obstaja v dveh izomernih oblikah (*cis* in *trans* konfiguracyji), v prosti in tudi v β -glukokonjugirani obliki. Stilbeni se lahko pojavijo tudi v oligomernih in polimernih oblikah, tako imenovani viniferini. Inducirani so z oksidativno polimerizacijo monomerov resveratrola preko dejavnosti peroksidaz. V vinski trti in vinu so identificirali stilbene, kot so: δ -viniferin, dva-resveratrol-dihidrodimer, resveratrol dimer palidol, α -viniferin, trimer resveratrol (Rentsch in sod., 2009).

2.3 GROZDNE KOŽICE

Grozdna kožica predstavlja od 5 do 10 % skupne suhe mase grozdne jagode. Deluje kot hidrofobna bariera, ki ščiti grozdje pred fizikalnimi in klimatskimi vplivi, dehidracijo in UV žarki. Grozdno kožico lahko razdelimo v tri plasti, te so:

- Povrhnjica iz hidroksiliranih maščobnih kislin, tako imenovana kutikula, ki je prekrita z voski
- Vmesna povrhnjica iz ene ali dveh plasti – epidermis
- Notranja plast – hipodermis je sestavljena iz večih slojev in vsebuje večino fenolov grozdne kožice (Pinelo in sod., 2006).



Slika 4: Različni sloji grozdne kožice (Pinelo in sod., 2006).

2.3.1 Sestava grozdne kožice

V grozdnih kožicah najdemo fenolne spojine, kot so: fenolne kisline (galna kislina), monomeri katehina in epikatehina, različne antociane (Yilmaz in Toledo, 2004) in flavonole (Castillo-Munoz in sod., 2007).

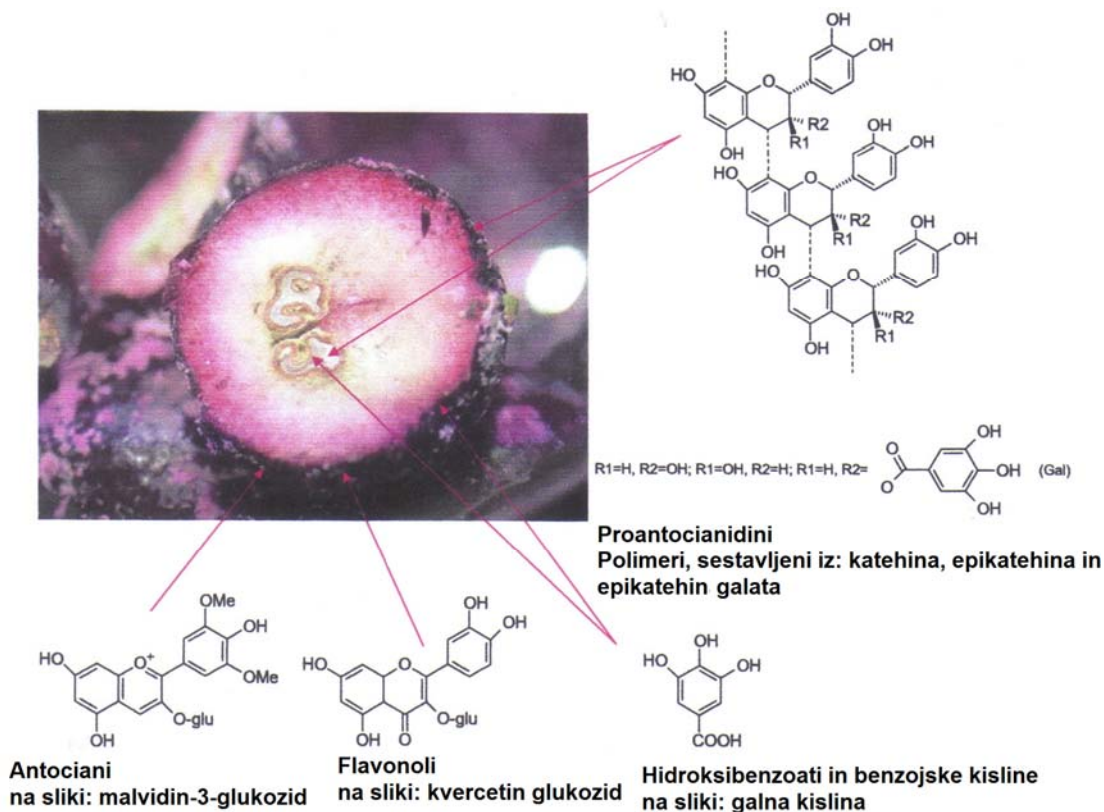
Na splošno fenolna sestava grozdnih kožic močno variira v odvisnosti od sorte in pogojev gojenja. Fenolne spojine se večinoma nahajajo v celični steni in vakuolah celic grozdne kožice. Grozdna kožica je bogata s tanini. Glavni tanini v grozdnih kožicah so katehin, epikatehin in epikatehin galat, v manjši meri tudi galokatehin in epigalokatehin (Pinelo in sod., 2006).

Stilbeni, ki so prisotni v jagodnih kožicah, so *cis* in *trans* resveratrol. Katalinič in sod. (2010a) so ugotovili, da je povprečna vsebnost monomerov resveratrola v rdečih sortah skoraj trikrat višja v primerjavi s koncentraciji resveratrola v belih sortah.

Grozdne kožice vinske trte (*Vitis vinifera* L.) vsebujejo flavonole, ki spadajo v skupino flavonoidov. V rdečem grozdju in vinu so našli flavonole, kot so: kamferol (4-hidroksi flavonol), kvercetin (3,4,-hidroksi flavonol), miricetin (3,4,5-trihidroksi flavonol), skupaj z izoramnetinom, ki je metoksilirani produkt 3-OH kvercetina. V rdečih grozdnih kožicah so

našli tudi laricitrin (metoksiliran produkt kvercetina) in siringetin (metoksiliran produkt c-3- miricetina). Flavonoli v grozdju obstajajo samo kot 3-glikozidi. V belem grozdju pa so našli samo kamferol in kvercetin. Sodobne raziskave so pokazale, da se lahko flavonolska slika uporablja kot splošen kemijski indikator za določanje avtohtonosti za različne rdeče in bele sorte vinske trte (Castillo-Munoz in sod., 2007).

V vinski trti (*Vitis vinifera* L.) so antociani nakopičeni v listih med zorenjem rastline in so odgovorni za obarvanje kože v rdečih in rose sortah vinske trte. Kopičenje antocianov v grozdnih kožicah se začne med zorenjem jagod in je odvisno od klimatskih pogojev, predvsem svetlobe in temperature, ki ob pomanjkanju predstavljata omejitveni faktor pri zorenju grozdja. Vsebnost antocianov v grozdju je odvisna tudi od časa obiranja. Antociani so edinstvene molekule med rastlinskimi fenoli, ker so lahko prisotne v rastlinskih tkivih kot različne kemične spojine. V kakšni obliki so prisotne je odvisno predvsem od vrednosti pH. (Revilla in sod., 1998). Antociani se nahajajo izključno raztopljeni v vakuolah celic. Tanini so nasprotno prisotni v več oblikah in v različnih delih jagodne kože. Raztopljeni so v vakuolah in vezani na membrane vakuol in celične membrane. V času zorenja grozdja se povečuje vsebnost antocianov in taninov. Zrelo grozdje ima zato jagodne kožice bogate z lahko izlužljivimi antociani in tanini in obratno (Nemanič in sod., 1997).



Slika 5: Fenolne spojine v kožici rdeče grozdnje jagode (Pinelo in sod., 2006).

2.3.2 Protimikrobno delovanje grozdnih kožic

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

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

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

2.3.3 Uporaba grozdnih kožic

Grozdje je eno najpomembnejših sadežev nasploh. Svetovna proizvodnja znaša približno 60 milijonov ton. Od tega se 70 % pridelka grozdja predela v vino, 27 % pridelka se porabi kot namizno grozdje in 2 % pridelka se posuši v rozine. Za primerjavo so zanimivi podatki za banane, oranže in jabolka, ki se jih pridelava 57, 50 in 43 milijonami ton. (Jackson, 2003). Pri proizvodnji vina so grozdne kožice pomemben stranski proizvod. Uporabijo se lahko pri krmljenju prašičev. Uporaba grozdnih kožic za krmo je možna, ker ne vpliva na kakovost parametrov klavnih trupov in mesa (Marsico in sod., 2003). V zadnjih letih se je zanimanje pri razvoju funkcionalnih živil, ki krepijo zdravje ali preprečujejo bolezni na osnovi funkcije zagotavljanja hranilnih snovi, povečalo. Ker izvlečki iz grozdja vsebujejo raznoliko mešanico fenolnih kislin, preprostih flavonoidov, kompleksne flavonoide in antociane, so številne študije pokazale koristi fenolnih spojin v grozdju, vključno z antioksidacijskimi učinki, protimikrobnimi učinki, antikancerogenimi učinki in zaščito proti srčno-žilnimi boleznimi. Zaradi tveganja toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov so izvlečki iz grozdja (vinske trte) postali priljubljeni kot prehranski dodatek (Rozek in sod., 2009).

Izvlečki kirkume, anata, karmina, grozdnih kožic, žafrana in beta karotena sodijo med pomembnejša naravna barvila v živilih. Za naravne aditive mora biti potrjeno, da ne povzročajo alergijskih reakcij. V grozdju lahko povzročajo alergijske reakcije določene beljakovine, medtem ko v grozdnih kožicah naj ne bi bile prisotne (Lucas in sod., 2001). Naravni barvni dodatki se uporabljajo za obarvanje živil, zdravil in kozmetike (Hallagan in sod., 1995).

2.4 LISTI VINSKE TRTE

2.4.1 Kemijska sestava listov vinske trte

Listi vsebujejo različne vrste polifenolov vključno z antocianini, flavonoidi in fenolnimi kislinami. (Pari in Suresh, 2008). V listih so identificirali tudi resveratrol in oligomere resveratrola, imenovane viniferini. Po infekciji ali stresu je glavna komponenta, ki je prisotna, viniferin - resveratrol dehidrodimer. Piceid - resveratrol glikozid je tudi prisoten v listih in predstavlja mobilno obliko resveratrola v celicah vinske trte (Douillet-Breuil in sod., 1999).

Dani in sod. (2010) so v izvlečkih listov vinske trte *Vitis labrusca* var. (Bordo) določili 20,2 mg GAE/ml skupnih fenolnih spojin, od tega je bilo največ rutina, nato so bili prisotni še kvercetin, katehin, kamferol in v najmanjših količinah resveratrol.

Katalinič in sod. (2010b) so v izvlečkih, pridobljenih iz listja vinske trte (*Vitis vinifera* L.) identificirali in kvantificirali naslednje fenolne spojine: katehin, epikatehin, apigenin, kamferol, kvercetin, miricetin, kvercetin-4-glukozid, rutin, *cis* in *trans*-resveratrol in astringin (stilben). Rezultati študije kažejo zanimivo fenolno sestavo izvlečkov. Prevladujoč flavonol je bil monomer kvercetin.

2.4.2 Protimikrobno delovanje izvlečkov listov vinske trte

Snovi v rastlinskih izvlečkih, kot so fenoli, terpeni in aldehidi, delujejo predvsem na celično membrano. Največjo protimikrobno aktivnost imajo fenolne spojine. Zdi se, da hidroksi kisline inaktivirajo mikrobiološke encime. Te snovi v interakciji s celično membrano povzročajo iztekanje komponent celične vsebine, spremembe v sestavi maščobnih kislin in fosfolipidov, oslabijo gradient elektronov na membrani oz. povzročijo izgubo presnovne energije in vplivajo na sintezo genetskega materiala (Pasqua in sod., 2007).

Podatkov o protimikrobni aktivnosti izvlečkov listja vinske trte v literaturi nismo našli, kar je bil tudi povod za eksperimentalno delo, v okviru katerega je nastala tudi ta diploma.

2.4.3 Uporaba listov vinske trte

Vitis vinifera L. pripada družini *Vitaceae*, katere plodovi se uporabljajo kot živilo in za proizvodnjo vina ali pijač. V ljudski medicini različnih delov sveta se listi vinske trte uporabljajo kot sredstvo za zdravljenje diareje in bruhanja. Listi se uporabljajo tudi za preprečitev krvavenja in za zdravljenje vnetij, bolečin in hepatitisa (Pari in Suresh, 2008; Katalinič in sod., 2010b).

Liste vinske trte uporabljajo tudi v kulinariki. V Egiptu je znana jed Mahshi (kuhani listi vinske trte z mesom in rižem), ki ima atraktiven okus in aromo (Hebash in sod., 1991). V nekaterih evropskih državah se listi vinske trte (*Vitis vinifera* L.) tradicionalno uporabljajo kot živilo v sveži in konzervirani obliki. V Turčiji liste pripravijo v slanici in jih tako konzervirajo do nadaljnje uporabe (Dani in sod., 2010).

2.5 BAKTERIJE VRSTE *Bacillus cereus*

Rod *Bacillus* spada v družino *Bacillaceae*, ki jih ima več kot 50 vrst. Najbolj znane so vrste *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. subtilis* (Maza in sod., 2004). Bakterije rodu *Bacillus* so ubikvitarne bakterije, prisotne v zemlji, zraku, vodi, rastlinah in človeških ter živalskih iztrebkih (Adamič in sod., 2003).

B. cereus je po Gramu pozitivna, sporogena, gibljiva paličasta bakterija. Lahko je aerobna ali fakultativno anaerobna. Psihrotrofni sevi povzročajo probleme v mlečni industriji (Granum in Lund, 1997).

B. cereus je za prenos s hrano najpomembnejša bakterija v rodu *Bacillus*, ker je povzročitelj alimentarnih toksikoinfekcij. Te bakterije sintetizirajo vrsto izvenceličnih metabolitov vključno s toksini in drugimi virulenčnimi dejavniki (Adamič in sod., 2003). *B. cereus* povzroča dva različna tipa zastrupitve z živili (Granum in Lund, 1997).

Emetični sindrom povzroča emetični toksin, ki je bil poimenovan kot cereulid in je sestavljen iz krožne strukture treh ponovitev štirih amino in oksid kislin: (_D-O-Leu-_D-Ala-_L-O-Val-_L-Val)₃. Ta krožna struktura ima molekulsko maso 1,2 kDa in je kemijsko najbolj podobna kalijevemu ionofornemu valinomycinu. Emetični toksin je odporen na vročino, pH in proteolizo, ni pa antigen (Granum in Lund, 1997).

Diarejni sindrom naj bi povzročal enterotoksin T in dva različna tri komponentna enterotoksina, in sicer tri- komponentni hemolizin (HBL), ki sestavljen iz treh proteinov B, L₁,L₂ (vse tri komponente so potrebne, za maksimalno delovanje toksina) in nehemolitičen tri-komponentni enterotoksin (NHE). HBL ima dermonekrotično in žilno permeabilno aktivnost. HBL je opisan kot primarni virulentni dejavnik (Granum in Lund, 1997).

Preglednica 3: Karakteristike dveh tipov bolezni, ki jih povzroča *B. cereus* (Granum in Lundu, 1997).

	Diarejni sindrom	Emetični sindrom
Infektivna doza	10 ⁵ -10 ⁷ (total.)	10 ⁵ -10 ⁸ (celic g ⁻¹)
Mesto, kjer se tvori toksin	tanko črevo gostitelja	živilo
Kemijska struktura toksina	protein	ciklični peptid
Inkubacijska doba	8-16 ur (ponavadi > 24 ur)	0,5-5 ur
Trajanje bolezni	12-24 ur	6-24 ur
Simptomi	abdominalna bolečina, diareja, (včasih bruhanje)	bruhanje, slabost, (včasih diareja)
Živilo, ki povzroča zastupitve	mesne, zelenjavne jedi, juhe, pudingi, mlečni produkti, omake	riž, krompir, testenine, peciva

Obe vrsti bolezni sta relativno blagi in trajata manj kot 24 ur. Na Japonskem je emetični sindrom 10-krat pogostejši od diarejnega, v Evropi in Severni Ameriki pa je diarejni sindrom pogostejši (Granum in Lund, 1997).

2.6 BAKTERIJE VRSTE *Escherichia coli*

Bakterije vrste *E. coli* spadajo v družino *Enterobacteriaceae*. So po Gramu negativne, nesporogene, fakultativno anaerobne palčke (Maza in sod., 2004). Ime je bakterija dobila po odkritelju bakteriologu Theodoru Escherichu (Scheutz in Strockbine, 2005).

Večinoma so bakterije gibljive s peritrihimi flageli. Nekateri sevi imajo tudi fimbrije, ki sodelujejo pri pritrditvi bakterije na gostiteljsko celico, in pile, ki sodelujejo pri izmenjavi genetskega materiala med dvema celicama. Pri nekaterih sevih najdemo tudi kapsulo. Kromosom je krožen, pogosti so izvenkromosomski elementi DNA – plazmidi. Velikost genoma med različnimi sevi variira od 4,6 x 10⁶ bp do 5,3 x 10⁶ bp, razlike pa so tudi v številu genov (Battner in sod., 1997). Nevirulentni sevi *E. coli* so del normalne flore debelega črevesa ljudi in živali. Virulentni sevi pa povzročajo različne okužbe, najpogosteje okužbe sečil in prebavil. Poznamo pet različnih mehanizmov, s katerimi *E. coli* delujejo in povzročajo bolezni. Glede na patogenezo jih delimo v: enterotoksigene (ETEC), enteropatogene (EPEC), enteroinvazivne (EIEC), enterohemoragične (EHEC) ali »Shiga toxin- producing *E. coli* » (STEC) in enteroagregativne (EAggEC) (Kastelec in Harlander, 2005).

Med zelo patogene spada EHEC, serotip 0157:H7, ki je bila leta 1982 prvič opisana kot povzročiteljica krvave driske pri človeku v ZDA. EPEC so pomembne povzročiteljice akutne in trdovratne driske pri dojenčkih in malih otrocih do 3. leta starosti v deželah v razvoju. Bolezen se prenaša fekalno-oralno med otroki. Vir je lahko okužena hrana. ETEC povzročajo driske pri prebivalcih in popotnikih v nerazvitih deželah. Okužbe so posledica zaužitja okužene hrane in vode. Izloča toplotno labilni enterotoksin (TL), posledica je vodena driska. Ti sevi povzročajo potovalno drisko. EIEC povzročajo drisko s klinično sliko dizenterije. EAggEC povzroča dolgotrajno drisko pri otrocih v državah v razvoju (Kastelec in Harlander, 2005).

E. coli (tip I) je najpogosteje uporabljen indikatorski mikroorganizem sveže fekalne kontaminacije. Tvori plin in kislino iz laktoze pri temperaturi 44 °C do 45,5 °C (fekalni koliformi). Na mesu, ribah, v mleku ipd. se hitro razmnožuje in povzroča zakisanje ter kvar (Adamič in sod., 2003).

2.7 BAKTERIJE RODU *Salmonella*

Salmonele spadajo v družino *Enterobacteriaceae*, so po Gramu negativne, fakultativno anaerobne, oksidaza negativne, katalaza pozitivne, nesporogene paličaste bakterije. Večina tipov je gibljivih in fermentirajo glukozo ter jo razgrajujejo do kisline in plina. *Salmonella* raste v območju med 2-54 °C, optimum rasti ima pri 37 °C, temperature pasterizacije pa jo uničijo (Cox, 1999).

Rod *Salmonella* obsega približno 2463 različnih serotipov, ki so uvrščeni v 2 taksonomski vrsti *S. enterica* in *S. bongori*. *S. enterica* je razdeljena v 6 podvrst in obsega praktično vse serotipe, medtem ko *S. bongori* zajema le 18 serotipov. Salmonele serološko klasificiramo na osnovi njihove antigenske zgradbe po White-Kauffmanovi shemi: O antigeni (somatski), H antigeni (flagelarni) in K antigeni (kapsularni). Salmonele razdelimo v več skupin, glede na prilagojenost in gostitelje, in sicer na človeka prilagojene salmonele (*S. typhi*, *S. paratyphi*), na nekatere živalske vrste prilagojene salmonele (*S. gallinarum* - kokoši, *S. dublin* - govedo) ter zoonozne salmonele, ki povzročajo diarejo pri ljudeh in živalih (Kastelec in Harlander, 2005).

Salmonella je organizem, ki je v naravi zelo razširjen in ga pogosto najdemo v prebavnem traktu ljudi in živali. Izloča se z blatom in na ta način lahko kontaminira predmete, ki pridejo v stik s fekalijami. Salmonela se razlikuje od drugih organizmov, ki povzročajo zastrupitve s hrano po zelo pomembnih značilnostih, ki vključujejo: prisotnost v povsem običajnih živilih (salmoneloza je tipična za mesne izdelke, jajca, surovo mleko in mlečne izdelke ter vso hrano, ki ima v ozadju fekalno kontaminacijo); sposobnost, da raste v širokem temperaturnem rangu; sposobnost enostavnega širjenja iz človeka na človeka. Inkubacijska doba je od 12-36 ur. Pacient ima vročino, bolečine v trebuhu in diarejo. Bruhanje je manj pogosto. Večina ljudi, ki so okuženi s salmonelo, okreva v sedmih dneh brez zdravljenja z antibiotiki, ti namreč niso zmeraj priporočeni (Eley, 1996).

Salmonella enterica serovar *Infantis* je paličasta bakterija, ki se nahaja v bakterijski flori živečih plazilcev in dvoživk. Zelo pogosto jo najdemo pri perutnini, rdečem mesu, nepasteriziranem mleku in mlečnih izdelkih. *S. Infantis* lahko povzroči gastroenteritis z zaužitjem kontaminirane hrane ali vode. Je ena najpomembnejših patogenih bakterij, ki se prenaša s hrano, zaradi svoje raznolike odpornosti (Villamizar in sod., 2008).

2.8 BAKTERIJE VRSTE *Staphylococcus aureus*

Rod *Staphylococcus* spada v družino *Micrococaceae* (Sandel in McKillip, 2004) in je eden od najštevilčnejših rodov z okrog 50 vrstami, med katerimi so za živilstvo pomembnejše *S. aureus*, *S. carnosus*, *S. epidermidi*, *S. saprophyticus* itd. Naseljujejo kožo in sluznico ljudi in živali, od koder mnogokrat zaidejo v živila. Pojavljajo se v grozdastih skupkih, po katerih so dobili rodovno ime (Adamič in sod., 2003). Celice so velike od 0,5 do 1,5 μm , odvisno od vrste in kulturnih pogojev (Sandel in McKillip, 2004).

S. aureus je gram pozitivna, fakultativno anaerobna, nesporogena bakterija, ki ima obliko koka, in je koagulaza, katalaza in deoksiribonukleaza pozitivna (Eley, 1996; Adamič in sod., 2003). Bakterije *Staphylococcus aureus* so sposobne rasti v prisotnosti 7,5% ali 10% NaCl (Sandel in McKillip, 2004).

S. aureus je zelo razširjena vrsta, ki jo je mogoče najti v različnih habitatih in je pogosto del normalne človeške mikroflore (Sandel in McKillip, 2004). Najdemo jo kot zajedavca na koži in nosni sluznici človeka. Prisotna je v zraku, mleku in odpadni vodi. Živila, ki so najpogosteje povezana z zastrupitvijo s toksini bakterij *Staphylococcus aureusom* so meso in mesni izdelki, jajca, mleko in mlečni izdelki ter kuhana hrana, ki jo zaužijemo hladno (Eley, 1996).

S. aureus je vsestranski in nevaren povzročitelj bolezni pri ljudeh. Pomemben je s kliničnega kot tudi prehrabnega vidika. Pod določenimi pogoji lahko povzročijo bolezen tudi oportunistični sevi. Stafilokokna zastupitev s hrano je med najpomembnejšimi vzroki gastroenteritisa v razvitih državah (Sandel in McKillip, 2004).

Zastrupitve s hrano povzročajo bakterijski toksini, znani kot stafilokokni enterotoksini v osmih seroloških tipih (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E in F). Eksperimenti na primatih so pokazali, da ti toksini niso takšni kot klasični enterotoksini, npr. kolera toksin, ki deluje direktno na črevesne celice. Ti toksini delujejo na receptorje v prebavilih, tako da stimulirajo center v možganih, ki vzpodbuja bruhanje in se lahko smatrajo kot nevrotoksini. Toksine proizvajajo bakterijske celice med rastjo v živilu, pri skladiščenju živil oz. pripravi živila, preden ga zaužijemo. Vsak toksin je posamezna polipeptidna veriga, ki je odporna na veliko število proteolitičnih encimov. Je toplotno obstojna, saj preživi 100 °C več kot 30 minut, čeprav vegetativna celica ne preživi takih pogojev. Najbolj pogost enterotoksin v povezavi z stafilokokno zastrupitvijo z živilom je enterotoksin A, ki je vzrok za obolenja v 75 % primerih (Eley, 1996). V raziskavi, ki so jo letos opravili v sodelovanju slovenski in slovaški raziskovalci, so pri 38 sevih *S. aureus* iz živil najpogosteje ugotovili gen za sintezo toksina SEC (Trnčikova in sod., 2010).

Znaki zastrupitve se začnejo kazati po 1-6-ih urah po zaužitju kontaminirane hrane. Simptomi so slabost in bolečina v želodcu, bruhanje, lahko tudi diareja, ampak pacient nima vročine. Večina pacientov brez zdravljenja ponavadi okreva v 24 urah (Eley, 1996).

2.9 OBCUTLJIVOST PATOGENIH BAKTERIJ NA RASTLINSKE FENOLNE IZVLEČKE

Na splošno je protimikrobna učinkovitost eteričnih olj in rastlinskih izvlečkov odvisna od kemične strukture, torej posameznih protimikrobnih elementov in njihove koncentracije. Veliko protimikrobnih sestavin, ki so prisotne v rastlinah, so del pred- ali postinfekcijskega obrambnega mehanizma za boj rastline proti boleznim, parazitom in mikrobom. Rastline so zato vir relativno visoke ravni protimikrobnih spojin in lahko zavirajo rast patogenih mikroorganizmov, ki se prenašajo s hrano. Glavne protimikrobne sestavine rastlin, zelišč in začimb so fenolne spojine, lahko pa tudi terpeni, alifatski alkoholi, aldehidi, ketoni, kisline, izoflavoni (Tiwari in sod., 2009).

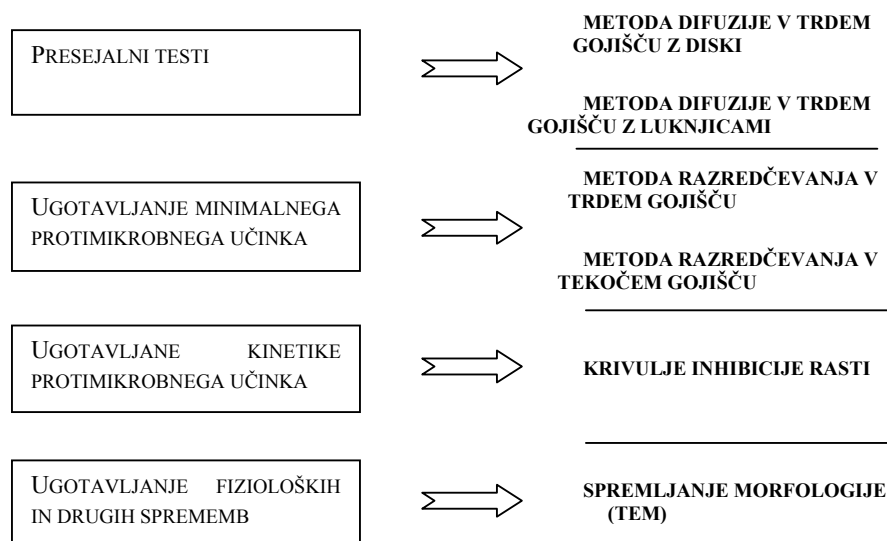
Po Gramu pozitivne bakterije veljajo za bolj občutljive bakterije na rastlinske fenolne izvlečke kot po Gram negativne bakterije, kar so potrdile različne študije. Tako delovanje so dokazali z *in vitro* metodami (večinoma z metodo difuzije v agarju), testiranimi na po Gramu pozitivne bakterije (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*...) in po Gramu negativne bakterije (*E. coli*, *Salmonella* Enteritidis...) za izvlečke iz grozdnih pečk (Jayaprakasha in sod., 2002; Baydar in sod., 2003), enostvnih fenolnih spojin ter izvlečke iz žajblja (Krznar, 2010; Shan in sod., 2007), rožmarina (Krznar, 2010; Klančnik in sod., 2009; Shan in sod., 2007), olja mete (Tassou in sod., 2000), smole mastike (Tassou in Nychas, 1995), izvlečke iz kumine, cimeta, koriandra, janeža, lovorovih listov, mete, muškatanega oreščka, bazilike, origana, popra, listnatega peteršilja, timijana, dresna, drena, mongolskega grahovca, navadne peruše, zelene hutinje, britanskega omana, granatnega jabolka (Shan in sod., 2007) in za različna rastlinska eterična olja (Oussalah in sod., 2007). V sami raziskavi Shan in sod. (2007), kljub temu da so za večino rastlinskih izvlečkov dokazali boljše protimikrobno delovanje izvlečkov na Gram pozitivne bakterije, pa so za tri rastlinske izvlečke iz navadne črnoglavke, nageljnovih žbic in izvlečka iz rastline *Terminalia bellirica* Roxb določili primerljivo delovanje na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije. Ti trije izvlečki so sicer imeli najboljše protimikrobno delovanje na bakterije vrste *S. aureus*, nato pa boljše protimikrobno delovanje na bakterije vrste *E. coli* in *S. anatum* v primerjavi z bakterijami vrste *B. cereus* in *L. monocytogenes*. Bili so mnenja, da ti trije izvlečki vsebujejo spojine, ki protimikrobno bolje delujejo na Gram negativne bakterije v primerjavi z ostalimi izvlečki.

Tudi druge raziskave so pokazale, da so na primer različni izvlečki iz grozdnih kožic (Katalinić in sod., 2010a), jabolčnih kožic (Alberto in sod., 2006), grozdnih pečk (Baydar in sod., 2006) delovali primerljivo na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije.

V poročilih lahko tudi zasledimo, da so nekatere nefenolne sestavine rastlinskih izvlečkov bolj učinkovite proti Gram negativnim bakterijam, na primer alilizotiocianat (AIT) in česnovno olje (Tiwari in sod., 2009).

2.10 *In vitro* METODE UGOTAVLJANJA BAKTERIJSKE OBČUTLJIVOSTI

Metode za *in vitro* določanje protimikrobnega delovanja delimo na difuzijske, dilucijske (razredčevalne) in metode spremljanja kinetike mikrobne rasti (Burt, 2004). Metode ne temeljijo na enakih principih, zato rezultat ni odvisen samo od izbranega mikroorganizma in topnosti izbrane testne snovi, temveč tudi od izbrane metode (Valgas in sod., 2007). Na končen rezultat pa tudi vplivajo: vrsta izvlečka, metode ekstrakcije protimikrobne snovi, volumen inokuluma, faza rasti, uporabljeno gojišče, pH gojišča, čas inkubacije in temperatura (Burt, 2004). Želimo, da je poskus hiter, enostaven, ponovljiv, poceni. Glede na to izberemo primeren postopek (Valgas in sod., 2007).



Slika 6: Metode določanja protimikrobnega delovanja (Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009).

2.10.1 Difuzijske metode

Metoda difuzije v trdem gojišču je v zadnjih 50 letih pomembna tehnika za ocenjevanje mikrobne občutljivosti za različne snovi s protimikrobnim delovanjem. Najbolj razširjena je za določanje protimikrobne aktivnosti antibiotikov. Metoda vključuje kopico različnih izvedb, kot so papirna metoda z diski (Bonev in sod., 2008), E-testi (komercialna izvedba s koncentracijskim gradientom protimikrobne snovi). Za izvedbo lahko uporabljamo komercialno pripravljene papirnate diske, ki jih prepojimo z določeno količino protimikrobne snovi in jih položimo na površino trdih gojišč, inokuliranih s preiskovalno kulturo. Namesto diskov lahko v gojišče z inokulirano preiskovalno kulturo naredimo luknjice in vanje damo določeno količino protimikrobne snovi. Protimikrobna snov nato v času inkubacije prehaja iz diska v trdo gojišče. Na površinah, kjer je protimikrobno sredstvo, nastanejo inhibicijske cone, brez mikrobne rasti. Metoda je cenovno ugodna in ne zahteva nobene posebne opreme. Metoda poleg tega omogoča določanje kvalitativnih rezultatov (občutljiv, vmesen, odporen). Prednosti metode sta tudi tehnična enostavnost in

ponovljivost (Woods in Washington, 1999). Na natančnost in ponovljivost metode difuzije v trdem gojišču pa vplivajo številni dejavniki, in sicer debelina in homogenost agarja, izbira ločnice, velikosti con inhibicije in prelomnih točk, temperatura. Določanje MIC po teh postopkih kaže primerljive rezultate z mikrodilucijsko metodo (Bonev in sod., 2008).

2.10.2 Dilucijske metode

Metode razredčevanja v tekočem ali trdnem gojišču se uporabljajo za kvantitativno določanje protimikrobnega delovanja. Protimikrobni učinek določamo z metodami v tekočih gojiščih (klasična metoda razredčevanja v tekočem gojišču ali izvedba v mikrotitrski ploščici, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v tekočem gojišču) ali v trdem (metoda razredčevanja v trdnem gojišču, kjer protimikrobno sredstvo razredčimo v trdnem gojišču). Metoda razredčevanja v trdnem gojišču je dobro standardizirana, zanesljiva tehnika za testiranje občutljivosti, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih sistemov. Prav tako je možno hkratno testiranje posameznih izolatov. V primerjavi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču je detekcija kontaminacije hitrejša. Največja slabost metode razredčevanja v trdnem gojišču je velika poraba materiala in časa za pripravo trdih gojišč, še posebej pri velikem številu različnih protimikrobnih sredstev (Woods in Washington, 1999; Klančnik in sod., 2009).

Namen metode razredčevanja v trdnem ali tekočem gojišču je določiti najnižjo koncentracijo protimikrobnega sredstva, ki inhibira rast testnih bakterij. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču porabimo veliko materiala, zato se za večino rutinskih testiranj priporoča izvedba metode v mikrotitrski ploščici. Prednost uporabe mikrotitrskih ploščic je tudi v možnosti, da si ploščice v naprej pripravimo in jih do uporabe shranimo na temperaturi 20 °C (Wiegand in sod., 2008; Klančnik in sod., 2009).

2.10.3 Metode spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja

Medtem ko zgoraj opisane metode testiranja protimikrobnega delovanja temeljijo na končni točki merjenja, pri metodi spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja merimo hitrost in/ali trajanje bakteriostatičnega ali bakteriocidnega učinka. Rezultate pridobimo z izrisom in analizo krivulj preživetja, oziroma odmiranja mikrobne kulture v odvisnosti od časa po dodatku protimikrobnega sredstva. Najpogosteje uporabljene metode za določanje teh učinkov so merjenje optične gostote in štetja živih celic z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (Burt, 2004).

2.10.4 Vrednotenje protimikrobnega delovanja

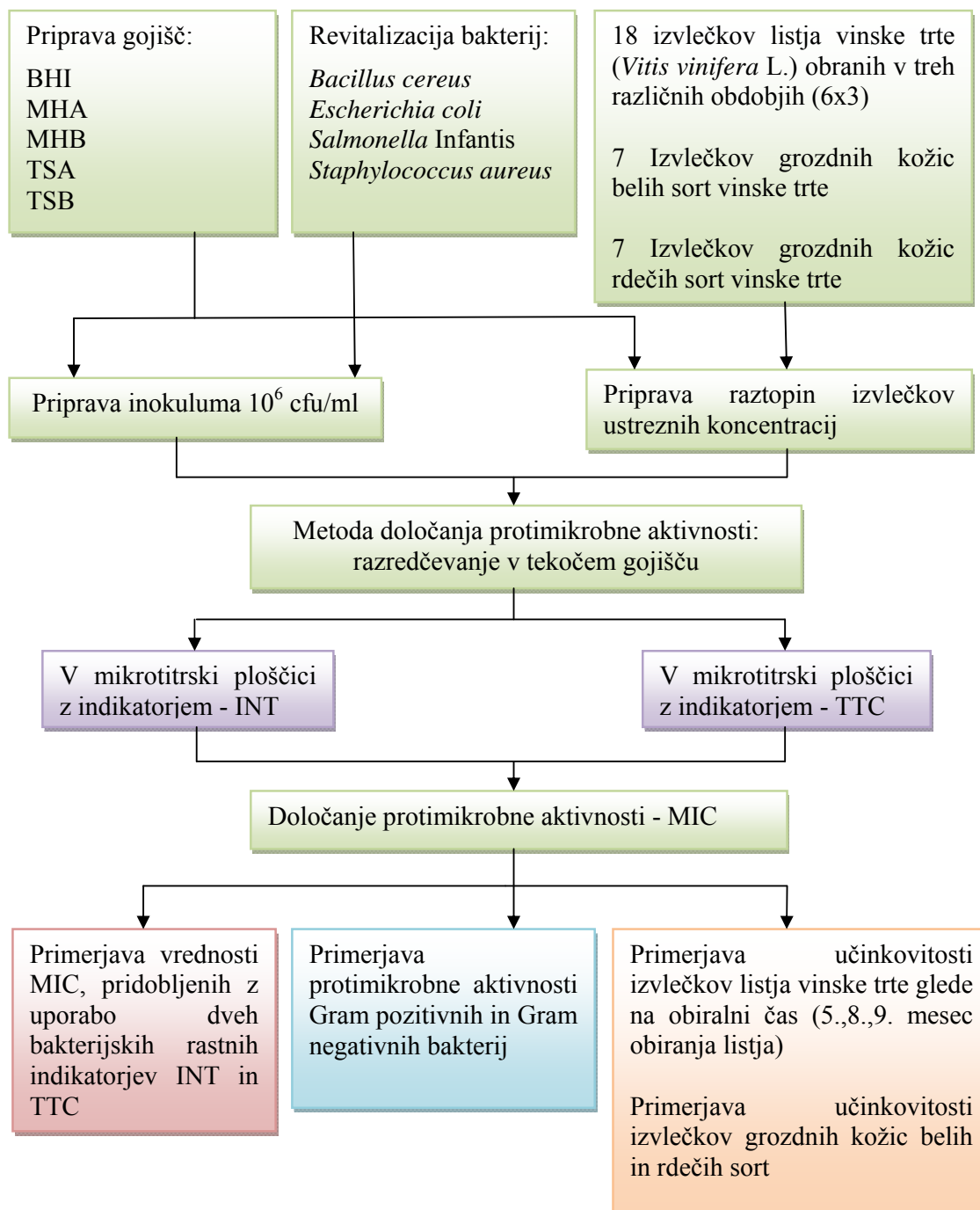
Tako kot metodika določitve protimikrobnega delovanja izvlečkov, začimb in eteričnih olj ni standardizirana, so tudi definicije protimikrobnih učinkovin različne, kar pomeni velikokrat problem pri primerjavi literaturnih podatkov. Za vrednotenje protimikrobnega delovanja se poleg minimalne inhibitorne koncentracija (MIC) uporabljajo še naslednji načini izražanja: minimalna baktericidna koncentracija (MBC), bakteriostatična in baktericidna koncentracija (Burt, 2004; Klančnik in sod., 2009).

Preglednica 4: Načini izražanja protimikrobnega delovanja (Burt, 2004).

	Definicija
Minimalna inhibitorna koncentracija	Najnižja koncentracija protimikrobne snovi, pri kateri se ohrani ali zmanjša začetna koncentracija mikrobne kulture. Najnižja koncentracija protimikrobne snovi za popolno inhibicijo mikrobne kulture v 48 urah. Najnižja koncentracija, pri kateri se zmanjša živost mikrobne kulture za več kot 90%.
Minimalna baktericidna koncentracija	Koncentracija protimikrobne snovi, ki uniči 99,9% ali več mikrobnih celic. Najnižja koncentracija, pri kateri ni rasti mikrobne kulture po subkultivaciji v svežem tekočem gojišču.
Bakteriostatična koncentracija	Najnižja koncentracija protimikrobne snovi, pri kateri bakterije ne rastejo v tekočem gojišču, vendar pa rastejo pri precepljanju na trdo gojišče.
Baktericidna koncentracija	Najnižja koncentracija protimikrobne snovi, pri kateri bakterije ne rastejo v tekočem gojišču in ne rastejo pri precepljanju na trdo gojišče.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 7: Hodogram poteka eksperimentalnega dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizmi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili seve bakterij *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Infantis in *Staphylococcus aureus*.

Preglednica 5: Bakterijski sevi

Oznaka seva	Vir seva
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	WSBC - 10530
<i>Escherichia coli</i> ŽM370	klinični izolat
<i>Salmonella</i> Infantis ŽM9	piščančje meso
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATCC 25923

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče BHI

Sestavine:

- ♦ 19,5 g BHI (Oxoid, CM225, Anglija)
- ♦ 500 mL dH₂O

Priprava:

19,5 g osnovnega medija smo natehtali v 1000 ml steklenico in ga raztopili v 500 ml dH₂O. Gojišče smo odpipetirali v epruvete po 4 ml in jih sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Tako pripravljena gojišča smo ohladili na sobno temperaturo in jih hranili v hladilniku pri 4 °C.

Uporaba:

Gojišče smo uporabili za revitalizacijo (stresanje) kulture *Salmonella* Infantis.

3.2.2.2 Tekoče gojišče MHB

Sestavine:

- ♦ 10,5 g MHB (Oxoid, CM0405, Anglija)
- ♦ 500 ml dH₂O

Priprava:

10,5 g osnovnega medija smo natehtali v 1000 ml steklenico in ga raztopili v 500 ml dH₂O. V epruvete smo odpipetirali 4 ml, 5 ml in 10 ml tako pripravljenega gojišča in ga preostanek prelili v 250 ml steklenico. Epruvete in steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Gojišče smo ohladili na sobno temperaturo in ga nato do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Uporaba:

Gojišče v epruvetah po 4 ml smo uporabili za revitalizacijo (stresanje) kultur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *E. coli*. Epruvete po 5 ml in 10 ml smo uporabili za

pripravo inokuluma kultur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Salmonella*. Tekoče gojišče, pripravljeno v steklenici, pa smo uporabili za pripravo potrebnih koncentracij izvlečka in kot gojišče pri mikrodiluciji z izvedbo v mikrotitrski ploščici, za testirane kulture *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Salmonella* Infantis.

3.2.2.3 Tekoče gojišče TSB

Sestavine:

- ♦ 15 g TSB (Oxoid, CM0129, Anglija)
- ♦ 500 mL dH₂O

Priprava:

15 g osnovnega medija smo natehtali v 1000 ml steklenico in ga raztopili v 500 ml dH₂O. Del gojišča smo odpipetirali po 5 ml in 10 ml v epruvete. Tako pripravljene epruvete in steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Gojišče smo ohladili na sobno temperaturo in ga nato hranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

Uporaba:

Gojišče v epruveh smo uporabili za pripravo inokuluma kulture *E. coli*. Gojišče v steklenici pa smo po aseptičnem prelitju v plastični lonček uporabili kot tekoče gojišče pri mikrodiluciji z izvedbo v mikrotitrski ploščici za testirano bakterijo *E. coli*.

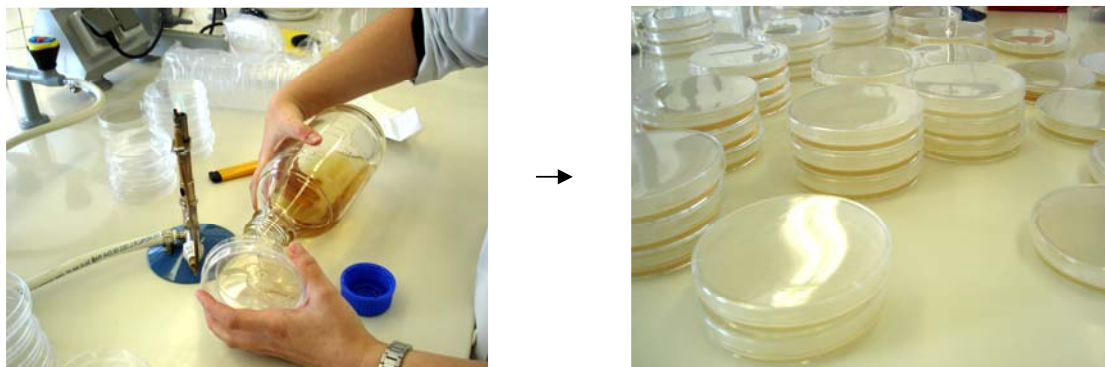
3.2.2.4 Trdno gojišče MHA

Sestavine:

- ♦ 19 g MHA (Oxoid, CM0337, Anglija)
- ♦ 500 mL dH₂O

Priprava:

19 g osnovnega medija smo natehtali v 1000 ml steklenico in ga raztopili v 500 ml dH₂O. Steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo hranili v inkubatorju, da se je ohladilo na 45 °C, nato smo ga aseptično vlili v sterilne petrijevke. Ohlajene petrijevke smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.



Slika 8: Prikaz razlivanja gojišča MHA v sterilne petrijevke

Uporaba:

Gojišče smo uporabili za precepljanje kultur *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Salmonella* Infantis s cepilno zanko kot obnavljanje kulture, da smo imeli vsak teden svežo in za določanje koncentracije celic v inokulumu.

3.2.2.5 Trdo gojišče TSA

Sestavine:

- ♦ 20 g TSA (Oxoid, CM0131, Anglija)
- ♦ 1,25 g K₂HPO₄
- ♦ 1,25 g D-(+)- glukoze (Kemika, 070557, Hrvaška)
- ♦ 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija)
- ♦ 500 mL dH₂O

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali osnovni medij TSA, K₂HPO₄, glukozo in kvasni ekstrakt ter sestavine raztopili v 500 ml dH₂O. Steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo hranili v inkubatorju, da se je ohladilo na 45 °C, nato pa smo ga aseptično vlili v sterilne petrijevke. Ohlajene petrijevke smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Uporaba:

Gojišče smo uporabili za precepljanje kulture *E. coli* s cepilno zanko kot obnavljanje kulture, da smo vsak teden imeli svežo in za določanje koncentracije celic v inokulumu.

3.2.2.6 Puferska raztopina PBS

Sestavine:

- ♦ Fosfatni pufer (PBS; Oxoid BR0014; Anlija) 1 tableta
- ♦ ddH₂O

Priprava:

V 1 l ddH₂O smo raztopili 10 tablet in sterilizirali v avtoklavu 10 minut pri 115 °C.

3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem

Preglednica 6: Izvlečki listov vinske trte, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu. Listje je bilo obrano v treh različnih mesecih, t.i. v mesecu maju (oznaka 5), mesecu avgustu (oznaka 8) in mesecu septembru (oznaka 9).

IZVLEČEK iz listov sorte	Skupne fenolne spojine mg GAE/ml	IZVLEČEK iz listov sorte	Skupne fenolne spojine mg GAE/ml	IZVLEČEK iz listov sorte	Skupne fenolne spojine mg GAE/ml
Lasin 5	22,10	Lasin 8	25,48	Lasin 9	32,46
Maraština 5	18,84	Maraština 8	25,15	Maraština 9	34,54
Merlot 5	24,92	Merlot 8	32,00	Merlot 9	45,35
Pošip 5	20,01	Pošip 8	27,33	Pošip 9	46,96
Syrah 5	20,98	Syrah 8	29,83	Syrah 9	45,79
Vranac 5	27,98	Vranac 8	35,00	Vranac 9	37,82

Preglednica 7: Izvlečki grozdnih kožic, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

IZVLEČEK iz grozdnih kožic sorte	Območje rasti	Barva sorte	Skupne fenolne spojine mg GAE/ml
Babić	Vrgorac	rdeča	3,34
Debit	Drniš	bela	2,01
Kuč	Vrgorac	bela	1,50
Kujundžuša	Imotski	bela	2,55
Lasin	Drniš	rdeča	1,34
Maraština	Drniš	bela	1,21
Medna	Vrgorac	bela	1,18
Merlot	Vrgorac	rdeča	3,49
Plavina	Vrgorac	rdeča	2,33
Rkaciteli	Vrgorac	bela	1,17
Rudenžuša	Imotski	rdeča	6,66
Trnjak	Imotski	rdeča	6,08
Vranac	Imotski	rdeča	5,24
Zlatarica	Vrgorac	bela	3,36

V preglednicah 3.3 in 3.4 je vsebnost skupnih fenolnih spojin izražena kot ekvivalent mg galne kisline (GAE) na ml izvlečka. Izvlečki so bili raztopljeni v 50 % metanolu.

Izvlečke so pripravili in kemijsko okarakterizirali na Fakulteti za kemijsko tehnologijo v Splitu leta 2008.

Priprava:

Izvlečke listja smo pripravili kot 32 % matično raztopino v gojišču MHB. Izvlečke grozdnih kožic pa smo pripravili kot 60 % in 40 % matično raztopino v gojišču MHB. To raztopino smo nato serijsko razredčevali.

♦ Galna kislina

Najprej smo si pripravili 8 % galno kislino tako, da smo odtehtali 0,08 g galne kisline v 1 ml dH₂O. Nato smo 0,5 ml mešanici dodali 1,5 ml gojišča MHB in tako dobili 2 % galno kislino v gojišču MHB.

♦ Metanol

Pripravili smo si 50 % raztopino metanola tako, da smo v 0,5 ml dH₂O odpipetirali 0,5 ml metanola. To raztopino smo vzeli kot izhodiščno raztopino 100 % in postopek priprave nadaljevali enako kot za pripravo izvlečkov iz preglednice 3-4.

3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- ♦ bakterijski rastni indikator: 2,3,5 trifenil-tetrazolium klorid = TTC (Biolife, Italija)
- ♦ bakterijski rastni indikator: p-iodo-nitro-tetrazolium violet = INT (Sigma, Švica)
- ♦ absolutni etanol (Merck, Nemčija)
- ♦ destilirana voda
- ♦ McFarland standard (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francija)

3.2.5 Laboratorijska oprema

- ♦ avtoklav (tip 500x700, Sutjeska, Jugoslavija)
- ♦ avtoklav (tip 1-61-137, Sutjeska, Jugoslavija)
- ♦ digitalna tehtnica (PB1502-S, Mettler-toledo, Švica)
- ♦ hladilnik (LAE, Slovenija)
- ♦ hladilnik (LTH, Slovenija)
- ♦ inkubator (I-115C, Kambič, Slovenija)
- ♦ inkubator (SP190, Kambič, Slovenija)
- ♦ mikrovalovna pečica (Sanyo, Japonska)
- ♦ omara za sušenje steklovine (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- ♦ plinski gorilnik
- ♦ stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija)
- ♦ vrtinčnik (Yellowline, TTS2, Slovenija)
- ♦ zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra PIO, Slovenija)

Poleg navedenih aparaturno smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo:

avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija), cepilne zanke, epruvete, laboratorijske steklenice (250ml, 500 ml, 1000 ml, Duran), merilnik časa (Eppendorf, Nemčija), merilni valj (Plastibrand, Nemčija), mikrodilucijske ploščice, nastavke za pipete 10 µl, 100 µl in 1000 µl (Eppendorf, Nemčija; Plastibrand, Nemčija), petrijeve plošče (Labor tehnika Golias, Slovenija), plastične lončke (Labor tehnika Golias Slovenija), stojala in vrečke za smeti, pipetor (Eppendorf easypet, Nemčija), rokavice.

3.3 METODE

3.3.1 Priprava in ohranjanje kultur

Kulture smo enkrat tedensko aseptično precepljali na sterilne plošče s trdim gojiščem, da smo ohranili čisto kulturo in čim večjo živost celic. *B. cereus*, *S. Infantis* in *S. aureus* smo precepili na gojišče MHA, *E. coli* pa na gojišče TSA. Plošče smo po 24 h na 37 °C uporabili za pripravo inokuluma, nato smo jih hranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnje uporabe (Klančnik in sod., 2009).

3.3.2 Priprava inokuluma

Po inkubaciji (opisano v poglavju 3.3.1) smo preverili rast in prisotnost značilnih kultur. Po eno kolonijo ustrezne kulture smo s cepilno zanko prenesli v 4 ml tekočega gojišča BHI (*S. Infantis*), MHB (*B. cereus*, *S. aureus*) in TSB (*E. coli*), ki smo ga predhodno pripravili v epruветah. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalu in tako pripravljene čiste kulture v tekočem gojišču čez noč kultivirali na stresalniku pri 37 °C in 100 obr./min. Predvidevali smo, da se je *S. Infantis* namnožila do koncentracije 10⁹ cfu/ml, ostale tri bakterije pa do koncentracije 10⁸ cfu/ml. Zato smo iz gojišča BHI odpipetirali 0,5 ml kulture v 4,5 ml PBS in *S. Infantis* razredčili do koncentracije 10⁸ cfu/ml. Za pripravo inokuluma smo iz vseh epruветk odpipetirali 0,15 ml kulture, za katere smo predvidevali, da so se namnožile do koncentracije 10⁸ cfu/ml, in jih razredčili v 10 ml MHB ali TSB gojišča, tako je končna koncentracija celic v inokulumu znašala 10⁶ cfu/ml (Klančnik in sod. 2009; Klančnik in sod., 2010; Katalinić in sod., 2010a; Krznar 2010).

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Za določanje števila bakterij smo uporabili dve metodi, in sicer metodo štetja kolonij na trdem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003), kjer smo rezultate preverili naslednji dan in z določanjem koncentracije celic na osnovi motnosti z McFarland standardi, kjer smo rezultate lahko odčitali takoj (Valgas in sod., 2007).

3.3.3.1 Metoda štetja kolonij na trdem gojišču

Iz epruветk, ki smo jih pripravili kot inokulum (opisano v poglavju 3.3.2), smo iz bujona MHB ali TSB aseptično odpipetirali 50 µl ustrezne kulture v 450 µl PBS. Vsebino smo premešali na vrtničnem mešalniku. Postopek razredčevanja vzorca smo ponavljali do koncentracije ~ 10² in 10¹ cfu/ml vzorca. Trdo gojišče MHA in TSA smo razdelili na 8 enakih delov in na en razdelek odpipetirali 3x po 10 µl razredčenega vzorčka, za vsak mikroorganizem, da smo dobili tri paralelke, ter ga s tako nacepitvijo dvakrat razredčili. Počakali smo, da se je tekočina vpila v gojišče in nato petrijevke inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C. Pri kulturi *B. cereus* smo petrijevko pustili 24 ur na sobni temperaturi in tako upočasnili rast kolonij ter si s tem olajšali štetje. Po inkubaciji smo prešteli zrastle kolonije in izračunali koncentracijo bakterij (N) pri posamezni razredčitvi. Prešteli smo samo kolonije na razdelku, kjer je zrastle od 1 do 25 kolonij in za te uporabili enačbo 3-1.

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) \quad \dots (1)$$

Legenda: C: seštevek vseh kolonij, na vsakem števnem razdelku, preštejemo vse kolonije n_1 : število števnih paralelk na prvem razdelku, pri prvi razredčitvi; n_2 : število števnih paralelk na drugem razdelku, pri drugi razredčitvi; R: faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi; N: koncentracija bakterij (cfu/ml)

3.3.3.2 Določanje koncentracije celic na osnovi motnosti

Motnost oz. bistrost epruvetk, ki smo jih pripravili kot inokulum (opisano v poglavju 3.3.2), smo primerjali z že v naprej pripravljenimi McFarland standardi, ki na osnovi motnosti določajo koncentracijo celic v epruvetki (Valgas in sod., 2007).

3.3.4 Mikrodilucija v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z bakterijskim rastnim indikatorjem INT

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici smo v sterilno mikrotitrsko ploščico v prvo vrsto aseptično odpipetirali 100 μ l začetne koncentracije izvlečka, v vse ostale luknjice v kolonah pa 50 μ l sterilnega gojišča MHB ali TSB, odvisno na katere mikroorganizme smo testirali protimikrobno delovanje. Nato smo iz prve vrste vdolbin odpipetirali 50 μ l izvlečka in ga prenesli v drugo vrsto vdolbin ter s pipeto 8x premešali vsebino v luknjici. Tako smo nadaljevali serijske razredčitve do konca kolone, kjer smo v zadnji vrsti vdolbin po osem-kratnem mešanju vsebine 50 μ l vsebine zavrgli. V vse luknjice smo na koncu dodali 50 μ l pripravljenega inokuluma posamezne kulture. Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija fenolnih spojin v našem izvlečku zmanjševala za polovico po koloni navzdol.

Pripravili smo si tudi kontrole tako, da smo v eno luknjico odpipetirali 100 μ l gojišča MHB ali TSB; v drugo luknjico 50 μ l gojišča in 50 μ l pripravljenega izvlečka; v tretjo pa 50 μ l gojišča in 50 μ l inokuluma. Nato smo mikrotitrsko ploščico prekrili s pokrovom in jih dali za 20 s na mešalo za mikrotitrsko ploščico, kjer se je vsebina temeljito premešala. Ploščice smo inkubirali 24 ur pri 37 °C.

Po inkubaciji smo v vsako luknjico odpipetirali 10 μ l bakterijskega ravnega indikatorja INT. Ker je INT občutljiv na svetlobo, smo ploščice zavili v alufolijo, preden smo jih dali inkubirati še za 30 min na 37 °C. V temnem prostoru se je barva lepo razvila. Odčitati smo rezultate. Luknjice, ki so bile obarvane temno rdeče, so predstavljale negativen rezultat, torej izvleček ni imel vpliva na zmanjšano rast mikroorganizma. Prva neobarvana luknjica je predstavljala MIC, torej minimalno inhibitorno koncentracijo, pri kateri je naša koncentracija izvlečka inhibirala rast testnega mikroorganizma (Eloff, 1998; Valgas; 2007; Klančnik in sod., 2009; Klančnik in sod., 2010).

3.3.5 Mikrodilucija v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z bakterijskim rastnim indikatorjem TTC

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici smo v sterilno mikrotitrsko ploščico v prvo vrsto aseptično odpipetirali 100 μ l začetne koncentracije izvlečka, v vse ostale luknjice v kolonah pa 50 μ l sterilnega gojišča MHB ali TSB, odvisno na katere mikroorganizme smo testirali protimikrobno delovanje. Nato smo

iz prve vrste vdolbin odpipetirali 50 μ l izvlečka in ga prenesli v drugo vrsto vdolbin ter s pipeto 8x premešali vsebino v luknjici. Tako smo nadaljevali serijske razredčitve do konca kolone, kjer smo v zadnji vrsti vdolbin po osem-kratnem mešanju vsebine 50 μ l vsebine zavrgli. V vse luknjice smo na koncu dodali 50 μ l pripravljene inokuluma posamezne kulture. Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija fenolnih spojin v našem izvlečku zmanjševala za polovico po koloni navzdol.

Pripravili smo si tudi kontrole, in sicer v eno luknjico smo odpipetirali 100 μ l gojišča MHB ali TSB; v drugo luknjico 50 μ l gojišča in 50 μ l pripravljene izvlečka; v tretjo pa 50 μ l gojišča in 50 μ l inokuluma. Nato smo mikrotitrne ploščice prekrili s pokrovom in jih dali za 20 s na mešalo za mikrotitrne ploščice, kjer se je vsebina temeljito premešala. Ploščice smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo v vsako luknjico v temnem prostoru odpipetirali 1 μ l bakterijskega rastnega indikatorja TTC in dali ploščice inkubirati še za 30 min na 37 °C v inkubator, da se je barva lepo razvila.

Odčitali smo rezultate. Luknjice, ki so bile obarvane roza, so predstavljale negativen rezultat, torej izvleček ni imel vpliva na zmanjšano rast mikroorganizma. Prva neobarvana luknjica je predstavljala MIC, torej minimalno inhibitorno koncentracijo, pri kateri je naša koncentracija izvlečka inhibirala rast testnega mikroorganizma (Eloff, 1998; Klančnik in sod., 2009; Klančnik in sod., 2010).

3.3.6 Statistična obdelava podatkov

Rezultate določanja protimikrobnega učinka izvlečkov listov vinske trte in izvlečkov grozdnih kožic različnih sort vinske trte, pridobljenih z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, smo pripravili in uredili v računalniškem programu Microsoft Office Excel 2007. Tako urejene podatke smo statistično analizirali s Studentovim T testom (Valgas in sod., 2007; Dani in sod., 2010; Katalinić in sod. 2010a).

Za primerjavo rezultatov smo uporabili tri modele, ki so opisani v nadaljevanju in so bili izračunani z uporabo T testa pri 5 % tveganju (Katalinić in sod., 2010a).

◇ Statistični model za primerjavo MIC, določenih pri bakterijah z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču, izvedeni v mikrotitrski ploščici, je vključeval vpliv obiralnega časa (5., 8., 9., mesec obiranja listja) za pripravo izvlečkov.

$$Y_{ij} = \mu + E_i + e_i \quad \dots (2)$$

Legenda: Y_{ij} : opazovanje; μ : povprečna vrednost; E_i : vpliv vegetativne dobe ($i = 1$: peti mesec; $i = 2$: osmi mesec; $i = 3$: deveti mesec); e_i : napaka

◇ Statistični model za primerjavo MIC, določenih pri bakterijah z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču, izvedeni v mikrotitrski ploščici, je vključeval vpliv vrste bakterij.

$$Y_{ij} = \mu + X_i + e_i \quad \dots (3)$$

Legenda: Y_{ij} : opazovanje; μ : povprečna vrednost; X_i : vpliv vrste bakterij ($i = 1$: *S. aureus*; $i = 2$: *B. cereus*; $i = 3$: *S. Infantis*; $i = 4$: *E.coli*); e_i : napaka

◇ Statistični model za primerjavo MIC, določenih pri bakterijah z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču, izvedeni v mikrotitrski ploščici, je vključeval vrsto izvlečka (izvleček bele sorte vinske trte, izvleček rdeče sorte vinske trte).

$$Y_{ij} = \mu + Z_i + e_i \quad \dots (4)$$

Legenda: Y_{ij} : opazovanje; μ : povprečna vrednost; Z_i : vpliv vrste bakterij ($i = 1$: izvleček grozdnice, pridobljen iz belih sort vinske trte; $i = 2$: izvleček grozdnice, pridobljen iz rdečih sort vinske trte); e_i : napaka

4 REZULTATI

Bakterijske kulture smo izpostavili določeni koncentraciji izvlečka in iskali minimalno inhibitorno koncentracijo, torej najnižjo, ki bo zaustavila rast mikroorganizma. Z eksperimenti smo hoteli potrditi domnevo, da je aktivnost izvlečkov odvisna od vsebnosti skupnih fenolnih spojin in da imajo fenolni izvlečki boljši protimikrobni učinek na Gram pozitivne bakterije kot pa na Gram negativne bakterije. Poleg tega pa smo želeli ugotoviti, ali ima čas obiranja listov v različnem vegetacijskem ciklusu vinske trte vpliv na protimikrobni učinek izvlečkov listja. Zanimala pa nas je tudi razlika v učinkovitosti izvlečkov iz grozdnih kožic rdečih in belih sort grozdja.

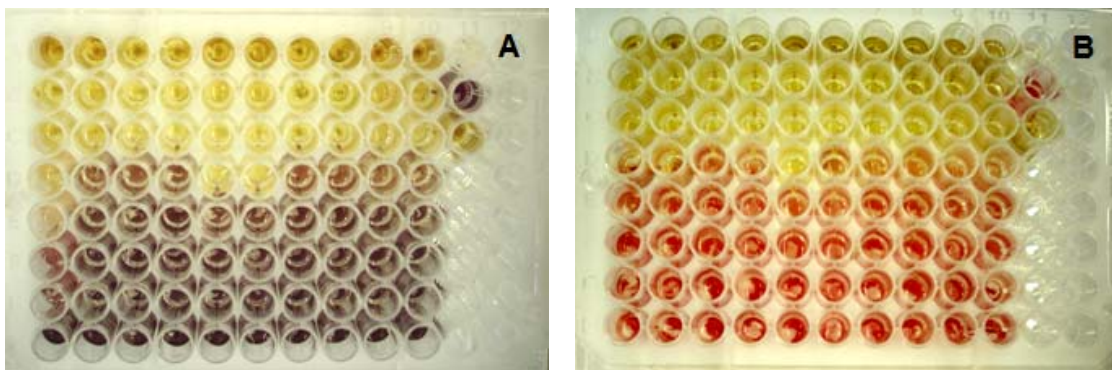
Predstavljeni so rezultati, ki so bili pridobljeni na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil v času od 1. oktobra 2008 do 12. januarja 2009.

4.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE FENOLNIH IZVLEČKOV IZ LISTOV VINSKE TRTE

4.1.1 Primerjava MIC izvlečkov, določenih z mikrodilucijo v tekočem gojišču z dvema različnima indikatorjema INT in TTC

V prvem delu eksperimenta smo izvlečkom listja šestih različnih sort vinske trte, kjer so listi za pripravo izvlečka bili obrani v treh različnih mesecih, določili protimikrobno učinkovitost z metodo mikrodilucije, izvedene v mikrotitrski ploščici. Najprej smo metodo izvedli z dvema različnima bakterijskima rastnima indikatorjema INT in TTC na bakteriji *S. aureus* in indikatorja primerjali med seboj.

Na sliki 9 in v preglednicah 8 in 9 so prikazani rezultati za pet naključnih vzorcev, analiziranih v dveh paralelkah.



Slika 9: Prikaz rezultatov mikrodilucije v mikrotitrski ploščici za pet testiranih izvlečkov v dveh paralelkah na bakterijo *S. aureus*; A: uporabljen bakterijski rastni indikator INT, B: uporabljen bakterijski rastni indikator TTC.

Slika 9 in preglednici 8 in 9 prikazujejo, kako smo razredčevali vzorec v razponu od 16 % do 0,125 %. Luknjice, ki so se obarvale rumeno, smo označili z oznako -, kar pomeni, da je izvleček deloval inhibitorno na testni mikroorganizem, oznako + pa smo uporabili tam,

kjer je barvilo obarvalo luknjice, izvleček ni imel zadostnega inhibitornega učinka. Iskana MIC je pri tisti koncentraciji, kjer zabeležimo prvi -. Eksperiment smo izvedli v dveh paralelkah in rezultate zabeležili v preglednicah.

Preglednica 8: Primer odčitavanja dobljenih rezultatov za sliko A.

Razredčevanje %	MER 8	MER 8	POŠ 8	POŠ 8	SYR 8	SYR 8	VRA 8	VRA 8	LAS 9	LAS 9	Kontrola
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bujon
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pozitivna
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativna
2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Legenda: **8,9**: mesec, v katerem so bili listi različnih sort obrani za pridobitev izvlečka; **MER**: izvleček iz listja vinske trte sorte Merlot; **POŠ**: izvleček iz listja vinske trte sorte Pošip; **SYR**: izvleček iz listja vinske trte sorte Syrah; **VRA**: izvleček iz listja vinske trte sorte Vranac; **LAS**: izvleček iz listja vinske trte sorte Lasin

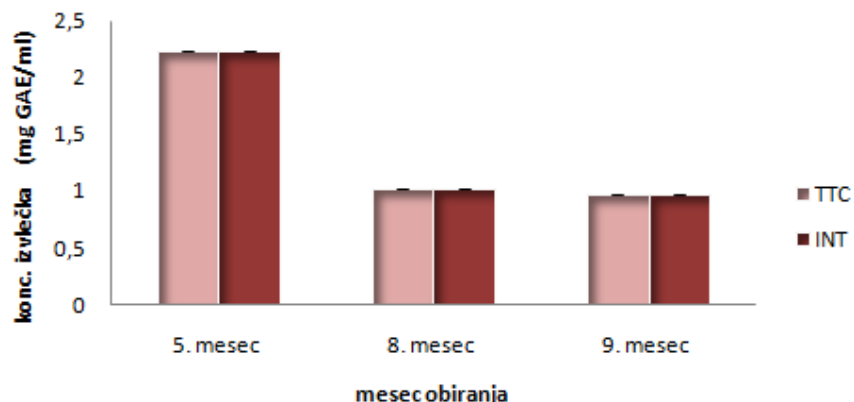
Preglednica 9: Primer odčitavanja dobljenih rezultatov za sliko B.

Razredčevanje %	MER 8	MER 8	POŠ 8	POŠ 8	SYR 8	SYR 8	VRA 8	VRA 8	LAS 9	LAS 9	Kontrola
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bujon
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pozitivna
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativna
2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Legenda: **8,9**: mesec, v katerem so bili listi različnih sort obrani za pridobitev izvlečka; **MER**: izvleček iz listja vinske trte sorte Merlot; **POŠ**: izvleček iz listja vinske trte sorte Pošip; **SYR**: izvleček iz listja vinske trte sorte Syrah; **VRA**: izvleček iz listja vinske trte sorte Vranac; **LAS**: izvleček iz listja vinske trte sorte Lasin

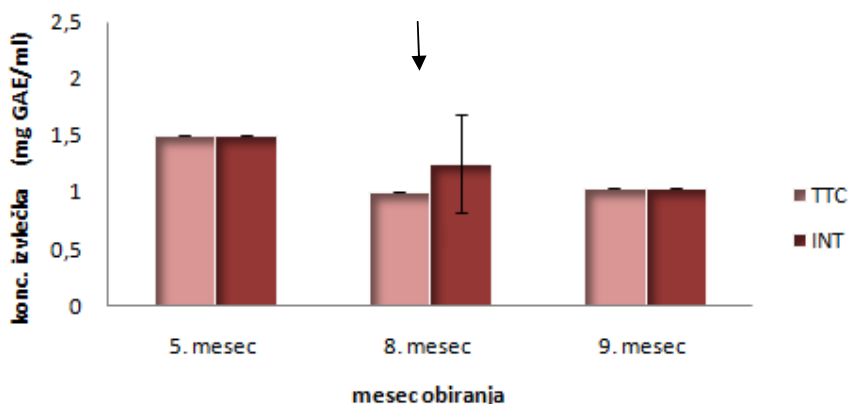
Povprečne vrednosti MIC, dobljene v %, smo preračunali v mg GAE/ml (glej priloge). Za lažjo primerjavo smo vse rezultate predstavili slikovno.

Vrednost MIC smo definirali kot najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi, ki inhibira rast bakterij na gojišču MHB z dodano protimikrobno snovjo po 24 urni inkubaciji na 37 °C.



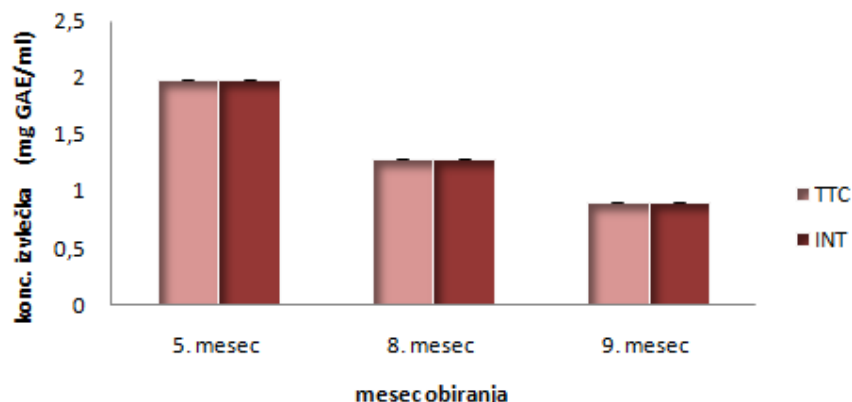
Slika 10: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Lasin. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge).

Iz slike 10 je razvidno, da so izvlečki iz listja vinske trte sorte Lasin delovali inhibitorno pri enakih koncentracijah ne glede na to, kateri indikator smo uporabili pri izvedbi metode.



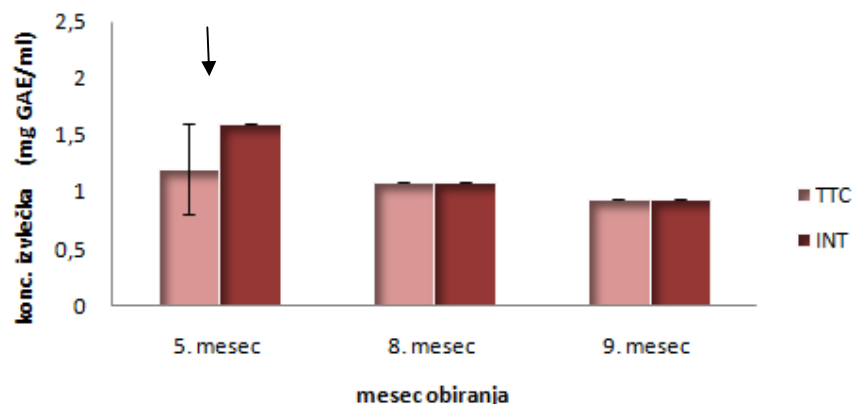
Slika 11: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Maraština. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). \downarrow = vrednosti MIC določeni z indikatorjema INT in TTC se razlikujeta.

Pri določanju MIC izvlečkov iz listja vinske trte sorte Maraština je prišlo do majhnega odklona pri izvlečkih, ko so bili listi obrani v osmem mesecu, saj smo pri uporabi indikatorja TTC dobili manjšo vrednost MIC kot pri uporabi indikatorja INT (slika 11). Pri izvlečkih, ko so bili listi obrani v petem in devetem mesecu, pa smo kot rezultat dobili enake vrednosti MIC pri uporabi obeh indikatorjev.



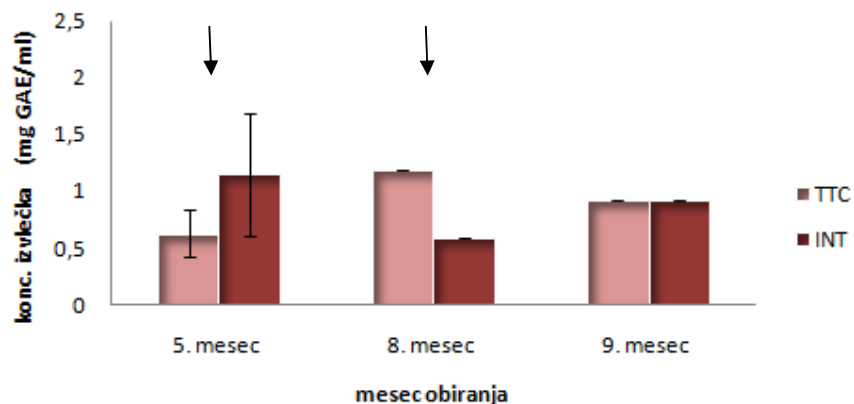
Slika 12: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Merlot. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge).

Izvlečki iz listja vinske trte sorte Merlot so delovali inhibitorno pri enakih koncentracijah ne glede na to, kateri indikator smo uporabili pri izvedbi metode (slika 12).



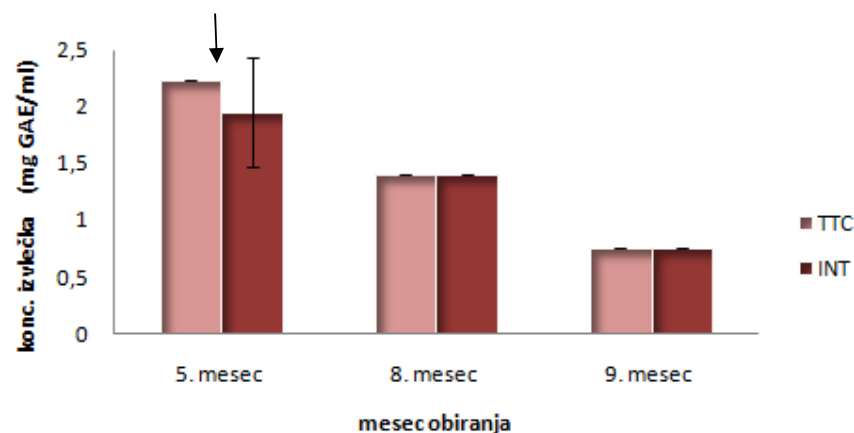
Slika 13: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Pošip. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). \downarrow = vrednosti MIC določeni z indikatorjema INT in TTC se razlikujeta.

Pri določanju MIC izvlečkov iz listja vinske trte sorte Pošip je prišlo do majhnega odklona pri izvlečku, za katerega so bili listi obrani v petem mesecu, ker smo pri uporabi indikatorja TTC dobili manjšo MIC kot pri uporabi indikatorja INT (slika 13). Pri izvlečkih, za katere so bili listi obrani v osmem in devetem mesecu, pa smo kot rezultat dobili enake vrednosti MIC pri uporabi obeh indikatorjev.



Slika 14: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Syrah. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). \downarrow = vrednosti MIC določeni z indikatorjema INT in TTC se razlikujeta.

Iz slike je razvidno, da smo pri določanju MIC izvlečkov iz listja vinske trte sorte Syrah dobili za izvleček, za pripravo katerega so bili listi obrani v petem mesecu, pri uporabi bakterijskega barvnega indikatorja TTC manjšo MIC kot pri uporabi indikatorja INT (slika 14). Pri izvlečku za katerega so bili listi obrani v osmem mesecu pa ravno obratno. Za izvleček, za katerega je bil rastlinski vir obran v devetem mesecu, so rezultati enaki pri uporabi obeh indikatorjev.



Slika 15: Primerjava protimikrobnega delovanja, določenega z uporabo indikatorja TTC (roza) in INT (vijolična), izvlečkov iz listja vinske trte sorte Vranac. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Testni mikroorganizem je *S. aureus*. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). \downarrow = vrednosti MIC določeni z indikatorjema INT in TTC se razlikujeta.

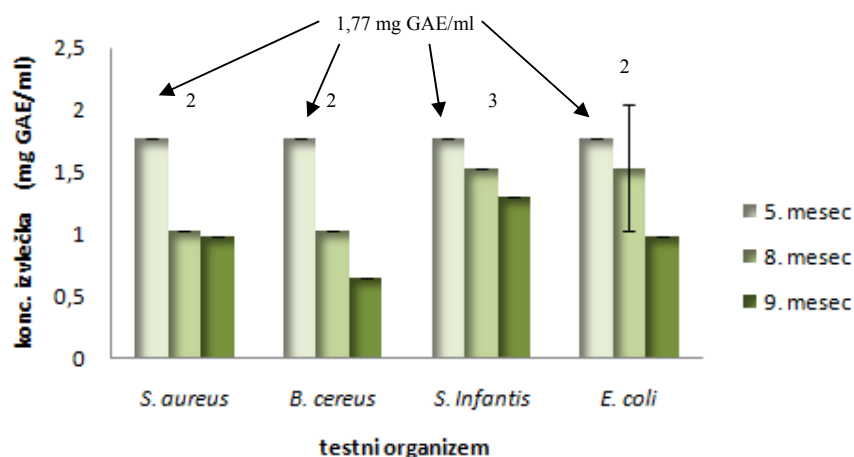
Izvlečki iz listja vinske trte sorte Vranac so delovali inhibitorno pri enakih koncentracijah ne glede na to, kateri indikator smo uporabili pri izvedbi metode, razen pri izvlečku, pridobljenem iz listja, obranega v petem mesecu (slika 15).

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da dobljene MIC niso odvisne od uporabe bakterijskega rastnega indikatorja, saj smo pri 72 % rezultatov (72 % predstavljajo vrednosti MIC na slikah 10 - 15, kjer ni puščic) dobili enak rezultat pri uporabi obeh indikatorjev. Pri preostalih 28 % pa je 40 % rezultatov (kar prikazujeta sliki 14 in 15, kjer so puščice) imelo pri uporabi indikatorja INT boljšo MIC, 60 % pa boljšo učinkovitost pri uporabi indikatorja TTC (kar prikazujejo slike 11,13 in 14, kjer so puščice). V povprečju vrednosti MIC določene z indikatorjem INT za vse izvlečke znašajo 1,23 mg GAE/ml, povprečne vrednosti MIC določene z indikatorjem TTC pa 1,24 mg GAE/ml. Ker smo ugotovili, da so rezultati, pridobljeni z različnima bakterijskima barvnima indikatorjema primerljivi, smo za nadaljni poskus uporabili samo en indikator, in sicer INT. Pri uporabi indikatorja INT smo lažje odčitali rezultate, ker je temnejše barve, in smo vrednosti MIC lažje določili (slika 9).

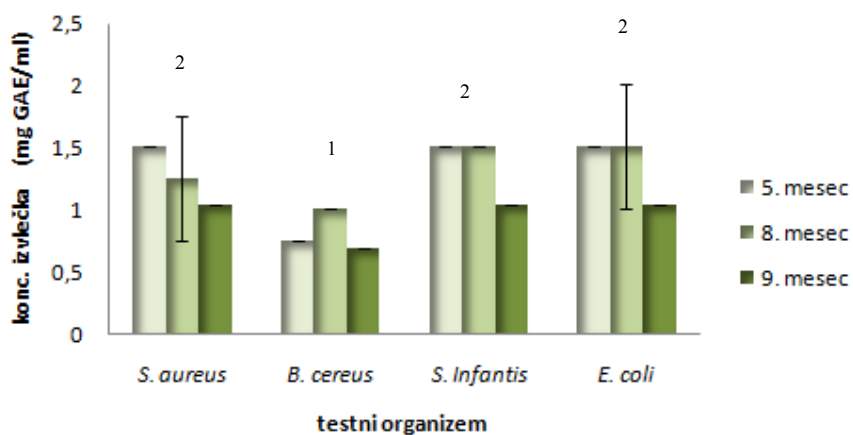
4.1.2 MIC izvlečkov, testiranih na štiri patogene bakterije z mikrodilucijo v tekočem gojišču z rastnim indikatorjem INT

Na podlagi rezultatov v točki 4.1.1 smo se odločili, da za nadaljno izvedbo mikrodilucije v tekočem gojišču uporabimo bakterijski rastni indikator INT in izvlečkom listja določimo še protimikrobno učinkovitost testirano na bakterije: *B. cereus*, *E. coli* in *S. Infantis*. S tem eksperimentom smo hoteli dokazati, da imajo fenolni izvlečki boljši protimikrobni učinek na Gram pozitivne bakterije *B. cereus* in *S. aureus* ter slabše protimikrobno delovanje na Gram negativne bakterije *E. coli* in *S. Infantis*. Preverili smo še tudi, ali ima različen čas obiranja rastlinskega vira za pripravo le tega v izvleček vpliv na protimikroben učinek.

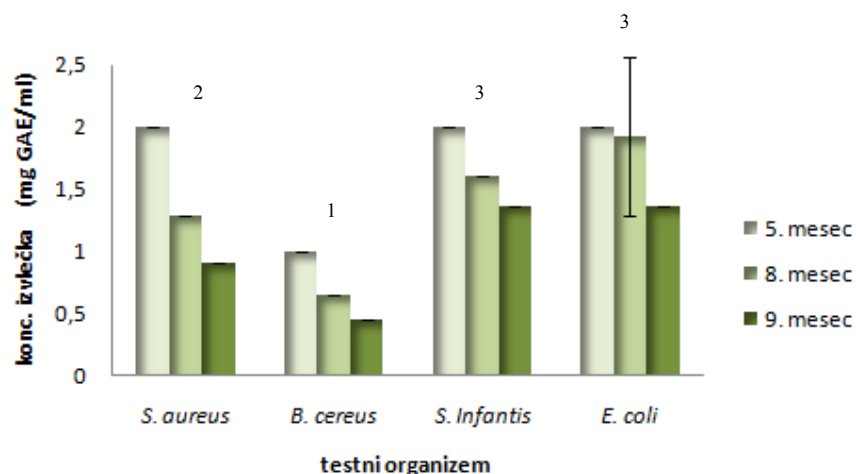
Na slikah 16 - 21 so podani rezultati protimikrobnega delovanja izvlečkov listja iz naslednjih sort vinske trte: Lasin, Maraština, Merlot, Pošip, Syrah, Vranac, kjer so bili listi za pripravo v izvleček obrani v treh različnih razvojnih fazah rastline oz. v treh različnih mesecih. Listi so bili obrani maja (peti mesec), ko je vinska trta v fazi rasti mladice, nato avgusta (osmi mesec) in septembra (deveti mesec), ko je vinska trta v fazi zorenja grozdnih jagod in lesa.



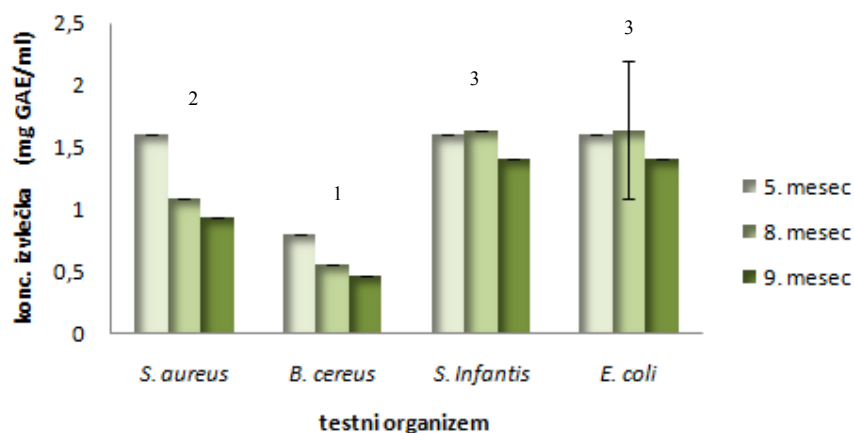
Slika 16: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Lasin, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečki so pridobljeni iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)



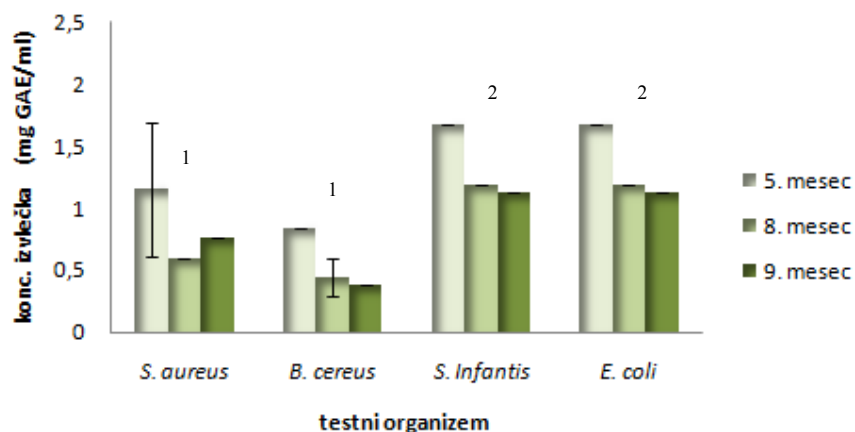
Slika 17: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Maraština, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečki so pridobljeni iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)



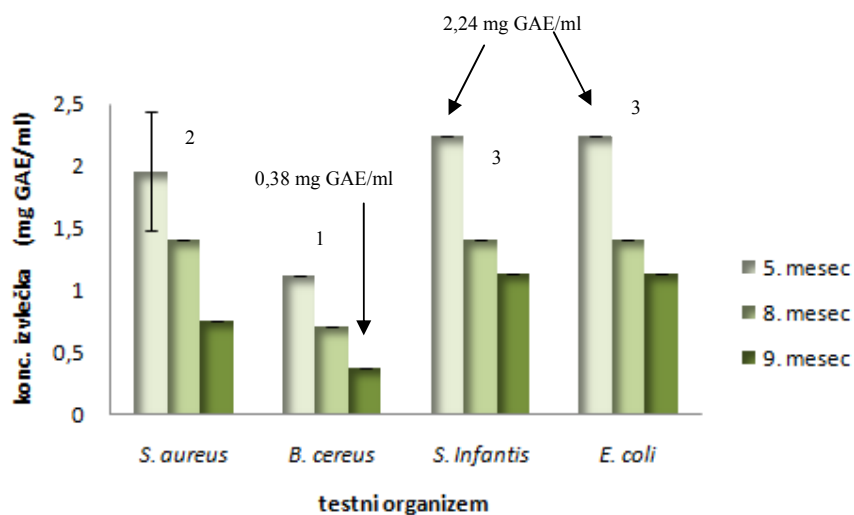
Slika 18: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Merlot, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečki so pridobljeni iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)



Slika 19: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Pošip, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečki so pridobljeni iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)



Slika 20: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Syrah, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečki so pridobljeni iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)



Slika 21: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov iz listja vinske trte sorte Vranac, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Izvlečke smo pridobili iz listja, ki so bili obrani v treh različnih mesecih. Vrednosti MIC so podane v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ali štirih ponovitev \pm SD (glej priloge). (občutljivost mikroorganizmov na testirane izvlečke; 1 = občutljivost; 2 = srednja občutljivost; 3 = odpornost)

Izvlečki listja vinske trte so imeli na vse izbrane vrste patogenih bakterij protimikroben učinek. Najnižjo MIC smo določili izvlečku iz listja sorte Vranac (slika 21) in znaša 0,38 mg GAE/ml, najvišjo vrednost MIC pa smo tudi določili izvlečku iz listja sorte Vranac in znaša 2,24 mg GAE/ml (slika 21). Vrednosti MIC za izvlečke iz listja se torej gibljejo med 0,38 – 2,24 mg GAE/ml.

4.1.2.1 Protimikrobno delovanje izvlečkov iz listov vinske trte (*Vitis vinifera* L.) glede na vrsto testne bakterije

Za izvlečke iz listja sorte Lasin, ko so bili listi obrani v petem mesecu, smo dobili kot rezultat enake MIC za vse testirane bakterije (slika 16). Za izvlečke sorte Lasin, lahko glede na rezultate podane na sliki 16 povzamemo, da izvlečki delujejo primerljivo na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus*, *S. aureus* in Gram negativne bakterije vrste *E. coli*, ter slabše na bakterije vrste *S. Infantis*.

Na sliki 17 vidimo, da izvlečki sorte Maraština delujejo bolje na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus*, ter primerljivo na bakterije *S. aureus*, *S. Infantis* in *E. coli*.

Iz slik 18 - 21 pa smo za izvlečke iz listja sort Merlot, Pošip, Syrah in Vranac ugotovili, da so imeli najboljši protimikroben učinek na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus*, nato na Gram pozitivne bakterije vrste *S. aureus* ter slabše delovanje na Gram negativne bakterije. Pri bakterijah vrste *S. infantis* in *E. coli* smo dobili večinoma enake MIC.

Z gotovostjo 95 % lahko trdimo, da imajo izvlečki, testirani na Gram negativne bakterije višjo MIC, kot pri testiranju na Gram pozitivne bakterije. Torej je statistično značilno, da izvlečki delujejo bolje na Gram pozitivne bakterije kot na Gram negativne bakterije.

Z gotovostjo 95 % lahko trdimo, da so MIC, določene za bakterije vrste *S. aureus*, višje kot pri bakterijah vrste *B. cereus*. Iz tega sledi, da imajo izvlečki, če primerjamo Gram pozitivne bakterije med seboj, boljši protimikroben učinek na bakterije vrste *B. cereus*.

Z gotovostjo 95 % lahko trdimo, da so MIC, določene za bakterije vrste *S. Infantis*, enake kot pri bakterijah vrste *E. coli*.

4.1.2.2 Vpliv vegetativne dobe na protimikrobno delovanje izvlečkov iz listov vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

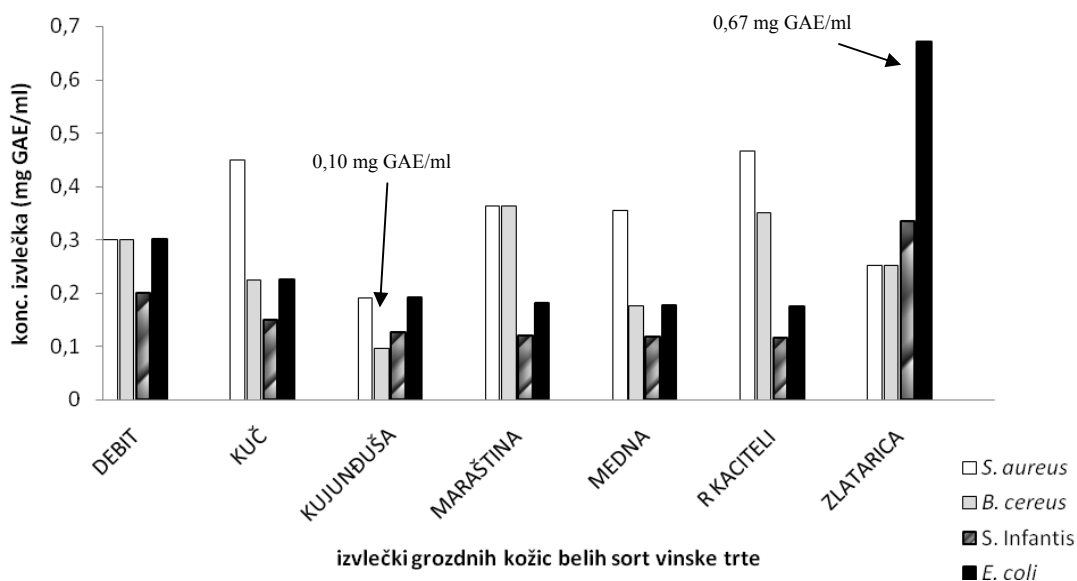
Vrednosti MIC izvlečkov iz listja vinske trte, ko so bili listi za pripravo izvlečka obrani v devetem mesecu, so v povprečju znašale 1,01 mg GAE/ml. Za izvlečke iz listov, ko so le ti bili obrani v osmem mesecu, so povprečne vrednosti MIC znašale 1,23 mg GAE/ml in za izvlečke, ko so bili listi za pripravo izvlečka obrani v petem mesecu, so povprečne vrednosti MIC znašale 1,57 mg GAE/ml. Najslabše inhibitorno delovanje so torej imeli izvlečki, za katere so listje obrali v petem mesecu, nato izvlečki, za katere so liste obrali v osmem mesecu, ter najboljšo protimikrobno aktivnost izvlečki, za katere so listi bili obrani v devetem mesecu. Do odklona pride pri testiranem izvlečku iz sorte vinske trte Maraština, kjer smo pri testnem mikroorganizmu *B. cereus* določili boljšo protimikrobno aktivnost izvlečka, za katerega so bili listi obrani v petem mesecu, kot pa izvleček, za katerega so bili listi obrani v osmem mesecu (slika 17). Tudi pri izvlečku iz sorte Syrah za katerega so listi bili obrani v osmem mesecu, je vrednost MIC nižja, v primerjavi z vrednostjo MIC za katerega so listi bili obrani v devetem mesecu (slika 20). Testni mikroorganizem je bil *S. aureus*.

Z gotovostjo 95 % lahko trdimo, da imajo izvlečki za pripravo, katerih surovino so obrali v osmem mesecu, boljše protimikrobno delovanje kot tisti, za katere so surovino za predelavo le te v izvleček obrali v petem mesecu. Z gotovostjo 95 % lahko trdimo tudi, da imajo izvlečki za pripravo, katerih listje so obrali v devetem mesecu, boljše protimikrobno delovanje kot tisti izvlečki, za katere so listje obrali v osmem mesecu.

4.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE FENOLNIH IZVLEČKOV IZ GROZDNIH KOŽIC VINSKE TRTE

V drugem delu eksperimenta smo protimikrobno aktivnost določali izvečkom grozdnih kožic. Uporabili smo sedem izvlečkov, pridobljenih iz belih sort vinske trte in sedem izvlečkov, pridobljenih iz rdečih sort vinske trte, ki smo jih testirali na bakterije *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* in *S. Infantis*. Predvidevamo, da imajo fenolni izvlečki boljši protimikrobni učinek na Gram pozitivne bakterije kot pa na Gram negativne bakterije in da so protimikrobno bolj učinkoviti izvlečki rdečih sort.

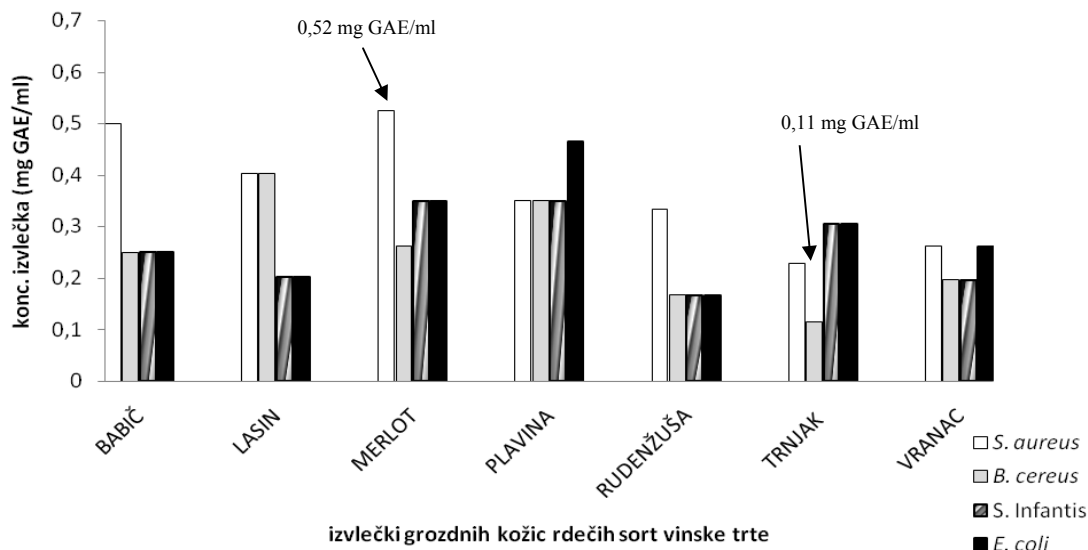
Na sliki 22 so podani rezultati protimikrobnega delovanja izvlečkov iz grozdnih kožic naslednjih belih sort vinske trte: Debit, Kuč, Kujundžuša, Maraština, Medna, Rkaciteli in Zlatarica.



Slika 22: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov grozdnih kožic, pridobljenih iz belih sort vinske trte, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Vrednosti MIC so izražene v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot vrednost, ki smo jo določili na podlagi ene izvedbe poskusa.

Iz slike 22 je razvidno, da so imeli izvlečki iz grozdnih kožic različnih belih sort vinske trte protimikroben učinek na vse izbrane vrste bakterij. Vrednosti MIC se gibljejo med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml (slika 22). Najboljše protimikrobno delovanje je imel izvleček sorte Kujundžuša (MIC vrednosti v povprečju znašajo 0,15 mg GAE/ml), najslabše pa izvleček sorte Zlatarica (MIC vrednosti v povprečju znašajo 0,38 mg GAE/ml).

Na sliki 23 so podani rezultati protimikrobnega delovanja izvlečkov iz grozdnih kožic naslednjih rdečih sort vinske trte: Babič, Lasin, Merlot, Plavina, Rudenžuša, Trnjak in Vranac.



Slika 23: Prikaz protimikrobnega delovanja izvlečkov grozdnih kožic, pridobljenih iz rdečih sort vinske trte, testiranih na štiri patogene mikroorganizme. Vrednosti MIC so izražene v mg GAE/ml. Rezultati so podani kot vrednost, ki smo jo določili na podlagi ene izvedbe poskusa.

Iz slike 23 je razvidno, da so imeli izvlečki pridobljeni iz grozdnih kožic različnih rdečih sort vinske trte protimikroben učinek ne vse izbrane vrste bakterij. Vrednosti MIC se gibljejo med 0,11 – 0,52 mg GAE/ml (slika 23). Najboljše protimikrobno delovanje je imel izvleček sorte Rudenžuša (v povprečju 0,21 mg GAE/ml), najslabše pa izvleček sorte Plavina (v povprečju 0,38 mg GAE/ml).

4.2.1 Vpliv vrste bakterije na protimikrobno delovanje izvlečkov grozdnih kožic vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Iz rezultatov podanih na slikah 22 in 23 smo izračunali povprečne vrednosti MIC, določenih glede na vrsto bakterij. V povprečju so MIC določene za bakterije vrste *S. aureus* znašale 0,34 mg GAE/ml, za bakterije vrste *B. cereus* 0,25 mg GAE/ml, za bakterije vrste *S. Infantis* 0,21 mg GAE/ml in za bakterije vrste *E. coli* 0,26 mg GAE/ml. Izvlečki iz grozdnih kožic vinske trte so delovali najbolj inhibitorno na Gram negativne bakterije *S. Infantis*, nato na Gram pozitivne bakterije *B. cereus*, nato nekoliko slabše na bakterije vrste *E. coli* ter najslabše na bakterije vrste *S. aureus*. Rezultati statistične obdelave pa kažejo, da so izvlečki iz grozdnih kožic delovali primerljivo na Gram pozitivne in na Gram negativne bakterije.

Če primerjamo delovanje Gram pozitivnih bakterij med seboj, lahko z 95% gotovostjo trdimo, da izvlečki iz grozdnih kožic vinske trte delujejo boljše na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus* in slabše na Gram pozitivne bakterije vrste *S. aureus*. V

primerjavi Gram negativnih bakterij med seboj, pa lahko z gotovostjo 95% trdimo, da so izvlečki iz grozdnih kožic pokazali primerljivo delovanje na Gram negativne bakterije *S. Infantis* in *E. coli*.

4.2.2 Vpliv vrste izvlečka (bele ali rdeče sorte) na protimikrobno delovanje izvlečkov iz grozdnih kožic vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Iz slik 22 in 23 je razvidno, da se vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic gibljejo med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml. Primerjali smo vpliv vrste izvlečka iz belih in rdečih sort vinske trte. Iz rezultatov podanih na slikah 22 in 23 smo izračunali povprečne vrednosti. V povprečju so MIC za izvlečke iz grozdnih kožic rdečih sort znašale 0,29 mg GAE/ml, iz belih pa 0,26 mg GAE/ml. Ugotovili smo, da so v povprečju izvlečki belih sort vinske trte delovali bolj inhibitorno kot izvlečki iz rdečih sort vinske trte, kljub temu da so izvlečki grozdnih kožic iz rdečih sort vinske trte vsebovali višje začetne koncentracije skupnih fenolnih spojin kot pa izvlečki iz belih sort (preglednica 7).

Ko smo podatke statistično obdelali, pa smo ugotovili, da lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da so imeli izvlečki belih in rdečih sort primerljivo inhibitorno delovanje.

4.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE METANOLA

Vsi izvlečki so bili pripravljani v 50 % raztopini metanola, zato nas je zanimalo, ali ima sam metanol vpliv na protimikrobno delovanje uporabljenih izvlečkov na testirane bakterije. Metanol smo pripravili na dva načina, in sicer prvič po postopku kot izvlečke iz listja vinske trte, drugič pa kot izvlečke iz grozdnih kožic različnih sort vinske trte. Tako smo lažje preverili sinergistično delovanje metanola s komponentami v fenolnih izvlečkih, če metanol prispeva k boljšemu protimikrobnemu delovanju izvlečkov. Rezultati so predstavljeni v preglednici 10 in 11.

Preglednica 10: Vpliv protimikrobnega delovanja metanola na protimikrobno delovanje izvlečkov iz listja vinske trte. Testni mikroorganizmi so bili *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Infantis*, *E. coli*.

Koncentracije %	Testni mikroorganizem			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>E. coli</i>
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
1	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+

Legenda: -: potrjeno inhibitorno delovanje metanola; +: ne potrjeno inhibitorno delovanje matanola

Iz preglednice 10 je razvidno, da metanol ni imel vpliva pri delovanju izvlečkov iz listja vinske trte.

Preglednica 11: Vpliv protimikrobnega delovanja metanola na protimikrobno delovanje izvlečkov iz grozdnih kožic. Testni mikroorganizmi so bili *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Infantis*, *E. coli*.

Koncentracije %	Testni mikroorganizem			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>E. coli</i>
15	+	+	+	+
10	+	+	+	+
7,5	+	+	+	+
5	+	+	+	+
3,75	+	+	+	+
2,5	+	+	+	+
2,5	+	+	+	+

Legenda: -: potrjeno inhibitorno delovanje metanola; +: nepotrjeno inhibitorno delovanje metanola

Iz preglednice 11 je razvidno, da metanol ni imel vpliva pri delovanju izvlečkov iz grozdnih kožic vinske trte.

4.4 PROTIMIKROBNO DELOVANJE GALNE KISLINE

V preglednici 12 so zbrani rezultati protimikrobnega delovanja komercialno pripravljene galne kisline na štiri patogene bakterije. Zanimalo nas je, kakšno delovanje ima komercialno pripravljena galna kislina v primerjavi z naravnimi fenolnimi izvlečki.

Preglednica 12: Prikaz protimikrobnega delovanja galne kisline. Testni mikroorganizmi so bili *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Infantis*, *E. coli*.

Koncentracije %	Testni mikroorganizem			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>E. coli</i>
2	-	-	-	-
1	-	-	+	+
0,5	-	-	+	+
0,25	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+

Legenda: -: potrjeno inhibitorno delovanje galne kisline; +: nepotrjeno delovanje galne kisline

Galna kislina je pokazala protimikrobno delovanje na vse testirane bakterije. MIC za Gram pozitivne bakterije *S. aureus* in *B. cereus* sta enaki, in sicer 5 mg/ml, za Gram negativne bakterije *S. Infantis* in *E. coli* pa 20 mg/ml (preglednica 12). Na Gram pozitivne bakterije je galna kislina delovala bolj inhibitorno kot na Gram negativne bakterije. V primerjavi z naravnimi izvlečki iz listja in grozdnih kožic ima komercialno pripravljena galna kislina slabše protimikrobno delovanje.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovnimi hipotezami smo preverili, ali imajo izvlečki listov in grozdnih kožic vinske trte (*Vitis Vinifera* L.) protimikrobno delovanje na patogene bakterije vrste *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* in *S. Infantis* in v kakšnih koncentracijah izvlečki vplivajo na bakterije. Primerjali smo tudi učinek izvlečkov na po Gramu pozitivne bakterije (*S. aureus* in *B. cereus*), ki veljajo za bolj občutljive, in po Gramu negativne bakterije (*E. coli* in *S. infantis*). Po Gramu negativne bakterije veljajo za manj občutljive za protimikrobna sredstva. To lahko vsaj deloma razložimo s sestavo zunanje membrane, ki obdaja celično steno in otežuje prehajanje spojin skozi lipopolisaharidni ovoj. Membrana po Gramu pozitivnih bakterij je znatno bolj dovzetna za prehajanje protimikrobnih snovi (Klančnik in sod., 2009). Hkrati pa smo preverjali, ali ima pridobivanje listja za predelavo le tega v izvleček v različnem obdobju vegetacijskega ciklusa vinske trte vpliv na protimikroben učinek in ali so protimikrobno bolj učinkoviti izvlečki rdečih sort.

Fenolne spojine, med katere spada tudi galna kislina, so odgovorne za protimikrobno delovanje fenolnih izvlečkov. To velja tudi za izvlečke iz listja in grozdnih kožic, ki smo jih analizirali. Skupne fenolne spojine izvlečkov so bile izražene v mg galne kisline (GAE)/ml izvlečka. Vzporedno je potekala tudi raziskava kemijske sestave prisotnih fenolnih spojin: flavonoidov, katehinov, flavonolov, katehin glukozida, resveratrola (Katalinič in sod., 2010a).

Protimikrobna učinkovitost je odvisna tudi od posameznih fenolnih komponent izvlečkov. Sestava izvlečkov pa je seveda odvisna od načina ekstrakcije fenolnih komponent izvlečkov iz rastlinskega materiala, v osnovi od rastlinskega vira. Žal je neposredna primerjava učinkovitosti iz rezultatov študij pri testiranju naravnih izvlečkov zelo težavna ali nemogoča, ker so v uporabi različne metode testiranja (Klančnik in sod., 2009) in različne definicije MIC (Burt, 2004).

Ker so bili izvlečki raztopljeni v metanolu, nas je zanimalo, ali ima morda metanol sam protimikroben učinek. Preverili smo tudi protimikroben učinek komercialno pripravljene galne kisline.

Poskus smo izvedli z *in vitro* metodo za ugotavljanje bakterijske občutljivosti na protimikrobna sredstva, in sicer z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici z dvema različnima bakterijskima rastnima indikatorjema INT in TTC.

5.1.1 Metoda mikrodilucije v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici

Mikrodilucija v tekočem gojišču je občutljiva metoda in je primerna za hitro kvantitativno določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih izvlečkov. Klančnik in sodelavci (2010) so potrdili, da je uporaba mikrodilucijske metode za določanje protimikrobne aktivnosti izražena kot MIC primerljiva z drugimi dilucijskimi metodami in da je metoda bolj občutljiva v primerjavi s presejalnimi testi. Pri mikrodiluciji potrebujemo majhno količino

izvlečka. Mikrodilucijska metoda je poceni, daje ponovljive rezultate, za izvedbo ne potrebujemo veliko materiala in priprave ter je uporabna za pregledovanje številnih kombinacij različnih bakterij in rastlinskih izvlečkov. Študije so potrdile, da je primerna metoda, če delamo z mikroorganizmi, kot so: *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Infantis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*... Mikrodilucijo lahko uporabimo za določanje protimikrobnega učinka izvlečkov, za katere nimamo dobro definiranih vseh komponent izvlečka, kjer bi pri uporabi npr. difuzijskih metod lahko dobili lažno pozitiven ali lažno negativen rezultat (Eloff, 1998; Klančnik in sod., 2010).

5.1.1.1 Primerjava dveh bakterijskih rastnih indikatorjev INT in TTC

Indikatorja INT in TTC se uporabljata za detekcijo biološke aktivnosti, ker ob tem poteče redukcija v obarvane produkte (Eloff, 1998). Obarvano luknjico smo tolmačili kot negativen rezultat, kjer izvleček ni imel protimikrobnega delovanja. Iz rezultatov zbranih na slikah 10 – 15, smo izračunali povprečne vrednosti MIC, glede na indikator, ki smo ga uporabili pri poskusu INT in TTC. V povprečju so MIC določene z indikatorjem INT 1,23 mg GAE/ml, z indikatorjem TTC pa 1,24 mg GAE/ml. Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici izvedena z indikatorjema bakterijske rasti INT in TTC je dala primerljive rezultate. Za rastna indikatorja INT in TTC je znano, da sta dobra substrata za encimske reakcije. Če ju primerjamo med seboj glede uporabnosti, je uporaba INT bolj hvaležna zaradi kontrasta, saj je temnejše barve, enostaven je za pripravo in razvije obstojno barvo (Valgas in sod., 2007). Derivat TTC zbledi, ko se raztopina posuši, medtem ko je INT zelo stabilen (Eloff, 1998). INT in TTC označujeta aktivnost aerobnih bakterij, zato smo ju lahko uporabili. Če pa bi pri eksperimentu testirali rast anaerobnih mikroorganizmov, bi bilo bolj primerno uporabiti indikator ATP.

5.1.2 Vpliv vrste bakterij

Iz slik 16 - 21 je razvidno, da so izvlečki imeli protimikroben učinek na vse štiri izbrane vrste bakterij. Iz rezultatov podanih na slikah 16 – 21 smo izračunali povprečne vrednosti MIC glede na vrsto bakterij. V povprečju MIC Gram pozitivnih bakterijah znaša 1 mg GAE/ml, pri Gram negativnih pa 1,53 mg GAE/ml. Pri določanju MIC izvlečkov iz listja vinske trte rezultati kažejo, da so Gram pozitivne bakterije bolj občutljive na delovanje izvlečka kot Gram negativne bakterije, saj potrebujemo manjšo količino izvlečka, da preprečimo rast Gram pozitivnim bakterijam, kot pa da preprečimo rast Gram negativnim bakterijam. To lahko pripišemo lipopolisaharidni zunanji membrani, ki jo imajo Gram negativne bakterije in omejujejo difuzijo hidrofobnih komponent v notranjost celice (Burt, 2004). Celična stena ima namreč pomembno vlogo pri infektivnosti in patogenosti. Ta je pri Gram pozitivnih bakterijah sestavljena iz ene plasti, ki je sestavljena iz peptidoglikana (mureina), teihoične kisline in na celično steno vezanih proteinov (Dimitriev in sod., 2004). Celična stena Gram negativnih bakterij pa vsebuje poleg notranje citoplazemske membrane tudi prej omenjeno zunanjo membrano, ki je edinstvena struktura za organizme te skupine. Prostor med peptidoglikanskim slojem (celično steno) in zunanjo membrano se imenuje periplazma, kjer so našli ne le peptidoglikan (murein) celične stene, ampak tudi številne beljakovine (lipoproteine, vezavne proteine) (Osborn, 2000). Rezultate lahko primerjamo z rezultati iz različnih objav, kjer tudi te kažejo, da so Gram pozitivne bakterije bolj občutljive na protimikrobne snovi. Tako delovanje je opisano za izvlečke iz: grozdnih

pečk (Jayaprakasha in sod., 2002; Baydar in sod., 2003), izvlečke iz rožmarina (Klančnik in sod., 2009; Krznar, 2010), enostavnih fenolnih spojin in izvlečke iz žajblja (Krznar, 2010).

V povprečju so MIC določene za bakterije vrste *S. aureus* znašale 0,34 mg GAE/ml, za bakterije vrste *B. cereus* 0,25 mg GAE/ml, za bakterije vrste *S. Infantis* 0,21 mg GAE/ml in za bakterije vrste *E. coli* 0,26 mg GAE/ml. Presenetljivo so izvlečki grozdnih kožic delovali najbolj inhibitorno na bakterije vrste *S. Infantis* (slika 22 in 23). Vsi izvlečki pa so imeli najslabše inhibitorno delovanje na Gram pozitivne bakterije vrste *S. aureus*. Fenolni izvlečki iz grozdnih kožic niso pokazali značilnega protimikrobnega delovanja, kjer naj bi na Gram pozitivne bakterije delovali bolj inhibitorno (Klančnik in sod., 2009), saj rezultati kažejo, da so izvlečki iz grozdnih kožic delovali primerljivo na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije. Rezultate lahko primerjamo z raziskavami, kjer so različni izvlečki iz grozdnih kožic (Katalinič in sod., 2010a), jabolčnih kožic (Alberto in sod., 2006), navadne črnoglavke, nageljnovih žbic in izvlečka iz rastline *Terminalia bellirica Roxb* (Shan in sod., 2007) delovali primerljivo na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije.

Galna kislina je imela boljše protimikrobno delovanje na Gram pozitivne bakterije kot pa na Gram negativne bakterije (preglednica 12), enako kot izvlečki iz listja vinske trte (slike 16 - 21). MIC za bakterije vrste *S. aureus* in *B. cereus* znaša 5,0 mg/ml, na bakterije vrste *S. Infantis* in *E. coli* pa znaša 20,0 mg/ml. Galna kislina je imela primerljive rezultate pri obeh vrstah Gram pozitivnih bakterij *S. aureus* in *B. cereus*, kjer so za primerjavo izvlečki iz listja vinske trte imeli boljše protimikrobno delovanje na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus*. Tudi na Gram negativne bakterije je galna kislina delovala enako inhibitorno pri obeh bakterijskih vrstah *S. Infantis* in *E. coli*.

5.1.3 Vpliv vegetativne dobe surovine za pripravo izvlečka

Na grafih 16 – 21 je prikazano protimikrobno delovanje izvlečkov iz listja vinske trte glede na različen mesec obiranja rastlinskega vira za pripravo izvlečka. Listi vinske trte *Vitis vinifera* L. so bili obrani v treh različnih mesecih, in sicer v petem mesecu (mesecu maju), osmem mesecu (mesecu avgustu) in devetem mesecu (mesecu septembru). Iz rezultatov podanih na grafih 16 – 21, smo glede na čas obiranja listov izračunali povprečne vrednosti MIC. MIC izvlečkov iz listja, ki so ga obrali v devetem mesecu, so v povprečju znašale 1,01 mg GAE/ml, v osmem 1,23 mg GAE/ml in petem 1,57 mg GAE/ml. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je glede na čas obiranja listov (maj, avgust, september) za pripravo izvlečka v izvlečkih naraščala. Potrdili smo hipotezo, da čas obiranja rastlinkega vira za pripravo izvlečka vpliva na protimikrobno delovanje. Najbolj inhibitorno so delovali izvlečki iz listja vinske trte, kjer so listi za pripravo izvlečka bili obrani v mesecu septembru. Slabše delovanje so imeli izvlečki, ko so liste vinske trte za pripravo izvlečka obrali v mesecu avgustu. Najvišje MIC pa smo določili izvlečkom pripravljenim iz listja, ko so le ti bili obrani v mesecu maju. Visok protimikroben potencial, zlasti tistih izvlečkov, kjer so listi bili obrani v mesecu avgustu in septembru, ponujajo možnost za njihovo uporabo pri preprečevanju mikrobiološkega kvarjenja živil. Listi, ki ostanejo na trti po trgatvi (septembra), ponujajo možnost nadaljnega izkoriščanja, saj nabiranje ne moti dozorevanja grozdja. Tako so listi dober in poceni vir za predelavo le teh v produkt protimikrobnega značaja. (Katalinič in sod., 2010b)

Tudi različne študije so pokazale razlike v protimikrobni učinkovitosti izvlečkov iz iste rastline. Razloge so pripisali različnemu geografskemu viru, sezoni pobiranja, genotipu, klimatskim pogojem, postopku ekstrakcije in delu rastline uporabljene za pridobitev izvlečka. Vsi naštetih dejavniki imajo vpliv na kemijsko sestavo in relativno koncentracijo vsake spojine v izvlečku (Oussalah in sod., 2007).

5.1.4 Vpliv izvlečka iz belih in rdečih grozdnih kožic

Pri grozdni jagodi sta kožica in pečke odpadni produkt, bogat s polifenolnimi spojinami, ki imajo biološko aktivnost, vključno s protimikrobnim delovanjem. Na splošno je znano, da imajo grozdne jagode rdečih sort vinske trte višjo vsebnost fenolnih spojin, predvsem antocianov (Thimothe in sod., 2007). Za grozdne kožice je potrjeno, da so bogat vir tako flavonoidnih kot ne flavonoidnih spojin. Proučeni so bili predvsem antociani, flavonoli, flavanoli, stilbeni, ker pozitivno vplivajo na zdravje zaradi antioksidativnega delovanja. Še zmeraj pa je zelo malo objav glede protimikrobnega delovanja izvlečkov grozdnih kožic in primerljivega delovanja z drugimi izvlečki iz stranskih proizvodov v vinarstvu. Zelo so zanimive kožice belih sort vinske trte, ki jih pri predelavi grozdja v vino ne izkoristijo, saj niso uporabne pri maceraciji in tako predstavljajo lahko dostopen in poceni surov material za produkcijo zanimivih fenolnih spojin ali produktov, baziranih na njih (Katalinič in sod., 2010a). Iz slike 22 in 23 je razvidno, da se vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic gibljejo med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml. Iz rezultatov podanih na grafih 22 in 23 smo izračunali povprečne vrednosti. V povprečju so MIC za izvlečke iz rdečih sort znašale 0,29 mg GAE/ml, za bele pa 0,26 mg GAE/ml. V povprečju smo dobili nižje MIC pri uporabi fenolnih izvlečkov grozdnih kožic iz belih sort vinske trte kot pri uporabi izvlečkov iz rdečih sort vinske trte za vse testirane mikroorganizme, kljub temu da so izvlečki grozdnih kožic iz rdečih sort vinske trte vsebovali višje začetne koncentracije skupnih fenolnih spojin kot pa izvlečki iz belih sort. Statistično pa smo ovrednotili, da med MIC izvlečkov iz grozdnih kožic različnih belih in rdečih sort vinske trte ni razlik.

5.1.5 Primerjava protimikrobnega učinka naravnih izvlečkov s protimikrobnim učinkom komercialno pripravljene galne kisline

Fenolne spojine, med katere spada tudi galna kislina, so glavne komponente v izvlečkih iz listja in grozdnih kožic vinske trte, ki so odgovorne za protimikrobno delovanje. Izvlečki so imeli vsebnost skupnih fenolnih spojin izraženo v mg GAE/ml, zato nas je zanimalo protimikrobno delovanje same galne kisline. Nismo pa imeli podatkov o ostalih fenolnih spojinah, ki so še prisotne v izvlečkih.

Vrednosti MIC za izvlečke iz listja se gibljejo med 0,38 – 2,24 mg GAE/ml (slike 16 - 20). Vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic se gibljejo med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml (slika 22 in 23). MIC za komercialno pripravljeno galno kislino pa 5 - 20 mg/ml (preglednica 12). Rastlinski fenolni izvlečki so pokazali bolj učinkovito delovanje na vse izbrane vrste bakterij v primerjavi s posamezno izolirano komponento kot je komercialno pripravljena galna kislina. Tako delovanje lahko pripišemo sinergističnemu delovanju različnih protimikrobnih spojin, ki so prisotne v rastlinskih izvlečkih, kar potrjujejo tudi različne študije (Burt, 2004).

5.1.6 Vpliv metanola na protimikrobni učinek izvlečkov

Yong Ju in Howard (2003) sta pri ekstrakciji uporabila različna topila: vodo, etanol in metanol. Ugotovila sta, da so izvlečki, raztopljeni v metanolu imeli izluženih največ skupnih fenolnih spojin. Metanol je eno izmed najbolj učinkovitih topil in tudi izvlečki, ki so bili pripravljani in kemijsko okarakterizirani na Fakulteti za kemijsko tehnologijo v Splitu, so bili raztopljeni v metanolu. Zato smo preverili učinek metanola na bakterije v koncentracijah, ki so bile prisotne ob določitvi MIC izvlečkov. Potrdili smo hipotezo, da metanol ni vplival na protimikrobno delovanje izvlečkov (preglednica 10 in 11).

5.2 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalnega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- ♦ Potrdili smo, da so izvlečki iz listja in grozdnih kožic vinske trte *Vitis vinifera* L. dober vir fenolnih spojin s protimikrobnim delovanjem. Vrednosti MIC za izvlečke iz listja so se gibale med 0,38 – 2,24 mg GAE/ml, vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic pa med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml.
- ♦ Potrdili smo protimikrobno delovanje vseh izvlečkov na Gram pozitivne bakterije vrste *B. cereus* in *S. aureus* in na Gram negativne bakterije vrste *E. coli* in *S. Infantis*. Izvlečki iz listja vinske trte so bolj delovali na Gram pozitivne bakterije in slabše na Gram negativne bakterije. Izvlečki grozdnih kožic iz belih sort vinske trte so delovali primerljivo na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije.
- ♦ Čas obiranja listov vinske trte ima pomemben vpliv na protimikrobno delovanje pripravljenih izvlečkov. Izvlečki, za katere so bili listi obrani v devetem mesecu, so imeli najboljše inhibitorno delovanje. Najslabše inhibitorno delovanje pa so imeli izvlečki iz listov, ko so le ti bili obrani v petem mesecu.
- ♦ Na podlagi rezultatov ne moremo trditi, da so izvlečki grozdnih kožic rdečih sort delovali bolj inhibitorno na testirane bakterije v primerjavi z izvlečki grozdnih kožic belih sort.

6 POVZETEK

Kontaminacija hrane z bakterijami je pomemben dejavnik, ki vpliva na izgubo kakovosti in varnosti hrane. *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* in *S. Infantis* so patogene bakterije, ki povzročajo kvar živil in s hrano prenosljive bolezni. Zato je preprečevanje mikrobne rasti ključnega pomena za proizvodnjo varnih živil.

V zadnjih desetletjih se je povečalo zanimanje po uporabi naravnih protimikrobnih sredstev, ker se uporaba sintetičnih aditivov poskuša omejiti zaradi trenda zelenega potrošništva, ki favorizira uporabo naravnih snovi, ker imajo manjši vpliv na zdravje ljudi in okolje. Tudi potrošniki zahtevajo vedno bolj varna, pestra in naravna živila, brez kemijskih konzervansov, z manjšo koncentracijo soli in sladkorja. Že v preteklosti so se začimbe uporabljale ne samo za aromo in okus, ampak tudi zaradi daljše obstojnosti živil. Zato lahko zadnja leta zasledimo porast raziskav glede protimikrobnega učinka naravnih sredstev. Semena, sadje, zelenjava, začimbe, žita, zelišča so naravni viri protimikrobnih snovi, ki so bili raziskani kot možen vir za izdelavo živilskega konzervansa in možna nadomestitev kemičnih aditivov.

Najpogosteje uporabljeno merilo v raziskavah za določanje protimikrobnega delovanja snovi je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). V diplomski nalogi smo določali MIC z *in vitro* metodo mikrodilucije v tekočem gojišču, izvedeni v mikrotitrski ploščici. Uporabili smo 18 izvlečkov iz listja iz šestih različnih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Listi za pripravo izvlečka so bili obrani v treh različnih rastnih fazah rastline. Testirali smo tudi 7 izvlečkov iz grozdnih kožic belih sort in 7 izvlečkov iz grozdnih kožic rdečih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.).

Potrdili smo, da so izvlečki iz listja in grozdnih kožic vinske trte *Vitis vinifera* L. dober vir fenolnih spojin s protimikrobnim delovanjem, saj so imeli inhibitorno delovanje na vse testirane mikroorganizme. Vrednosti MIC za izvlečke iz listja se gibljejo med 0,38 – 2,24 mg GAE/ml. Vrednosti MIC za izvlečke iz grozdnih kožic se gibljejo med 0,10 - 0,67 mg GAE/ml. Izvlečki iz listja vinske trte so imeli boljše protimikrobno delovanje na Gram pozitivne bakterije kot na Gram negativne bakterije. Izvlečki grozdnih kožic pa so pokazali primerljivo delovanje na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije.

Potrdili smo hipotezo, da čas obiranja rastlinskega materiala v različnih obdobjih vegetacijskega ciklusa rastline, vpliva na protimikrobno delovanje fenolnih izvlečkov. Najslabše inhibitorno delovanje so imeli izvlečki, za katere so liste obrali v mesecu maju, najboljše protimikrobno delovanje pa izvlečki, za katere so liste obrali v mesecu septembru.

Izvlečki grozdnih kožic iz belih sort vinske trte so imeli primerljivo protimikrobno delovanje z izvlečki iz rdečih sort vinske trte, so pa izvlečki iz rdečih sort vinske trte vsebovali višje začetne koncentracije fenolnih spojin v izvlečku.

Z rezultati smo potrdili možnost uporabe fenolnih izvlečkov kot protimikrobnega sredstva. Poskuse smo izvedli v *in vitro* razmerah, zato bi bilo potrebno preveriti učinek izvlečkov tudi v živilih.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidati v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Grašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Faramacevtski vestnik, 48: 573-589
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine stranskih proizvodov rastlinske predelave – funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april, 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Accoa M., Ferreirab F. S., Henriquesa J. A. P., Tondob E. C. 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food Microbiology, 20: 489–493
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Oddelek za živilstvo: 1-46
- Alberto M.R., Canavosio M. A. R., Nadra M. C. M. 2006. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. Electronic Journal of Biotechnology, 9, 3: 205-209 DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-1
- Baydar N.G., Özkan G., Sagdiç O. 2003. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. Food Control, 15, 5: 335-339
- Baydar N.G., Sagdic O., Özkan G., Cetin S. 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. International Journal of Food Science and Technology, 41: 799-804
- Bonev B., Hooper J., Parisot J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61, 6: 1295-1301
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253
- Battner F. R., Plunkett G. III., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 277, 5331: 1453-1462

- Castillo-Munoz N., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermosin-Gutierrez I. 2007. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3: 992-1002
- Cox J. 1999. *Salmonella*: Introduction. V: *Encyclopedia of food microbiology*. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D. (eds.). Sydney, Academic Press: 1928-1937
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582
- Dani C., Oliboni L.S., Agostini F., Funchal C., Serafini L., Henriques J.A., Salvador M. 2010. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 24: 148-153
- Das S., Rosazza J. P. N. 2006. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products*, 69, 3: 499-508
- De Souza E. L., Stamford T. L. M., Lima E. De O., Nogueira Trajano V. N., Barbosa Filho J. M. 2005. Antimicrobial effectiveness of spices: An approach of use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 549-558
- Dimitriev B. A., Toukach F. V., Holst O., Rietschel E. T., Ehlers S. 2004. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *Journal of Bacteriology*, 186, 21: 7141-7148
- Douillet-Breuil A. C., Jeandet P., Adrian M., Bessis R. 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis Spp.* in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4456-4461
- Eley A. R. 1996. *Microbial food poisoning*. 2nd ed. London, Chapman&Hall: 211 str.
- Ellof J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711-713
- IVZ. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 33-42
www.ivz.si/ivz (10.3.2010)
- Granum P. E., Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS - Microbiology Letters*, 157: 223-228
- Goodwin T. W., Mercer E. I. 1983. *Plant phenolics*. Oxford, Academic Press: 528-566
- Hallagan J. B., Allen D. C., Borzelleca J. F. 1995. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 6: 515-528

- Hebhash K.A.H., Fadel H.M., Soliman M. M. A. 1991. Volatile components of grape leaves. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 4, 1: 26-28
- Ho C. T. 1992. Phenolic compounds in food - An overview. V: Phenolic compounds in food and their effects on health. Ho C. T., Lee C. Y., Huang M. T. (eds.). New Jersey, American Chemical Society: 2-6
- Holko I., Bisova T., Holkova Z., Kmet V. 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17: 393–396
- Jackson R.S. 2003. Grapes. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 2957-2967
- Jayaprakasha G. K., Selvi T., Sakariah K. K. 2002. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 2:117-122
- Kastelec B., Harlander T. 2005. *Enterobacteriaceae* kot povzročiteljice okužb s hrano v Sloveniji. *Zdravstveno varstvo*, 45, 3: 165-174
- Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramović H., Miloš M., Ljubenković I., Piskernik S., Pezo I., Terpinc P., Boban M. 2010a. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119, 2: 715-723
- Katalinić V., Smole Možina S., Generalić I., Skroza D., Ljubenković I., Klančnik A. 2010b. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, (v tisku).
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 29-30 jan. 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-157
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121–126
- Krznar D. 2010. Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin ter ekstraktov rožmarina in žajblja na različne vrste bakterij. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 70 str.
- Lucas C. D., Hallagan J. B., Taylor S. L. 2001. The role of natural color additives in food allergy. *Advances in Food and Nutrition Research*, 43: 195-216

- Marsico G., Vicenti A., Ragani M., Dimatteo S., Melodia L., Zezza F. 2003. Carcass traits and meat quality of pigs fed diets containing grape skin. *Italian Society of Veterinary Science*, 57: 25-27
- Maza L. L., Pezzlo M. T., Shigei J. T., Peterson E. M. 2004. Color atlas of medical bacteriology. Washington, American Society for Microbiology Press: 316 str.
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Turgo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 4507-4513
- Nemanič J., Kocijančič M., Resnik M., Žnidaršič P. 1997. Novi trendi pri predelavi rdečega grozdja. V: *Moderne tehnologije predelave in kakovosti živil*. 18. Bitenčevi živilski dnevi '97, Ljubljana, 12. in 13. jun. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 199-210
- Osborn M. J. 2000. Outer membrane, gram-negative bacteria. V: *Encyclopedia of microbiology*. 2rd ed. Vol. 3. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 517-525
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 15: 414-420
- Pari L., Suresh A. 2008. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food Chemistry and Toxicology*, 46 : 1627–1634
- Pasqua R. D., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Maurello G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4863-4870
- Phillipson J. D. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56: 237-243
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A. S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 579-590
- Rates S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613
- Rentzsch M. 2009. Phenolic compounds. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). Madrid, Springer: 437-571
- Revilla E., Ryan J. M., Ortega G. M. 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 11: 4592-4597

- Rozek A., Achaerandio I., Guell C., Lopez F., Ferrando M. 2009. Use of commercial grape phenolic extracts to supplement solid foodstuff. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 623-631
- Sandel M.K., McKillip J.L. 2004. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 15: 5-10
- Scheutz F., Strockbine N.A. 2005. Genus I. *Escherichia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2, The proteobacteria. Part: B, The gramaproteobacteria 2nd ed. Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J.T. (eds.). New York, Springer: 607-624
- Shan B., Cai Y-Z., Brooks J. D., Corke H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119
- SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krmil - Horizontalna metoda za štetje mikroorganizmov - Štetje kolonij pri 30 °C. 2003: 2 str.
- Spigno G., Dermiki M., Pastori C., Casanova F., Jauregi P. 2010. Recovery of gallic acid with colloidal gas aphrons generated from a cationic surfactant. *Separation and Purification Technology*, 71, 1: 56-62
- Tassou C. C., Nychas G.-J. E. 1995. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model food system. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36, 34: 411-420
- 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
- Tauveron G., Slomianny C., Henry C., Faille C. 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 254-262
- Thimother J., Bonsi I.A., Padilla-Zakour O. I., Koo H. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* Interspecific Hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10200-10207
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O' Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 14: 5987-6000

- Trnčíková T., Piskernik S., Kaclíková E., Smole Možina S., Kuchta T., Jeršek B. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food produced in Slovakia and Slovenia with regard to the presence of genes encoding for enterotoxins. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49: 215-220
- Tsao R., Zhou T. 2007. Natural antimicrobials from plant essential oils. V: *New biocides development: The combined approach of chemistry and microbiology*. Zhu P. C. (ed.). Washington, American Chemical Society: 364-387
- Valgas C., de Souza M. S., Smania E. F. A., Smania A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 370-380
- Vattem D.A., Lin Y.T., Ghaedian G., Shetty K. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, 40: 1583–1592
- Villamizar R. A., Marotoa A., Riusa F. X., Inzab I., Figuerasb M. J. 2008. Fast detection of *Salmonella* Infantis with carbon nanotube field effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 279–283
- Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: *Zbornik referatov 1. Slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4 do 6 decembra 1996*. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124-134
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3, 2: 163-175
- Woods G. L., Washington J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341
- Xia X., Zhao S., Smith A., McEvoy J., Meng J., Bhagwat A.A. 2009. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 93-98
- Yilmaz Y., Toledo R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2: 255-260
- Yong Ju Z., Howard L. R. 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5207-5213

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem, da mi je dodelila zelo zanimivo temo diplomske naloge, ter za strokovno pomoč in natančen pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Petru Rasporju za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Zahvala gre tudi univ. dipl. ing. Ivici Hočevar za tehnični pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se Saši Piskernik in Anji Klančnik, za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu.

Teti Anastaziji Brkljačič se zahvaljujem, da mi je diplomsko delo lektorirala.

Hvala ti Djurdjica za enomesečno, nepozabno, skupno sodelovanje pri izvajanju eksperimentalnega dela, kjer smeha in resnega dela ni manjkalo.

MAMI IN ATI: »HVALA VAMA ZA STALNO PODPORO, SPODBUJANJE IN KORISTNE NASVETE ZA ŽIVLJENJE!«

Hvala tudi tebi Žiga za spodbudo, razumevanje, ter vse ostale male in velike trenutke, ki jih je preveč, da bi jih naštevala. Brez tebe pa tudi moje slike v diplomski nalogi ne bi bile takšne kot so ☺.

Hvala Arijani, Darji, Janji, Sonji, Valeriji ter vsem ostalim prijateljem in sošolcem, za nepozabna študijska leta!

PRILOGE

Priloga A: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil *S. aureus*

METODA	Mikrodilucija v mikrotitrski ploščici z barvilom INT						
TESTNA BAKTERIJA	<i>S. aureus</i>						
IZVLEČEK	REZULTATIV % 4 paralelke				KONČNI REZULTAT		SD
	1.	2.	3.	4.	%	mgGAE/ml	
Lasin 5	8	8	8	8	8	1,77	0
Maraština 5	8	8	8	8	8	1,51	0
Merlot 5	8	8	8	8	8	1,99	0
Pošip 5	8	8	8	8	8	1,60	0
Syrah 5	4	2	8	8	5,5	1,15	0,54
Vranac 5	8	4	8	8	7	1,96	0,48
Lasin 8	4	4	4	4	4	1,02	0
Maraština 8	4	4	4	8	5	1,26	0,43
Merlot 8	4	4	4	4	4	1,28	0
Pošip 8	4	4	4	4	4	1,09	0
Syrah 8	2	2	2	2	2	0,60	0
Vranac 8	4	4	4	4	4	1,40	0
Lasin 9			3	3	3	0,97	0
Maraština 9	/	/	3	3	3	1,04	0
Merlot 9			2	2	2	0,91	0
Pošip 9	/	/	2	2	2	0,94	0
Syrah 9	/	/	2	2	2	0,92	0
Vranac 9	/	/	2	2	2	0,76	0

Priloga B: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom TTC. Testni mikroorganizem je bil *S. aureus*.

METODA	Mikrodilucija v mikrotitrski ploščici z barvilom TTC				
TESTNA BAKTERIJA	<i>S. aureus</i>				
IZVLEČEK	REZULTATI V % dve paralelki		KONČNI REZULTAT		SD
	1.	2.	% mgGAE/ml		
Lasin 5	8	8	8	2,24	0
Maraština 5	8	8	8	1,51	0
Merlot 5	8	8	8	1,99	0
Pošip 5	4	8	6	1,20	0,4
Syrah 5	4	2	3	0,63	0,21
Vranac 5	8	8	8	2,24	0
Lasin 8	4	4	4	1,02	0
Maraština 8	4	4	4	1,01	0
Merlot 8	4	4	4	1,28	0
Pošip 8	4	4	4	1,09	0
Syrah 8	4	4	4	1,19	0
Vranac 8	4	4	4	1,40	0
Lasin 9	3	3	3	0,97	0
Maraština 9	3	3	3	1,04	0
Merlot 9	2	2	2	0,91	0
Pošip 9	2	2	2	0,94	0
Syrah 9	2	2	2	0,92	0
Vranac 9	2	2	2	0,76	0

Priloga C: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil *B. cereus*.

METODA	Mikrodilucija v mikrotitrski ploščici z barvilom INT				
TESTNA BAKTERIJA	<i>B. cereus</i>				
IZVLEČEK	REZULTATI V % dve paralelki		KONČNI REZULTAT	SD	
	1.	2.			
Lasin 5	8	8	8	1,77	0
Maraština 5	4	4	4	0,75	0
Merlot 5	4	4	4	1,00	0
Pošip 5	4	4	4	0,80	0
Syrah 5	4	4	4	0,84	0
Vranac 5	4	4	4	1,12	0
Lasin 8	4	4	4	1,02	0
Maraština 8	4	4	4	1,01	0
Merlot 8	2	2	2	0,64	0
Pošip 8	2	2	2	0,55	0
Syrah 8	2	1	1,5	0,45	0,15
Vranac 8	2	2	2	0,70	0
Lasin 9	2	2	2	0,65	0
Maraština 9	2	2	2	0,69	0
Merlot 9	1	1	1	0,45	0
Pošip 9	1	1	1	0,47	0
Syrah 9	1	1	1	0,46	0
Vranac 9	1	1	1	0,38	0

Priloga D: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil *S. Infantis*.

METODA	Mikrodilucija v mikrotitrski ploščici z barvilom INT					
TESTNA BAKTERIJA	<i>S. Infantis</i>					
IZVLEČEK	REZULTATI V % 3 paralelke			KONČNI REZULTAT		SD
	1.	2.	3.	% mgGAE/ml		
Lasin 5	8	8	8	8	1,77	0
Maraština 5	8	8	8	8	1,5	0
Merlot 5	8	8	8	8	1,99	0
Pošip 5	8	8	8	8	1,60	0
Syrah 5	8	8	8	8	1,68	0
Vranac 5	8	8	8	8	2,24	0
Lasin 8	6	6	/	6	1,53	0
Maraština 8	6	6	/	6	1,51	0
Merlot 8	5	5	/	5	1,60	0
Pošip 8	6	6	/	6	1,64	0
Syrah 8	4	4	4	4	1,19	0
Vranac 8	4	4	4	4	1,40	0
Lasin 9	4	4	4	4	1,30	0
Maraština 9	3	3	3	3	1,04	0
Merlot 9	3	3	3	3	1,36	0
Pošip 9	3	3	3	3	1,41	0
Syrah 9	3	3	3	3	1,37	0
Vranac 9	3	3	3	3	1,14	0

Priloga E: Vrednosti MIC izvlečkov listja vinske trte, določene z mikrodilucijo v mikrotitrski ploščici z barvilom INT. Testni mikroorganizem je bil *E. coli*.

METODA	Mikrodilucija v mikrotitrski ploščici z barvilom INT						
TESTNA BAKTERIJA	<i>E. coli</i>						
IZVLEČEK	REZULTATI V % 4 paralelke				KONČNI REZULTAT		SD
	1.	2.	3.	4.	% mgGAE/ml		
Lasin 5	8	8	8	8	8	1,77	0
Maraština 5	8	8	8	8	8	1,51	0
Merlot 5	8	8	8	8	8	1,99	0
Pošip 5	8	8	8	8	8	1,60	0
Syrah 5	8	8	8	8	8	1,68	0
Vranac 5	8	8	8	8	8	2,24	0
Lasin 8	8	8	4	4	6	1,53	0,51
Maraština 8	8	8	4	4	6	1,51	0,50
Merlot 8	8	8	4	4	6	1,92	0,64
Pošip 8	8	8	4	4	6	1,64	0,55
Syrah 8	4	4	4	4	4	1,19	0
Vranac 8	4	4	4	4	4	1,40	0
Lasin 9	3	3	/	/	3	0,97	0
Maraština 9	3	3	/	/	3	1,04	0
Merlot 9	3	3	/	/	3	1,36	0
Pošip 9	3	3	/	/	3	1,41	0
Syrah 9	3	3	/	/	3	1,37	0
Vranac 9	3	3	/	/	3	1,13	0