Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata na odabrane patogene uzročnike kvarenja hrane

Šarić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:283632

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKU FAKULTET

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BILJNIH EKSTRAKATA NA ODABRANE PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

ZAVRŠNI RAD

MATEA ŠARIĆ

Matični broj: 1460

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKU FAKULTET
STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BILJNIH EKSTRAKATA NA ODABRANE PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

ZAVRŠNI RAD

MATEA ŠARIĆ

Matični broj: 1460

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
COURSE: FOOD TECHNOLOGY

ANTIMICROBICAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AGAINST SELECTED FOOD BORNE PATHOGENS

BACHELOR THESIS

MATEA ŠARIĆ

Parent number: 1460

Split, October 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Stručni studij kemijske tehnologije, smjer Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BILJNIH EKSTRAKATA NA ODABRANE PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

Matea Šarić,1460

Sažetak:

Patogeni uzročnici kvarenja hrane predstavljaju veliki zdravstveni problem širom svijeta što je posljednjih godina eskaliralo na neviđenu razinu. Prema tome, potražnja za sigurnom i kvalitetnom hranom je sve veća. Korištenje sintetskih konzervansa je često, ali je njihova sigurnost još uvijek upitna, što je potaknulo znanstvenike da traže prirodne konzervanse.
U ovom radu ispitana su antimikrobna svojstava odabranih ljekovitih biljaka protiv najčešćih patogenih uzročnika kvarenja hrane. Istraživane su četiri biljne vrste (lavanda, ružmarin, mravinac i matičnjak) kako bi se odredilo njihovo antibakterijsko djelovanje prema tri Gram pozitivne (G (+)) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus feacalis*, *Listeria monocytogenes*) i dvije Gram negativne (G (-)) bakterijske vrste (*Salmonella enterica, Escherichia coli*). Biljni ekstrakti su pripremljeni korištenjem ultrazvučne kupelji (2 h, 60 °C, biljni materijal: voda = 15: 100). Antibakterijsko djelovanje određeno je korištenjem metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*).
Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti pokazali su bolju aktivnost biljnih ekstrakata prema G (+) vrstama i najučinkovitiji ekstrakti, s najnižim MIC vrijednostima (u rasponu od 217 do 707 mg GAE/L) bili su ekstrakti ružmarina i mravinca, dok je najslabiji antimikrobni učinak zapažen kod matičnjaka (> 5551,2 mg GAE/L). Suprotno tome, matičnjak i mravinac pokazali su veću zonu inhibicije (30 mm) prema G (+) vrstama, korištenjem metode difuzije u jažicama. Kod obje metode svi testirani biljni ekstrakti pokazali su slabiju aktivnost, odnosno visoke MIC vrijednosti, te malu ili nikakvu zonu inhibicije prema G (-) bakterijama.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, MIC, zona inhibicije, fenoli

Rad sadrži: 25 stranica, 15 slika, 4 tablice, 27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Mladen Miloš
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Datum obrane: 01. listopada 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Proffesional study of chemical technology, course: Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3.

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor
Technical assistance: Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor

ANTIMICROBICAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AGAINST SELECTED FOOD BORNE PATHOGENS

Matea Šarić,1460

Abstract:

Food-borne pathogens are causing major public health problems worldwide what in recent years have escalated to unprecedented levels. Accordingly, demand for safe and high-quality food has increased. The use of synthetic preservatives is well known but still questionable due to their safety, what encouraged scientists to search for natural preservatives.
The present research was conducted in order to study the antimicrobial properties of selected medicinal plants against commonly food borne pathogens. Four plant species (lavender, rosemary, oregano and lemon balm) were investigated to evaluate their antibacterial activity against three Gram positive (G (+)) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus feacalis*, *Listeria monocytogenes*) and two Gram negative (G (-)) bacterial strains (*Salmonella enterica, Escherichia coli*). Plant extracts have been prepared using ultrasound bath (2 h, 60 °C, plant material: water ratio = 15:100). The antibacterial activity was quantified using well diffusion and broth microdilution methods by detection of the inhibition zone and minimal inhibitory concentrations (MICs), respectively.
The analyses of antibacterial activities showed better activity of plant extracts against G (+) species and the most effective, with the lowest MIC values (range from 217 to 707 mg GAE/L), were rosemary and oregano, while the weakest antibacterial activity was observed for lemon balm (> 5551.2 mg GAE/L). On contrary, lemon balm and oregano showed larger inhibition zone (30 mm) using well diffusion method against G (+) species. Using both methods all tested plant extracts showed weaker activity, higher MIC values and no or smaller inhibition zone against G (-) bacteria.

Keywords: plant extracts, MIC, inhibition zone, phenolics

Thesis contains: 25pages, 15 figures, 4 tables, 27 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Mladen Miloš, Full Professor
2. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Defence date: 1st October 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad izrađen je u zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu i u Laboratoriju medicinske mikrobiologije i parazitologije, Medicinskog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od veljače do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Od srca hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Danijeli Skroza na svim idejama, savjetima i vremenu koje je pružila prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i cijeloj komisiji što je izdvojila vrijeme i ukazala mi na pogreške.

Veliko hvala mojoj obitelji, mami, tati, braći i sestri na strpljenju, razumijevanju i podršci koju mi je pružila tijekom studiranja, bez njih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene i učinili sve lakšim.

I kao šećer na kraju, hvala Ivanu koji je bio uz mene i pomagao kad se sve činilo nemogućim.

VELIKO HVALA SVIMA!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Ispitati antimikrobnu aktivnost biljnih ekstrakata (lavande, matičnjaka, mravinca i ružmarina) na odabrane patogene uzročnike kvarenja hrane G (+): *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecelis, Listeria monocytogenese* i G (-): *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*.
- Antimikrobnu aktivnost odrediti metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama.
- Na osnovu dobivenih rezultat donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanih biljnih ekstrakata.

SAŽETAK

Patogeni uzročnici kvarenja hrane predstavljaju veliki zdravstveni problem širom svijeta što je posljednjih godina eskaliralo na neviđenu razinu. Prema tome, potražnja za sigurnom i kvalitetnom hranom je sve veća. Korištenje sintetskih konzervansa je često, ali je njihova sigurnost još uvijek upitna, što je potaknulo znanstvenike da traže prirodne konzervanse.

U ovom radu ispitana su antimikrobna svojstava odabranih ljekovitih biljaka protiv najčešćih patogenih uzročnika kvarenja hrane. Istraživane su četiri biljne vrste (lavanda, ružmarin, mravinac i matičnjak) kako bi se odredilo njihovo antibakterijsko djelovanje prema tri Gram pozitivne (G (+)) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus feacalis*, *Listeria monocytogenes*) i dvije Gram negativne (G (-)) bakterijske vrste (*Salmonella enterica, Escherichia coli*). Biljni ekstrakti su pripremljeni korištenjem ultrazvučne kupelji (2 h, 60 °C, biljni materijal: voda = 15: 100). Antibakterijsko djelovanje određeno je korištenjem metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*).

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti pokazali su bolju aktivnost biljnih ekstrakata prema G (+) vrstama i najučinkovitiji ekstrakti, s najnižim MIC vrijednostima (u rasponu od 217 do 707 mg GAE/L) bili su ekstrakti ružmarina i mravinca, dok je najslabiji antimikrobni učinak zapažen kod matičnjaka (> 5551,2 mg GAE/L). Suprotno tome, matičnjak i mravinac pokazali su veću zonu inhibicije (30 mm) prema G (+) vrstama, korištenjem metode difuzije u jažicama. Kod obje metode svi testirani biljni ekstrakti pokazali su slabiju aktivnost, odnosno visoke MIC vrijednosti, te malu ili nikakvu zonu inhibicije prema G (-) bakterijama.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, MIC, zona inhibicije, fenoli

SUMMMARY

Food-borne pathogens are causing major public health problems worldwide what in recent years have escalated to unprecedented levels. Accordingly, demand for safe and high-quality food has increased. The use of synthetic preservatives is well known but still questionable due to their safety, what encouraged scientists to search for natural preservatives.

The present research was conducted in order to study the antimicrobial properties of selected medicinal plants against commonly food borne pathogens. Four plant species (lavender, rosemary, oregano and lemon balm) were investigated to evaluate their antibacterial activity against three Gram positive (G (+)) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus feacalis*, *Listeria monocytogenes*) and two Gram negative (G (-)) bacterial strains (*Salmonella enterica, Escherichia coli*). Plant extracts have been prepared using ultrasound bath (2 h, 60 °C, plant material: water ratio = 15:100). The antibacterial activity was quantified using well diffusion and broth microdilution methods by detection of the inhibition zone and minimal inhibitory concentrations (MICs), respectively.

The analyses of antibacterial activities showed better activity of plant extracts against G (+) species and the most effective, with the lowest MIC values (range from 217 to 707 mg GAE/L), were rosemary and oregano, while the weakest antibacterial activity was observed for lemon balm (> 5551.2 mg GAE/L). On contrary, lemon balm and oregano showed larger inhibition zone (30 mm) using well diffusion method against G (+) species. Using both methods all tested plant extracts showed weaker activity, higher MIC values and no or smaller inhibition zone against G (-) bacteria.

Keywords: plant extracts, MIC, zone inhibition, phenolics

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. Fenoli u biljkama 2
1.1.1. Flavonoidi 2
1.1.2. Fenolne kiseline 3
1.1.3. Stilbeni 4
1.2. Ljekovite biljke 5
1.2.1. Lavanda 5
1.2.2. Matičnjak 6
1.2.3. Mravinac 7
1.2.4. Ružmarin 8
1.3. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata 8
1.4. Patogeni uzročnici u hrani 9
1.4.1. Gram pozitivne (G (+)) bakterije 10
1.4.2. Gram negativne (G (-)) bakterije 11
2. EKSPERIMENTALNI DIO 13
2.1. Materijal 13
2.2. Reagensi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti 13
2.3. Bakterijske kulture 14
2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti 15
2.4.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) 15
2.4.2. Metoda difuzije u jažicama 16
3. REZULTATI I RASPRAVA 18
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) 18
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama 19
4. ZAKLJUČAK 22
5. LITERATURA 23

UVOD

Poznato je da kontaminacija hrane može biti fizička, kemijska ili mikrobiološka. Zbog svog sastava hrana predstavlja pogodan medij za rast mikroorganizama, te je samim time podložna kvarenju. U cilju proizvodnje sigurne hrane, često se uz postojeće metode procesiranja hrane koriste različiti dodaci kako bi se smanjio broj ili u potpunosti eliminirali patogeni mikroorganizmi u hrani.

Iako je primjena aditiva u proizvodnji hrane uobičajena, danas se sve češće postavlja pitanje o sigurnosti primjene pojedinih vrsta aditiva kao i o njihovom djelovanju na ljudsko zdravlje. Upravo iz tog razloga su se razvile brojne studije i znanstvena istraživanja o mogućnosti zamjene pojedinih sintetskih aditiva prirodnim.

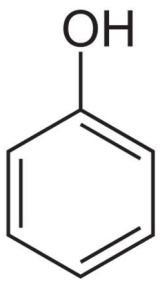
Pri tome, posebna pažnja posvećuje se biljkama kao glavnim izvorima fenolnih spojeva, osobito polifenola kojima su dokazana brojna antioksidacijska svojstva i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Osim antioksidacijskog kapaciteta, ovoj grupi spojeva dokazano je i antimikrobna aktivnost što ih čini još kvalitetnijim izborom kao aditiva jer time mogu imati značajan učinak na očuvanje hrane i produljenje njene trajnosti.

Zbog dokazanih pozitivnih svojstava biljnih ekstrakata, cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost četiri biljna ekstrakta: lavande, matičnjaka, mravinca i ružmarina na najčešće Gram pozitivne i Gram negativne patogene uzročnike kvarenja hrane (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecelis, Listeria monocytogenese, Salmonella enterica* i *Escherichia coli*). Antimikrobni učinak testiranih biljnih ekstrakata određen je primjenom metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije i metodom difuzije u jažicama.

1. OPĆI DIO

1.1. Fenoli u biljkama

Fenolni spojevi predstavljaju najraznovrsnije i najrasprostranjenije sekundarne biljne metabolite, koji u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten, s jednom ili više hidroksilnih skupina (-OH) **(1)**.



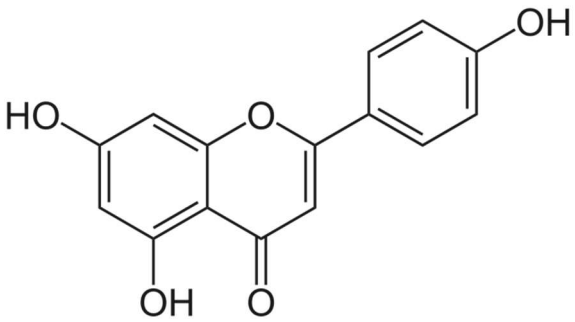
Slika 1. Osnovna kemijska struktura fenola **(2)**

Raznolikost i rasprostranjenost fenola u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije ovih spojeva. Prema kemijskoj strukturi, fenolne spojeve dijelimo na: fenolne kiseline, flavonoide, polifenolne amide i ostale polifenole. Najvažniji izvori fenolnih spojeva su različite vrste pića (čajevi, crno vino, pivo, kava i dr.), čokolada, voće i povrće, ljekovito bilje itd **(1)**.

1.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u grupu polifenola, koji su široko rasprostranjeni u biljnim organizmima. Izolirano ih je preko 4000, a odgovorni su za šarenilo voća, povrća i cvijeća, te imaju ulogu u zaštiti biljaka od UV zračenja, kod pigmentacije, stimulacije fiksacije dušika (apigenin i luteolin služe kao signalne molekule u interakcijama s bakterijama) i zaštite od štetnika **(3)**.

Flavonoidi kao sekundarni metaboliti nemaju direktnog utjecaja na rast i razvoj biljaka, ali mogu inhibirati slobodne radikale pa se smatraju moćnim antioksidansima. Osim antioksidativnog, flavonoidima je dokazano antikancerogeno, antitoksično, te antibakterijsko, djelovanje **(5)**.



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida **(6)**

Obzirom na razlike u osnovnoj strukturi molekule, flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko podskupina pa razlikujemo antocijane, flavone, flavanole i flavanoni **(3)**.

Tablica 1. Glavni predstavnici flavonoida **(3)**

Skupine	**Najčešći predstavnici (izvori)**
Flavoni	Apigenin, luteolin (peršin, timijan, celer)
Flavanoli	Katehini (jabuke, breskve, trešnje, crveno vino, kokos)
Antocijani	Cijanidin, pelargonidin (tamno obojeno voće)
Flavanoni	Hesperitin, naringenin (citrusi, jabuke)

1.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih spojeva koji se mogu naći u različitim vrstama voća, povrća, žitarica i različitim biljkama, te u različitim dijelovima biljaka (korijen, stabljika, lišće, sjemenke). Prema osnovnoj strukturi dijele se na ***derivate hidroksibenzojeve*** **(C_6-C_1)** i ***derivate hidroksicimetne kiseline*** **(C_6-C_3) (7)**.

Osnovna razlika između ove dvije skupine spojeva je u položaju karboksilne grupe u odnosu na aromatsku jezgru, dok se ostale razlike temelje na stupnju hidroksilacije i/ili metoksilacije aromatskog prstena **(7)**.

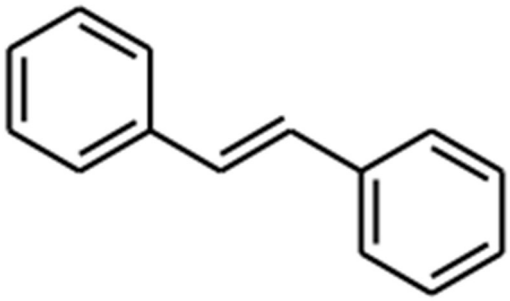
Na fenolne kiseline otpada gotovo 1/3 od ukupnih fenola u prehrambenim proizvodima. Uglavnom se nalaze u obliku glikozida, estera i etera, dok su samo male količine prisutne u slobodnom obliku. Fenolne kiseline imaju utjecaj na boju, miris, nutritivnu vrijednosti i antioksidativne osobine hrane **(4)**.

Tablica 2. Glavni derivati benzojeve i cimetne kiseline **(7)**

	Fenolna kiselina
Derivati benzojeve kiseline	*p*-hidroksibenzojeva
	Protokatehinska
	Vanilinska
	Galna
	Ružmarinska
	Gentisinska
	Siriginska
Derivati cimetne kiseline	*p*-kumarinska
	Kafeinska
	Ferulinska
	Sinapinska

1.1.3. Stilbeni

Stilbene ubrajamo u skupinu neflavonoida, a strukturno ova skupina fenola sadrži dva benzenska prstena međusobno povezana molekulom etanola ili etilena (slika 3). Stilbeni su u biljkama učinkovita obrana od gljivica, ali i to djelovanje im je aktivno i u ljudskom organizmu. Stilbeni također posjeduju snažna antioksidacijska svojstva **(1)**.



Slika 3. Struktura stilbena **(8)**

Najznačajniji stilben je resveratrol kojeg nalazimo u nekim vrstama ljekovitog bilja, grožđu, kikirikiju, soji. i dr. Osim resveratrola u ovu grupu fenola ubrajaju se i derivati kao što su astringin (zastupljen u drvenastim biljkama), izoropotin te piceid **(1)**.

U posljednje vrijeme osim dokazanog jakog antikancerogenog i antioksidativnog učinka resveratrola, istražuje se i njegovo djelovanje na ljudsko zdravlje, ponajviše na kardiovaskularni i imunološki sustav **(1)**.

1.2. Ljekovite biljke

1.2.1. Lavanda

Lavanda (lat. *Lavandula*) pripada rodu biljaka iz porodice Lamiaceae. Autohtona je na području Mediterana i Indije, ali danas se uzgaja u cijelom svijetu te raste pod raznim klimatskim uvjetima. Raste u grmovima visine od 45 do 80 cm, a promjera oko 1 m **(10)**.



Slika 4. Lavanda **(11)**

Od davnina su lavandu stari Grci koristili kao lijek i to za ublažavanje smetnji pri disanju te kao prirodni laksativ. Za vrijeme Prvog i Drugog svjetskog rata lavanda je korištena kao sredstvo protiv bolova i kao zaštita od infekcija. Danas se pak lavanda koristi kod uklanjanja parazita iz crijeva i kod niza drugih poremećaja u crijevnoj flori, djeluje kao analgetik, sedativ i antiseptik. Osim što se koristi u različitim kozmetičkim pripravcima, lavanda se upotrebljava i kao začin i to najčešće ribi i raznim umacima **(10)**.

1.2.2. Matičnjak

Matičnjak (lat. *Melissa*) je vrsta trajnice iz porodice Lamiaceae koja raste u visinu i do 150 cm, a miris joj je jak i podsjeća na limun i metvicu. Ova biljka je autohtona u južnoj Europi i na Mediteranu **(10)**.



Slika 5. Matičnjak **(12)**

Listovi matičnjaka sadrže 4-7% derivata hidroksicimetne kiseline, prije svega ružmarinske kiseline, ali i klorogensku kiselinu, te kafeinsku. Listovi su bogati i eteričnim uljem kojeg ima od 0,05 do 0,3%, a kod uzgojnih vrsta ta količina može biti i do 0,8% **(10)**.

Zbog svojih antibakterijskih, antivirusnih i protuupalni svojstava matičnjak se često koristi kao lijek. Najčešća primjena matičnjaka je u obliku čaja ili se pak koristi njegovo eterično ulje. Pripravci matičnjaka pomažu kod migrena, anksioznosti, probavnih smetnji, a koriste se i kao lijek kod niza infekcija. Slično kao i lavanda, i matičnjak se često koristi kao začin **(10)**.

1.2.3. Mravinac

Mravinac (lat. *Origanum*) je također biljka iz porodice Lamiaceae. Raste u mediteranskom podneblju i može narasti do visine od 60 cm **(9)**.

Ova biljka posjeduje jaka antibakterijska svojstva i pomaže kod tegoba probavnog sustava, infekcije želudca, upale mokraćnog mjehura, kod različitih bakterijskih infekcija. Obični mravinac ima i insekticidni učinak na mrave i moljce. Koristi se u obliku čaja, eteričnog ulja ili sušene biljke, a poznata je i njegova kao začin **(9)**.



Slika 6. Mravinac **(13)**

1.2.4. Ružmarin

Ružmarin (lat. *Rosmarinus*) je grmolika zimzelena biljka iz porodice Lamiaceae. Grm ružmarina obično je visok 1-3 m. Ova biljka potječe sa područja Mediterana, a danas se proširila diljem Europe, a uzgaja se u SAD-u i Meksiku **(9).**

Poznato je da listovi ružmarina i njegovo eterično ulje imaju ljekovito djelovanje. Poznata djelovanja ružmarina su antimikrobno djelovanje i suzbijanje širenja patogenih mikroorganizma u hrani, ublažavanje probavnih tegoba i bolova, poticanje cirkulacije i toka krvi prema mozgu, poboljšavanje koncentracije i liječenje glavobolje, ublažavanje tegoba kod alergije i stresa. Koristimo ga i kao začin u mnogim jelima te za čuvanje namirnica **(9)**.



Slika 7. Ružmarin **(14)**

1.3. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata

Poznato je da niz biljaka i biljnih pripravaka ima značajan antimikrobni učinak za koji su zaslužni polifenoli, sekundarni biljni metaboliti. Osim ovog djelovanja neki od njih pokazuju široki spektar ostalih bioloških učinaka uključujući protuupalna i antikancerogena svojstva **(15)**.

Obzirom da se antimikrobna aktivnost biljaka i biljnih pripravaka pripisuje višestrukim mehanizmima, potencijal bakterija da razviju otpornost na antimikrobne tvari je relativno manji u usporedbi s antibioticima. Antimikrobni učinak biljnih ekstrakata definira se kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), odnosno kao najniža koncentracija ispitivane tvari koja će spriječiti vidljivi rast mikroorganizama **(15)**.

Sekundarni biljni metaboliti mogu utjecati na stanicu mikroorganizma na nekoliko načina: izazivajući poremećaj membranske funkcije i strukture, prekid sinteze i funkcije DNA / RNA, imajući utjecaj na metabolizam, izazivajući indukciju koagulacije citoplazmatskih sastojaka i ometajući normalnu funkciju stanice **(17)**.

1.4. Patogeni uzročnici u hrani

Hrana je bilo koja tvar koju čovjek ili životinja jede ili pije, a biljka apsorbira u cilju održanja života i rasta. Za čovjeka hrana ima važnu ulogu u osiguravanju energije za normalan rad organizma, izgradnji tkiva i organa, te regulaciji aktivnosti organizma (rad srca, održavanje tjelesne temperature, kontrakcija mišića, zgrušavanje krvi...). Glavni sastojci hrane su bjelančevine, ugljikohidrati i masti. Obzirom da hrana sadrži sve nutrijente potrebne za rast mikroorganizama, ona je sama medij podložan kontaminaciji i kvarenju, a najznačajniji uzročnici kvarenja hrane su bakterije i gljivice **(3)**.

Biljke i začini koji sadrže eterična ulja pokazali su se korisnim u borbi s patogenima (*S. aureus, E. coli, L. monocytogenas, B. cereus i Salmonella*) u hrani **(16)**.

Uz veliki broj biljaka, koje pokazuju antimikrobna svojstva, za uklanjanje ili smanjenje patogenih mikroorganizama, koriste se i brojni antimikrobni pripravci biljnog podrijetla dobiveni različitim metodama iz aromatskih i hlapljivih uljnih tekućina iz cvjetova, pupova, sjemenki, lišća, kore, voća i korijena biljaka **(16)**.

Jestive i medicinske biljke te začini kao što su mravinac, ružmarin, bosiljak, đumbir, luk, kurkuma i kadulja se uspješno koriste sami ili u kombinaciji s drugim začinima kao antimikrobne tvari u hrani. Koriste se izravno ili neizravno kako bi se produljio rok trajanja hrane ili kao antimikrobno sredstvo protiv raznih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Njihova učinkovitost ovisi o pH vrijednosti, temperaturi, količini dostupnog kisika, koncentraciji esencijalnih ulja i ostalih aktivnih komponenata **(16)**.

Na osnovi bojanja po Gramu bakterije možemo podijeliti na Gram pozitivne (G (+)) i Gram negativne(G (-)) bakterije. G (+) bakterije pri bojanju daju tamnoplavu boju, i zadržavaju je nakon tretiranja jodom i postupka ispiranja s alkoholom, imaju deblju staničnu stjenku koja se sastoji od peptidoglikana i drugih polimera. Dok su G (-) bakterije bezbojne, ali kasnijim bojenjem s kontrastnom bojom, boje se u crveno, stjenke su im tanje, sadrže lipoproteine i lipopolisaharide i odvojene su od stanice periplazmatskim prostorom **(18)**.

Odabrani patogeni mikroorganizmi u ovom istraživanju su: *E.coli. S.enterica, S.aureus, L.monocytogenes, E.faecalis.*

1.4.1. Gram pozitivne (G (+)) bakterije

Staphylococcus aureus su G (+), fakultativni, anaerobni koki koji su katalitički pozitivni, što je karakteristika koja ih razlikuje od ostalih značajnih G (+) koka kao što su *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Lactococcus*. Nalazi se u sustavu normalne flore dišnih organa i kože, iznimno je patogen i često se dobiva kroz infekciju (zlatni stafilokok) i jako je otporan na antibiotike. Najčešći je kontaminant hrane životinjskog porijekla, a u ljudski organizam može doći preko otvorenih rana ili opekotina. Za čovjeka su najopasniji enterotoksini koja ova bakterija proizvodi, a koji mogu uzrokovati bolest ili čak smrt **(17, 18)**.

Listeria monocytogenes je također fakultativno anaerobna G (+) bakterija. Ona kataliziraa pozitivno, a oksidira negativno. Optimalna temperatura rasta joj je između 30-35 °C. Možemo je izolirati iz silaže ili druge vegetacije, u tlu, kanalizaciji i u svježoj vodi. U hrani ovu bakteriju možemo pronaći u mlijeku i mliječnim proizvodima, mesu i morskim plodovima. Od trovanja uzrokovanim ovom bakterijom najčešće obolijevaju mala djeca, trudnice te starije osobe sa oslabljenim imunitetom **(18)**.

Enterococcus faecalis je fakultativno anaerobna G (+) bakterija kojoj je optimalna temperatura rasta između 10-45 °C. Prenosi se s osobe na osobu zbog loših higijenskih uvjeta. Nalazi se u flori probavnog sustava i sluznice, a ako je nađemo u drugim dijelovima tijela uzrokuje ozbiljne infekcije. U hrani je najčešće prisutna zbog nehigijenskog postupanja s namirnicama **(18)**.

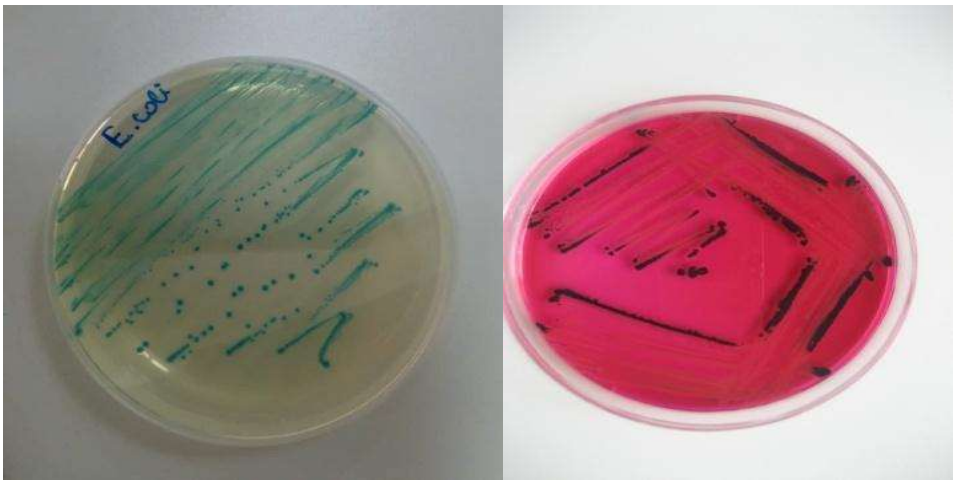


a) **b)** **c)**

Slika 8. Korištene G (+) bakterije na hranjivim podlogama: a) *Staphylococcus aureus* (vlastita fotografija), b) *Enterococcus faecalis* i c) *Listeria monocytogenes* **(20,21)**

1.4.2. Gram negativne (G (-)) bakterije

Salmonella je Gram negativna bakterija koja je fakultativno anaerobna sa optimalnom temperaturom rasta od 37 °C. Nalazi se u gastrointestionalnom sustavu zaraženih ljudi i životinja. Stanice *Salmonelle*su toplinski osjetljive tako da do kontaminacije dolazi uslijed konzumiranja sirove i slabo termički obrađene hrane **(17, 19)**.



a) **b)**

Slika 9. Korištene G(-) bakterije na hranjivim podlogama: a) *Escherichia coli* (vlastita fotografija) i b) *Salmonella* **(22)**

Escherichia coli je, kao i *Salmonella*, G (-) fakultativno anaerobna bakterija. Nalazi se u malim količinama u ljudskom organizmu, dok u većim količinama uzrokuje razvoj bolesti. Najveći je uzročnik kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i voća i povrća **(17, 18)**.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su vodeni ekstrakti biljaka: lavanda *(Lavandula*), matičnjak (*Melissa officinalis)*, mravinac *(Origanum vulgare)*, ružmarin *(Rosmarinus officinalis).*

Biljni ekstrakti pripravljeni su kao dio prethodnog istraživanja na način da se ekstrakcija provodila u ultrazvučnoj kupelji tijekom 2 sata pri temperaturi 60 °C. Omjer biljnog materijala i ekstrakcijskog otapala (destilirana voda) bio je 15:100 (g : mL).

2.2. Reagensi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti

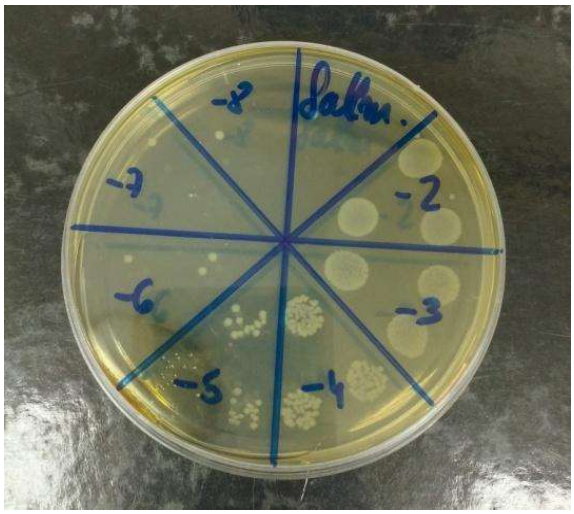
- *Fosfatni pufer (*Phosphate Buffered Saline, *PBS)*: 1 tableta (*Biolife, Italija*) otopi se u 100 mL destilirane vode, nakon čega se otopina sterilizira 10 minuta u autoklavu (121 °C; 1,2 bara).
- *Mueller-Hinton bujon (MHB)*: U staklenu bocu od 1 L izvaže se 10,5 g MHB (*Biolife, Italija*) kojem se doda 500 mL destilirane vode. Sadržaj se dobro promiješa, a zatim se staklenka stavi u mikrovalnu pećnicu tijekom 2 minute kako bi se sadržaj bolje otopio. Pripravljena otopina se potom sterilizira (autoklav, 20 minuta).
- *Mueller-Hinton agar (MHA)*: 19 g MHA (*Biolife, Italija*) otopi se u 500 mL destilirane vode. Otopina se stavi 2 minute u mikrovalnu pećnicu nakon čega se sterilizira (autoklav, 20 minuta). Tekući agar ohlađen na temperaturu oko 44 °C se odmah poslije sterilizacije razlije u sterilne petrijeve posude (otprilike po 15 mL). Nakon hlađenja, petrijeve posude s agarom se do korištenja čuvaju u hladnjaku pri +4 °C.
- *Otopina jodonitrotetrazolium klorida (INT) c=2 mg/mL*: 0,04 g reagensa se otopi u 20 mL sterilne destilirane vode. Pripravljena otopina reagensa se zaštiti folijom od svjetla i do korištenja čuva u hladnjaku pri +4 °C.

2.3. Bakterijske kulture

Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu su: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecelis* 29219, *Listeria monocytogenes* DG 3269, *Salmonella enterica* i *Escherichia coli 25922*. Svi sojevi su ATCC (engl. *American Type Culture Collection*), osim *L. monocytogenes* koja je klinički izolat preuzet iz Kliničkog bolničkog centra Split. Bakterijske kulture su preuzete s dubokog hranjivog agara i uzgojene na krvnom agaru koji sadrži 5% ovčje krvi u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Ovako uzgojeni sojevi čuvani su u hladnjaku pri +4 °C.

Prije početka eksperimenta svaka bakterijska kultura je revitalizirana na način da je ezom prenesena s krvnog agara na hranjivi MHA agar i inkubirana 20-24 h pri 35 °C. Ovako pripravljena kultura koristila se za pripremu inokuluma na način da se ezom prenese bakterijska kolonija u MHB agar i uz pomoć Densitomata namjesti turbiditet suspenzije od 0,5 McFarlenda, što odgovara gustoći od 10^7-10^8 kolonija (engl. *Colony Forming Units*, CFU) po 1 mL. Od ove suspenzije se potom otpipetira 2 mL bakterijske kulture u novu sterilnu posudicu s 38 mL MHB-a. Ovako pripravljen inokulum ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^6-10^7 CFU/mL i koristi se u daljnjim postupcima testiranja antimikrobne aktivnosti.

Za potvrdu kontrole inokuluma koristi se metoda po Kochu, kojom se pripravom serije decimalnih razrijeđena i njihovim nakapavanjem na hranjivi agar broje porasle bakterije nakon inkubacije i tako potvrđuje broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po 1 mL uzorka **(23, 27)**.



Slika 10. Izgled kontrole inokuluma (vlastita fotografija)

2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

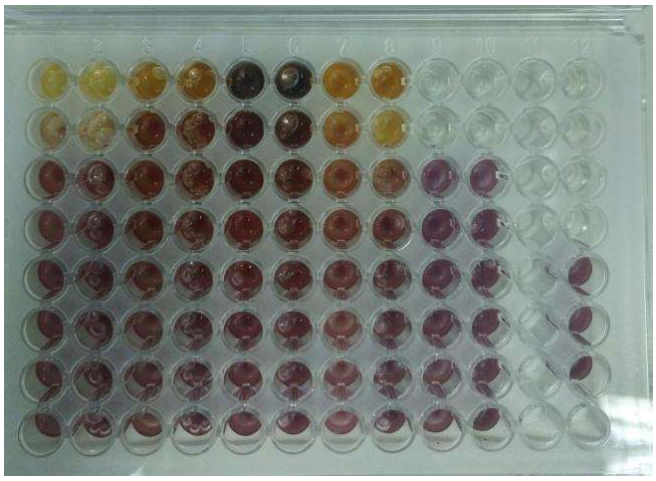
Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata određena je MIC metodom odnosno metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije i metodom difuzije u jažicama.

Otopine, pribor i posuđe korišteno za određivanje antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano. Svi postupci provedeni u ovom radu urađeni su pri sterilnim uvjetima.

2.4.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

MIC vrijednost predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizama. Prilikom izvođenja mikrodilucijske metode koriste se sterilne mikrotitarske pločice s 96 otvora. Testirani uzorci (prethodno odgovarajuće razrijeđeni u MHB) serijski se razrjeđuju u MHB duž mikrotitarske pločice i to tako da se 50 µL uzorka prenese u svaki sljedeći otvor na pločici koji sadrži 50 µL MHB te izmiješa i tako sve do kraja mikrotitarske pločice. Ovakvim načinom razrjeđivanja, početna koncentracija testiranog uzorka se razrijedi duž pločice tako da je svaka sljedeća koncentracija upola niža od prethodne. Konačni volumen u svakom otvoru nakon razrjeđivanja je jednak i iznosi 50 µL.

U svrhu kontrole rezultata na svakoj se pločici pripremi slijepa proba (100 µL MHB), pozitivna kontrola (50 µL MHB + 50 µL bakterijske kulture) i negativne kontrole za svaki uzorak i korišteno otapalo (50 µL MHB + 50 µL razrijeđenog ekstrakta). Nakon toga se u sve otvore mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole, doda po 50 µL ispitivanih kultura bakterija. Po dodatku bakterijskih kultura, suspenzije u pločicama se izmiješaju i nakon 24-satne inkubacije (37 °C) u svaki se otvor mikrotitarske pločice doda po 10 µL indikatora INT te se pločice stave još 30 minuta na inkubaciju (37 °C). Nakon inkubacije vizualno se očitavaju rezultati tako da se promatra pojava crvenog obojenja u otvorima na mikrotitarskoj pločici. MIC vrijednost je ona koncentracija uzorka, tj. ekstrakta, prisutna u prvom nezamućenom otvoru pločice pazeći da pri istim uvjetima pozitivna i negativna kontrola prikazuju odgovarajući rezultat **(23, 25)**.



Slika 11. Izgled mikrotitarske pločice pri određivanju MIC vrijednosti (vlastita fotografija)

2.4.2. Metoda difuzije u jažicama

Cilj ove metode je odrediti inhibiciju rasta bakterija oko jažice (rupice) s određenom koncentracijom ekstrakata. Ova metoda se izvodi u petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj MHA podlozi koja se inokulira bakterijskim kulturama. Nakon sušenja tijekom 2-3 minute, u agaru se buše jažice (rupice) promjera 7-8 mm. Potom se u svaku jažicu dodaje po 50 µL ispitivanog ekstrakta, nakon čega se petrijeve zdjelice stave u hladnjak na 1 h kako bi se omogućilo difuziju aktivnih komponenti ekstrakta u hranjivu podlogu. Potom slijedi inkubacija u trajanju od 20-24 h pri 35 °C, a nakon provedene inkubacije mjerenje zone inhibicije. Ukoliko je zona inhibicije bila ≥ 12 mm smatra se da biljni ekstrakt ima dobar inhibitorni učinak **(25, 26)**.



a) **b)**

Slika 12. Izgled zone inhibicije primjenom metode difuzije u jažicama: a) *S. aureus;* b) *E. coli* (vlastite fotografije)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost biljnih ekstrakata na odabrane patogene uzročnike kvarenja hrane metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije i metodom difuzije u jažicama, te na osnovu dobivenih rezultat donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanih biljnih ekstrakata.

3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Tablica 3. MIC vrijednosti biljnih ekstrakata u mg GAE/L za G (+) bakterije

	S. aureus	***E. faecalis***	***L. monocytogenes***
Lavanda	1858,4	929,2	696,9
Matičnjak	5551,2	> 5551,2	4626,0
Mravinac	707,3	1886,1	1886,1
Ružmarin	2314,1	217,0	578,5

Tablica 4. MIC vrijednosti biljnih ekstrakata u mg GAE/L za G (-) bakterije

	S. enterica	***E. coli***
Lavanda	2787,6	1858,4
Matičnjak	> 5551,2	> 5551,2
Mravinac	2829,2	1886,1
Ružmarin	> 3471,2	3471,2

U tablicama 3 i 4 su prikazane srednje vrijednosti (n=3) rezultata MIC vrijednosti biljnih ekstrakata prema G (+) i G (-) bakterijama iz kojih se može vidjeti da su biljni ekstrakti pokazali bolju antimikrobnu aktivnost prema G (+) bakterijskim vrstama u usporedbi s G (-).

Među testiranim ekstraktima osobito se ističe ekstrakt ružmarina koji je imao najnižu MIC vrijednost prema G (+) bakterijama *E. faecalis* (MIC = 217,0 mg GAE/L) i *L. monocytogenes* (MIC = 578,5 mg GAE/L), dok je najslabiji učinak pokazao ekstrakt matičnjaka prema svim testiranim G (+) i G (-) bakterijama.

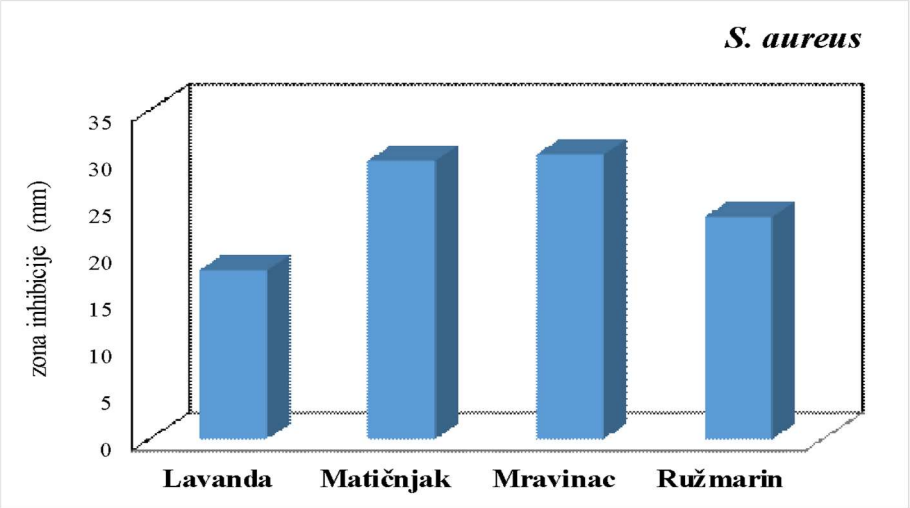
Iako u ovom radu nije određivan udio fenola u biljnim ekstraktima, za usporedbu MIC vrijednosti taj podatak je iznimno važan. Ispitivanjima je utvrđeno da je najveći sadržaj fenola imao ekstrakt matičnjaka (13878 mg GAE/L), potom je slijedio ekstrakt ružmarina (8678 mg GAE/L), mravinac (7073 mg GAE/L) dok je najmanji udio fenola imao ekstrakt lavande (6969 mg GAE/L).

Usporedbom udjela fenola i dobivenih MIC vrijednosti možemo uočiti da biljni ekstrakti s većim sadržajem fenola nisu u pravilu pokazali najbolji antimikrobni učinak. Navedeno potvrđuje ekstrakt matičnjaka koji je prema G (+) i G (-) bakterijskim vrstama pokazao najveće MIC vrijednost, odnosno najslabiju antimikrobnu aktivnost, iako je udio fenola u tom ekstraktu bio najveći. Antimikrobna aktivnost ekstrakta lavande prema testiranim bakterijama bila je jako dobra, osobito prema G (+) gdje su MIC vrijednosti bile u rasponu od 696,9-1858,4 mg GAE/L. Aktivnost ekstrakta lavande osobito se ističe prema G (-) vrstama gdje se pokazao najbolji antimikrobni učinak iako su MIC vrijednosti bile velike (1858,4-2787,6 mg GAE/L). Prema *S. aureus* najbolju aktivnost imao je ekstrakt mravinca, dok je prema ostalim G (+) bakterijama njegov učinak bio nešto slabiji. Kod G (-) bakterija bolji učinak su biljni ekstrakti imali prema *E. coli* u usporedbi s *S. enterica*, a najvišu MIC vrijednost pokazali su ekstrakti ružmarina i matičnjaka.

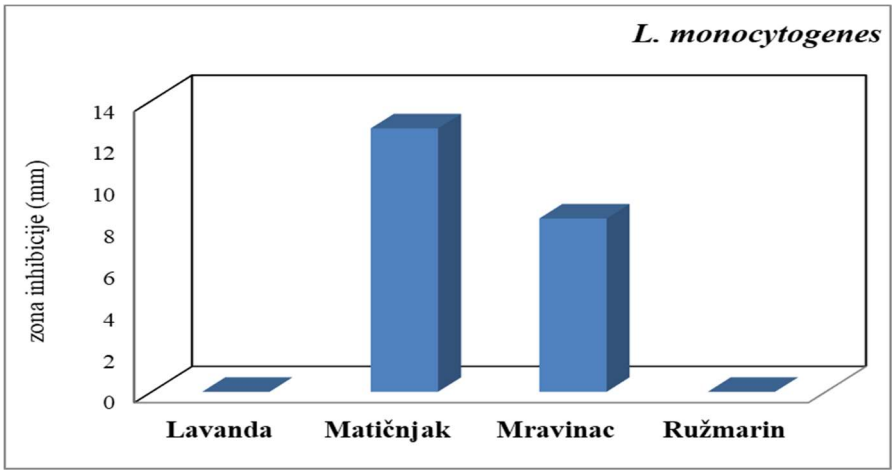
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama

Rezultati antimikrobne aktivnosti određene metodom difuzije u jažicama prikazani su na slikama 13-15. Slično kao i kod MIC metode, bolji antimikrobni učinak pokazuju biljni ekstrakti prema G (+) bakterijskim vrstama u usporedbi s G (-). Zanimljivo je istaknuti da niti jedan testirani biljni ekstrakti nije pokazao zonu inhibicije prema G (+) *E. faecalis* i G (-) *E. coli*. Iako su svi ekstrakti pokazali aktivnost prema *S. aureus*, samo je ekstrakt matičnjaka djelovao na *L. monocytogenes* i *S. enterica*.

Najbolju antimikrobnu aktivnost, odnosno dobar inhibitorni učinak (≥ 12) pokazali su biljni ekstrakti prema bakteriji *S. aureus*. Najveću zonu inhibicije imao je ekstrakt mravinca koji je ujedno bio i najbolji u MIC metodi prema istoj bakteriji (slika 13). Matičnjak koji je imao najviše MIC vrijednosti u ovoj metodi je pokazao iznimno dobru antimikrobnu aktivnost (zona inhibicije = 29,7 mm) prema *S. aureus*, dok je ekstrakt lavande bio najslabiji (zona inhibicije = 18 mm).



Slika 13. Grafički prikaz zona inhibicije (mm) dobivenih metodom difuzije u jažicama za *S. aureus*



Slika 14. Grafički prikaz zona inhibicije (mm) dobivenih metodom difuzije u jažicama za *L. monocytogenes*

Rast bakterije *L. monocytogenes* inhibirali su ekstrakti matičnjaka i mravinca, s tim da se za ekstrakt mravinca ne može reći da pokazuje dobar inhibitorni učinak obzirom da je zona inhibicije bila samo 8,3 mm (slika 14).

Na slici 15 prikazani su rezultati antimikrobne aktivnosti za G (-) bakteriju *S. enterica* iz čega se uočava da je samo matičnjak pokazao zonu inhibicije od 10,3 mm. Ukoliko se usporedi sadržaj fenola u testiranim ekstraktima s antimikrobnim učinkom, može se uočiti da u ovom slučaju sadržaj fenola ima utjecaj na antimikrobni učinak, tj. inhibicijski učinak ekstrakata, ali samo na pojedine bakterije.



Slika 15. Rezultati antimikrobne aktivnosti G (-) bakterije *S. enterica* metodom difuzije u jažicama (vlastita fotografija)

4. ZAKLJUČAK

- Rezultati antimikrobne aktivnosti pokazale su bolju antimikrobnu aktivnost biljnih ekstrakata prema G (+) vrstama u usporedbi s G (-) korištenjem obje metode.

- Najučinkovitiji ekstrakti, s najnižim MIC vrijednostima bili su ružmarin i mravinac, dok je najslabiji antimikrobni učinak zapažen kod matičnjaka.

- Metodom difuzije u jažicama najbolju antimikrobnu aktivnost, odnosno dobar inhibitorni učinak pokazali su biljni ekstrakti prema bakteriji *S. aureus*, a najveću zonu inhibicije imao je ekstrakt mravinca.

- Usporedbom sadržaja fenola u testiranim ekstraktima s antimikrobnim učinkom, ne može se donijeti općeniti zaključak o utjecaju fenola na antimikrobni učinak.

5. LITERATURA

1. Naczk M, Shahidi F. Phenolics in Food and Nutraceuticals. New york*: CRC* Press; 2003.
2. Struktura fenola: https://bs.wikipedia.org/wiki/Fenoli#/media/File:Phenol2.svg (preuzeto: 24.09.2018)
3. Bilušić T. Osnove znanosti o hrani Skripta za predavanja
4. https://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/18/fenolne-kiseline/ (preuzeto: 24.09.2018)
5. http://www.pmf.unsa.ba/hemija/files/Katedra%20za%20organsku%20hemiju%20i%20biohemiju/Predmeti%20KOHBH/I_ciklus/IV_godina/Hemija_prirodnih_produkata/10-_Flavonoidi.pdf (preuzeto: 24.09.2018.)
6. Struktura flavonoida: http://www.wikiwand.com/it/Flavonoidi (preuzeto: 24.09.2018)
7. Bival- Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
8. Stilbeni: https://en.wikipedia.org/wiki/(E)-Stilbene#/media/File:Stilbene_trans_structure.svg8. (preuzeto: 24.09.2018.)
9. Gursky Z. Zlatna knjiga ljekovitog bilja, (preuzeto: 26.09.2018.) https://www.scribd.com/doc/162453770/Zlatna-Knjiga-Ljekovitog-Bilja-1978
10. Ekološka udruga Krka Knin, Priručnik o sakupljanju ljekovitog bilja http://www.eu-krka-knin.hr/files/Prirucnik_ljekovito_bilje.pdf (preuzeto: 26.09.2018.)
11. Lavanda, https://eterika.si/sivka-lavandin.html(preuzeto: 26.09.2018.)
12. Matičnjak,https://www.kupindo.com/Seme/35855335_Melisa-Maticnjak-Limun-trava-200-semena(preuzeto: 26.09.2018.)
13. Mravinac:https://www.google.hr/search?q=mravinac&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjIw6XPg97dAhUF0xoKHSzTBKAQ_AUICigB&biw=1440&bih=827 (preuzeto: 26.09.2018.)
14. Ružmarin:https://www.uppula.hr/pcelarenje/medonosno-bilje/57-ruzmarin (preuzeto: 26.09.2018.)

15. Antimikrobna aktivnost biljnih ulja i drugih biljnih ekstrakata, 2017. – online članak – dostupno online http://www.ba.binmeibio-fr.com/info/antimicrobial-activity-of-plant-oils-22461705.html (preuzeto: 25.09.2018.)
16. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food, Food Control (2010),21, 1199-1218
17. Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action, Current Medicinal Chemistry, 2013, 20, 932-952
18. Campbell-Plat G. Food Science and Technology. A John Wiley & Sons. 2009
19. Marinculić A, Habrun B, Barbić Lj, Beck R. Biološke opasnosti u hrani , Hrvatska agencija za hranu https://www.hah.hr/pdf/Prirucnik_bioloske_opasnosti.pdf (preuzeto: 24.09.2018.)
20. Enterococcus faecalis: (preuzeto: 26.09.2018.) https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1417959903
21. Listeria monocytogenes, https://www.thermofisher.com/blog/food/wp-content/uploads/sites/5/2016/10/tfs-listeria-small.jpg (preuzeto: 26.09.2018.)
22. Salmonella, preuzeto s: Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; 2015.
23. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; 2015.
24. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods. 2010; 81: 121-126.
25. Balouir M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. A review in Journal of Pharmaceutical. 2015; 6: 71-79.
26. Koohsari H, Ghaemi EA, Shesh Poli MS, SadeghA. Evaluation of antibacterial activity of *Lemon verbena* (*Lippiacitriodora*) leaves. Annals of Biological Research, 2013, 4 (10):52-55

27. Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramovič H, Miloš M, Ljubenkov I, Piskernik S, Pezo I, Terpinc P, Boban M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia. Food Chemistry. 2010; 119: 715-723.