

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matija ŠTRLEKAR

**VPLIV IZVLEČKA ROŽMARINA NA TOPLOTNO ODPORNOST  
BAKTERIJSKIH SPOR  
VRSTE *Bacillus cereus* IN RODU *Alicyclobacillus***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ROSEMARY EXTRACT ON THERMAL RESISTANCE  
OF *Bacillus cereus* AND *Alicyclobacillus* spp.**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko doc. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matija Štrlekar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.852.11:579.26 : 547.56 (043)=163.6  
KG mikroorganizmi/spore/*Bacillus cereus*/*Alicyclobacillus* spp./protimikrobno delovanje/toplotna odpornost spor/rožmarin/*Rosmarinus officinalis* L.  
AV ŠTRLEKAR, Matija  
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN VPLIV IZVLEČKA ROŽMARINA NA TOPLOTNO ODPORNOST BAKTERIJSKIH SPOR VRSTE *Bacillu cereus* IN RODU *Alicyclobacillus*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 63 str., 8 pregl., 25 sl., 106 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil ugotoviti učinek rožmarinskega izvlečka na toplotno odpornost spor sevov *Bacillus cereus* (ŽMJ 91), *Bacillus cereus* (ŽMJ 164), *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ŽMJ 184) in *Alicyclobacillus acidiphilus* (ŽMJ 185). Uporabili smo komercialno pripravljene izvleček rožmarina s 40,69 % karnozolne kisline (Vitiva d.d., Slovenija), za katerega je že bilo potrjeno inhibitorno delovanje na rast omenjenih bakterij v *in vitro* pogojih in v živilih. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in njeno štirikratno vrednost smo dodali vsaj teden dni starim, predhodno pripravljenim koncentriranim suspenzijam spor ( $10^4$ - $10^7$  spor/mL) in preverjali njihovo viabilnost po 1-10 minutni toplotni obdelavi pri temperaturah 80-100 °C. Potrdili smo hipotezo, da se toplotna odpornost testiranih sevov med seboj dokaj razlikuje. Ugotovili smo, da so spore rodu *Alicyclobacillus* bolj občutljive na toplotno obdelavo od spor vrste *Bacillus cereus*. Med slednjimi so bile spore seva *B. cereus* (ŽMJ 91), ki je znan kot producent emetičnega toksina, bolj občutljive kot spore seva *B. cereus* (ŽMJ 164), ki je znan producent diarealnega toksina. V vseh primerih pa smo potrdili, da je dodatek rožmarinskega izvlečka suspenziji spor pred toplotno obdelavo povečal občutljivost spor oz. zmanjšal njihovo viabilnost po toplotni obdelavi glede na kontrolo, kateri izvleček ni bil dodan. Za kvantitativno ovrednotenje učinka izvlečka na toplotno občutljivost spor smo iz termičnih inaktivacijskih krivulj izračunali D-vrednosti. Za spore vrste *Bacillus cereus* (ŽMJ 164) brez dodatka izvlečka je  $D_{100}$  znašala 4,77 min, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 2,44 min. Za spore *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ŽMJ 184) smo izračunali D-vrednosti 15,90 min brez dodatka izvlečka, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 3,03 min pri temperaturi segrevanja 90 °C. Rezultati nakazujejo potencialno uporabnost izvlečka ne le za inhibicijo rasti bakterij, ampak tudi za povečanje učinkovitosti pasterizacije, torej zagotavljanja kakovosti in varnosti toplotno obdelanih živil, ki jih ogrožajo toplotno odporne bakterijske spore.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC UDC 579.852.11:579.26 : 547.56 (043)=163.6  
 CX pathogens/*Bacillus cereus* spores/*Alicyclobacillus* spp. spores/rosemary extract /rosemary/*Rosmarinus officinalis* L./thermal resistance of spores/minimal inhibitory concentration  
 AU ŠTRLEKAR, Matija  
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Food Science and Technology  
 PY 2010  
 TI INFLUENCE OF ROSEMARY EXTRACT ON THERMAL RESISTANCE OF *Bacillus cereus* AND *Alicyclobacillus* spp.  
 DT Graduation thesis (University studies)  
 NO XI, 63 p., 8 tab., 25 fig., 106 ref,  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB The aim of our research was to determine what effect rosemary extract has on the thermal resistance of spores *Bacillus cereus* (ŽMJ 91), *Bacillus cereus* (ŽMJ 164), *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ŽMJ 184) and *Alicyclobacillus acidiphilus* (ŽMJ 185). Commercial rosemary extract VivOX 40 (Vitiva d.d., Slovenia) with 40.69 % carnosic acid was used and has already been confirmed as inhibitor of growth of these bacteria *in vitro* and in foodstuffs. Minimum inhibitory concentration (MIC) and four times its value were added to at least a week old, pre-prepared concentrated spore suspensions ( $10^4$ - $10^7$  spores/mL) and examined their viability in 1-10 minute heat treatments at temperatures 80-100 °C. We confirmed the hypothesis that the thermal resistance varies between tested strains. *Alicyclobacillus* genus spores were found to be more sensitive to heat treatment than spores of *Bacillus cereus* strains, *B. cereus* (ŽMJ 91) also known as a producer of emetic toxin was found to have more sensitive spores than *B. cereus* (ŽMJ 164) strain, producer of diarrheal toxin. In all cases, we confirmed that the addition of the rosemary extract to the spore suspension before heat treatment had increased sensitivity of the spores or reduced their viability after heat treatment in comparison to control sample (without extract addition). For quantitative evaluation of the effect of the extract on the thermal sensitivity of spores, the thermal inactivation curves were used to calculate D-values of *Bacillus cereus* (ŽMJ 164) with values of 4.77 min without the extract and 2.44 min with extract with MIC concentration at 100 °C. For *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ŽMJ 184), we calculated D-value of 15.90 min without the extract and 3.03 min containing the extract with a concentration of MIC at heating temperature of 90 °C. The results suggest the potential usefulness of the extract, not only as the inhibitor of bacterial growth, but also to increase effectiveness of pasteurization, thus ensuring quality and safety of heat-processed foods, which are affected by heat-resistant bacterial spores.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija .....	III
Key words documentation .....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazalo slik.....	IX
Okrajšave in simboli.....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ROŽMARIN .....	3
<b>2.1.1 Uporaba in lastnosti rožmarina.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Kemijska sestava rožmarina .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Fenolni diterpeni.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.4 Ekstrakcija izvlečka rožmarina .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.5 Protimikrobno delovanje komponent rožmarina .....</b>	<b>6</b>
2.2 BAKTERIJE .....	7
<b>2.2.1 Bakterije rodu <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>7</b>
2.2.1.1 Zgodovina.....	7
2.2.1.2 Morfološke in fiziološke lastnosti bakterije <i>B. cereus</i> .....	7
2.2.1.3 Ekologija in patogenost bakterije <i>B. cereus</i> .....	8
<b>2.2.2 Bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....</b>	<b>8</b>
2.2.2.1 Zgodovina.....	9
2.2.2.2 Morfološke in fiziološke lastnosti bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	9
2.2.2.3 <i>Alicyclobacillus</i> kot povzročitelj kvara brezalkoholnih pijač.....	10
2.3 SPORE .....	11
<b>2.3.1 Struktura spore.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2 Sporulacija vegetativne celice.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.3 Kaljenje spore .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.4 Odpornost spor .....</b>	<b>14</b>
2.3.4.1 Toplotna odpornost spor.....	15
2.4 METODE ZA SEPARACIJO SPOR IN VEGETATIVNIH CELIC .....	17
<b>2.4.1 Učinkovitost metod za separacijo vegetativnih celic in spor .....</b>	<b>17</b>
2.5 METODE TESTIRANJA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI.....	19
<b>2.5.1 Difuzijske metode .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5.2 Dilucijske metode.....</b>	<b>21</b>

<b>2.5.3 Kinetika protimikrobnega delovanja</b> .....	21
2.6 METODE TESTIRANJA VIABILNOSTI SPOR .....	21
<b>2.6.1 Merjenje toplotne odpornosti spor</b> .....	22
<b>2.6.2 Decimalni redukcijski čas</b> .....	22
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>24</b>
3.1 POTEK DELA .....	24
3.2 MATERIAL .....	25
<b>3.2.1 Mikroorganizmi</b> .....	25
<b>3.2.2 Mikrobiološka gojišča</b> .....	25
3.2.2.1 Selektivna gojišča .....	25
3.2.2.1.1 Gojišče <i>Bacillus cereus</i> .....	25
3.2.2.1.2 Gojišče <i>Alicyclobacillus</i> medij (AM) - za difuzijsko metodo v agarju ter štete kolonij na ploščah .....	26
3.2.2.1.3 Gojišče <i>Alicyclobacillus</i> medij (AM) - za dilucijsko metodo .....	26
3.2.2.1.4 Bujon <i>Alicyclobacillus</i> (bujon AM) za pripravo inokuluma .....	27
3.2.2.1.5 Gojišče za pripravo spor <i>Alicyclobacillus</i> (AM za spore) .....	27
3.2.2.1.6 Gojišče za pripravo spor <i>Bacillus cereus</i> .....	28
3.2.2.2 Neselektivna gojišča .....	28
3.2.2.2.1 Gojišče triptični soja agar (TSA) za gojenje biomase vrste <i>B. cereus</i> .....	28
3.2.2.2.2 Bujon TSB za pripravo inokuluma vrste <i>B. cereus</i> .....	28
3.2.2.2.3 Gojišče BHI za pripravo inokuluma vrste <i>B. cereus</i> .....	28
<b>3.2.3 Raztopine in dodatki</b> .....	29
3.2.3.1 Fiziološka raztopina .....	29
<b>3.2.4 Snovi s protimikrobnim delovanjem</b> .....	29
3.2.4.1 Izvleček rožmarina VivOX 40 v prahu (Vitiva, Markovci, Slovenija) .....	29
3.2.4.2 Priprava osnovne raztopine izvlečkov in nadaljnjih razredčitev .....	29
<b>3.2.5 Druge kemikalije in dodatki</b> .....	29
<b>3.2.6 Laboratorijska oprema</b> .....	30
3.3 METODE DELA .....	31
<b>3.3.1 Revitalizacija mikroorganizmov</b> .....	31
<b>3.3.2 Priprava inokuluma za gojenje spor</b> .....	31
<b>3.3.3 Sporulacija vegetativnih celic</b> .....	31
<b>3.3.4 Priprava suspenzije spor z ločevanjem biomase na vegetativne celice in spore</b> .....	31
<b>3.3.5 Določanje koncentracije spor</b> .....	32
<b>3.3.6 Metoda difuzije v gojišču AM za določitev minimalne inhibitorne         koncentracije izvlečka (MIC)</b> .....	32
3.3.6.1 Uporabljeni material .....	32
3.3.6.2 Izvedba metode .....	32
<b>3.3.7 Metoda dilucije v gojišču AM</b> .....	33
3.3.7.1 Uporabljeni material .....	33
3.3.7.2 Izvedba metode .....	33

<b>3.3.8 Ugotavljanje vpliva izvlečka rožmarina na toplotno odpornost bakterijskih spor <i>Bacillus</i> in <i>Alicyclobacillus</i></b> .....	34
3.3.8.1 Uporabljeni material .....	34
3.3.8.2 Izvedba metode .....	34
<b>3.3.9 Izračun D-vrednosti</b> .....	34
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>35</b>
4.1 EKSPERIMENTI S SEVOMA <i>B. CEREUS</i> (ŽMJ 164) TER <i>B. CEREUS</i> (ŽMJ 91) .....	36
4.1.1 Izbor koncentracij rožmarinskega izvlečka za testiranje občutljivosti sevov vrste <i>Bacillus cereus</i> .....	36
4.1.2 Preverjanje učinkovitosti toplotnega šoka pri bakteriji <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) za pripravo suspenzije spor .....	36
4.1.3 Določanje optimalnega kontaktnega časa izvlečka rožmarina s sporami bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pred toplotno obdelavo .....	38
4.1.4 Iskanje optimalnega časa toplotne obdelave pri 100 °C za določitev vpliva izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) .....	40
4.1.5 Izračun D-vrednosti za spore bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri 100 °C .....	41
4.1.6 Iskanje optimalne koncentracije spor in izvlečka rožmarina za realno ocenitev redukcije števila spor po toplotni obdelavi v živilu za spore bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) .....	42
4.1.7 Vpliv izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 91) .....	43
4.2 EKSPERIMENTI S SEVOMA <i>A. ACIDOTERRESTRIS</i> (ŽMJ 184) TER <i>A. ACIDIPHILUS</i> (ŽMJ 185) .....	44
4.2.1 Izbor koncentracij rastlinskega izvlečka (MIC) za testiranje občutljivosti spor vrst <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) in <i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> (ŽMJ 185) .....	44
4.2.2 Izbor ustreznih časov segrevanja suspenzije spor bakterije <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 100 °C in 90 °C .....	44
4.2.4 Vpliv izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterij <i>A. acidiphilus</i> (ŽMJ 185) .....	48
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>49</b>
5.1 RAZPRAVA .....	49
5.1.1 Primerjava D-vrednosti .....	50
5.2 SKLEPI .....	52
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>53</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>55</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne učinkovine v listu rožmarina (Rosemary-eco, 2006; Del Campo in sod., 2000).....	4
Preglednica 2: Najpogostejše metode za čiščenje bakterijskih spor.....	18
Preglednica 3: Mikrobiološke metode za določanje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004). ...	20
Preglednica 4: Delovni mikroorganizmi .....	25
Preglednica 5: D-vrednosti za spore bakterij <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri 100 °C.....	41
Preglednica 6: D-vrednosti za spore bakterij <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 90 °C.....	47
Preglednica 7: Primerjava D-vrednosti <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) z drugimi avtorji.....	50
Preglednica 8: Primerjava D-vrednosti <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) z drugimi avtorji .....	50



## KAZALO SLIK

Slika 1: Rožmarin ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) (Rosemary..., 2007).....	3
Slika 2: Najpomembnejši antioksidanti v rožmarinu (Armengol in Betés, 1995).....	5
Slika 3: Bakterije vrste <i>Bacillus cereus</i> (Blais in Shaw, 2005).....	8
Slika 4: Bakterije <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> , posnete z elektronskim mikroskopom (Rohde, 2009).....	9
Slika 5: Strukturna formula $\omega$ -cikloheksilne in $\omega$ -cikloheptilne maščobne kisline (Goto, 2007). .....	10
Slika 6: Kemijske spojine, povezane z okužbo z bakterijami <i>Alicyclobacillus</i> in odgovorne za neprijeten vonj (Tokuda, 2007).....	11
Slika 7: Spora <i>B. cereus</i> , posneta s TEM ( <i>Bacillus</i> spore, 2006).....	11
Slika 8: Prerez spore <i>B. cereus</i> (Zhao, 2006).....	12
Slika 9: Stopnje sporulacije vegetativne celice in kaljenja spore (Slepecky, 1978).....	13
Slika 10: Slika suspenzije spor (TEM), obdelana z lizocimom (Zhao, 2006).....	19
Slika 11: Slika suspenzije spor (TEM), obdelana s centrifugacijo (Zhao, 2006).....	19
Slika 12: Testiranje inhibicije bakterijske rasti z difuzijsko metodo v agarju z diski.....	20
Slika 13: Shema eksperimentalnega dela.....	24
Slika 14: Vpliv temperature toplotne obdelave (šoka) na separacijsko neobdelan inokulum spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri temperaturi 80 °C, 90 °C in 100 °C.....	37
Slika 15: Vpliv kontaktnega časa spor in izvlečka rožmarina pri sobni temperaturi in temperaturi hladilnika (8 °C) na preživelost spor <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) brez segrevanja. ....	38
Slika 16: Vpliv kontaktnega časa spor in izvlečka rožmarina pri sobni temperaturi in temperaturi hladilnika (8 °C) na preživetje spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) po naknadni toplotni obdelavi (100 °C; 5 min).....	39
Slika 17: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 10 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri temperaturi 100 °C.....	40
Slika 18: Termična inaktivacijska krivulja za spore bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri 100 °C.....	41
Slika 19: Vpliv nižje koncentracije spor ( $10^4$ - $10^5$ CFU/mL) na testiranje učinka izvlečka rožmarina na spore bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 164) pri 100 °C.....	42
Slika 20: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 10 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>B. cereus</i> (ŽMJ 91) pri 100 °C.....	43
Slika 21: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 5 min) in dodatka izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 100 °C.....	44
Slika 22: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 2 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 100 °C.....	45
Slika 23: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 4 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 90 °C.....	46
Slika 24: Termična inaktivacijska krivulja za spore bakterije <i>A. acidoterrestris</i> (ŽMJ 184) pri 90 °C.....	47

Slika 25: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 4 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *A. acidiphilus* (ŽMJ 185) pri 90 °C.....48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

### Okrajšava, simbol

*A. acidiphilus*

*A. acidoterrestris*

AM

ATCC

*B. cereus*

BCA agar

BHI

CFU

DNA

DPA

DSMZ

g

EtOH

MIC

NCTC

OTC

ppb

RPM

SASP

TEM

TSA

TSB

UVT

WSBC

ŽMJ

### Pomen

*Alicyclobacillus acidiphilus*

*Alicyclobacillus acidoterrestris*

gojišče *Alicyclobacillus*, tekoči ali trdni medij

American Type Culture Collection

*Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* agar

Brain Heart Infusion bujon

kolonijska enota (ang. »Colony Forming Unit«)

deoksiribonukleinska kislina

dipikolinska kislina

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

gravitacijska sila

etanol

minimalna inhibitorna koncentracija

National Collection of Type Cultures

oksitetraciklin

št. delcev na milijardo

obrati na minuto

majhni, v kislinah topni proteini (ang. »Small, Acid-Soluble Proteins«)

transmisijski elektronski mikroskop

tripton soja agar (Tryptone Soya Agar)

tripton soja bujon (Tryptone Soya Broth)

ultra visoka temperatura

tipski sev zbirke Weihenstephan *B. cereus* Culture Collection

mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

## 1 UVOD

Začimbe in zelišča so vedno imela pomembno vlogo pri pripravi hrane in pijač, saj vsebujejo številne aromatične, pa tudi antioksidativne in protimikrobne snovi, ki prispevajo k boljši kakovosti, npr. izboljšanim senzoričnim lastnostim, pa tudi k varnosti in podaljšani obstojnosti hrane, saj zavirajo njeno kvarjenje. Na ta način lahko nadomestijo druge, npr. kemijske dodatke.

Sodobni potrošniki zahtevajo prehranske izdelke z manj sintetičnimi dodatki, hkrati pa tudi povečano varnost in obstojnost živil. Te zahteve povečujejo pomen rastlinskih zaščitnih snovi, ki lahko preprečujejo kvarjenje živilskih izdelkov in rast patogenih mikroorganizmov.

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je zimzelen grm z številnimi uporabnimi lastnostmi. Dodan v obliki listov ali kot izvleček podaljšuje obstojnost živil s preprečevanjem oksidacije. Fenolne spojine rožmarinskega izvlečka imajo tudi protimikrobno aktivnost na Gram pozitivne bakterije, saj zavirajo njihovo rast (Del Campo in sod., 2000).

Mnogi rastlinski izvlečki imajo dokazano protimikrobno delovanje na bakterije v obliki zaviranja njihovega razmnoževanja oz. hitrosti rasti, pa tudi zmanjševanja števila vegetativnih mikrobnih celic v živilih. Kvarjenje in zdravstveno neustreznost pa lahko povzročajo tudi sporogene bakterije. Bakterije rodu *Bacillus* so v naravi in tudi živilstvu zelo razširjene sporogene bakterije. Poleg številnih vrst, ki kvarijo različna živila, vrsto *Bacillus cereus* povezujemo z dvema oblikama alimentarnih toksikoinfekcij - z zastrupitvijo z emetičnim toksinom in črevesno okužbo z diarejo. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so termofilne, aerobne, nepatogene, sporogene bakterije, ki lahko rastejo tudi pod vrednostjo pH 3. Povzročajo kvar jabolčnega in pomarančnega soka oz. povsod tam, kjer je kislost zadosti nizka, da te acidofilne bakterije rastejo (Goto, 2007; Bhunia, 2008).

Bakterijske spore nastanejo s sporulacijo vegetativnih bakterijskih celic takrat, ko pogoji za rast in razmnoževanje postanejo neugodni. Preživijo lahko daljša obdobja pri visokih temperaturah, suši in ob prisotnosti kemikalij. Spore kalijo v vegetativne celice, ko so razmere za rast spet ugodne. V živilski tehnologiji je zelo pomemben parameter toplotna odpornost spor, saj so visoke temperature sterilizacijskih postopkov daleč največkrat uporabljen način uničevanja bakterijskih spor v živilih. Pri toplotni odpornosti spor so najpomembnejši dejavniki temperatura, pri kateri je spora nastala, vrednost pH in hranilne snovi v mediju, vodna aktivnost ( $a_w$ ), raven kisika, prisotnost organskih kislin in različnih protimikrobnih snovi (Holdsworth in Simpson, 2008).

Že pred leti so opazili, da so pijače v aparatih s toplimi napitki bolj obstojne, če so pripravljene na osnovi zelenega čaja. Sakanaka in sod. (2000) so zato naredili raziskave vpliva polifenolov v zelenem čaju na toplotno odpornost bakterijskih spor rodov *Bacillus stearothermophilus* in *Clostridium thermoaceticum*. Toplotna odpornost spor se je po dodatku rastlinskih polifenolov zmanjšala pri obeh bakterijskih vrstah.

Ker so bili v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo v teku poizkusi za dokazovanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih fenolov v obliki inhibicije rasti različnih sevov bakterij, vključno s sporogenimi rodovi, smo želeli preizkusiti tudi njihov protimikrobni učinek v obliki zmanjšanja toplotne odpornosti spor, kar je v živilstvu zelo pomembno za ohranjanje kakovosti in varnosti toplotno obdelanih živil. Zato smo postavili naslednje cilje diplomskega dela:

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti učinek komercialnega rožmarinskega izvlečka VivOX 40 in temperature toplotne obdelave na toplotno odpornost spor različnih sevov rodov *Bacillus* in *Alicyclobacillus*. Najprej smo raziskali in primerjali toplotno odpornost bakterijskih spor brez dodatka rastlinskega izvlečka, nato pa še ob različnih koncentracijah rastlinskega izvlečka. Pri eksperimentalnem delu smo izhajali iz naslednjih hipotez:

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Toplotna odpornost spor različnih sevov vrste *B. cereus* in rodu *Alicyclobacillus* je različna.
- Toplotno občutljivost spor lahko povečamo z dodatkom rožmarinskega izvlečka.
- Sinergistični učinek je odvisen od uporabljene temperature toplotne obdelave in koncentracije izvlečka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ROŽMARIN

Rožmarin je gostolistni zimzeleni grm iz družine ustnatic (*Lamiaceae*). Doma je v suhih sredozemskih območjih, kjer zraste do 2 m visoko. V Evropi ga že stoletja gojijo kot dišavno zelišče. Mnoge varietete, ki jih gojijo kot okrasne rastline, izhajajo iz navadnega rožmarina (*Rosmarinus officinalis*). Raste v suhih, južnih delih Evrope, predvsem v mediteranski regiji na vseh substratih do 2800 metrov. Največ ga pridelajo v Španiji, Tuniziji in Maroku (Rosemary-eco, 2006). Protimikrobne komponente, ki jih najdemo v celotni družini *Lamiaceae* in sorodni družini *Labiatae*, učinkujejo na širok spekter mikroorganizmov (Fernández-López in sod., 2005). Imajo tudi antioksidativne lastnosti, ki so zelo pomembne za ohranjanje kakovosti hrane, podaljševanje obstojnosti in preprečevanje ekonomskih izgub (Yin in Cheng, 2003).

#### 2.1.1 Uporaba in lastnosti rožmarina

Celotna rastlina se uporablja pri izdelavi eteričnega olja in oleorezina, ki ima pomembno mesto v tradicionalni in moderni medicini. Rožmarin učinkuje kot sredstvo proti vetrovom (flavanoidi), kot antidepresiv, sredstvo proti krčem (hlapna olja), sredstvo za pordečenje kože (fenoli), ima protimikrobni (diterpeni), protivnetni in antikancerogeni učinek (karnozol), velja kot razstrupljevalec jeter (karnozol in izvleček cele rastline), protirevmatično sredstvo (rožmarinsko mazilo) in sredstvo za povzročitev splava (vodni izvleček) (Jones, 2002; Plouzek in sod., 1999). Tradicionalno so ga uporabljali kot antiseptik in konzervans v hrani, še preden so izumili hladilnik (Cuvelier in sod., 1996).



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

## 2.1.2 Kemijska sestava rožmarina

Preglednica 1: Glavne učinkovine v listu rožmarina (Rosemary-eco, 2006; Del Campo in sod., 2000).

		komponente	koncentracija (%)
Eterična olja		$\alpha$ -pinen; 1,8-cineol; kamfor, kamfen, borneol, bornil acetat, $\alpha$ -terpineol	1 - 2,5 %
Polifenoli	Flavonoidi	apigenin, rutin, hesperetin, genkvanin	-
	Fenolne kisline	kavna kislina, klorogenska kislina in rožmarinska kislina	2 - 3 %
Terpenoidi	Diterpeni	karnozolna kislina in karnozol (v večini), rožmanol, epirožmanol...	> 4 %
	Triterpeni	ursolna kislina	2 - 4 %

Snovi, ki nas zanimajo, lahko delimo tudi po kriteriju polarnosti v 3 skupine (Del Campo in sod., 2000):

- fenolne kisline: ferulna kislina, kavna kislina, rožmarinska kislina
- flavonoidi: apigenin, rutin, hesperetin, genkvanin
- fenolni diterpeni: karnozolna kislina, karnozol, rožmanol, rožmandial, karnozolna kislina o-kinin, epirožmanol, isorožmanol.

Rožmarinska kislina je ester, ki nastane z povezavo kavne (3,4-hidroksi-dihidro kavne kisline) in mlečne kisline. Predstavlja eno izmed najbolj pogostih estrov kavne kisline v rastlinskem materialu. Biološki učinki rožmarinske kisline so protibakterijski, protivirusni in antioksidativni. Nedavne raziskave ji pripisujejo tudi anti-HIV aktivnosti (Chen in sod., 1999).

Flavonoidi so fenolne strukture z eno karbonilno skupino in hidroksilirane fenolne snovi, katere se pojavljajo v C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> enotah, povezanih v aromatski obroč. Rastline jih sintetizirajo kot protimikrobni odgovor pri okužbah, ki pa se pokaže tudi *in vitro* proti široki paleti mikroorganizmov. Ta aktivnost je povezana z sposobnostjo ustvarjanja kompleksov z bakterijskimi proteini in bakterijsko celično steno. Proteini pri tem izgubijo svojo funkcijo. Nekatere protimikrobne snovi delujejo kompleksno na več tarčnih mest oz. organel celice. Pri nekaterih drugih pa izkoriščamo prav specifično učinkovanje, npr. inhibicijo kaljenja bakterijskih spor, kar je razumljivo, saj je le malo možnosti za obvladovanje sporogenih bakterij (Smole Možina in sod., 2009).

### 2.1.3 Fenolni diterpeni

Fenolni diterpeni so znani po močni antioksidativni aktivnosti, močni aktivnosti proti tumorjem, proti-HIV in protimikrobni aktivnosti (Schwarz, 2002).

Karnozolno kislino so našli v največji koncentraciji v listih rožmarina in žajblja (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L.), največ v kloroplastih. Kot organel je kloroplast najbolj izpostavljen oksidativnim poškodbam v celici, prav zaradi višjih vsebnosti kisika in tvorbe radikalov, zaradi opravljanja funkcije fotosinteze. Radikali lahko poškodujejo membrano in povzročijo celično smrt, ki jo karnozolna kislina s svojo antioksidativno aktivnostjo ustavi. Koncentracija karnozolne kisline v listih je odvisna od letnega časa, in sicer je imajo največ listi poleti, najmanj pozimi. Nizka vlaga povzroči stresno situacijo, ki posledično prav tako poveča koncentracijo karnozolne kisline (Schwarz, 2002).

Od vseh fenolnih diterpenov sta najbolj učinkovita antioksidanta karnozolna kislina in karnozol, ki sta učinkovitejša od  $\alpha$ -tokoferola, butiliranega hidroksitoluena (BHT) in butiliranega hidroksitoluena (BHA). Ostali fenolni diterpeni, npr. rožmanol, izhajajo iz karnozolne kisline. Pretvorbo lahko sproži oksidacija (radikali), daljše hranjenje, ekstrakcija in encimska dehidrogenacija karnozolne kisline (Masuda in sod., 2001).



Slika 2: Najpomembnejši antioksidanti v rožmarinu (Armengol in Betés, 1995).



### 2.1.4 Ekstrakcija izvlečka rožmarina

Ekstrakcija eteričnega olja poteka z destilacijo, ker so komponente hlapne. V primeru nehlapnega izvlečka pa se uporablja konvencionalna solventna ekstrakcija z uporabo različnih topil, kot so heksan, benzen, etilen, kloroform, dioksan in metanol. Uporablja se tudi superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE) s CO<sub>2</sub>, ki omogoča najučinkovitejšo ekstrakcijo karnozolne kisline v čisti obliki (Tena in sod., 1997).

### 2.1.5 Protimikrobno delovanje komponent rožmarina

Rastlinski izvlečki ponavadi vsebujejo veliko različnih kemijskih sestavin, med katerimi ima vsaka lahko drugačen način delovanja. Tarče ter principi delovanja so lahko povezani s poškodbo celične stene, membrane, membranskih proteinov, uhajanjem celične vsebine, koagulacijo citoplazme in zmanjšanjem protonskega gradienta (Burt, 2004; Smole Možina in sod., 2009).

Pomembna lastnost fenolnih komponent je hidrofobnost, ki jim omogoča vgraditev v lipide v celični steni bakterije in mitohondriju ter posledično povzročijo večjo prepustnost in zmotijo delovanje teh struktur. Zatem se lahko pojavi puščanje ionov in celične vsebine, katere celica dopušča do neke meje, brez izgube viabilnosti. Izgubo kritičnih molekul, ionov in preveliko puščanje vsebine pa bo vedno vodilo do celične smrti (Burt, 2004).

Med fenolnimi komponentami iz rožmarinskega izvlečka je karnozolna kislina najbolj protimikrobno učinkovita (Del Campo in sod., 2003; Moreno in sod., 2006). Raziskave so bile opravljene na vrsti *Listeria monocytogenes* s karnozolno kislino, ki ima boljšo protimikrobno aktivnost pri nižjih vrednostih pH in slabšo pri višjih koncentracijah NaCl. Kaže baktericidni učinek na bakterijah *L. monocytogenes* pri nizkih koncentracijah karnozolne kisline (ca. 100-krat nižjih kot v živilu). Princip delovanja karnozola je inhibicija poti sinteze nukleinskih kislin, karnozolne kisline pa preprečuje vgrajevanje timidina v DNA in uridina v RNA (Schwarz, 2002).

Različni rožmarinski izvlečki so pokazali inhibitorno aktivnost na bakterijski vrstah *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* in *Vibrio cholerae*. Karnozol in ursolna kislina sta bila odgovorna za protimikrobni učinek, ki vključuje tudi HIV-1 virus, glive (*Aspergillus* spp. itd.) in mlečnokislinske bakterije (npr. *Lactobacillus brevis*). Metanolni rožmarinski izvleček (30 % karnozolne kisline, 16 % karnozola, 5 % rožmarinske kisline) je pokazal največji protimikrobni učinek proti Gram pozitivnim bakterijam. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je znašala med 2-15 mg/mL. Proti Gram negativnim bakterijam in kvasovkam so bile te vrednosti višje (med 2-60 mg/mL), torej je bila

učinkovitost slabša. Sama rožmarinska kislina (15 %) v vodni raztopini je bila veliko manj učinkovita od rožmarinskega izvlečka (Moreno in sod., 2006).

Novejše raziskave so opravili Klančnik in sod. (2009) na bakterijah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* in *Salmonella Infantis*. Z različnimi metodami ugotavljanja protimikrobne aktivnosti so ugotovili večjo občutljivost Gram pozitivnih bakterij. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) z dilucijsko metodo v agarju za vrsti *S. aureus* in *B. cereus* so ugotovili pri 0,078 - 0,625 mg/mL koncentracije komercialnega izvlečka s 40 % karnozolne kisline. Pokazali so tudi veliko razliko v protimikrobni učinkovitosti v olju topnega rožmarinskega izvlečka in vodotopno formulo. V olju topna formula se je izkazala kot veliko bolj protimikrobno učinkovita.

## 2.2 BAKTERIJE

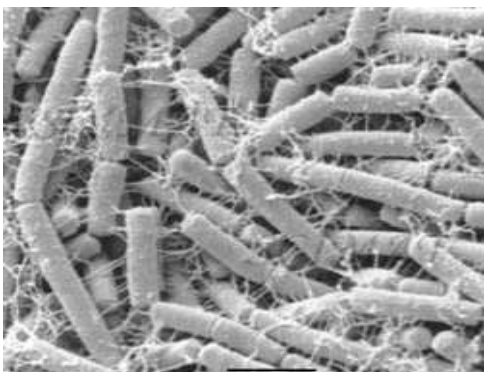
### 2.2.1 Bakterije rodu *Bacillus*

#### 2.2.1.1 Zgodovina

Rod *Bacillus* je poimenoval Ferdinand Cohn leta 1872, ko je preimenoval Ehrenbergov »*Vibrio subtilis*« v *Bacillus subtilis*. Vrsto *B. cereus* sta prvič izolirala in opisala mikrobiologa Frankland 1887. leta. Ugotovila sta, da so to običajni in pogosti mikroorganizmi v prsti. V Evropski literaturi je že na začetku 20. stoletja veliko poročil o zastrupitvah z hrano s to vrsto ali tem bakterijam podobnimi mikroorganizmi (Kramer in Gilbert, 1989).

#### 2.2.1.2 Morfološke in fiziološke lastnosti bakterije *B. cereus*

Bakterija *B. cereus* je ubikvitarna, Gram pozitivna, sporogena, aerobna ali fakultativno anaerobna bakterija paličaste oblike. Dimenzije vegetativnih celic so približno 0,5 x 1,2 do 2,5 x 10 µm in se pojavljajo samostojno ali v verižicah. Večina bacilov je gibljivih. Rastna temperatura je 4-50 °C, z optimumom od 25 do 37 °C, termofilni sevi pa tudi do 75 °C. Psihrotolerantne seve bacilov najdemo v mleku in mlečnih izdelkih. *B. cereus* ponavadi ne raste pod pH 4,5 (Bhunia, 2008). Tvori lahko eno endosporo v centralni ali paracentralni poziciji. Celica sporulira na številnih medijih v aerobnih razmerah in najhitreje pri 30 °C. Določeni sevi lahko izkoriščajo saharozo, salicin, maltozo, manozo, glicerol, m-inozitol in laktozo. Manjši delež bakterij *B. cereus* je tudi ureaza pozitivnih, večji delež pa hidrolizira škrob, kazein in želatino (Kramer in Gilbert, 1989).



Slika 3: Bakterije vrste *Bacillus cereus* (Blais in Shaw, 2005).

### 2.2.1.3 Ekologija in patogenost bakterije *B. cereus*

Primarna ekološka niša teh bakterij je zemlja, kjer je saprofit in od tam se lahko zlahka prenese na različna živila, posebno rastlinskega izvora. Pogosto je izoliran tudi iz mesa, jajc, mlečnih proizvodov, hrane za dojenčke, začimb, živil na osnovi žit, itd. (Kramer in Gilbert, 1989).

Bakterija *B. cereus* je znana kot oportunistični patogen, ki ga pogosto povežemo z dvema vrstama zastrupitev z hrano - diarejo in abdominalnimi bolečinami, ki se pojavijo 8-16 ur po zaužitju kontaminirane hrane, ter slabostjo in bruhanjem, pri čemer se simptomi pojavijo že po nekaj urah. Pri obeh vrstah okužbe je bolezen ponavadi mila in kratka ter ponavadi ne traja več kot 24 ur. Kljub temu poznamo tudi več primerov smrti, zaradi zaužitja kontaminirane hrane okužene z visokimi koncentracijami emetičnega toksina ali pa nekrotičnega enterotoksina. Posebej nevaren je pri pacientih z slabšim imunskim sistemom ali pacientih, ki so prestali operacijo. Pri obeh vrstah zastrupitev s hrano je ta ponavadi toplotno obdelana, vir zastrupitve pa so preživele spore, ki v ugodnih razmerah kalijo v vegetativne celice. Če temperatura toplotne obdelave ni dovolj visoka, spor ne uniči, pač pa spodbudi njihovo kalitev (Bhunja, 2008).

### 2.2.2 Bakterije rodu *Alicyclobacillus*

Nedolgo nazaj je obstajalo prepričanje, da bakterijske spore ne morejo kaliti v vegetativne celice, le-te pa se ne morejo razmnoževati v tako kislem mediju, kot so to na primer sadni sokovi (Splittstoesser in sod., 1994). Zato so dolgo časa za domnevne krivce kvarjenja veljale kvasovke, plesni in nekatere nesporogene bakterije. Vieira in sod (2002) pa so dokazali, da je bila pasterizacija dovolj učinkovita, da je uničila te mikroorganizme, a premalo, da bi uničila spore bakterij *Alicyclobacillus*.

### 2.2.2.1 Zgodovina

Kot prva sta leta 1967 Uchino in Doi nevede izolirala bakterije rodu *Alicyclobacillus* iz toplega vrelega blizu jezera Tazawa na Japonskem. Tam so uspevale v podobno kislih in geotermičnih razmerah kot bakterije *Bacillus coagulans*. Kasneje so tudi drugi znanstveniki odkrili sev, s karakteristikami, podobnimi iz Japonske, tokrat v Yellowstonskem parku v ZDA. Poimenovali so ga *Bacillus acidocaldarius*, kot novo vrsto v rodu *Bacillus*. Odkrili so tudi nenavadne  $\omega$ -cikloheksilne maščobne kisline kot glavne celične maščobne kisline (Sawaki, 2007).

Leta 1982 je prvič prišlo do dokazanega obsežnejšega kvarjenja aseptično polnjenega jabolčnega soka v Nemčiji in potrditev bakterij rodu *Alicyclobacillus* kot povzročiteljev kvarjenja soka. Od takrat se je kvar pojavljal tudi v drugih podjetjih, skupaj z neprijetnim vonjem in usedlino, ki ju povzroča *Alicyclobacillus* (Duong in Jensen, 2000). Prvi incident v ZDA se je pojavil leta 1994, leta 1997 še v Avstraliji, kjer so identificirali neprijeten vonj kot gvajakol, skupaj s sevom, podobnim bakterijam *Alicyclobacillus*. V zadnjih letih pa je ta bakterija povzročila kontaminacije in kvarjenje tudi drugih izdelkov v proizvodnji pijač in postaja velik industrijski problem (Sawaki, 2007).



Slika 4: Bakterije *Alicyclobacillus acidocaldarius*, posnete z elektronskim mikroskopom (Rohde, 2009).

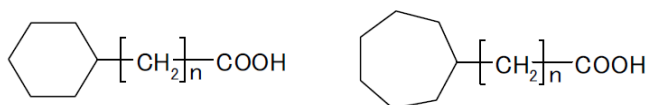
### 2.2.2.2 Morfološke in fiziološke lastnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus*

Vegetativne celice *Alicyclobacillus* so termofilne, aerobne, nepatogene, slabo gibljive, paličaste oblike, ki formirajo približno 0,7-1  $\mu\text{m}$  široke in 3-5  $\mu\text{m}$  dolge ovalne endospore. Verižna razvrstitev celic je redka. Večina celic nabreka, medtem ko formira endosporo. Celice so grampozitivne v prvih fazah gojenja, kasneje postanejo gram variabilne ali gramnegativne. Velikost kolonij je odvisna od rastnega medija, a ponavadi zrastejo do 2-5 mm. Morfologija kolonije je odvisna od seva, vendar so običajno okrogle, bele do bež, s starostjo postajajo

temnejše barve. Rastejo le 0,5-1 mm v gojišče zaradi pomanjkanja koncentracije kisika (Imperio in sod., 2008; Goto, 2007).

Rod *Alicyclobacillus* je bil uveden v bakterijsko nomenklaturu v letu 1992, ko so Wisotzkey, Jurstuk, Fox, Deinhard in Poralia (1992) preimenovali *Bacillus acidoterrestris*, *B. acidocaldarius* in *B. cycloheptanicus* v *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* in *A. cycloheptanicus*, predvsem zaradi drugačne vsebnosti maščobnih kislin v plazmini membrani. Danes poznamo 18 različnih vrst teh bakterij (*A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. contaminans*, *A. cycloheptanicus*, *A. disulfidooxydans*, *A. fastidiosus*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. kakegawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. pohliae*, *A. pomorum*, *A. sacchari*, *A. sendaiensis*, *A. shizuokensis*, *A. tolerans*, *A. vulcanalis*). Izolirane so bile iz zemlje, pokvarjenih sokov ali drugih ekstremnih okolij (Imperio in sod., 2008). Rastne karakteristike v priporočenem mediju (BAM- *Bacillus acidocaldarius* medij) so rast med 25-60 °C, vrednost pH med 2,55-5,5 (optimalni pH 3,5-4,5) (Previdi in sod., 1995).

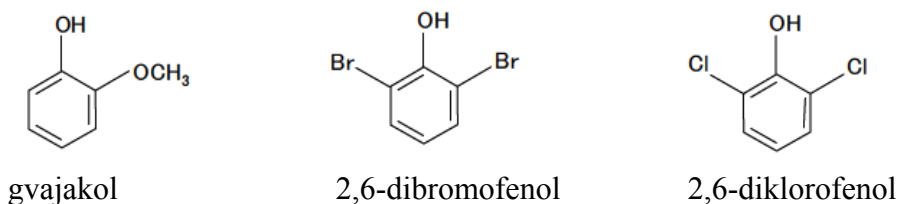
Posebnost večine *Alicyclobacillus* vrst je prisotnost  $\omega$ -cikloheksilnih/ $\omega$ -cikloheptilnih maščobnih kislin v membrani (Goto in sod., 2003). Te maščobne kisline (Slika 5) so našli v vseh vrstah rodu *Alicyclobacillus*, razen v *A. pomorum*. Prisotnost  $\omega$ -alicikličnih maščobnih kislin verjetno pripomore, da lahko preživijo v ekstremnih razmerah. Čeprav so aliciklobacili striktno aerobni mikroorganizmi, lahko rastejo v mikro-aerofilnih pogojih (0,1 % kisika), vendar ko kisika zmanjka, vegetativne celice sporulirajo. Podobno kot rod *Bacillus* tudi *Alicyclobacillus* potrebuje visoko vodno aktivnost ( $a_w > 0,9$ ) in lahko preživi tudi pri 18-20 °Brix, medtem ko spore preživijo več kot pri 60 Brix° (Goto, 2007).



Slika 5: Strukturna formula  $\omega$ -cikloheksilne in  $\omega$ -cikloheptilne maščobne kisline (Goto, 2007).

### 2.2.2.3 *Alicyclobacillus* kot povzročitelj kvara brezalkoholnih pijač

Kvar živil zaradi bakterij *Alicyclobacillus* je težko vizualno zaznati. Pri pokvarjenih sokovih nastane rahla usedlina in netipičen vonj po antiseptikih oz. zdravilih, za katere je odgovoren gvajakol in drugi halofenoli, kot so 2,6-dibromofenol (Borlinghaus in Engel, 1997) in 2,6-diklorofenol (Jensen, 2000). Od teh je najbolj problematičen gvajakol in ga zaznamo pri približno 5 log CFU/mL celic *A. acidoterrestris* in pri koncentraciji 2 ppb. *A. acidoterrestris* ne proizvaja plina, tako da se pokrovček na embalaži ne izboči in se kljub taki okužbi proizvodi prodajajo (Gocmen in sod., 2005).



Slika 6: Kemijske spojine, povezane z okužbo z bakterijami *Alicyclobacillus* in odgovorne za neprijeten vonj (Tokuda, 2007).

### 2.3 SPORE

Vrste rodu *Bacillus*, *Alicyclobacillus* in *Clostridium* ob neugodnih razmerah v okolju tvorijo endospore. Posebna struktura endospore omogoča visoko odpornost na različne dejavnike, kot so visoka temperatura, suša, kemikalije, UV/ $\gamma$  - radiacija in podobno. Ta odpornost sporam omogoča preživetje v okolju več let ali desetletij. Čeprav spore nimajo metabolizma, se lahko ob prisotnosti hranil in drugih ugodnih razmer hitro spremenijo v vegetativno obliko, torej kalijo. Spore predstavljajo glavno oviro pri zagotavljanju varnosti konzervirane in pasterizirane hrane. Po 50 letih aktivnih raziskav ostaja UVT še vedno v rabi, prav tako tudi obdelava z visokim hidrostatskim tlakom (Nakayama in sod., 1996; Zhao, 2006).

Spora vsebuje bakterijsko DNA, malo citoplazme, peptidoglikan, zelo malo vode in keratinu podoben plašč, ki je odgovoren za povečano odpornost spore na toploto, izsuševanje, sevanje in kemikalije (Gould, 2006).

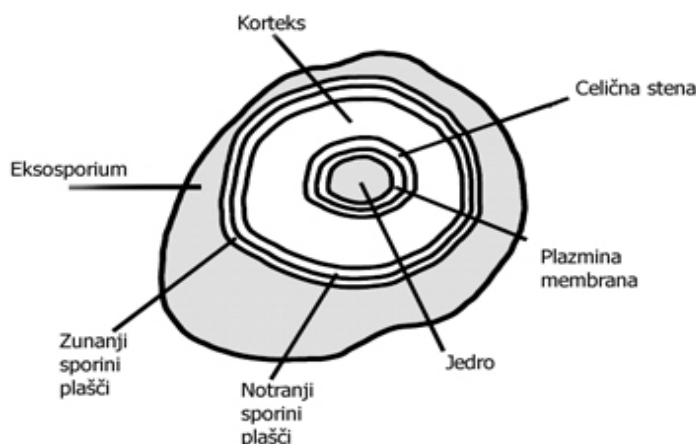


Slika 7: Spora *B. cereus*, posneta s TEM (*Bacillus* spore, 2006).

### 2.3.1 Struktura spore

Slika 8 prikazuje splošno strukturo spore, podrobnosti se razlikujejo pri nekaterih vrstah. Spora je sestavljena iz jedra, ki je obdan z plazmino membrano, celično steno, sporino skorjo (korteksom) ter notranjimi in zunanji sporinimi plašči. Sporine plašče sestavljajo koncentrično organizirani proteini in sestavljajo približno polovico volumna spore. V splošnem plašči zagotavljajo spori odpornost proti kemikalijam. V notranjem plašču ležita korteks in celična stena, oba iz peptidoglikana (mureina) (Madigan in sod., 2008).

Centralno jedro vsebuje komponente za prihodnjo vegetativno celico ter dipikolinsko kislino (DPA), večino kalcija, kalija, mangana in fosforja. Proteini, pomembni za kaljenje, se prav tako nahajajo v centralni regiji. To so majhni, v kislinah topni proteini (SASP), ki obstajajo v  $\alpha/\beta$  obliki in se vežejo na DNA. SASP se lahko hitro razgradijo med kaljenjem (Sabli in sod., 1996). Kalcijev dipikolinat (CaDPA) sestavlja do 15% suhe teže spore in je specifična sestavina bakterijskih spor (Madigan in sod., 2008).



Slika 8: Prerez spore *B. cereus* (Zhao, 2006).

### 2.3.2 Sporulacija vegetativne celice

Vegetativne celice sporo tvornih mikroorganizmov rastejo in se delijo, dokler ne pride do pomanjkanja hranil ali drugih neugodnih razmer, kot so visoke ali nizke temperature, skrajne vrednosti pH okolja, sevanje, prisotnost nekaterih mineralov (posebno  $Mn^{+2}$  in  $Ca^{+2}$ ), koncentracija določenih ogljikovih in dušikovih komponent, itd. To povzroči sporulacijo (Bergère in Cerf, 1992). Analize pod elektronskim mikroskopom so pokazale različne stopnje sporulacije, ki so ponazorjene na sliki 9:

**Stopnja 0 (vegetativna celica):** Bakterije normalno vegetativno rastejo.

**Stopnja I (aksialni filament):** Jedrni material se razporedi aksialno v filamente.

**Stopnja II (nastanek septuma):** Kromatin se loči na oba pola celice, sočasno se plazmina membrana uviha asimetrično glede na celico, da tvori septum (pregrado). Ta pregrada je podobna tisti, ki se tvori pred delitvijo celice (Hitchins in Slepecky, 1969).

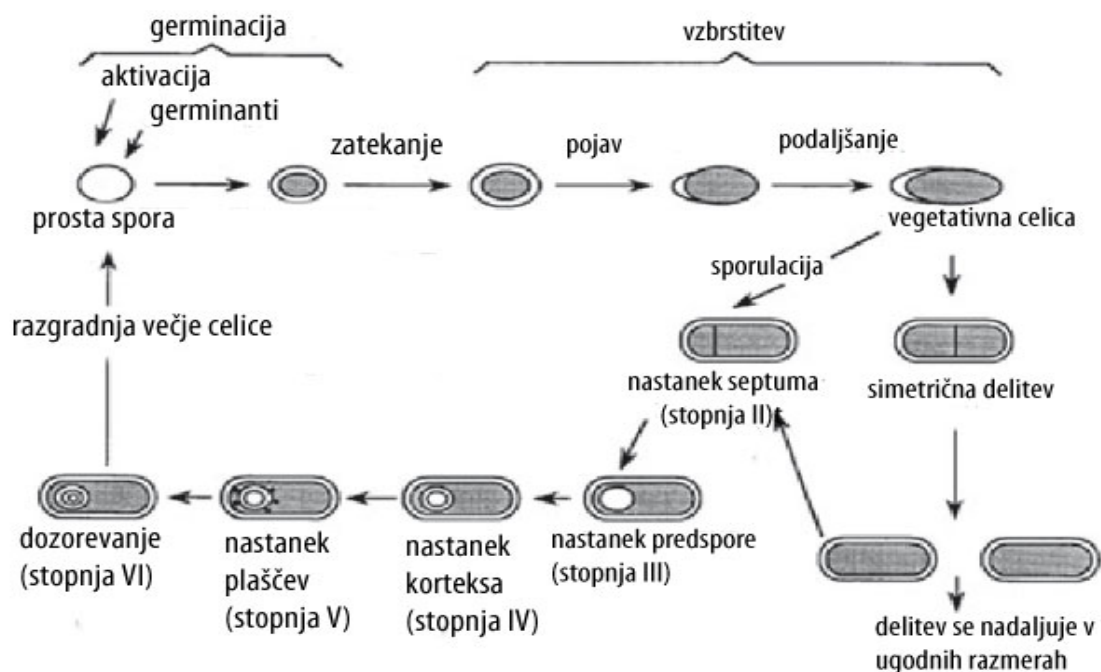
**Stopnja III (razvoj predspore):** Predspora je sedaj obdana z dvojno membrano v citoplazmi vegetativne celice.

**Stopnja IV (nastanek korteksa):** Manjša celica (predspora) postopoma postane jedro večje vegetativne celice, ta proizvaja za bodočo sporo zunanjo zaščitno plasti in hkrati vgrajuje kalcij in DPA.

**Stopnja V (nastanek plaščev):** Nastanejo plaščni proteini in pri nekaterih vrstah še eksosporium.

**Stopnja VI (dozorevanje spore):** Sintetizira se dipikolinska kislina in poveča vnos Ca v sporo. Spora je v mirujočem stanju, pridobi odpornost in ima sposobnost kaljenja.

**Stopnja VII (sprostitev dozorele spore):** Matična celica lizira, spora se sprosti (Aronson in Fitz-James, 1976; Setlow, 2003).



Slika 9: Stopnje sporulacije vegetativne celice in kaljenja spore (Slepecky, 1978).



### 2.3.3 Kaljenje spore

S kalitvijo mirujoče spore izgubijo svojo odpornost in preidejo v aktivne vegetativne celice. Določeni dejavniki (zunanji/notranji) vzpodbudijo spore h kalitvi (jih aktivirajo), sledi iniciacija kaljenja in nato vzbrstitev spore (Chaibi in sod., 1996).

Kalitev lahko sprožijo tudi različni kemični ali fizikalni vzpodbujevalni dejavniki (t.i. germinanti). Vežejo se na receptorje na zunanjih plasteh spore ali v jedrni membrani. S tem jim spremenijo strukturo in lastnosti. Tako največkrat pride do alosteričnega učinka na površini spore, sprememb v permeabilnosti, aktivacije encimov (hidrolaze, amidaze, peptidaze), ki razgradijo peptidoglikan v plašču. Učinkoviti germinanti za *B. cereus* so nekatere aminokisliline (L-alanin), ribonukleozidi (inozin, adenozin), sladkorji (glukoza, fruktoza), laktati, bikarbonati in encimi (lizocim) (Chen in sod., 2000).

V prvih dveh minutah kaljenja se prične RNA sinteza, do tedaj dormantna spora nima sposobnosti biosinteze aminokislilin. Tako je v prvih minutah kaljenja 20 % sporinih proteinov degradiranih v aminokisliline, ki zagotovijo vir za biosintezo novih proteinov in majhnih molekul (nukleotidov) pri rasti. Degradirani proteini so majhni proteini SASP, ki se nahajajo v jedru spore in so občutljivi na proteolizo. Vezani na DNA povečajo sporino odpornost na UV svetlobo (Setlow, 1988).

Bergère in Cerf (1992) sta kaljenje bakterijskih spor razdelila na 10 stopenj:

- (1) spore postanejo občutljive za segrevanje,
- (2) sprostijo se kalij, DPA in kalcij,
- (3) spore izgubijo sposobnost odsevanja svetlobe pod mikroskopom,
- (4) lahko se obarvajo v mikroskopskem preparatu,
- (5) iz skorje se začne sproščati heksozamin,
- (6) pride do sprememb v optični gostoti,
- (7) sledijo postgerminacijske reakcije,
- (8) začneta se tvoriti ATP in NADH,
- (9) poveča se prepustnost v spori,
- (10) poveča se prostornina spore.

### 2.3.4 Odpornost spor

Spore so veliko bolj odporne od vegetativnih celic na številne okoljske dejavnike, npr. na sušenje, antibiotike, hidrostatski tlak, razkužila in druge kemikalije (Setlow, 2000). Nizka vsebnost vode v protoplastu in jedru spore, skupaj z nakopičenimi minerali, pripomore k toplotni odpornosti spore (Bender in Marquis, 1985; Ulanowski in sod., 1987), mineralizacija pa poveča odpornost tudi na oksidirajoče snovi (Marquis in Shin, 1994).

K toplotni odpornosti prispeva tudi visoka koncentracija dipikolinne kisline (DPA). Njeno pomanjkanje poveča sporino vsebnost vode, zmanjša odpornost na toploto in vodikov peroksid (Paidhungat in sod., 2000).

Nasičenost sporine DNA s proteini SASP zagotavlja odpornost proti UV radiaciji, vodikovem peroksidu in sušenju z zmrzovanjem (Sabli in sod., 1996). Sporini plašči so nepropustna bariera za peptidoglikan-litični encim (lizocim) in kemikalije, sporina skorja (korteks) pa je odgovorna za odpornost na toploto, klor in jod (Setlow, 2000).

#### 2.3.4.1 Toplotna odpornost spor

Glavni dejavniki, ki vplivajo na toplotno odpornost spor rodov *Bacillus*, *Clostridium* in *Alicyclobacillus*, so opisani v nadaljevanju.

- **Vpliv sporulacijskih dejavnikov:**

- Velik vpliv ima visoka temperatura med sporulacijo, npr. spore *A. acidocaldarius*, formirane pri 45 °C, so imele 8-krat nižjo D-vrednost v primerjavi s sporami, ki so nastale pri 65 °C. Podobno so ugotovili za vrsti *A. acidoterrestris* in *B. cereus*.

- $MnSO_4$  in citronska kislina v sporulacijskem mediju povečata toplotno odpornost spor.

- Divalentni kationi ( $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ) nimajo učinka, razen  $Mn^{+2}$ , ki deluje različno na vrsto seva in različno glede na sporulacijske dejavnike (gojišče, inkubacijska temperatura in čas itd.).

- Postopek ionske izmenjave na sporini površini: spore *B. cereus* postanejo manj odporne na toploto, ko so v H-obliki (kislinski postopek) in lahko preidejo v Ca-obliko (Ca-ionski postopek). V tej obliki pa imajo povečano odpornost na toploto. Pri *A. acidoterrestris* obdelava s kislino ali kalcijem nima učinka, ker se Ca in Mn močno vežeta na PDA in preprečita izmenjavo ionov (Tanaka, 2007)

- Pomembna je tudi nizka vodna aktivnost pri sporulaciji, ki močno poveča toplotno občutljivost spor *B. subtilis* in podaljša čas sporulacije. Torej čim višja je vodna aktivnost v sporulacijskem mediju, tem večja je toplotna odpornost spore in obratno (Nguyen Thi Minh in sod., 2008).

- **Vpliv temperature toplotne obdelave spor:**

- Po 1 h pri 97 °C so dosegli 5-log stopenj redukcije pri *B. subtilis* (Nguyen Thi Minh in sod., 2008). Pri sporah bakterij *A. acidoterrestris* (izoliranih iz mešano-sadnega in

pomarančnega soka) so bile vrednosti  $D_{89^{\circ}\text{C}} = 10,9\text{-}13,7$  min in  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,1\text{-}3,2$  min (Tanaka, 2007).

- **Vpliv vodne aktivnosti:**

- Vsebnost vode v jedru spore je obratno sorazmerna njeni toplotni odpornosti (Setlow, 2006). Fine in Gervais (2005) sta našla optimalno  $a_w$  za odpornost spor *Bacillus subtilis* pri toplotni obdelavi ( $T = 140^{\circ}\text{C}$ ) okoli 0,3-0,4.

- Med celično rastjo in sporulacijo pri nizki vodni aktivnosti se pojavijo številne modifikacije v metabolizmu celic in posledično lastnostih kasneje nastale spore. Celice začnejo privzemati ione (predvsem  $\text{K}^+$ ) iz gojišča in sintetizirajo organske osmolite (npr. proline, glicin, betain), da uravnovesijo visoko osmolarnost v okolju. To spremeni bakterijski metabolizem in proteinsko sestavo kasneje nastale spore (Wood in sod., 2001).

- **Suha snov:**

- Čim več je suhe snovi v mediju ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), tem večja bo toplotna odpornost spor in D-vrednost. V koncentriranih sokovih je odstranjevanje spor *Alicyclobacillus* težje kot v nekoncentriranih. Še večji učinek ima suha snov skupaj z nižjo vrednostjo pH (Tanaka, 2007).

- **Vrednost pH:**

- Čim nižja je vrednost pH, tem nižja je toplotna odpornost spor pri vrsti *B. cereus* (Couvert, 1999). To velja tako za medij, v katerem segrevamo suspenzijo spor, kot za medij, v katerem revitaliziramo spore (González, 1996). Pri rodu *Alicyclobacillus* pa nižja vrednost pH puferiranega medija ni vplivala na toplotno odpornost spor, razen v sokovih, kjer so spore nastale - in sicer, čim nižja je bila vrednost pH, tem nižja je bila tudi toplotna odpornost (Tanaka, 2007).

- **Vpliv organskih kislin:**

- Na toplotno odpornost spor vrste *A. acidoterrestris* prisotnost organskih kislin (npr. citronske kisline) ni vplivala (Tanaka, 2007).

- **Vpliv rodu bakterij:**

- Pri bakterijah *Alicyclobacillus* je toplotna odpornost manjša kot pri *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Clostridium botulinum* in *C. tetani* (Tanaka, 2007).

- **Vpliv drugih snovi (nizina, lizocima ipd.):**

- Nizin je bakteriocin, ki ga sintetizirajo bakterije *Lactococcus lactis*, in se uporablja v mnogih državah kot konzervans. Inhibira rast vegetativnih celic in klitje spor *A. acidoterrestris*. Lizocim pa vpliva na znižanje toplotne odpornosti spor z hidroliziranjem  $\beta$ -1,4 vez med N-acetil-glukozaminom in N-acetil-muraminsko kislino v peptidoglikanski bakterijski celični steni. Čeprav ne penetrira skozi korteks, vseeno močno zmanjša toplotno odpornost. Preprečuje kaljenje toplotno odpornih spor in deluje protimikrobno proti *Alicyclobacillus* (Tanaka, 2007).

- **Vpliv staranja spor:**

- Staranje in toplotna aktivacija spor sta delovala kot podobna dogodka, saj se starane spore obnašajo, kot če bi bile toplotno aktivirane. Spore, ki so bile hranjene 22 dni pri 4 °C, so imele manjšo redukcijo kot pa tiste spore, ki so bile pravkar pripravljene. Maksimalno redukcijo spor po aktivaciji so dobili med časoma 90 in 120 min hranjenja spor, po daljšem času hranjenja so ostale vrednosti redukcije konstantne. Redukcija spor pri 15 minutah po aktivaciji je bila 20-49 % (Collado in sod., 2003).

## 2.4 METODE ZA SEPARACIJO SPOR IN VEGETATIVNIH CELIC

Na voljo je veliko metod za separacijo spor in celic oz. odstranitev vegetativnih celic iz suspenzije spor. Taki postopki so sprememba osmotskega okolja, avtoliza v destilirani vodi, počasno zamrzovanje in odtajevanje, hranjenje v etanolu, izpiranje v deionizirani vodi, obdelava z lizocimom in temperaturni šok. Najbolj pogosti citirani načini priprave suspenzije spor so navedeni v preglednici 2 (Zhao in sod., 2007).

### 2.4.1 Učinkovitost metod za separacijo vegetativnih celic in spor

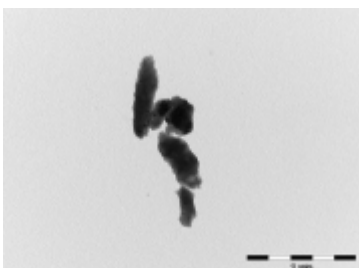
Obdelava z etanolom, lizocimom in vsakodnevnim izpiranjem z vodo omogoči najboljšo čistost spor (97-99 %) pri 3 dneh starih kulturah. Obdelava z toploto da najmanjšo čistost (67 %) in centrifugacija okoli 80 %. Vse metode so dale vsaj 93 % čistost pri kulturah, starih 10 dni.

Pomemben podatek pri teh metodah je tudi donos spor (delež spor, ki bodo klile v vegetativne celice). Centrifugacija in etanol imata največji donos (20-28 %), 5-10 % pa toplotna obdelava in izpiranja z vodo pri 3- dnevni kulturah. Pri 10 dnevni kulturah je bil donos centrifugacije in etanola 39 %, medtem ko so vse ostale metode dosegle le 4 % ali manj. Upoštevati moramo tudi, da pri dekantiranju po centrifugaciji izgubljam spore. Torej, čim več izpiramo, tem manjšo koncentracijo suspenzije spor bomo imeli na koncu (Zhao, 2006).

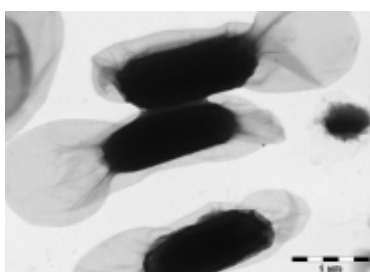
Nicholson in Galeano (2003) sta odkrila, da se med separacijo vegetativnih celic in spor poškodujejo le vegetativne celice, razen pri obdelavi z lizocimom. Lizocim je namreč encim, ki razgradi sporin korteks (peptidoglikan).

Preglednica 2: Najpogostejše metode za čiščenje bakterijskih spor

Metoda čiščenja spor	Pogoji	Reference
50 % Etanol	60 min 2 h 24 h	(Dragon in Rennie, 2001) (Hamouda in sod., 1999), (Hamouda in sod., 2002), (Couvert in sod., 1999), (Gaillard in sod., 1998)
Temperaturni šok	63 °C, 20 min 3 izpiranja, 65 °C, 30 min večkrat.izpir., 70 °C, 30 min brez izpir., 80 °C, 30 min 1 izpir., 80 °C, 12 min 3 izpir., 80 °C, 12 min 3 izpir., 80 °C, 20 min 6 izpir., 80 °C, 10 min večkrat. izpir., 80 °C, 10 min	(Dragon in Rennie, 2001), (Ireland in Hanna, 2002), (Setlow in sod., 2001), (Fujii in sod., 2002), (Zs. Cserhalmia in sod, 2002), (Larson in Marinas, 2003), (Son in sod., 2005)
Vsakodnevno izpiranje	Št.izpiranj ni omenjeno  Vsakodn. vodn. izp., 4-7 dni	(Schiza in sod., 2005), (Vaid in Bishop, 1998), (Setlow in sod., 2001), (Paidhungat in sod., 2002)
Centrifugacija	2000 rpm-1 h, 2500 x g- 15 min, 4 krat 4000 x g- 30 min, 5-6 krat  10000 x g- 10 min, 8-10 krat 12000 x g- 10 min, 5-krat	(Long in Williams, 1958), (Jorge De Lara, 2002), (Fernandez in sod., 2001), (Leuschner in sod., 2000), (Bailey-Smith in sod., 2005)
Obdelava z ultrazvokom	večkrat izpiranje nato pa obdelava z ultrazvokom	(Setlow in sod., 2003)
Obdelava z lizocimom	Obdelava z lizocimom Obdelava z lizocimom, nato 80 °C, 10 min	(Vohra in sod., 2005), (Nicholson in Galeano, 2003)



Slika 10: Slika suspenzije spor (TEM), obdelana z lizocimom (Zhao, 2006).



Slika 11: Slika suspenzije spor (TEM), obdelana s centrifugacijo (Zhao, 2006).

Obdelava z etanolom bi bila pri 3-dnevni kulturi optimalna glede na enostavnost, uspešnost čiščenja in donos. Če imamo na voljo čas, pa bi bilo bolje uporabiti 10 dni staro kulturo in postopek centrifugacije, saj ta vzame najmanj časa, medtem ko je postopek z lizocimom dolgotrajen. Ne pride pa v poštev tudi zaradi visoke kompleksnosti procesa in slabega donosa (razgradi korteks), čeprav lahko s tem postopkom dosežemo visoko čistost suspenzije (Zhao, 2006).

## 2.5 METODE TESTIRANJA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Kot merilo protimikrobne aktivnosti se najpogosteje uporablja minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC), ki pomeni največjo razredčitev protimikrobne snovi, ki še zavira rast določenega mikroorganizma (Rios in sod., 1988; Burt, 2004). Metode testiranja protimikrobne aktivnosti pa v grobem lahko razdelimo v difuzijske in dilucijske metode.

### 2.5.1 Difuzijske metode

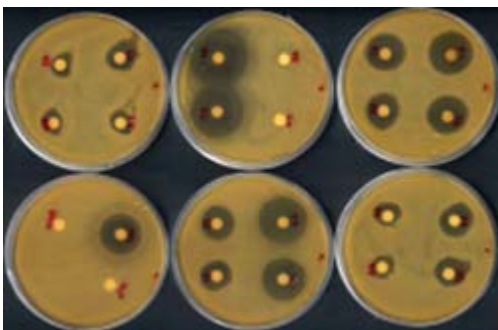
Metoda difuzije v agarju z diski je pogosta metoda za določanje učinkovitosti protibakterijskega sredstva, ki ga nanese na pripravljene diske na vrhu inokuliranega agarja v petrijevki. Protibakterijsko sredstvo preide iz napojenega diska v agar, kjer se ustvari dinamični gradient protibakterijskega sredstva. Testni mikroorganizem ne raste v območju

okrog diska, kjer koncentracija sredstva rast mikroorganizmov onemogoča. Po določenem času inkubacije lahko opazimo inhibicijske cone, kjer ni rasti (Woods in Washington, 1999).

Difuzija v agarju z diski je relativno poceni, lahka za uporabo, fleksibilna metoda, ki da kvalitativne rezultate (npr. organizem je občutljiv, odporen ali vmesen) za hitro rastoče aerobne bakterije. Metoda je neprimerna za občutljive, počasi rastoče bakterije (Woods in Washington, 1999; Rios in sod., 1988).

Preglednica 3: Mikrobiološke metode za določanje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004).

Namen	Metoda	Način odčitavanja
Presejalni testi protimikrobne aktivnosti	Metoda difuzije v agarju z diski Metoda difuzije v agarju z luknjami	Inhibicijske cone na agarju
Določitev učinkovitosti protimikrobne aktivnosti	Dilucijska metoda v agarju Dilucijska metoda v bujonu	Rast na gojišču Optična gostota Absorbanca Kolorimetrija Sprememba upornosti Štetje kolonij
Ugotavljanje kinetike protimikrobne aktivnosti	Krivulja odmiranja/preživetja	
Opazovanje morfoloških sprememb	Elektronska mikroskopija	



Slika 12: Testiranje inhibicije bakterijske rasti z difuzijsko metodo v agarju z diski (Piskernik, 2008).

## 2.5.2 Dilucijske metode

Najpogostejša metoda za določanje vrednosti MIC je dilucijska metoda v bujonu, kjer serijsko razredčimo protimikrobno snov v rastnem mediju vdolbinicah mikrotitrne plošče ali v epruветah. Poznamo makro- in mikro-dilucijsko metodo v bujonu. Prva je bila razvita kot referenčna metoda in se običajno uporablja z steklenimi epruветami, kjer imamo več kot 1mL bujona. Pri mikro diluciji uporabljamo plastične mikrotitrne ploščice in manjše volumne, primernejše za rutinsko testiranje. Pomembna je tudi uporaba standardne koncentracije mikroorganizma, ki ga testiramo. Najnižja koncentracija, pri kateri ni več rasti, je obravnavana kot MIC (Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda je dobro standardizirana z možnostjo hkratnega testiranja večjega števila izolatov. Slabost je velika poraba materiala ter časa, potrebnega za pripravo agarских plošč (Woods in Washington, 1999).

## 2.5.3 Kinetika protimikrobnega delovanja

Kinetiko bakteriostatičnega in/ali baktericidnega delovanja lahko določimo z analizo krivulje preživetja/odmiranja, tako da narišemo graf, ki upošteva število preživelih celic v odvisnosti od časa inkubacije. Koncentracijo živiх celic najpogosteje določimo s štejetjem kolonij na agarju (Burt, 2004).

## 2.6 METODE TESTIRANJA VIABILNOSTI SPOR

Standardizirane, poceni in hitre kvantifikacijske metode za ugotavljanje viabilnosti spor so zelo iskane v biotehnologiji in živilski industriji (Miller, 1993). Nekatere kaleče spore ne preidejo v vegetativne celice (ang. »germinable-but-not culturable«), prav tako nekatere spore sploh ne bodo klile (superdormantne spore) in nekatere ne bodo tvorile kolonij (VBNC, ang. »viable-but-non-culturable«) (Colwell in Grimes, 2000).

- Ugotavljanje števila zraslih kolonij (CFU): Referenčna in najbolj pogosta metoda je štejetje kolonij na agarских ploščah. Slabe strani te metode so porabljen čas, delo in včasih tudi nenatančni rezultati. Princip te metode je razredčevanje originalnega vzorca v serijske razredčitve in nacepljanje na agar v petrijevkah. Preštete kolonije so označene kot CFU, kjer predpostavljamo, da je vsaka kolonija nastala iz viabilne celice ali spore. Upoštevamo le števne plošče s 15-300 kolonijami (Lee, 2008).
- S tehniko PCR v realnem času lahko uspešno določimo število spor v vzorcu. V primerjavi s štejetjem kolonij na ploščah je ta metoda dala podobne rezultate, z le nekoliko nižjimi rezultati od štejetja kolonij na ploščah (Jørgensen in Leser, 2007).



- Endosporni viabilnostni test (ang. »Endospore Viability Assay«, EVA) je bil razvit za spore rodov *Bacillus* in *Clostridium* in temelji na detekciji dipikolinske kisline (DPA), ki se izloči v začetni stopnji kaljenja (Yang in Ponce, 2008).
- S fazno-kontrastnim mikroskopom lahko preštajemo nekaleče spore (svetle) in kaleče spore oz. vegetativne celice (temne). Preštajemo jih na objektnem steklu, ki ima vgrajeno mrežo in na ta način kvantificiramo (Yang in Ponce, 2008).

### 2.6.1 Merjenje toplotne odpornosti spor

Najbolj pogosta načina merjenja toplotne odpornosti spor v območju 60-135 °C sta metoda s končno točko merjenja (ang. »end-point«) in merjenje kinetike odmiranja. Pri slednji metodi segrevamo en vzorec kontinuirno in odvezemamo vzorce za analizo v določenih časovnih intervalih (Holdsworth in Simpson, 2008).

Eden večjih problemov segrevanja spor je čas, ki je potreben, da se toplota prenese preko stene posode. Pri temperaturah v območju 100-120 °C je relativno lahko popraviti napako. Problem je večji pri višjih temperaturah, ker so takrat časi segrevanja lahko tako majhni, kot je prehod toplote skozi steno v suspenzijo spor. V takih primerih je večji segrevani volumen manj natančen, zato se uporabljajo majhni volumni (Holdsworth in Simpson, 2008). Vodna kopel je idealna za segrevanje do temperature 90 °C, oljna kopel pa med 90-120 °C. Uporablja se tudi miniaturni avtoklav za evaluacijo bioloških indikatorjev in termorezistometer, ki se uporablja tudi med 120-140 °C pri kratkih časih segrevanja (Pflug in sod., 2000).

### 2.6.2 Decimalni redukcijski čas

D-vrednost pomeni čas segrevanja v minutah, ki omogoči inaktivacijo 90 % mikroorganizmov oz. 10 % preživelih organizmov. To je najbolj pogost način opisovanja toplotne odpornosti mikroorganizmov. V živilski industriji se uporablja že zadnjih 50 let (Manas in sod., 2003). Število viabilnih organizmov pri času nič ( $N_0$ ) in število pri času  $t$  ( $N$ ) je v naslednji zvezi:

$$\ln(N/N_0) = -kt \quad \dots(1)$$

ali

$$\log_{10}(N/N_0) = -kt/2,303 \quad \dots(2)$$

$$N/N_0 = e^{-kt} \quad \dots(3)$$

D-vrednost lahko določimo v eksperimentih toplotne odpornosti na grafu  $\log N$  proti  $t$  (termična inaktivacijska krivulja) v enačbi:

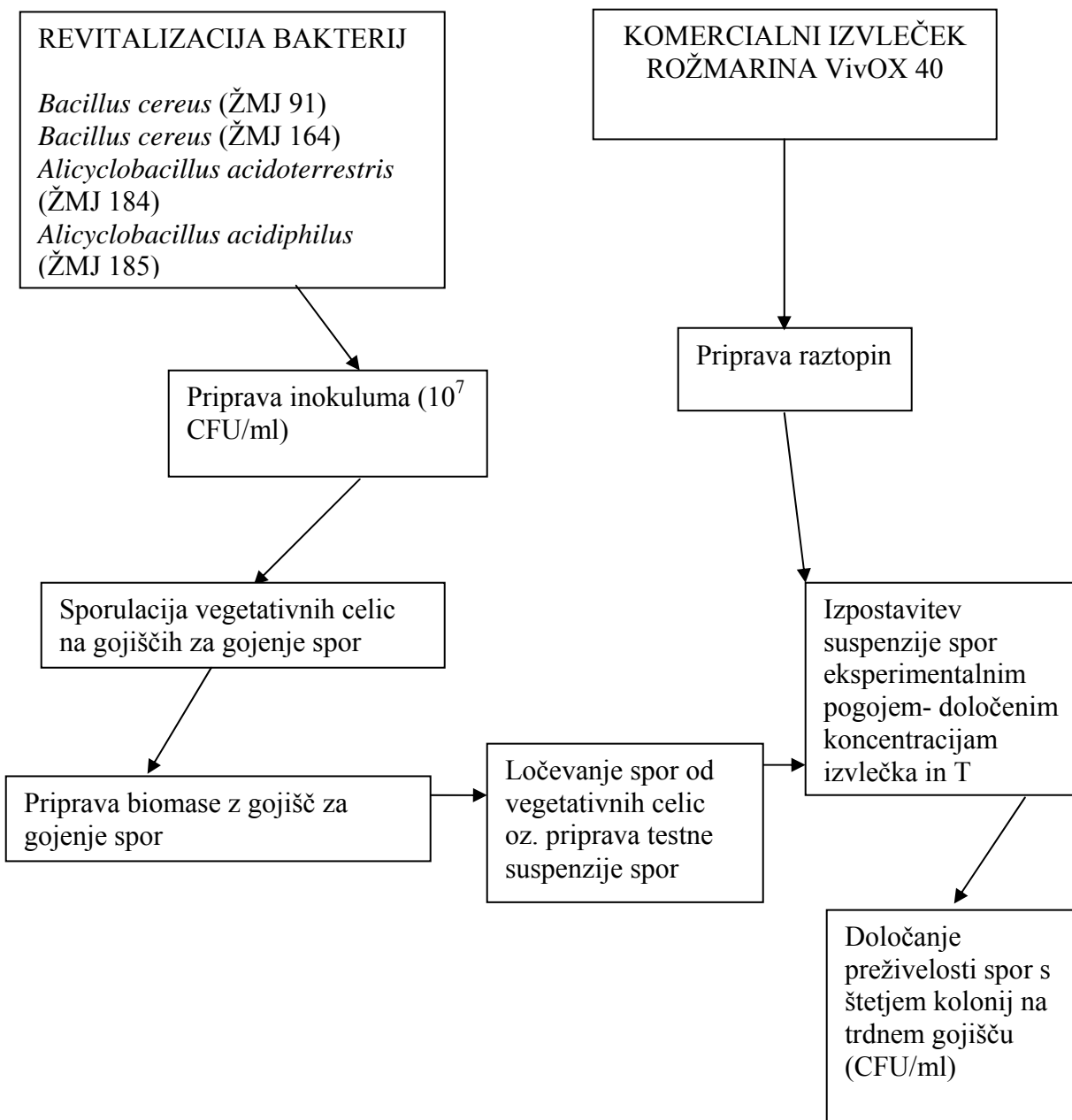
$$\log N = \log N_0 - t/D \quad \dots(4)$$

$$D = 2,3/60 k \quad \dots(5)$$

D-vrednost zapišemo v minutah in  $k$  v sekundah. Ta relacija (med  $D$  in  $k$ ) izhaja iz reakcije prvega reda in ne velja za reakcije drugih redov (Holdsworth in Simpson, 2008)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 13: Shema eksperimentalnega dela

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Mikroorganizmi

Pri eksperimentu smo skupno uporabili štiri bakterijske seve - dva seva bakterije *Bacillus cereus*, in po en sev vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* in *Alicyclobacillus acidiphilus*.

Preglednica 4: Delovni mikroorganizmi

Oznaka seva	Vir seva
<i>Bacillus cereus</i> (ŽMJ 91)	WSBC-10530 ( sinteza emetičnega enterotoksina)
<i>Bacillus cereus</i> (ŽMJ 164)	S1 (R2S)- tipski sev (Melle, Belgija)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (ŽMJ 184)	3922-DSMZ, Nemčija
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> (ŽMJ 185)	14558, DSMZ, Nemčija

ŽMJ: mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete,

WSBC: tipski sev zbirke Weihenstephan *B. cereus*, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

### 3.2.2 Mikrobiološka gojišča

#### 3.2.2.1 Selektivna gojišča

##### 3.2.2.1.1 Gojišče *Bacillus cereus*

Sestavine:

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

Priprava: 20,5 g gojišča z agarjem smo dodali v 470 mL destilirane vode, dobro premešali ter sterilizirali v avtoklavu (15 minut pri temperaturi 121 °C). Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C, dodali 25 mL jajčne emulzije (50 %) in 5 mL antibiotičnega dodatka, nato pa gojišče razlili v sterilne petrijevke.

### 3.2.2.1.2 Gojišče *Alicyclobacillus* medij (AM) - za difuzijsko metodo v agarju ter štetje kolonij na ploščah

Sestavine:

Raztopina 1:

- kalcijev diklorid;  $\text{CaCl}_2$  (Merck, 6000438346, Nemčija) - 0,25 g
- magnezijev sulfat; ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) - 0,5 g
- amonijev sulfat; ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Zorka Šabac, Hrvaška) - 0,2 g
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202, Italija) - 2 g
- glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 5 g
- kalijev dihidrogenfosfat;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, 1112408, Hrvaška) - 3 g
- 500 mL destilirane vode

Raztopini 1 smo še uravnavali vrednost pH na 4,0 z  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Raztopina 2: Raztopina elementov v sledovih

- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1 g
- $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,03 g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,3 g
- $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,2 g
- $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,01 g
- $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,02 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,03 g
- destilirana voda - 1 L

Raztopina 3:

- agar - 15 g
- destilirana voda - 500 mL

Vse tri raztopine smo sterilizirali (121 °C, 20 min) in jih zmešali v eni steklenici. Dobro premešano raztopino smo razlili v petrijevke (Silva in sod., 1999). Pri difuzijski metodi smo pa lahko to gojišče hranili v inkubatorju pri 45 °C, preden smo ga skupaj z inokulumom prelili v petrijevke.

### 3.2.2.1.3 Gojišče *Alicyclobacillus* medij (AM) - za dilucijsko metodo

Sestavine so enake kot pri opisu v točki 3.2.2.1.2

Priprava:

Sestavine smo zatehtali v 1000-mL steklenico in dolili 500 mL destilirane vode, premešali ter sterilizirali v avtoklavu. Z dispensorjem smo nato odmerili po 6 mL gojišča v sterilne epruvete, katere smo hranili v inkubatorju na 45 °C do uporabe.

#### 3.2.2.1.4 Bujon *Alicyclobacillus* (bujon AM) za pripravo inokuluma

Sestavine:

- kalcijev diklorid;  $\text{CaCl}_2$  (Merck, 6000438346, Nemčija) - 0,25 g
- magnezijev sulfat;  $(\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O})$  - 0,5 g
- amonijev sulfat;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Zorka Šabac, Hrvaška) - 0,2 g
- kvasni ekstrakt; (Biolife, 4122202, Italija) - 2 g
- glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 5 g
- kalijev dihidrogenfosfat;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, 1112408, Hrvaška) - 3 g
- 500 mL destilirane vode

Sestavine smo zatehtali v 1000-mL steklenico in raztopili v 500 mL destilirane vode in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min). Tako pripravljeno gojišče smo razdelili v sterilne epruvete in jih hranili v hladilniku.

#### 3.2.2.1.5 Gojišče za pripravo spor *Alicyclobacillus* (AM za spore)

Sestavine:

Raztopina 1:

- kalcijev diklorid;  $\text{CaCl}_2$  (Merck, 6000438346, Nemčija) - 0,25 g
- magnezijev sulfat  $(\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O})$  - 0,5 g
- amonijev sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Zorka Šabac, Hrvaška) - 0,2 g
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202, Italija) - 1 g
- glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 1 g
- kalijev dihidrogenfosfat;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, 1112408, Hrvaška) - 0,6 g
- 500 mL destilirane vode

Raztopini 1 smo še uravnali vrednost pH na 4,0 s  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Raztopina 2:

- agar - 20 g
- destilirana voda - 500 mL

Ti dve raztopini smo sterilizirali (121 °C, 20 min) in jih zmešali skupaj v stekleni posodi. Raztopino 3 (elementi v sledovih) dodamo le 1 mL, to praviloma naredimo na koncu. Dobro premešano raztopino smo razlili v petrijevke (Silva in sod., 1999).

### 3.2.2.1.6 Gojišče za pripravo spor *Bacillus cereus*

Sestavine:

- NA (hranljivi agar) - 14 g
- glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 1,5 g
- kalcijev diklorid; CaCl<sub>2</sub> (Merck, 6000438346, Nemčija) - 100 mg
- MnSO<sub>4</sub> - 20 mg

Priprava:

V 1000-mL steklenico smo dodali vse sestavine in 500 mL destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min) (Leguerinel in Mafart, 2001).

### 3.2.2.2 Neselektivna gojišča

#### 3.2.2.2.1 Gojišče triptični soja agar (TSA) za gojenje biomase vrste *B. cereus*

Sestavine:

- triptični soja agar (TSA) (Oxoid, CM0131, Anglija) - 20 g
- di-kalij-hidrogenfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 1,25 g
- D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007, Hrvaška) - 1,25 g
- kvasni ekstrakt (Biolife, 412220, Italija) - 3,0 g

Priprava:

V 1000-mL steklenico smo zatehtali 1,25 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,25 g D-(+)- glukoze, 3 g gojišča TSA, nato mešanico dobro raztopimo v 500 mL destilirane vode. Po 20 minutni sterilizaciji pri temperaturi 121 °C tako pripravljeno gojišče razlili v sterilne petrijevke ali pa do uporabe hranili v inkubatorju na temperaturi 45 °C.

#### 3.2.2.2.2 Bujon TSB za pripravo inokuluma vrste *B. cereus*

Sestavine

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

Priprava:

V 1000-mL steklenico zatehtamo 15 g TSB in dobro premešamo z 500 mL destilirane vode. Mešanico steriliziramo 20 minut pri temperaturi 121 °C.

#### 3.2.2.2.3 Gojišče BHI za pripravo inokuluma vrste *B. cereus*

Sestavine: Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Merck, 1.10493.0500, Nemčija).

Priprava:

V 1000-mL steklenico smo odtehtali 19 g gojišča BHI in dodali 500 mL destilirane vode. Nato smo vsebino dobro premešali in gojišče sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C.

### 3.2.3 Raztopine in dodatki

#### 3.2.3.1 Fiziološka raztopina

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

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

Priprava:

3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo raztopili v 100 mL destilirane vode (pH = 7,2). 1,2 mL tako pripravljene osnovne raztopine smo razredčili v 1000 mL destilirane vode ter sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20min).

### 3.2.4 Snovi s protimikrobnim delovanjem

#### 3.2.4.1 Izvleček rožmarina VivOX 40 v prahu (Vitiva, Markovci, Slovenija)

#### 3.2.4.2 Priprava osnovne raztopine izvlečkov in nadaljnjih razredčitev

Sestavine:

- izvleček rožmarina v prahu
- absolutni etanol

0,04 g izvlečka v prahu smo zatehtali v plastično sterilno epruveto s pokrovčkom in dodali 1 mL absolutnega etanola, tako da smo dobili 4 % (w/v) osnovno raztopino. Na vrtničnem mešalu smo zmes mešali dokler, se izvleček ni v celoti raztopil. Iz te osnovne raztopine smo pripravili ustrezne razredčitve.

### 3.2.5 Druge kemikalije in dodatki

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



### 3.2.6 Laboratorijska oprema

Aparature, ki so bile uporabljene pri eksperimentalnem delu:

- zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra PIO, Slovenija)
- tehtnica (Sartorius analytic, Nemčija)
- centrifuga (Mini spin PLUS, Eppendorf, Francija)
- avtoklav (Tip 250, Sutjeska, Beograd)
- digitalna tehtnica (PB1502-S, Mettler Toledo, Švica)
- inkubator (Kambič SP190, Slovenija)
- mikrovalovna pečica (Sanya, Japonska)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- vrtničnik (Yellowline, IKA)
- stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija)
- plinski gorilnik
- optični čitalec (ScanPrisa 1240 UT, Acer, Tajvan)

Poleg navedenih aparatov smo uporabljali še: cepilne zanke, avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija), nastavke za pipete - 10 $\mu$ l, 100  $\mu$ l in 1000  $\mu$ l (Eppendorf, Nemčija; Plastibrand, Nemčija), mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija), petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), laboratorijske steklenice - 1000mL (Duran), merilne valje (Plastibrand, Nemčija), plastične lončke (Labrotechnika Golias, Slovenija), plastične kivete, pipetor (Eppendorf easypet, Nemčija), parafilm »M« (PM 992, American National Can), ter drugo steklovino in programsko opremo Microsoft Office Corel Draw (ver.12).

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Revitalizacija mikroorganizmov

Izolata vrste *Bacillus cereus* sta bila hranjena v hladilniku na selektivnem gojišču BCA, iz katerega smo s cepilno zanko ob ognju prenesli posamezne izolate na trdno gojišče TSA. Po 24-urni inkubaciji na TSA smo prenesli kolonijo v bujon BHI, stresali in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Izolata rodu *Alicyclobacillus* smo revitalizirali iz ampul, katere so se hranile v zmrzovalniku, tako da smo celotno vsebino zlili v bujon AM in inkubirali pri 45 °C 24 ur.

#### 3.3.2 Priprava inokuluma za gojenje spor

Seva *Bacillus cereus* ŽMJ 164 in *B. cereus* ŽMJ 91 sta bila že predhodno revitalizirana, tako da smo po eno kolonijo prenesli v 4 mL bujona BHI in vsebino premešali na vrtničnem mešalu ter inkubirali (37 °C/24 ur) na stresalniku (100 obratov/min). Seva *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ 184 in *A. acidiphilus* ŽMJ 185 sta bila namnožena podobno kot seva *Bacillus cereus*, s to razliko, da je bilo uporabljeno gojišče AM, inkubacija za *A. acidoterrestris* je potekala pri 45 °C/24 ur, za *A. acidiphilus* pa pri 45 °C/48 ur.

#### 3.3.3 Sporulacija vegetativnih celic

Bujon BHI, v katerem smo namnožili seva *Bacillus cereus* do koncentracije okoli  $10^7$  CFU/mL, smo nacepili po 0,5 mL inokuluma na petrijeve plošče z gojiščem NA za gojenje spor. Bakterije smo inkubirali 5 dni (37 °C). Po tem času je velik delež vegetativnih celic sporuliral, zaradi pomanjkanja hranil. Postopek za sporulacijo rodu *Alicyclobacillus* je bil enak, le da smo za namnoževanje inokuluma uporabili bujon AM in ga nacepili na gojišče AM za gojenje spor. Inkubirali smo 5 dni na 45 °C (Silva in sod., 1999).

#### 3.3.4 Priprava suspenzije spor z ločevanjem biomase na vegetativne celice in spore

Spore smo postrgali z gojišča s cepilno zanko in suspendirali v 2-mL mikrocentrifugirki z 1,5 mL sterilne destilirane vode (SDW). To suspenzijo smo dobro premešali ter centrifugirali (15 min pri 2500 x g). Supernatant smo po centrifugiranju previdno odstranili, dodali 1,5 mL SDW ter postopek ponovili še trikrat (Leguerinel in Mafart, 2001; Jorge De Lara, 2002).

Pri prvem predpoizkusu (Slika 15) pa smo preverili eliminacijo vegetativnih celic s toplotno obdelavo (temperaturni šok). Po predhodno namnoženih celicah *B. cereus* na stresalniku v bujonu BHI (24 ur, 37 °C), smo 1 mL tega inokuluma prenesli v 9 mL bujona TSB v epruvetah in jih pustili na stresalniku (24 ur, 37 °C). Po razredčenvanju in segrevanju (5 min, 80 - 100 °C) smo vzorce nacepili na TSA agar. Z vsako višjo temperaturo smo lahko pričakovali večji delež spor v obdelanem vzorcu.

### 3.3.5 Določanje koncentracije spor

Za določevanje koncentracije suspenzije spor smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Število smo določili kot CFU/mL vzorca, za vrsto *B. cereus* na gojišču TSA, za *A. acidoterrestris* oz. *A. acidiphilus* pa na gojišču AM.

Razredčevanje po Koch-u:

Iz suspenzije spor smo vzeli 0,1 mL vzorca in ga aseptično odpipetirali v 0,9 mL fiziološke raztopine. Vsebinsko smo premešali na vrtničnem mešalniku. Postopek razredčevanja vzorca smo ponavljali do koncentracije ca.  $10^2$  in  $10^1$  CFU/mL vzorca. Po 0,1 mL tako razredčenega vzorca smo odpipetirali na agar TSA/AM in ga s stekleno palčko enakomerno razmazali po gojišču. Petrijeve plošče smo inkubirali pri 37 °C/45 °C, 24 ur za *B. cereus* oz. *A. acidoterrestris* in za *A. acidiphilus* 48 ur. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo bakterij (N). Prešteli smo samo tiste petrijevke, kjer je zraslo od 15-300 kolonij in za te uporabili enačbo 5:

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) \quad \dots(6)$$

Legenda: C: seštevek vseh kolonij na vseh števnihih ploščah,  $n_1$ : število petrijevk pri prvi razredčitvi;  $n_2$ : število petrijevk pri drugi razredčitvi; R: faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi; N: koncentracija bakterij (CFU/mL)

### 3.3.6 Metoda difuzije v gojišču AM za določitev minimalne inhibitorne koncentracije izvlečka (MIC)

#### 3.3.6.1 Uporabljeni material

- Gojišče AM
- Fiziološka raztopina
- Oksitetraciklin (OTC)
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije izvlečkov
- Čista kultura bakterij

#### 3.3.6.2 Izvedba metode

S to metodo smo določali protimikrobno aktivnost izvlečka rožmarina VivOX 40 v gojišču AM za sev *A. acidoterrestris* ŽMJ 184 in *A. acidiphilus* ŽMJ 185.

Najprej smo pripravili razredčitve iz osnovne (4 % (w/v)) raztopine izvlečka v koncentracijah od 4 - 0,00390 % (w/v) izvlečka v absolutnem etanolu.

Predhodno namnoženo kulturo v AM (1 mL), smo odpipetirali v 9 mL sterilne fiziološke raztopine. Vsebinsko smo dobro premešali na vrtničnem mešalniku, preden smo jo po 1 mL odpipetirali v prazne petrijevke, prelili z AM agarjem in previdno premešali. Ko se je agar strdil, smo namestili po 4 diske na vsako ploščo. Na vsak disk smo dodali 10 µl ustrezne koncentracije izvlečkov rožmarina. Za pozitivno kontrolo smo uporabili antibiotik oksitetraciklin, za negativno pa sterilno destilirano vodo. Preverili smo tudi učinek absolutnega etanola, katerega smo uporabili kot topilo za pripravo izvlečkov. Petrijeve plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo odčitali cone inhibicije rasti tako, da smo uporabili optični čitalec pri prenosu slike na računalnik. Z računalniškim programom Corel Draw smo lahko natančno izmerili polmere inhibicijskih con. Vrednost MIC pri tej metodi je najnižja koncentracija protimikrobnega sredstva, ki je še povzročila nastanek inhibicijske cone okoli diska.

Vse analize smo opravili v dveh ponovitvah. Rezultati meritev smo podali kot povprečno vrednost ( $\bar{X}$ ), ki smo jo dobili s pomočjo enačbe 7:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(7)$$

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

### 3.3.7 Metoda dilucije v gojišču AM

#### 3.3.7.1 Uporabljeni material

- Gojišče AM
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Sterilna destilirana voda
- Različne koncentracije izvlečka rožmarina

#### 3.3.7.2 Izvedba metode

Pri metodi dilucije v agarju smo uporabili koncentracijo celic v inokulumu  $\sim 10^7$  CFU/mL. Razredčitve kulture smo pripravili v fiziološki raztopini po Koch-u do koncentracije  $\sim 10^2$  CFU/mL.

Predhodno smo si iz 4 % (w/v) založne raztopine pripravili serije razredčitev izvlečka v absolutnem etanolu. Prav tako smo predhodno pripravili epruvete z gojiščem ter jih postavili v vodno kopel na 45° C, da se agar ni strdil v epruveti, medtem ko smo odpipetirali ustrezno količino izvlečka in vsebinsko prelili v male petrijeve plošče (premer 35 mm) in počakali, da se je zmes strdila. Po površini smo s cepilno zanko nacepili kulturo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili gojišča AM brez dodane raztopine izvlečka. Inkubacija petrijevih plošč je potekala

pri temperaturi 45 °C, 24 ur za *A. acidoterrestris* in 48 ur za *A. acidiphilus*. Po inkubaciji smo določali vrednost MIC - najnižjo koncentracijo, ki je še zavrla rast bakterij.

### **3.3.8 Ugotavljanje vpliva izvlečka rožmarina na toplotno odpornost bakterijskih spor *Bacillus* in *Alicyclobacillus***

#### **3.3.8.1 Uporabljeni material**

- Gojišča NA(za spore)/AM(za spore)
- Gojišče BHI/bujon AM
- Fiziološka raztopina
- Absolutni etanol
- Različne koncentracije VivOX 40
- Čista kultura bakterij

#### **3.3.8.2 Izvedba metode**

Postopek za pripravo suspenzije spor je opisan v poglavju 3.3.4. Osnovno raztopino izvlečka smo serijsko razredčili z absolutnim etanolom do ustreznih koncentracij in ga dodali v 0,9 mL fiziološke raztopine. Potem smo dodali 0,1 mL po Kochu razredčene suspenzije, da smo dobili željeno začetno koncentracijo spor za poizkus. Uporabili smo mikrocentrifugirke namesto epruvet zaradi manjšega volumna in s tem hitrejšega prenosa toplote. Te smo segrevali pri določenih časih in temperaturah. Po toplotni obdelavi smo jih ohladili in takoj nacepili po postopku 3.3.5.

### **3.3.9 Izračun D-vrednosti**

D-vrednost je čas, ki je potreben za 90 % redukcijo mikrobne populacije, ki smo jo izračunali kot obratno vrednost naklona premice log CFU/mL v odvisnosti od časa segrevanja (Savaş Bahçeci in Acar, 2007).

## 4 REZULTATI

V eksperimentalnem delu smo poizkušali dokazati vpliv rastlinskega izvlečka rožmarina na toplotno odpornosti spor bakterij rodu *Bacillus* in *Alicyclobacillus*. V predpoizkusih pa smo eksperimentalno ugotavljali optimalne testne razmere za določitev vpliva izvlečka na bakterijske spore:

- Določili smo minimalne inhibicijske koncentracije izvlečka z difuzijsko in dilucijsko metodo, te koncentracije pa smo nato uporabili za izražanje uporabljenih koncentracij izvlečka v nadaljnjih testih.
- Preverili smo 2 postopka za pridobivanje spor, in sicer toplotni šok in centrifugacijo.
- Določili smo optimalni kontaktni čas med sporami in izvlečkom pred toplotno obdelavo.
- Določili smo optimalne temperature in čase toplotne obdelave za določitev vpliva izvlečka rožmarina na povečano toplotno občutljivost spor (spremembo D-vrednosti).
- Nazadnje smo preverjali še optimalno začetno koncentracijo spor, ki bi bila najbolj realna (npr. podobna razmeram v živilu) in bi še omogočala izračun učinkovitosti izvlečka. Problem je predstavljala prekoračena spodnja meja detekcije preživelih spor po toplotni obdelavi pri uporabljenih nižjih koncentracijah spor.

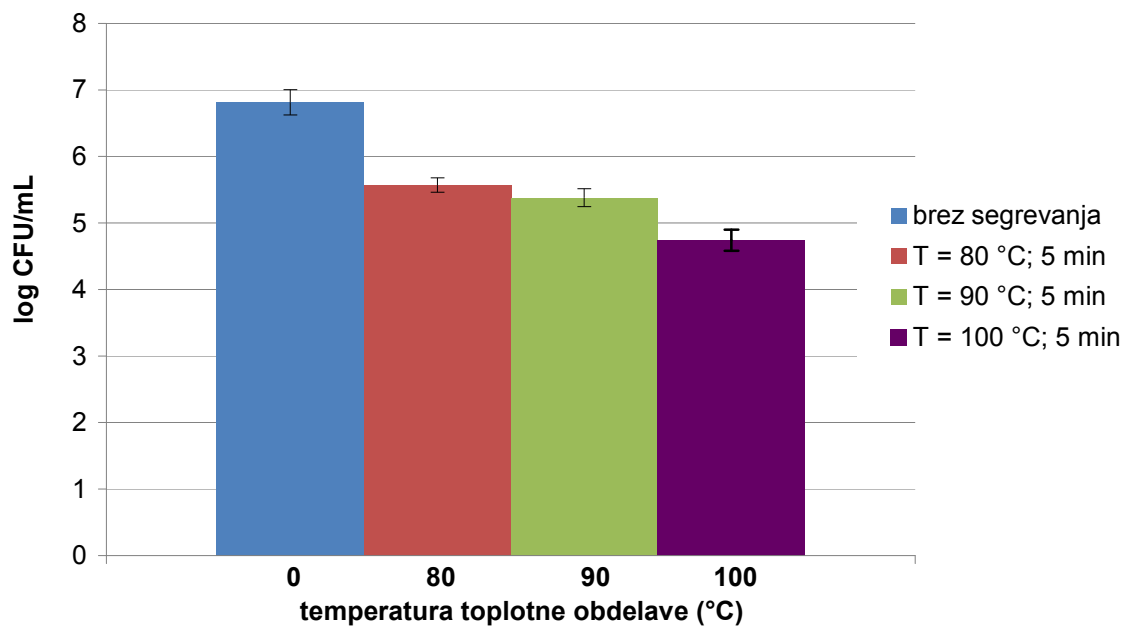
#### 4.1 EKSPERIMENTI S SEVOMA *B. cereus* (ŽMJ 164) TER *B. cereus* (ŽMJ 91)

##### 4.1.1 Izbor koncentracij rožmarinskega izvlečka za testiranje občutljivosti sevov vrste *Bacillus cereus*

Piskernik (2008) je za sev *Bacillus cereus* ŽMJ 164 ugotovila, da je vrednost MIC, ugotovljena z dilucijo na agarju 0,078 mg/mL, MIC, ugotovljena z difuzijo na agarju z diski, pa 0,312 mg/mL. Pri sevu *B. cereus* ŽMJ 91 je bila vrednost MIC, ugotovljena z dilucijo na agarju 0,156 mg/mL in z difuzijo na agarju z diski 0,625 mg/mL.

##### 4.1.2 Preverjanje učinkovitosti toplotnega šoka pri bakteriji *B. cereus* (ŽMJ 164) za pripravo suspenzije spor

V primerjavi s kasnejšimi poizkusi, pri katerih je bil uporabljen inokulum z bistveno večjim razmerjem spor glede na vegetativne celice, smo ugotovili, da v kontrolnem vzorcu (to je bil vzorec brez segrevanja in brez dodatka izvlečka) ni bilo tako velikega padca v log CFU kot pri kasnejših poizkusih z večjim deležem spor. To je bilo pričakovano, saj smo poizkus naredili brez predhodnih separacijskih postopkov, ki bi zagotovili ustrezno koncentracijo spor v vzorcu. Tako lahko sklepamo, da so pri segrevanju pri 80 °C (5 min) brez izvlečka še prisotne vegetativne celice. Pri 90 °C in 100 °C pa ne pričakujemo več preživetja vegetativnih celic. Tako odstranjevanje vegetativnih celic (toplotni šok) se je pokazalo za neučinkovito, ker je kontrolni vzorec še vedno vseboval velik delež vegetativnih celic in tako nismo imeli realne primerjave za dejansko redukcijo spor v vzorcu. Kontrolni vzorec je bil v tem primeru torej nerealen, saj so bili deleži spor v vzorcih, kjer smo poviševali temperaturo, drugačni in so tako onemogočali primerjavo rezultatov. To bi lahko postalo del napake, zato smo v vseh naslednjih poizkusih uporabili centrifugacijo kot ločevanje vegetativnih celic in spor ter tako dosegli stabilno suspenzijo spor. Učinkovitost in stabilnost centrifugiranega inokuluma lahko potrdimo na Sliki 15 in Sliki 16 v meritvah »brez inkubacije«, kjer se kljub segrevanju (100°C, 5 min) koncentracija spor ne spremeni v primerjavi z nesegrevanim vzorcem.

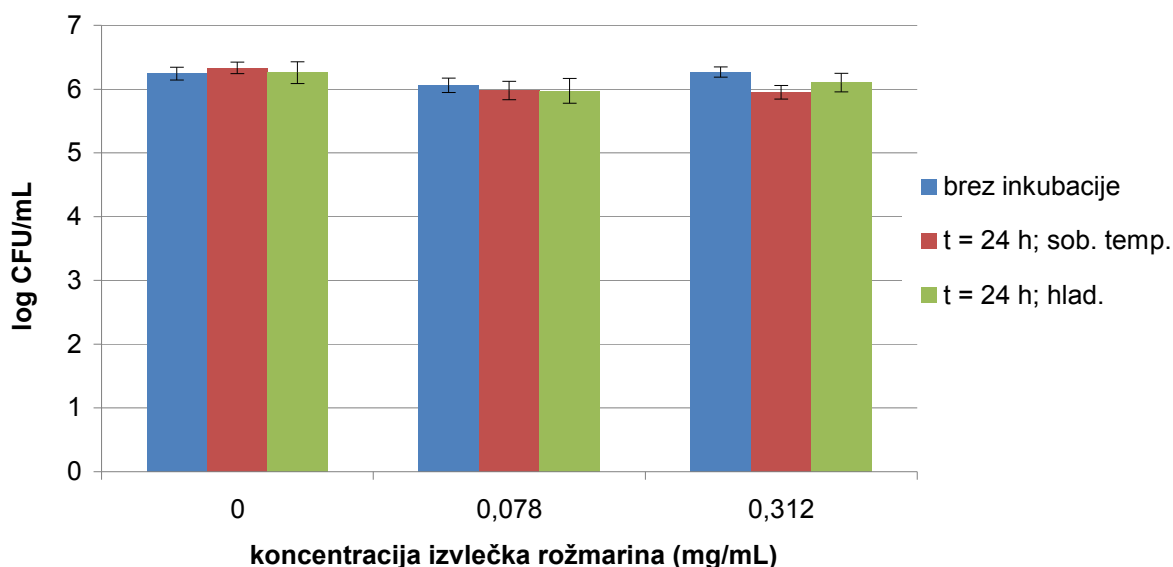


Slika 14: Vpliv temperature toplotne obdelave (šoka) na separacijsko neobdelan inokulum spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pri temperaturi 80 °C, 90 °C in 100 °C



#### 4.1.3 Določanje optimalnega kontaktnega časa izvlečka rožmarina s spori bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pred toplotno obdelavo

24-urni kontaktni čas izvlečka s spori pred toplotno obdelavo ni imel vpliva na preživelost spor, niti ob hranjenju pri sobni temperaturi, niti v hladilniku. Iz tega smo lahko sklepali, da sam izvleček ni poškodoval spor do te mere, da ne bi kalile.

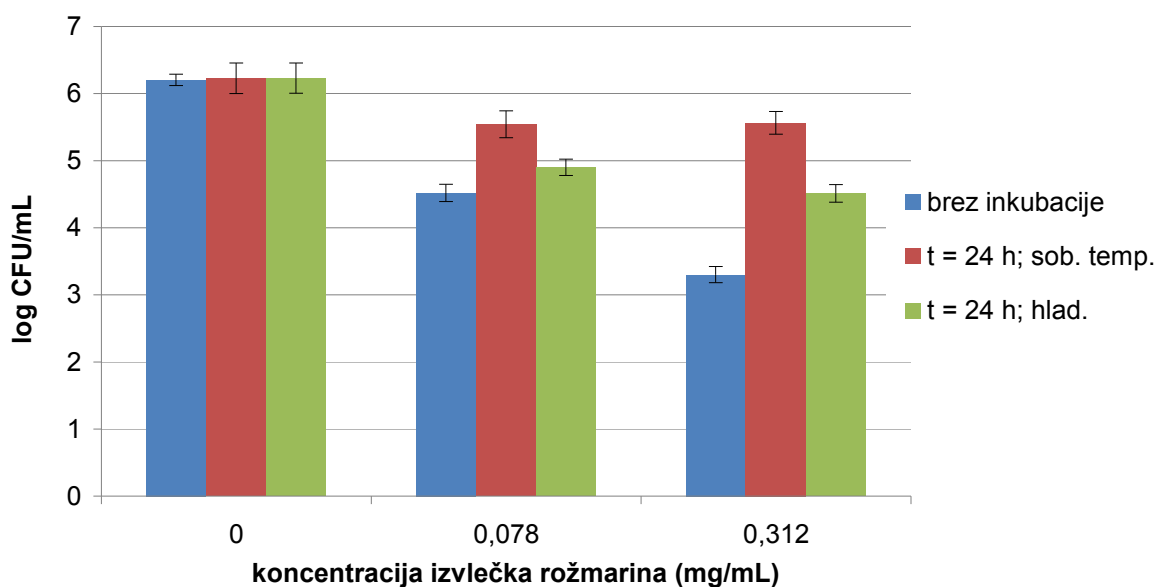


Slika 15: Vpliv kontaktnega časa spor in izvlečka rožmarina pri sobni temperaturi in temperaturi hladilnika (8 °C) na preživelost spor *B. cereus* (ŽMJ 164) brez segrevanja.

Slika 16 pa prikazuje rezultate vzporednega eksperimenta z delovanjem izvlečka takoj in po 24 urah kontaktnega časa pred toplotno obdelavo (kot v poizkusu na sliki 15), s to razliko, da smo v tem primeru vzorce po kontaktnem času še segrevali 5 min na 100 °C. Najboljši vpliv ima izvleček na vzorec pri takojšnji uporabi, pri vzorcih s 24-urnim kontaktom pa opazimo manjšo redukcijo spor kot bi pričakovali. Možna razlaga je, da je izvleček deloval na toplotno odpornost spor, tako da so se spore v tem obdobju 24-ur prilagajale na razne protibakterijske komponente iz izvlečka. Spora je tako lahko s prilagajanjem mehanizmov obrambe oz. svoje strukture povečala toplotno odpornost.

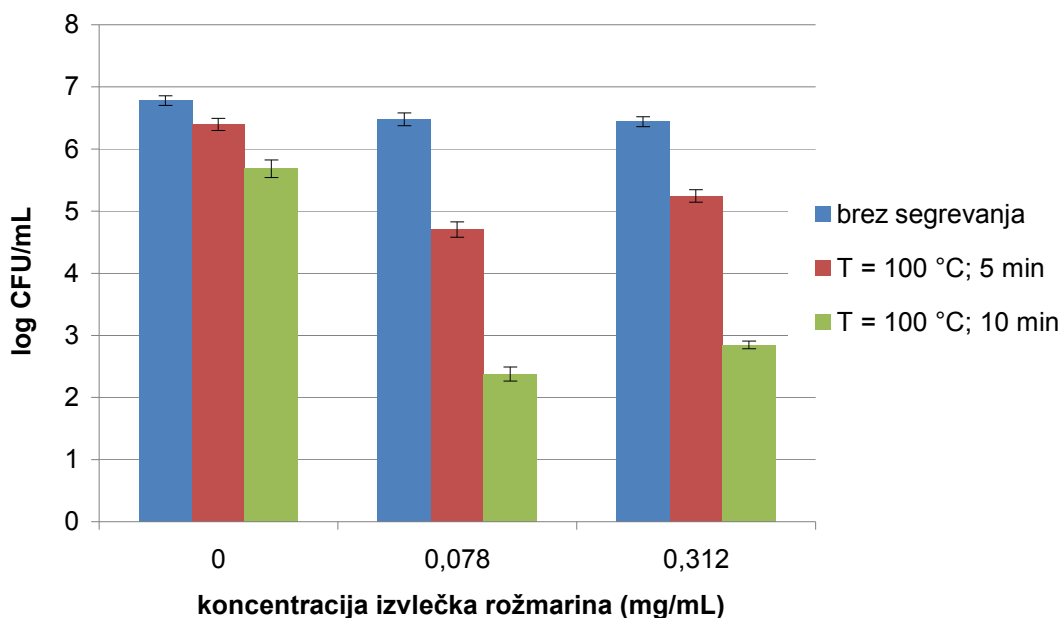
Čeprav je možen vpliv na toplotno odpornost spor pri daljših kontaktih z izvlečkom, smo se odločili, da jih ne bomo predinkubirali z izvlečkom, pač jih bomo testirali pri takojšnjem učinku izvlečka. V industriji bi verjetno prav tako tik pred toplotno obdelavo (pasterizacijo) pijač dodali takšen izvleček.

Omeniti je treba še, da smo pri teh poizkusih že uporabljali spore, ki so bile starane vsaj 1 teden v hladilniku, saj je iz literature znano, da se take spore aktivirajo, dosežen je pa tudi dober donos spor.



Slika 16: Vpliv kontaktnega časa spor in izvlečka rožmarina pri sobni temperaturi in temperaturi hladilnika (8 °C) na preživetje spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) po naknadni toplotni obdelavi (100 °C; 5 min).

#### 4.1.4 Iskanje optimalnega časa toplotne obdelave pri 100 °C za določitev vpliva izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164)

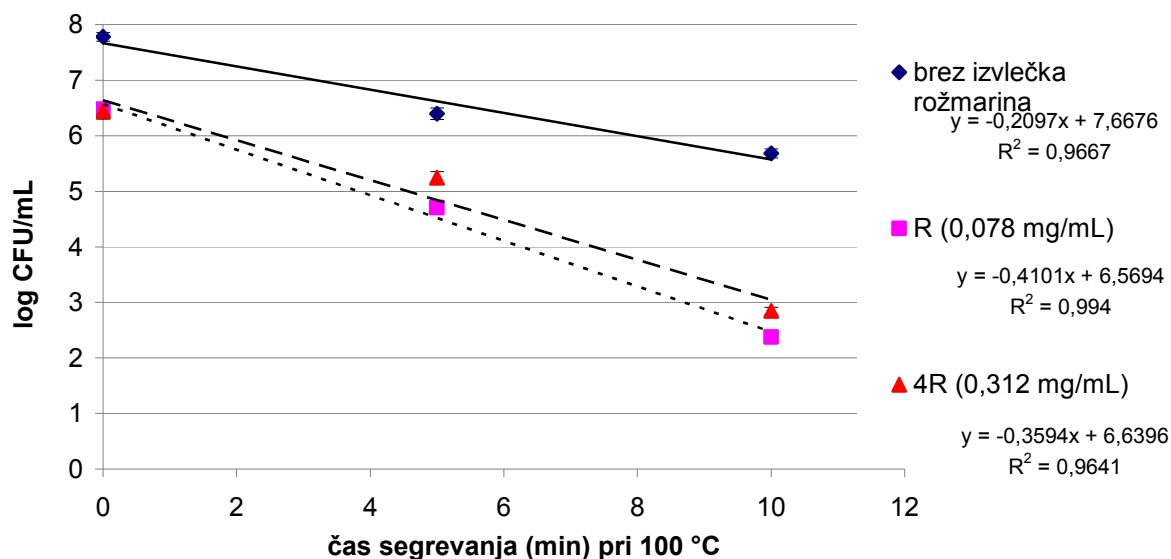


Slika 17: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 10 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pri temperaturi 100 °C

Iz zbranih rezultatov je viden vpliv dodatka izvlečka na toplotno odpornost spor. Ta se je po dodatku izvlečka zmanjšala, kar je razvidno iz dobljenih rezultatov po 5-minutni predvsem pa pri podaljšan, 10-minutni toplotni obdelavi spor. Redukcija števila kalečih spor je znašala manj kot polovico log stopnje po 5-minutni toplotni obdelavi spor in 1 log stopnjo pri 10-minutni obdelavi spor brez dodanega izvlečka. Če smo izvleček dodali pred 5-minutno toplotno obdelavo spor, smo pa dosegli skoraj 2 log stopnji redukcije števila kalečih spor, pri 10-minutnem segrevanju spor z dodanim izvlečkom pa je bila redukcija povprečno 4 log stopnje. Zanimivo pri tem je, da učinek ni bil sorazmeren s koncentracijo dodanega izvlečka, ampak je bil celo nekoliko večji pri nižji uporabljeni koncentraciji izvlečka, vendar so bile opažene razlike majhne. Optimalni čas segrevanja je torej 10 minut pri 100 °C, ker še pridemo do meje detekcije metode.

Iz zbranih rezultatov smo lahko izračunali spremembe D-vrednosti, ki nam boljše ponazorijo vpliv izvlečka na zmanjšano toplotno odpornost spor.

#### 4.1.5 Izračun D-vrednosti za spore bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pri 100 °C



Slika 18: Termična inaktivacijska krivulja za spore bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pri 100 °C

Iz naklonov dobljenih inaktivacijskih krivulj smo izračunali D-vrednosti po enačbi:

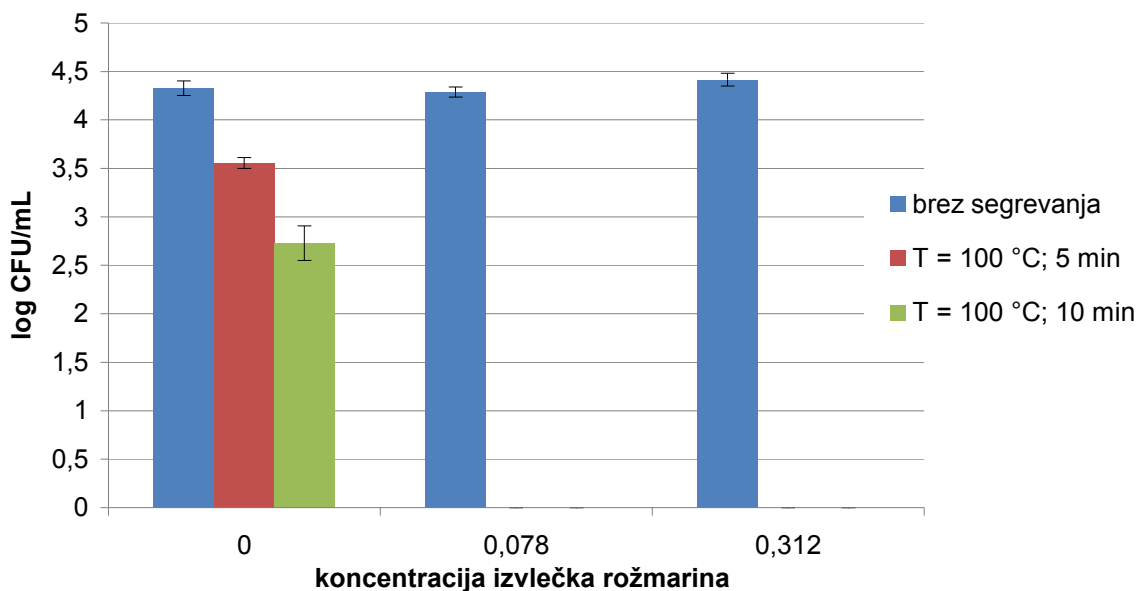
$$D = -1/k, \quad \dots(8)$$

kjer je k naklon premice, ki prikazuje odvisnost log CFU/mL od časa segrevanja (min) (Savaş Bahçeci in Acar, 2007).

Preglednica 5: D-vrednosti za spore bakterij *B. cereus* (ŽMJ 164) pri 100 °C

konc. izvlečka rožmarina (mg/mL)	naklon premice	D <sub>100</sub> - vrednost (min)	R <sup>2</sup>
0	-0,2097	4,77	0,9667
0,078 (R)	-0,4101	2,44	0,994
0,312 (4R)	-0,3594	2,78	0,9641

#### 4.1.6 Iskanje optimalne koncentracije spor in izvlečka rožmarina za realno ocenitev redukcije števila spor po toplotni obdelavi v živilu za spore bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164)

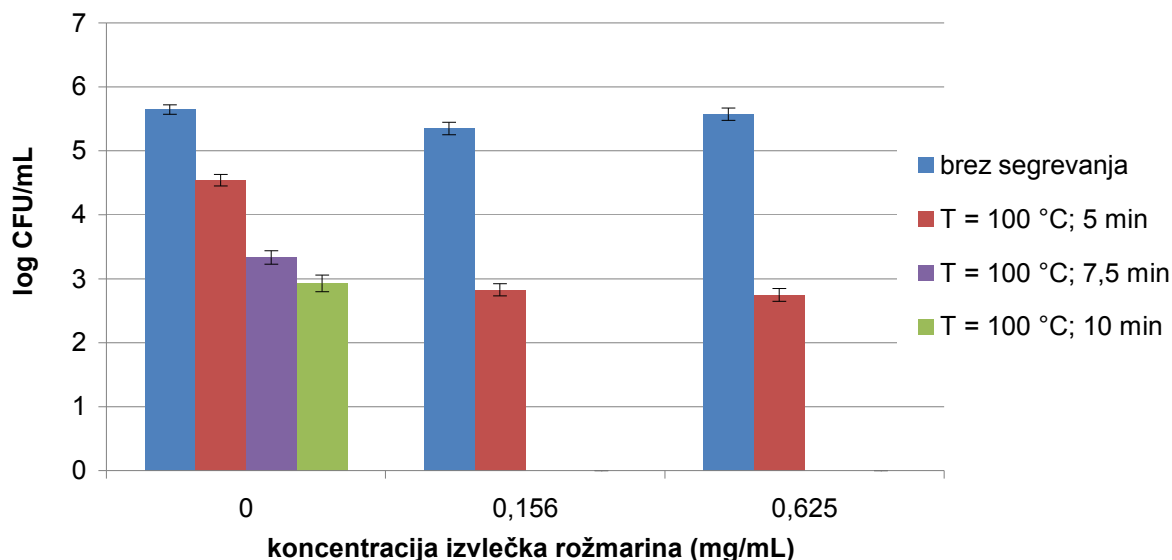


Slika 19: Vpliv nižje koncentracije spor ( $10^4$ - $10^5$  CFU/mL) na testiranje učinka izvlečka rožmarina na spore bakterije *B. cereus* (ŽMJ 164) pri 100 °C

Ker v živilu običajno ne pričakujemo tako visokih koncentracij spor, kot smo jih uporabili pri eksperimentalnem določanju toplotne občutljivosti spor, smo poizkus želeli ponoviti v realnejših razmerah, torej z nižjo koncentracijo spor. Ta je pri poizkusu, katerega rezultati so prikazani na sliki 19, znašala  $10^4$ - $10^5$  CFU/mL. Pri tem pa se je pojavil problem izvedbe tega poizkusa, pri katerem je zaradi načina nacepljanja na plošče meja detekcije znašala  $10^2$  CFU/mL. Pri dodatku izvlečka pred toplotno obdelavo je bil ta meja presežena v vseh poizkusih. Koncentracija kalečih spor se je namreč zmanjšala za 2 - 2,5 log stopnji že po 5-minutni obdelavi pri obeh testiranih koncentracijah izvlečka, zato nismo dobili kolonij na ploščah po inkubaciji. Rezultati so tako potrdili enako ali celo večjo učinkovitost zmanjšane toplotne odpornosti spor zaradi dodatka izvlečka, če je koncentracija spor nižja.

Zaradi presežene meje občutljivosti uporabljene metode smo poizkuse nadaljevali z višjim inokulumom spor ( $10^5$  -  $10^6$  CFU/mL).

#### 4.1.7 Vpliv izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 91)



Slika 20: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 10 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *B. cereus* (ŽMJ 91) pri 100 °C

Sev *B. cereus* ŽMJ 91 je znan kot producent emetičnega toksina, za te seve bakterij pa so v literaturi opisane drugačne rastne karakteristike kot za seve, ki so poznani kot producenti diarealnega toksina (mednje sodi tudi sev *B. cereus* ŽMJ 164). Predvsem so zbrani podatki o rasti v višjem temperaturnem območju, slabše pa rastejo pri temperaturah hladilnika (Carlin in sod., 2006). S poizkusi, katerih rezultati so prikazani na sliki 20, smo želeli ugotoviti vpliv dodatka izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor emetičnega seva, za katerega smo predpostavljali, da se prav tako razlikuje od odpornosti spor diarealnega seva.

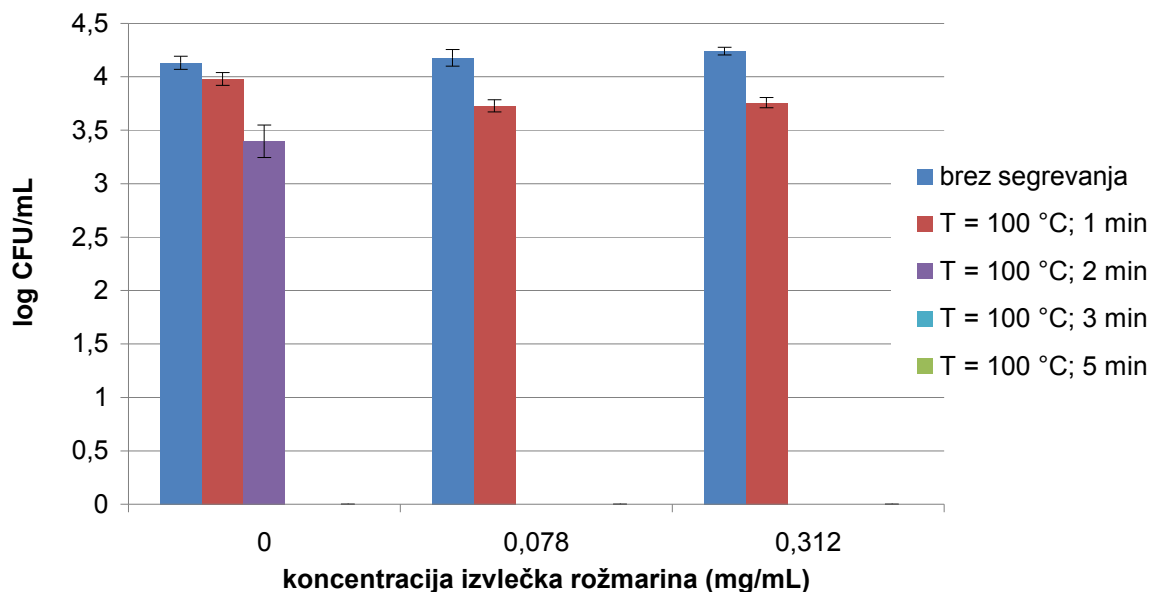
Iz rezultatov je razvidno, da je bila toplotna odpornost spor seva *B. cereus* ŽMJ 91 manjša kot odpornost seva *B. cereus* ŽMJ 164 (primerjava slik 17 in 20). Zato smo dodali tudi merjenje števila preživelih spor po 7,5 minutni toplotni obdelavi, vendar tudi v tem primeru pri poizkusih z dodatkom izvlečka pred toplotno obdelavo nismo dobili nobenih kolonij na ploščah po inkubaciji. Število preživelih spor je bilo manjše od meje občutljivosti metode ( $10^2$  CFU/mL). Meritve pri krajših časih toplotne obdelave niso bile smiselne zaradi večje napake. Zato izračuna D-vrednosti oz. njene spremembe po dodatku izvlečka pred toplotno obdelavo pri tem sevu nismo mogli izračunati.

## 4.2 EKSPERIMENTI S SEVOMA *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) TER *A. acidiphilus* (ŽMJ 185)

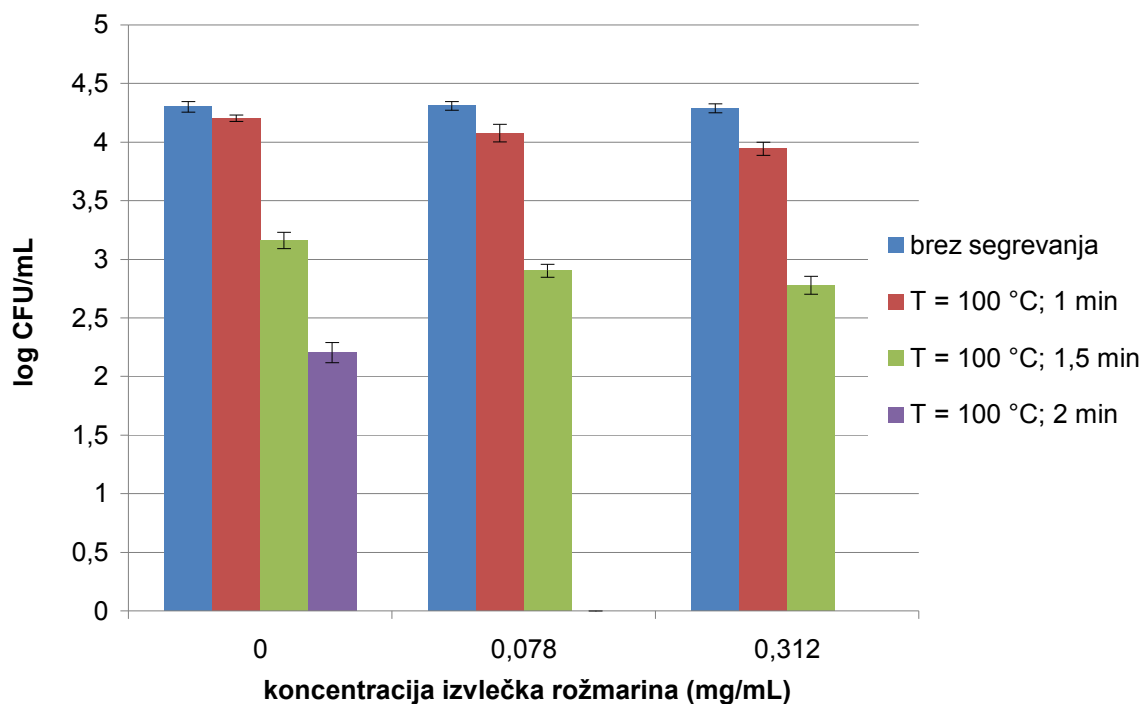
### 4.2.1 Izbor koncentracij rastlinskega izvlečka (MIC) za testiranje občutljivosti spor vrst *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ŽMJ 184) in *Alicyclobacillus acidiphilus* (ŽMJ 185)

Uporabili smo difuzijski test z diski na agarju in določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) za oba seva *A. acidoterrestris* in *A. acidiphilus* pri 0,007813 % raztopine izvlečka oz. 0,078 mg/mL. Za primerjalno koncentracijo smo uporabili štirikratno koncentracijo MIC (0,312 mg/mL), enako kot je bilo uporabljeno pri bakteriji vrste *B. cereus* ŽMJ 164.

### 4.2.2 Izbor ustreznih časov segrevanja suspenzije spor bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 100 °C in 90 °C



Slika 21: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 5 min) in dodatka izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 100 °C



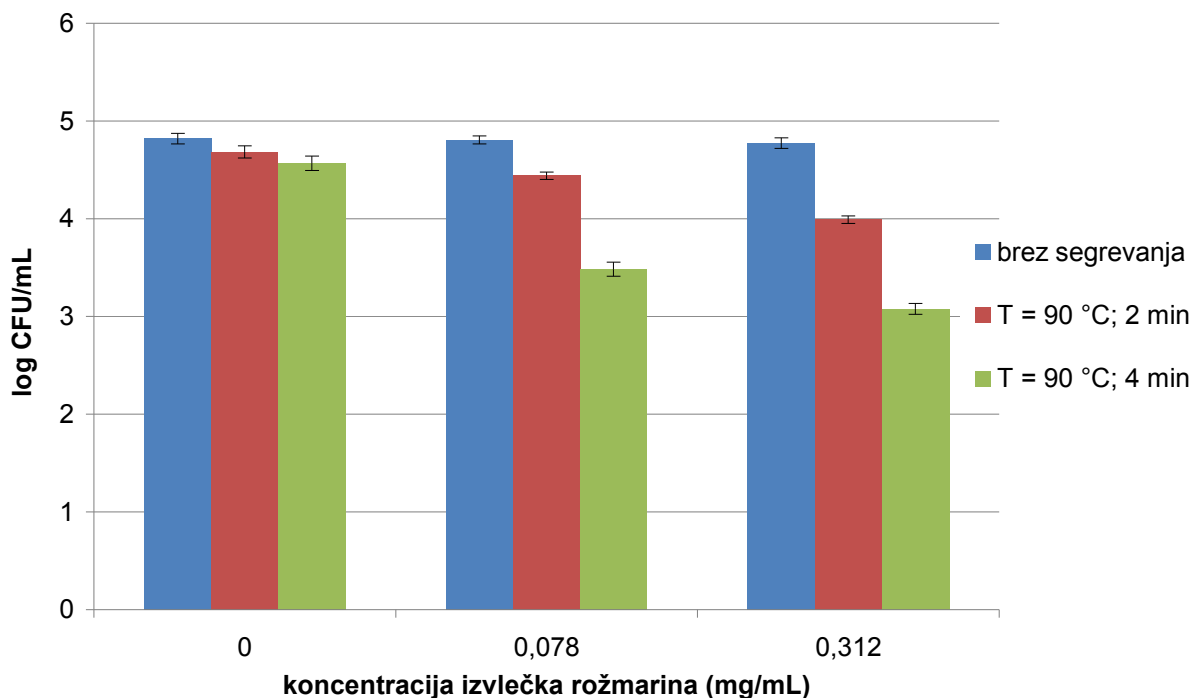
Slika 22: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 2 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 100 °C

Iz poizkusov, katerih rezultati so prikazani na sliki 21, je bilo razvidno, da smo lahko uporabili le kratke čase segrevanja pri 100 °C (do 2 minuti), če nismo želeli preseči meje občutljivosti metode. Rezultati teh poizkusov so prikazani na sliki 22.

Tudi pri sporah bakterije *A. acidoterrestris* ŽMJ 184 smo lahko potrdili nekoliko povečano toplotno občutljivost spor, če je bil pred toplotno obdelavo suspenziji spor dodan rastlinski izvleček, čeprav je bil učinek manjši kot pri sporah bakterije *B. cereus* (primerjava slik 17, 19 in 20).

Ker se pri krajših časih toplotne obdelave poveča napaka meritve, smo temperaturo toplotne obdelave znižali na 90 °C in ponovili vse poizkuse. Rezultati teh poizkusov so prikazani na sliki 23.



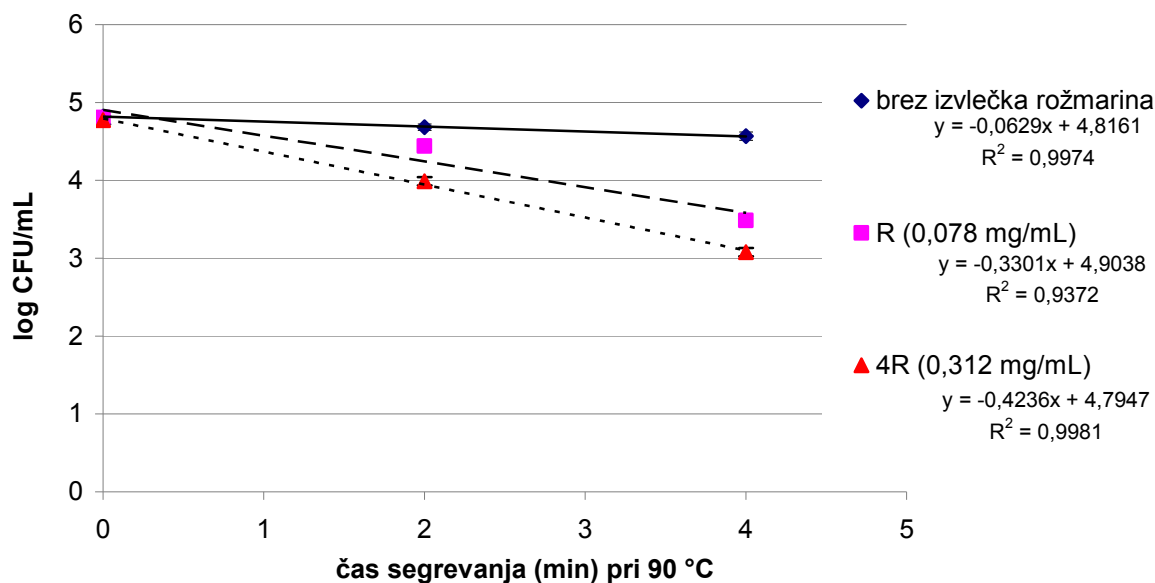


Slika 23: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 4 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 90 °C

Temperaturo toplotne obdelave smo znižali na 90 °C, da smo lahko bolj natančno kontrolirali čas segrevanja in si povečali možnosti, da dobimo viabilne spore v vzorcu. Tako smo dobili uporabne rezultate za izračun D-vrednosti. Uporabili smo nekoliko višjo koncentracijo spor kot pri poizkusih, prikazanih na sliki 22, da smo lahko zagotovili meritve v območju občutljivosti metode merjenja.

Potrdili smo rezultate, ki smo jih dobili že v prejšnjem eksperimentu. Dodatek izvlečka je povečal toplotno občutljivost spor, kar pomeni, da se je povečala redukcija viabilnih spor po 2- in 4-minutni toplotni obdelavi (slika 23). Vpliv je bil večji pri večji koncentraciji dodanega izvlečka.

#### 4.2.3 Izračun D-vrednosti za spore bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 90 °C



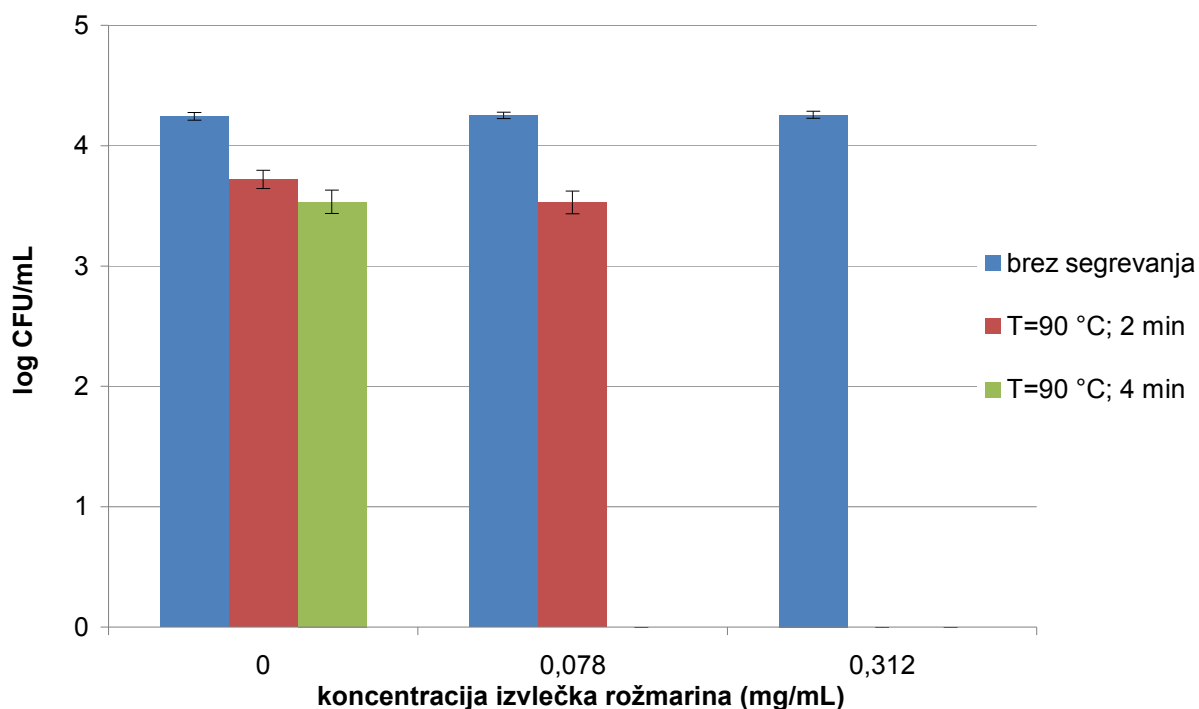
Slika 24: Termična inaktivacijska krivulja za spore bakterije *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 90 °C

Na enak način kot pri sporah bakterije *B. cereus* smo iz naklonov dobljenih inaktivacijskih krivulj izračunali D-vrednosti (slika 18).

Preglednica 6: D-vrednosti za spore bakterij *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) pri 90 °C

konc. izvlečka rožmarina (mg/mL)	naklon premice	$D_{90}$ - vrednost (min)	$R^2$
0	-0,0629	15,90	0,9674
0,078 (R)	-0,3301	3,03	0,9372
0,312 (4R)	-0,4236	2,36	0,9981

#### 4.2.4 Vpliv izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterij *A. acidiphilus* (ŽMJ 185)



Slika 25: Vpliv različnih časov toplotne obdelave (do 4 min) in koncentracije izvlečka rožmarina na toplotno odpornost spor bakterije *A. acidiphilus* (ŽMJ 185) pri 90 °C

Želeli smo potrditi tudi vpliv izvlečka rožmarina, da poveča toplotno odpornost spor seva *A. acidiphilus* ŽMJ 185 pri temperaturi 90 °C. Rezultati poizkusa so predstavljeni na sliki 25. Očitno je, da je dodatek izvlečka pred toplotno obdelavo povečal občutljivost spor, ker v večini poizkusov (4-minutno segrevanje z dodano koncentracijo 0,078 mg/mL ter 2- in 4-minutno segrevanje z dodano višjo koncentracijo izvlečka 0,312 mg/mL) ni dokazalo viabilnih spor oz. rasti kolonij na ploščah po inkubaciji. To dokazuje, da smo v teh eksperimentalnih pogojih dosegli redukcijo spor v vsaj 2 log stopnjah, kar kaže na občutno povečanje občutljivosti spor glede na kontrolo. Zaradi presežene meje občutljivosti uporabljene metode detekcije viabilnosti spor pa lahko poizkus ovrednotimo le kot kvalitativen, saj nismo mogli izračunati redukcije D-vrednosti po dodatku rožmarinskega izvlečka.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V eksperimentih smo preučevali vpliv rožmarinskega izvlečka na toplotno odpornost spor bakterij rodu *Bacillus* in *Alicyclobacillus*. Uporabili smo komercialno pripravljen izvleček rožmarina, ki vsebuje 40,69 % karnozolne kisline. Največ jo najdemo v listih rožmarina in žajblja (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L.), a samo v kloroplastih, kjer karnozolna kislina deluje kot zaščita proti radikalom in spada med fenolne spojine, ki so glavne protimikrobne komponente v izvlečkih rožmarina (Del Campo in sod. 2000). Uporabljeni izvleček rožmarina ima dokazano protimikrobno delovanje na bakterije *S. aureus*, *B. cereus*, *C. jejuni* in *Salmonella Infantis* (Klačnik in sod., 2009). V pričujočem diplomskem delu pa smo želeli proučiti še protimikrobno delovanje na bakterijske spore oz. zmanjšanje njihove toplotne odpornosti. To je ključnega pomena za zagotavljanje kakovosti in varnosti toplotno obdelanih živil, ki jih ogrožajo toplotno odporne bakterijske spore.

Za eksperimentalno proučevanje toplotne odpornosti spor je zelo pomembna njihova priprava. Na voljo smo imeli več metod za separacijo spor in celic oz. eliminacijo vegetativnih celic. Taki postopki so sprememba osmotskega okolja, avtoliza v destilirani vodi, počasno zmrzovanje in odtajevanje, hranjenje v etanolu več ur, izpiranje v deionizirani vodi, obdelava z lizocimom in temperaturni šok. Pri prvem predpoizkusu smo uporabljali tehniko temperaturnega šoka za eliminacijo vegetativnih celic iz TSB bujona, ki smo jo kasneje zamenjali za centrifugacijo. Ta se je izkazala za točnejšo, saj smo z njo dejansko ločili vegetativne celice, pa tudi bolj praktično, saj smo z njo zagotovili stalno in večjo koncentracijo spor (Zhao, 2006).

Pri poizkusih smo uporabljali vsaj 1 teden stare spore, ker starane spore postanejo odpornejše oz. se aktivirajo podobno kot s toploto. Tako smo pri toplotni obdelavi dosegali manjšo redukcijo spor, kot če bi uporabili spore takoj po centrifugaciji, eksperimentalni rezultati so bili tako bolj realni (Collado in sod., 2003).

V poizkusih za povečanje toplotne občutljivosti spor smo izvleček uporabljali v minimalni inhibitorni koncentraciji (MIC), ki je bila ugotovljena z difuzijsko metodo v okviru tega diplomskega dela, za seva *A. acidoterrestris* ŽMJ 184 in *A. acidiphilus* ŽMJ 185. Minimalni inhibitorni koncentraciji sta bili izmerjeni pri 0,07813 mg izvlečka/ mL. Z dilucijsko metodo pa meritev ni uspela zaradi lastnosti agarja AM, ki ga je potrebno hraniti pri 40- 50° C. Pri prvem neuspelem poizkusu smo si gojišče pripravili en dan prej in ga hranili čez noč na 40- 50 °C. Tako pripravljen agar se po vlivanju v petrijevke ni hotel strditi in ga je bilo nemogoče nacepiti. Sestavine v gojišču namreč niso prenesle tako dolgega segrevanja. Pri drugem poizkusu smo gojišče takoj po sterilizaciji razlili v epruvete in ga hranili na 40- 50° C le za kratek čas. Po vlivanju v petrijevke se je agar sicer strdil, vendar pa rasti bakterij nismo zabeležili.

Za bakteriji *B. cereus* ŽMJ 164 in *B. cereus* ŽMJ 91 smo uporabili minimalne inhibitorne koncentracije, ki so bile ugotovljena v predhodnih poizkusih (Piskernik, 2008). Za sev *Bacillus cereus* ŽMJ 164 so bile vrednosti dobljene z dilucijsko in difuzijsko metodo, in sicer 0,07813 oz. 0,3125 mg izvlečka/mL. Za sev *Bacillus cereus* ŽMJ 91 pa so bile vrednosti dobljene z istima metodama, vendar so koncentracije znašale 0,15625 oz. 0,625 mg izvlečka/mL.

Preživelost spor smo ugotavljali z najbolj pogosto uporabljeno ter referenčno metodo štetja kolonij na agarških ploščah. Princip te metode je razredčevanje originalnega vzorca v serijske razredčitve in nacepljanje teh na trdno gojišče v petrijevkah (Lee, 2008).

### 5.1.1 Primerjava D-vrednosti

D-vrednost pomeni čas segrevanja v minutah, ki predvideva inaktivacijo 90 % mikroorganizmov oz. 10 % preživelih mikroorganizmov.

Preglednica 7: Primerjava D-vrednosti *B. cereus* (ŽMJ 164) z drugimi avtorji

<i>B. cereus</i> ŽMJ 164 - brez izvlečka (pH = 7,0)	<i>B.cereus</i> ŽMJ 164 - z izvlečkom oz. drugimi spremembami	°C
12,60 min <sup>a</sup>		96
<b>4,77 min</b> , 4,50 min <sup>a</sup>	<b>2,78 min (4R), 2,44 min (R)</b> ; 1,10 min <sup>a</sup> (pH 5,2)	100
2,07 min <sup>a</sup>		102
1,08 min <sup>a</sup>		104
0,30 min <sup>a</sup>		108

<sup>a</sup> - (Moussa-Boudjemaa in sod., 2005)

Preglednica 8: Primerjava D-vrednosti *A. acidoterrestris* (ŽMJ 184) z drugimi avtorji

<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ 184 - brez izvlečka (pH = 4)	<i>A. acidoterrestris</i> ŽMJ 184 - z izvlečkom oz. drugimi spremembami	°C
25,9 min <sup>a</sup>		88
<b>15,90 min</b> , 15,6 min <sup>b</sup> - 18,0 min <sup>c</sup> - 16,1 min <sup>a</sup>	<b>2,36 min (4R), 3,03 min (R)</b> , 14,8 min <sup>a</sup> (pH 3,0)	90
	24,1 min (pH 2,5; °Brix 58,5)	91
6,1 min <sup>a</sup>		92
2,8 min <sup>a</sup> , 2,30 min <sup>b</sup>		95

<sup>a</sup> - (Murakami, 1998), <sup>b</sup> - (Tokuda., 2007), <sup>c</sup> - (Jay in sod., 2007), <sup>d</sup> - (Bahçeci in Acar, 2007),

<sup>e</sup> - (Silva in Gibbs, 2001)

S primerjanjem D-vrednosti za *A. acidoterrestris* smo ugotovili, da je redukcija spor z izvlečkom pri 90 °C podobna tisti brez izvlečka pri 95 °C, kar pa pomeni, da bi pri pasterizaciji lahko za isti učinek uporabljali 5 °C nižjo temperaturo. Praktično to pomeni prihranek toplotne energije, nižje stroške za zagotavljanje kakovosti izdelka, funkcionalnosti, daljši rok uporabnosti izdelka in boljšo ohranitev senzorične in prehranske kakovosti, ki se izgublja pri toplotni obdelavi. To še posebej velja za *A. acidoterrestris*, ki je razširjen v proizvodnji zelenjavnih, sadnih izdelkov in pijač ter ima velik potencial kvara živila z nižjo vrednostjo pH (jabolčni, paradižnikovi, pomarančni sokovi, ledeni čaji ...). Težave povzroča zaradi težje vizualne zaznave (tanek sediment) in netipičnega vonja po antiseptikih, ki ga kupec zazna po odprtju embalaže. Zniževanje vrednosti pH pri bakteriji *A. acidoterrestris* nima velikega učinka, saj je le-ta acidorezistentna oz. odporna na nizke vrednosti pH medija. Visoka suha snov (°Brix) še dodatno poveča odpornost spor v koncentriranih sokovih.

Kot lahko sklepamo iz rezultatov opravljenih poizkusov, ima preiskovani rožmarinski izvleček dober učinek na zniževanje toplotne odpornosti bakterijskih spor. Velika verjetnost je, da bi skupaj z optimizirano vrednostjo pH in vodne aktivnosti dobili še boljše aditivne učinke izvlečka pri preprečevanju klitja spor, saj vemo, da deluje vsaka snov/postopek na različne tarče v spori in celici. Čeprav so rezultati obetajoči, je raziskav s tega področja še zelo malo in bi bile potrebne nadaljnje raziskave na laboratorijskem nivoju in prenosu v prakso.

## 5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov eksperimentalnega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Toplotna odpornost spor testiranih sevov se je med seboj dokaj razlikovala. Spore obeh vrst rodu *Alicyclobacillus* so bile bolj občutljive na toplotno obdelavo od spor obeh sevov vrste *Bacillus cereus*, med slednjimi pa so bile spore seva *B. cereus* ŽMJ 91, ki je znan kot producent emetičnega toksina, bolj občutljive kot spore seva *B. cereus* ŽMJ 164, ki je znan kot producent diarealnega toksina.
- Centrifugacija se je primerjavi s toplotnim šokom izkazala za boljšo metodo za pridobivanje visoke koncentracije spor v postopku ločevanja spor od vegetativnih celic.
- Z dodatkom rožmarinskega izvlečka suspenziji spor pred toplotno obdelavo smo v vseh primerih povečali toplotno občutljivost spor oz. zmanjšali njihovo viabilnost po toplotni obdelavi glede na kontrolo, ki ji izvleček ni bil dodan.
- D-vrednost spor *Bacillus cereus* ŽMJ 164 kot merilo toplotne odpornosti pri obdelavi 100 °C je znašala 4,77 min brez dodatka izvlečka, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 2,44 min. Kot merilo toplotne odpornosti spor bakterij *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ 184 pri temperaturi 90 °C smo izračunali D-vrednost 15,90 min brez dodatka izvlečka, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 3,03 min.
- Rezultati nakazujejo potencialno uporabnost izvlečka ne le za inhibicijo rasti bakterij, ampak tudi za povečanje učinkovitosti pasterizacije, torej zagotavljanja kakovosti in varnosti toplotno obdelanih živil, ki jih ogrožajo toplotno odporne bakterijske spore.

## 6 POVZETEK

Tradicionalna uporaba začimb in zelišč v hrani se nanaša predvsem na izboljšanje senzoričnih lastnosti (vonja, okusa, barve itd.), dandanes pa vedno bolj prihajajo v ospredje tudi naravne varovalne funkcije rastlinskih sestavin, npr. antioksidativno in protimikrobno delovanje. Potrošniki se vedno bolj nagibajo k hrani z manj sintetičnimi aditivi, a in kljub temu pričakujejo povečano varnost in obstojnost hrane. V tem smislu tudi začimbe ali njihovi izvlečki lahko odigrajo zelo pomembno vlogo (Peter, 2004).

Proučevali smo toplotno odpornost spor bakterije vrste *B. cereus*, ki so sporogene, grampozitivne in oportunistične patogene bakterije. Lahko povzročijo diarejo in abdominalne bolečine in/ali slabost in bruhanje. Njihove spore lahko preživijo daljša obdobja pri visokih temperaturah, suši ali koncentraciji različnih snovi. Spore se lahko vrnejo v vegetativno stanje (klitje), ko so razmere za rast spet ugodne. Bakterije rodu *Alicyclobacillus* pa so prav tako sporogene, grampozitivne in acidofilne paličaste bakterije. So kvarljivci pasteriziranih sadnih in zelenjavnih sokov, ker njihove spore preživijo pasterizacijo, rastejo pa v okolju nizke vrednosti pH sadnih in zelenjavnih izdelkov. Niso patogeni za človeka, vendar povzročajo škodo proizvajalcem pijač, zaradi gvajakola, ki ima neprijetno aromo, zato izdelki niso več sprejemljivi za porabnika (Goto, 2007).

Za pripravo testne suspenzije spor se je kot najboljši postopek izkazala centrifugacija, zaradi dobrega donosa in čistosti spor. Na izbiro med postopki so bili še avtoliza v destilirani vodi, počasno zmrzovanje in odtajevanje, hranjenje v etanolu več ur, izpiranje v deionizirani vodi, obdelava z lizocimom in temperaturni šok (Zhao, 2006). Slednji se je pri prvih predpoizkusih izkazal za nepraktičnega, ker je bil delež spor premajhen, delež vegetativnih celic pa prevelik. Za preverjanje viabilnosti spor smo uporabili referenčno in najbolj pogosto metodo štetja kolonij na agarških ploščah.

Uporabili smo komercialno pripravljen izvleček rožmarina s 40,69 % karnozolne kisline (Vitiva d.d., Slovenija), za katerega je že bilo potrjeno inhibitorno delovanje na rast omenjenih bakterij v *in vitro* pogojih in v živilih. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in njeno štirikratno vrednost smo dodali vsaj teden dni starim, predhodno pripravljenim koncentriranim suspenzijam spor ( $10^4$ - $10^7$  spor/mL) in preverjali njihovo viabilnost po 1-10 minutni toplotni obdelavi pri temperaturah 80-100 °C. Potrdili smo hipotezo, da se toplotna odpornost testiranih sevov med seboj dokaj razlikuje.

Ugotovili smo, da so spore bakterij rodu *Alicyclobacillus* bolj občutljive na toplotno obdelavo od spor bakterij vrste *Bacillus cereus*. Med slednjimi so bile spore seva *B. cereus* ŽMJ 91, ki je znan kot producent emetičnega toksina, bolj občutljive kot spore seva *B. cereus* ŽMJ 164, ki je znan producent diarealnega toksina. V vseh primerih pa smo potrdili, da je dodatek



rožmarinskega izvlečka suspenziji spor pred toplotno obdelavo povečal občutljivost spor oz. zmanjšal njihovo viabilnost po toplotni obdelavi glede na kontrolo brez izvlečka.

Za kvantitativno ovrednotenje učinka izvlečka na toplotno občutljivost spor smo iz termičnih inaktivacijskih krivulj izračunali D-vrednosti. Za spore vrste *Bacillus cereus* ŽMJ 164 brez dodatka izvlečka je  $D_{100}$  znašala 4,77 min, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 2,44 min.

Za spore *Alicyclobacillus acidoterrestris* ŽMJ 184 smo izračunali D-vrednosti 15,90 min brez dodatka izvlečka, z dodatkom izvlečka v koncentraciji MIC pa 3,03 min pri temperaturi segrevanja 90 °C. Rezultati nakazujejo potencialno uporabnost izvlečka ne le za inhibicijo rasti bakterij, ampak tudi za povečanje učinkovitosti pasterizacije, torej zagotavljanja kakovosti in varnosti toplotno obdelanih živil, ki jih ogrožajo toplotno odporne bakterijske spore.

## 7 VIRI

Aronson A. I., Fitz-James P. C. 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriology Reviews*, 40: 360-402

Armengol R., Betés C. 1995. Antioxidant action of a natural extract: Cosmetic uses. *SÖFW Journal*: 14-18

Bacillus spore. 2006. Paris, INRA-L'Institut National de la Recherche Agronomique: 1 str. <http://www.lille.inra.fr/var/lille/storage/htmlarea/1751/Image/URGPTA/Spore%20Bacillus%20MET.jpg> (1. feb. 2010)

Bailey-Smith K., Todd S. J., Southworth T. W., Proctor J., Moir A. 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *Journal of Bacteriology*, 187, 11: 3800-3806

Bender G. R., Marquis R. E. 1985. Spore heat-resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 6: 1414-1421

Bergère J.L., Cerf O. 1992. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Bulletin of the International Dairy Federation, IDF*, 275: 319-322

Bhunia A.K. 2008. Foodborne microbial pathogens: Mechanism and pathogenesis. New York, Springer: 135-148

Blais B., Shaw S. 2005. *Bacillus cereus*. Canada, Magma: 1 str. [http://www.magma.ca/~scimat/b\\_cereus.htm](http://www.magma.ca/~scimat/b_cereus.htm) (1.jul. 2009)

Borlinghaus A., Engel R. 1997. Vorkommen von *Alicyclobacillus* sp. in kommerziellen Apfelsaftkonzentraten (ASK)- Methodenentwicklung und Validierung. *Flüssiges Obst*, 64, 6: 306-309

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

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

Chaibi A., Ababouch L.H., Busta F.F. 1996. Inhibition by monoglycerides of L-alanine-triggered *Bacillus cereus* in *Clostridium botulinum* spore germination and outgrowth. *Journal of Food Protection*, 59: 832-837

Chen H., Chen S.F., Zhang Y.L., Song J.Y. 1999. Production of rosmarinic acid and lithospermic acid B in Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, 34: 777-784

Chen Y., Fukuoka S., Maino S. 2000. A novel spore peptidoglycan hydrolase of *Bacillus cereus*: Biochemical characterization and nucleotide sequence of the corresponding gene, sleL. *Journal of Bacteriology*, 182, 6: 2595-2600

Collado J., Fernández, Rodrigo M., Camats J., Martínez Lopez A. 2003. Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, 20, 5: 545-548

Colwell R.R., Grimes J.D. 2000. Semantics and strategies. V: Non-culturable microorganisms in the environment. Colwell R.R., Grimes J.D. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 1-6

Couvert O., Leguerinel I., Mafart P. 1999. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 49: 57-62

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

Cserhalmi Zs., Vidács I., Beczner J., Czukor B. 2002. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 41-45

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

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

Del Campo J., Nguyen-The C., Sergeant M., Amiot M.J. 2003. Determination of the most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: Influence of concentration, pH, and NaCl. *Journal of Food Science*, 68, 6: 2066-2071

Dragon D. C., Rennie R. P. 2001. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 2: 100-105

- Duong H.A., Jensen N. 2000. Spoilage of ice tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia*, 52, 7: 292-292
- Fernandez A., Ocio M. J., Fernandez P. S., Martinez A. 2001. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 257-264
- Fernández-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A., Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380
- Fine F., Gervais P. 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. *Environmental Microbiology*, 7: 40-46
- Fujii K., Ohtani A., Watanabe J., Ohgoshi H., Fujii T., Honma K. 2002. High pressure inactivation of *Bacillus cereus* spores in the presence of argon. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 239-242
- Gaillard S., Leguerinel I., Mafart P. 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science*, 63: 887-889
- Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., Parish, M., Rouseff, R.L., 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 172-177
- González I., López M., Mazas M., Bernardo A., Martín R. 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 31: 341-347
- Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp.nov., a novel thermo-acidphilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended the description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1537-1544
- Goto K. 2007. Historical background related to *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 9-24
- Gould G.W. 2006. History of science-spores: Lewis B. Perry memorial lecture 2005. *Journal of Applied Bacteriology*, 101: 507-513

Hamouda T., Hayes M. M., Cao Z. Y., Tonda R., Johnson K., Wright D. C., Brisker J., Baker J. R. 1999. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporicidal activity against *Bacillus species*. *Journal of Infectious Diseases*, 180: 1939-1949

Hamouda T., Shih A. Y., Baker J. R. 2002. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 86-90

Harwood C.R. 1989. Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. V: *Bacillus*. Harwood C.R. (ed.). New York, Plenum Press: 1-4

Hitchins A. D., Slepecky R. A. 1969. Bacterial sporulation as a modified procaryotic cell division. *Nature*, 223: 804-807

Holdsworth D., Simpson R. 2008. Thermal processing of packaged foods. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer: 89-103

Imperio T., Viti C., Marri L. 2008. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., athermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the North-West slope of Mount Melbourne (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 221-225

Ireland J. A. W., Hanna P. C. 2002. Amino acid- and purine ribonucleoside induced germination of *Bacillus anthracis* delta Sterne endospores. *Journal of Bacteriology*, 184: 1296-1303

Jensen N. 2000. *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia*, 52: 282-285

Jones C. 2002. Rosemary's whole plant properties counter cancer. Barrie, Pure-le Natural: 3 str.  
<http://www.oreganocures.com/articles61.html> (1. jul.2009)

Jay M.J., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. Modern food microbiology. 7<sup>th</sup> ed. New York, Springer: 415-441

Jones J.D., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329

Jorge De Lara P. S. F., Periago P.M., Palop A. 2002. Irradiation of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with electron beams. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 379-384

Jørgensen C., Leser T.D. 2007. Estimating amplification efficiency improves multiplex real-time PCR quantification of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores in animal feed. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 588-595

Klačnik A., Guzej B., Kolar H., Abramovič H., Smole-Možina S. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72, 8: 1744-1752

Kramer J.M., Gilbert R.J. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. V: Foodborne bacterial pathogens. Doyle M.P. (ed.) New York, Marcel Dekker: 21-70

Laboratorij za živilsko mikrobiologijo. 2006. Metoda difuzije v agarju.

Larson M.A., Marinas B.J. 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine. *Water Research*, 37, 4: 833-44

Leguerinel I., Mafart P. 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 30-33

Lee P.S. 2008. Quantitation of microorganisms. V: Practical handbook of microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Goldman E., Green H.L. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 11-22

Leuschner R.G.K., Ferdinando D.P., Lillford P.J. 2000. Structural analysis of spores of *Bacillus subtilis* during germination and outgrowth. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 19: 31-41

Madigan T.M., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. 2009. Brock biology of microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 100-150

Manas P., Pagan R., Raso J., Condon S. 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 45-53

Masuda T., Inaba Y., Takeda Y. 2001. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5560-5565

Marquis R.E., Shin S.Y. 1994. Mineralization and responses of bacterial spores to heat and oxidative agents. *FEMS Microbiology Reviews*, 14: 375-380

Miller S.L., Torres P., McClean T.M. 1993. Basidiospore viability germination in ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. *Mycological Research*, 97, 2: 141-149

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

- Moussa-Boudjemaa B., Gonzalez J., Lopez M. 2005. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores in carrot extract acidified with different acidulants. *Food Control*, 17: 819-824
- Murakami M., Tedzuka H., Yamazaki K. 1998. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology*, 15: 577-582
- Nakayama A., Yano Y., Kobayashi S., Ishikawa M., Sakai K. 1996. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus strains* with their heat resistances. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3897-3900
- Nicholson W. L., Galeano B. 2003. UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: Validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1327-1330
- Nguyen Thi Minh H., Perrier-Cornet J.M., Gervais P. 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, 80: 107-114
- Paidhungat M., Setlow B., Driks A., Setlow P. 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, 182: 5505-5512
- Paidhungat M., Setlow B., Daniels W. B., Hoover D., Papafragkou E., Setlow, P. 2002. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6: 3172-3175
- Peter K.V. 2004. Introduction. V: Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd.: 4-20
- Pflug J.I., Holcomb G.R., Gómez M.M. 2000. Principles of the thermal destruction of microorganisms. V: Disinfection, sterilization and preservation. 5<sup>th</sup> ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 79-134
- Piskernik S. 2008. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Bacillus* in *Staphylococcus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43-46 str.
- Plouzek C.A., Ciolino H.P., Clarke R., Yeh G.C. 1999. Inhibition of p- glycoprotein activity and reversal of multi drug resistance in vitro by rosemary extract. *European Journal of Cancer*, 35, 10: 154-155
- Previdi, M.P., Quintavalla, S., Lusardi, C., Vicini, E., 1997. Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. *Industria Conserve*, 72: 353-358

Rohde M. 2009. *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Walnut Creek, Doe Joint Genome Institute: 1 str.

<http://www.jgi.doe.gov/education/adoptagenome/index.html> (1.jul.2009)

Rosemary. 2007. Boone, Bon Appétit: 1 str.

<http://www.bonappetit.com/tipstools/ingredients/2008/04/rosemary> (4. maj. 2008)

Rosemary-eco. 2006. Norwalk, Centerchem, Inc.: 9 str.

<http://www.centerchem.com/PDFs/Rosemary%20ECO%20Tech%20Lit.pdf> (1. jul.2009)

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

Sabli M. Z. H., Setlow P., Waites W. M. 1996. The effect of hypochlorite on spores of *Bacillus subtilis* lacking small acid-soluble proteins. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 405-407

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

Savaş Bahçeci K., Acar J. 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 267-270

Sawaki T. 2007. Historical background related to *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 6-7

Schiza M.V., Perkins D.L., Priore R.J., Setlow B., Setlow P., Bronk B.V., Wong D.M., Myrick M.L. 2005. Improved dispersion of bacterial endospores for quantitative infrared sampling on gold coated porous alumina membranes. *Applied Spectroscopy*, 59, 8: 1068-1074

Schwarz K. 2002. Phenolic diterpenes from rosemary and sage. V: *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Vol. 2. Shi J., Mazza G., Le Maguer M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 189-212

Setlow P. 1988. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus species*: Structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Annual Reviews in Microbiology*, 42: 319-338

Setlow P. 2000. Resistance of bacterial spores. V: *Bacterial stress responses*. Storz G.I., Hengee-Aronis R. (eds.). Washington D.C., ASM Press: 217-219

Setlow B., Melly E., Setlow P. 2001. Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage in spore germination. *Journal of Bacteriology*, 183: 4894-4899



- Setlow P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 550-556
- Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 514-525
- Silva F.V.M., Gibbs P. 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 70-71
- Silva M.F., Gibbs P., Vieira C. M., Silva C.L.M. 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*, 51: 95-103
- Smole Možina, S., Klančnik, A., Raspor, P. 2009. Protimikrobne snovi v živilih in živilstvu. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petkovič, H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-45
- Son H., Cho M., Kim J., Oh B., Chung H. M., Yoon J. 2005. Enhanced disinfection efficiency of mechanically mixed oxidants with free chlorine. *Water Research*, 39, 4: 721-727
- Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection*, 57: 1080-1083
- Tanaka T. 2007. Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores. V: *Alicyclobacillus*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 20-37
- Tena M.T., Valcarcel M., Hidalgo P.J., Uebera J.L. 1997. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: Comparison with liquid solvent sonication. *Analytical Chemistry*, 69, 3: 521-526
- Tokuda H. 2007. Toxicity and pathogenic characteristics of *Alicyclobacillus* and its metabolic products. V: *Alicyclobacillus*. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 20-37
- Vaid A., Bishop A. H. 1998. The destruction by microwave radiation of bacterial endospores and amplification of the released DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 1: 115-122
- Vohra A., Goswami D. Y., Deshpande D. A., Block S. S. 2005. Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 364-370
- Ulanowski Z., Ludlow I.K., Waites W.M. 1987. Water content and size of spore components determined by laser diffractometry. *FEMS Microbiology Letters*, 40: 229-232

Wisotzkey J.D., Jursthuk Jr. P., Fox G.E., Deinhard G., Poralia K. 1992. Comparative sequence analysis on the 16 s rRNA-(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 263-269

Wood J.M., Bremer E., Csonka L.N., Kraemer R., Poolman B., van der Heide T., Smith L.T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 130: 437-460

Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva F.M., Gaspar N., Silva C.L.M. 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: Kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 71-81

Yang W.W., Ponce A. 2008. Rapid endospore viability assay of *Clostridium sporogenes* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 133: 213-216

Yin M.C., Cheng W.S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63, 1: 23-28

Zhao J. 2006. Inactivation of microorganisms by photocatalytic nanostructures under dry conditions. Ph.D. Dissertation. Gainesville, University of Florida: 1-70  
<http://purl.fcla.edu/fcla/etd/UFE0015060> (21. jul. 2009)

Zhao J., Krishna V., Moudgil B., Koopman B. 2007. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. *Separation and Purification Technology*, 61: 341-347

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem za strokovno pomoč in nasvete pri praktičnem delu in prav tako pri pisanju naloge ter za natančen in poglobljen pregled teksta.

Recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za strokoven in temeljit pregled diplomske naloge.

Univ. dipl. živ. tehn. Tanji Rožman, univ. dipl. živ. tehn. Saši Piskernik in Jani Avbelj za pomoč in nasvete pri praktičnem delu diplome v laboratoriju.

Univ. dipl. živ. tehn. Ivici Hočevnar in univ. dipl. živ. tehn. Lini Burkan za pregled in urejanje virov.

Posebna zahvala staršem, starim staršem, bratu Mateju in kolegoma Matevžu in Lauri za vso podporo in razumevanje skozi vsa leta študija.