

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Suzana L. Vidaković Knežević

UTICAJ ETARSKIH ULJA NA ODABRANE
PATOGENE BAKTERIJE IZOLOVANE U
PROCESU PROIZVODNJE MESA

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Suzana L. Vidaković Knežević

EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON SELECTED
PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM
MEAT PROCESSING

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI

Dr **Nedeljko Karabasil**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Sunčica Kocić-Tanackov**, docent,
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr **Radoslava Savić Radovanović**, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Dubravka Milanov**, naučni savetnik,
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“

Dr **Jasna Kureljušić**, naučni saradnik,
Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija „*Uticaj etarskih ulja na odabrane patogene bakterije izolovane u procesu proizvodnje mesa*“ rezultat je istraživanja finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekata „*Istraživanje farmakoloških karakteristika antimikrobnih agenasa, uvođenje novih tehnoloških rešenja i alternativnih metoda profilakse s ciljem da se poboljša kontrola infektivnih oboljenja životinja*“, TR 31071, kojim je rukovodila dr Dubravka Milanov i „*Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje novih biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih i zoonoznih agenasa – analiza rizika za zdravlje ljudi, domaćih i divljih životinja i kontaminaciju životne sredine*“, TR 31084, kojim je rukovodio dr Tamaš Petrović, kao i Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u 2020. godini (broj 451-03-68/2020-14/200031 od 24.01.2020. godine) i 2021. godini (broj 451-03-9/2021-14/200031 od 05.02.2021. godine).

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem mentorima, prof. dr Neđeljku Karabasilu i doc. dr Sunčici Kocić-Tanackov, koji su me, kroz planiranje i izradu ove doktorske disertacije, uveli u različite niše čarobnog sveta bakterija. Neizmerno im zahvaljujem na svakom ispraćenom koraku do cilja, toplim rečima i korisnim savetima.

Članovima komisije, prof. dr Radoslavi Savić Radovanović, dr Dubravki Milanov i dr Jasni Kureljušić, zahvaljujem na svim sugestijama i pozitivnoj energiji. Posebno se zahvaljujem dr Dubravki Milanov na velikodušnoj pomoći prilikom koraćanja kroz gradove biofilma.

Kompanijama Terra co d.o.o. iz Novog Sada i Industriji mesa „Đurđević“ iz Subotića, koje su bezuslovno obezbedile etarska ulja i usitnjeno meso svinja, dugujem veliko hvala.

Bezuslovno se zahvaljujem prof. dr Snežani Kravić sa Tehnološkog fakulteta Novi Sad (Novi Sad), dipl. biol. Milošu Bokorovu sa Prirodno-matematičkog fakulteta (Novi Sad), dr sci. vet. med. Marku Dmitriću iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ (Kraljevo), kolegama senzorskog panela iz Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“, dr sci. vet. med. Jeleni Vranešević i dr vet. Slobodanu Kneževiću koji su velikodušno pridoneli eksperimentalnim delovima ove doktorske disertacije.

Porodici i suprugu Slobodanu zahvaljujem za beskrajno razumevanje, podršci i ljubavi.

Stranice ove doktorske disertacije posvećujem baki Dragici.

UTICAJ ETARSKIH ULJA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE IZOLOVANE U PROCESU PROIZVODNJE MESA

Sažetak:

Hranom prenosive bolesti, prouzrokovane bakterijama *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*, predstavljaju veliki problem za javno zdravlje širom sveta. U ovoj doktorskoj disertaciji izabrani izolati bakterija prenosivih hranom, izolovani u procesu proizvodnje mesa, potvrđeni su MALDI-TOF masenom spektrometrijom, dok je sastav 18 etarskih ulja utvrđen upotrebom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Utvrđeno je antibakterijsko dejstvo 18 etarskih ulja i njihove minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije protiv 16 izolata patogenih bakterija prenosivih hranom. Svi ispitivani izolati formirali su biofilmove na polistirenskim i površinama od nerđajućeg čelika, koje se često nalaze u pogonima industrije mesa. Dokazano je da stepen formiranja biofilmove zavisi od dostupnosti hranljivih materija i temperature. Primenom odabranih etarskih ulja na formirane biofilmove uočena je redukcija istih za 30,93% do 90,28%. Upotrebom SEM zapažaju se mikromorfološke promene na izolatima bakterija tretiranih etarskim uljima origana i timijana u vidu narušenog integriteta ćelija i lize. Etarska ulja origana i timijana u koncentracijama MIC i 2MIC na modelu usitnjenog mesa svinja znatno ($p < 0,05$) su redukovala broj *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* tokom skladištenja. Međutim, delovanje ovih etarskih ulja nije zapaženo protiv *S. Typhimurium*. Etarska ulja origana i timijana povoljno su uticala i na senzorska svojstva usitnjenog mesa svinja u vidu duže prihvatljivosti boje i manjeg intenziteta mirisa koji ukazuje na kvar tokom skladištenja na temperaturi od 4 ± 1 °C u aerobnim uslovima. Dobijeni rezultati ukazuju da odabrana etarska ulja mogu efektivno da se koriste u industriji mesa kao prirodna alternativa sintetskim aditivima i dezinfekcionim sredstvima.

Ključne reči: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, etarska ulja, antibakterijska aktivnost, biofilm, usitnjeno meso svinja, mikrobiološki status, senzorska svojstva

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Bezbednost hrane

UDK broj: 636.09:637.5:582.23

EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON SELECTED PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM MEAT PROCESSING

Abstract:

Foodborne illnesses, caused by *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*, are a major public health problem worldwide. In this doctoral dissertation, the selected foodborne pathogens isolated from meat processing, were confirmed by MALDI-TOF MS, while the composition of 18 essential oils was determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity of 18 essential oils was evaluated against 16 bacterial strains, followed by determination of minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations. All of the isolates formed biofilm on two common surfaces found in the meat industry, polystyrene and stainless steel. Formation of biofilm was found to be dependent on the availability of nutrients and the temperature. After treatment with selected essential oils, the reduction in biofilm biomass was in the range between 30.93% and 90.28%. Micromorphological changes on the isolates of the bacteria treated by oregano and thyme essential oils were observed in the form of impaired cell integrity and cell lyses using SEM. Oregano and thyme essential oils (MIC and 2MIC) significantly ($p < 0.05$) reduced the population of *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, and *Y. enterocolitica* in minced pork meat during the storage. On the other hand, the effect of oregano and thyme essential oils was not observed against *S. Typhimurium* in same conditions. Sensory evaluation of oregano and thyme essential oils on minced pork as a food model was conducted and panelist considered that they improved sensory properties, such as color and off-odor, during storage at 4 ± 1 °C under aerobic conditions. The obtained results indicate that the selected essential oils can be effectively used in the meat industry as a natural alternative to synthetic additives and disinfectants.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, essential oils, antibacterial activity, biofilm, minced pork, microbiological status, sensory properties

Scientific field: Veterinary Medicine

Scientific subfield: Food Safety

UDK number: 636.09:637.5:582.23

SPISAK TABELA

1. **Tabela 2.1.** Prikaz podataka epidemija izazvanih kontaminiranim mesom i/ili proizvodima od mesa na području Evropske unije tokom 2019. godine (EFSA i ECDC, 2021).
2. **Tabela 2.2.** Glavne komponente odabranih etarskih ulja i njihova zastupljenost (Jayasena i Jo, 2013).
3. **Tabela 4.1.** Prikaz odabranih izolata patogenih bakterija i njihovo poreklo.
4. **Tabela 4.2.** Prikaz kriterijuma za klasifikaciju ispitanih izolata kao biofilm producera (Stepanović i sar., 2007).
5. **Tabela 4.3.** Prikaz grupa uzoraka formiranih za mikrobiološka ispitivanja.
6. **Tabela 4.4.** Prikaz grupa uzoraka formiranih za senzorska ispitivanja.
7. **Tabela 4.5.** Prikaz parametara senzorskih osobina, njihov opis i bodovanje.
8. **Tabela 5.1.** Rezultati MALDI-TOF masene spektrometrije.
9. **Tabela 5.2.** Prikaz rezultata ispitanih izolata *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium primenom *real-time* PCR metode.
10. **Tabela 5.3.** Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja bosiljka (*Ocimum basilicum*) (EO1), crnog bibera (*Piper nigrum*) (EO2), tajlandskog đumbira (*Zingiber cassumunar*) (EO3), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum nees*) (EO4), limuna (*Citrus limonum*) (EO5) i karanfilića (*Syzygium aromaticum* L.) (EO6).
11. **Tabela 5.4.** Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja fenela (*Foeniculum vulgare*) (EO7), lavande (*Lavandula angustifolia*) (EO8), mirte (*Myrtus communis*) (EO9), origana (*Origanum vulgare*) (EO10), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) (EO11) i smilja (*Helichrysum italicum*) (EO12).
12. **Tabela 5.5.** Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja timijana (*Thymus vulgaris*) (EO13), žalfije (*Salvia officinalis*) (EO14), hajdučke trave (*Achillea millefolium*) (EO15), anđelike (*Angelica archangelica*) (EO16), vreska (*Satureja montana*) (EO17) i miloduha (*Hyssopus officinalis*) (EO18).
13. **Tabela 5.6.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* Enteritidis na etarska ulja primenom disk difuzione metode.
14. **Tabela 5.7.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* Typhimurium na etarska ulja primenom disk difuzione metode.
15. **Tabela 5.8.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Listeria monocytogenes* na etarska ulja (5 µl) primenom disk difuzione metode.
16. **Tabela 5.9.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Listeria monocytogenes* na etarska ulja (10 µl) primenom disk difuzione metode.
17. **Tabela 5.10.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Yersinia enterocolitica* na etarska ulja primenom disk difuzione metode.
18. **Table 5.11.** Sposobnost formiranja biofilmova testiranih izolata patogenih bakterija na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 37 ± 1 °C.
19. **Table 5.12.** Sposobnost formiranja biofilmova testiranih izolata patogenih bakterija prenosivih hranom na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 15 ± 1 °C.
20. **Table 5.13.** Sposobnost formiranja biofilmova testiranih izolata patogenih bakterija prenosivih hranom na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 5 ± 1 °C.
21. **Tabela 5.14.** Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Salmonella* Enteritidis.
22. **Tabela 5.15.** Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Salmonella* Typhimurium.
23. **Tabela 5.16.** Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Listeria monocytogenes*.
24. **Tabela 5.17.** Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Yersinia enterocolitica*.

25. **Tabela 5.18.** Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Salmonella* Enteritidis.
26. **Tabela 5.19.** Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Salmonella* Typhimurium.
27. **Tabela 5.20.** Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Listeria monocytogenes*.
28. **Tabela 5.21.** Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Yersinia enterocolitica*.
29. **Tabela 5.22.** Rezultati mikrobioloških ispitivanja usitnjenog mesa svinja namenjenog za ogled.
30. **Tabela 5.23.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella* Enteritidis SE53 i skladištenog na 4 ± 1 °C.
31. **Tabela 5.24.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.
32. **Tabela 5.25.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.
33. **Tabela 5.26.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella* Typhimurium ST35 i skladištenog na 4 ± 1 °C.
34. **Tabela 5.27.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.
35. **Tabela 5.28.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.
36. **Tabela 5.29.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Salmonella* Typhimurium između grupa ogleda.
37. **Tabela 5.30.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Listeria monocytogenes* UB2-01-2 (1) i skladištenog na 4 ± 1 °C.
38. **Tabela 5.31.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.
39. **Tabela 5.32.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.
40. **Tabela 5.33.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Yersinia enterocolitica* Y4/1 i skladištenog na 4 ± 1 °C.
41. **Tabela 5.34.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.
42. **Tabela 5.35.** Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.
43. **Tabela 5.36.** Uticaj etarskih ulja origana (EOO) i timijana (EOT) na intenzitet mirisa koji ukazuje na kvar* usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.
44. **Tabela 5.37.** Uticaj etarskih ulja origana (EOO) i timijana (EOT) na diskoloraciju* usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.
45. **Tabela 5.38.** Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Salmonella* Enteritidis u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.
46. **Tabela 5.39.** Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Salmonella* Typhimurium u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.
47. **Tabela 5.40.** Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Listeria monocytogenes* u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.
48. **Tabela 5.41.** Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Yersinia enterocolitica* u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.

SPISAK SLIKA

1. **Slika 2.1.** Prikaz procesa formiranja biofilma (Yin i sar., 2019).
2. **Slika 2.2.** Prikaz razlika u građi ćelijskih omotača Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija (Liu i sar., 2015).
3. **Slika 2.3.** Mehanizmi delovanja etarskih ulja i njihova ciljana mesta na bakterijskoj ćeliji (Rao i sar., 2019).
4. **Slika 4.1.** Nanošenje suspenzije inokulata na Mueller Hinton agar (A). Nanošenje papirnog filter diska na Mueller Hinton agar (B).
5. **Slika 4.2.** Nanošenje etarskog ulja na papirni filter disk (A). Merenje zone inhibicije (B).
6. **Slika 4.3.** Prikaz mikrotitar ploče nakon inkubacije.
7. **Slika 4.4.** Prikaz minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije etarskog ulja karanfilića za izolat *Salmonella* Enteritidis SE53.
8. **Slika 4.5.** Prikaz mikrotitar ploče u fazi rastvaranja kristal violet boje.
9. **Slika 4.6.** Prikaz kupona nerđajućeg čelika inokulisane suspenzijom izolata *Salmonella* Typhimurium ST28 u količini od 100 µl.
10. **Slika 4.7.** Prikaz kupona nerđajućeg čelika u Luria Bertani bujonu nakon inkubacije (levo – sa inokulisanim izolatom *Salmonella* Typhimurium ST28; desno – samo Luria Bertani bujon).
11. **Slika 4.8.** Kuponi nerđajućeg čelika napareni zlatom.
12. **Slika 4.9.** Usitnjeno meso svinja spremno za veštačku kontaminaciju ciljanim mikroorganizmima.
13. **Slika 5.1.** Prikaz različitih dijametara zone inhibicije: antibakterijska aktivnost EO lavande (5 µl/disk) prema izolatu *Salmonella* Enteritidis SE53 (ZI < 6 mm) (neosetljiv (-)) (A); antibakterijska aktivnost EO tajlandskog đumbira (5 µl/disk) prema izolatu *Salmonella* Typhimurium ST28 (ZI = 11,67 ± 1,15 mm) (osetljiv (+)) (B).
14. **Slika 5.2.** Prikaz različitih dijametara zone inhibicije: antibakterijska aktivnost EO karanfilića (10 µl/disk) prema izolatu *Salmonella* Typhimurium ST35 (ZI = 17,00 ± 0,00 mm) (veoma osetljiv (++)) (A); antibakterijska aktivnost EO timijana (10 µl/disk) prema izolatu *Salmonella* Enteritidis SE144 (ZI = 50,67 ± 2,08 mm) (izuzetno osetljiv (+++)) (B).
15. **Slika 5.3.** Skening elektronski mikrografi biofilmova izolata *Salmonella* Enteritidis (SE144) (A) i *Salmonella* Typhimurium (ST28) (B) na površini nerđajućeg čelika nakon 24 h inkubacije u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 37 ± 1 °C. Skala = 5 µm, uveličanje = 5000.
16. **Slika 5.4.** Skening elektronski mikrografi biofilmova izolata *Listeria monocytogenes* (UB2-01-2 (1)) (A) i *Yersinia enterocolitica* (Y9) (B) na površini nerđajućeg čelika nakon 24 h inkubacije u tripton soja bujonu na temperaturi od 37 ± 1 °C. Skala = 1 µm, uveličanje = 10 000.
17. **Slika 5.5.** Skening elektronski mikrografi ćelija *Salmonella* Enteritidis (SE144): (A) kontrola (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000).
18. **Slika 5.6.** Skening elektronski mikrografi ćelija *Salmonella* Typhimurium (ST28): (A) kontrola (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000).
19. **Slika 5.7.** Skening elektronski mikrografi ćelija *Listeria monocytogenes* (UB2-01-2 (1)): (A) kontrola (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 µm, uveličanje = 20 000).

20. **Slika 5.8.** Skening elektronski mikrografi ćelija *Yersinia enterocolitica* (Y9): (A) kontrola (skala = 1 μ m, uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 μ m, uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 0,5 μ m, uveličanje = 30 000).
21. **Slika 9.1.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE53.
22. **Slika 9.2.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE56.
23. **Slika 9.3.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE132.
24. **Slika 9.4.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE144.
25. **Slika 9.5.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST28.
26. **Slika 9.6.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST35.
27. **Slika 9.7.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST48.
28. **Slika 9.8.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST49.
29. **Slika 9.9.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L1.
30. **Slika 9.10.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* UB2-02-4 (L5).
31. **Slika 9.11.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L17.
32. **Slika 9.12.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L18.
33. **Slika 9.13.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* UB2-01-2 (1).
34. **Slika 9.14.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y4/1.
35. **Slika 9.15.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y9.
36. **Slika 9.16.** Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y14.
37. **Slika 9.17.** Hromatogram etarskog ulja bosiljka.
38. **Slika 9.18.** Hromatogram etarskog ulja crnog bibera.
39. **Slika 9.19.** Hromatogram etarskog ulja tajlandskog đumbira.
40. **Slika 9.20.** Hromatogram etarskog ulja cimeta.
41. **Slika 9.21.** Hromatogram etarskog ulja limuna.
42. **Slika 9.22.** Hromatogram etarskog ulja karanfilića.
43. **Slika 9.23.** Hromatogram etarskog ulja fenela.
44. **Slika 9.24.** Hromatogram etarskog ulja lavande.
45. **Slika 9.25.** Hromatogram etarskog ulja mirte.
46. **Slika 9.26.** Hromatogram etarskog ulja origana.
47. **Slika 9.27.** Hromatogram etarskog ulja ruzmarina.
48. **Slika 9.28.** Hromatogram etarskog ulja smilja.
49. **Slika 9.29.** Hromatogram etarskog ulja timijana.
50. **Slika 9.30.** Hromatogram etarskog ulja žalfije.
51. **Slika 9.31.** Hromatogram etarskog ulja hajdučke trave.
52. **Slika 9.32.** Hromatogram etarskog ulja anđelike.

53. **Slika 9.33.** Hromatogram etarskog ulja vreska.

54. **Slika 9.34.** Hromatogram etarskog ulja miloduha.

SPISAK GRAFIKONA

1. **Grafikon 5.1.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) deset izabranih etarskih ulja na izolate *Salmonella* Enteritidis.
2. **Grafikon 5.2.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) deset izabranih etarskih ulja na izolate *Salmonella* Typhimurium.
3. **Grafikon 5.3.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) 11 izabranih etarskih ulja na izolate *Listeria monocytogenes*.
4. **Grafikon 5.4.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) šest izabranih etarskih ulja na izolate *Listeria monocytogenes*.
5. **Grafikon 5.5.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) osam izabranih etarskih ulja na izolate *Yersinia enterocolitica*.
6. **Grafikon 5.6.** Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) šest izabranih etarskih ulja na izolate *Yersinia enterocolitica*.
7. **Grafikon 5.7.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na intenzitet mirisa koji ukazuje na kvar usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.
8. **Grafikon 5.8.** Uticaj etarskih ulja origana i timijana na diskoloraciju usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.
9. **Grafikon 5.9.** Prikaz krive *Salmonella* Enteritidis (log CFU/g) u vremenu (h) u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,04 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,08 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz oglada; (–) Baranyi i Robertov model.
10. **Grafikon 5.10.** Prikaz krive *Salmonella* Typhimurium (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,09 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,18 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz oglada; (–) Baranyi i Robertov model.
11. **Grafikon 5.11.** Prikaz krive *Listeria monocytogenes* (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,18 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,36 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,36 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,72 µl/g); (•) vrednosti iz oglada; (–) Baranyi i Robertov model.
12. **Grafikon 5.12.** Prikaz krive *Yersinia enterocolitica* (log CFU/g) u vremenu (h) u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,09 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,18 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz oglada; (–) Baranyi i Robertov model.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. BOLESTI PRENOSIVE HRANOM	3
2.2. <i>SALMONELLA</i> SPP. KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM.....	5
2.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM...	6
2.4. <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM....	7
2.5. FORMIRANJE BIOFILMOVA I NJIHOV ZNAČAJ U INDUSTRIJI MESA.....	8
2.6. ETARSKA ULJA	9
2.7. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA.....	11
2.8. MEHANIZMI DELOVANJA ETARSKIH ULJA NA BAKTERIJE	12
2.9. PRIMENA ETARSKIH ULJA U INDUSTRIJI MESA.....	14
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	16
4. MATERIJALI I METODE	17
4.1. MATERIJALI	17
4.1.1. Izolati patogenih bakterija prenosivih hranom.....	17
4.1.2. Etarska ulja.....	18
4.1.3. Meso.....	18
4.2. METODE	19
4.2.1. Potvrđivanje izolata <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Yersinia enterocolitica</i>	19
4.2.2. Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja	20
4.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja na izolate <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Yersinia enterocolitica</i> primenom disk difuzione metode.....	20
4.2.4. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih baktericidnih koncentracija etarskih ulja primenom mikrodilucione metode.....	21
4.2.5. Utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma ispitivanih vrsta bakterija.....	23
4.2.6. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirane biofilmove izolata <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Yersinia enterocolitica</i>	25
4.2.7. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na mikromorfološke promene izolata bakterija	26

4.2.8. Primena odabranih etarskih ulja na modelu usitnjenog mesa svinja kontaminiranog odabranim izolatima bakterija.....	26
4.2.9. Primena DMFit programa u cilju izrade Baranyi i Robertovog modela.....	30
4.2.10. Statistička obrada dobijenih rezultata i njihova uporedna analiza.....	30
5. REZULTATI.....	31
5.1. POTVRDA IZABRANIH IZOLATA <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS, <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM, <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> I <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	31
5.1.1. Potvrda izabranih izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom.....	31
5.1.2. Potvrda izolata <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>Salmonella</i> Typhimurium metodom <i>real-time</i> PCR.....	32
5.2. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA	33
5.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA.....	45
5.4. MINIMALNE INHIBITORNE I MINIMALNE BAKTERICIDNE KONCENTRACIJE ETARSKIH ULJA	58
5.5. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA	65
5.5.1. Formiranje biofilmova na polistirenskim mikrotitar pločama	65
5.5.2. Formiranje biofilmova na nerđajućem čeliku	70
5.6. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA FORMIRANE BIOFILMOVE	71
5.7. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA MIKROMORFOLOŠKE PROMENE IZOLATA BAKTERIJA.....	74
5.8. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA MIKROBIOLOŠKI STATUS USITNJENOG MESA SVINJA.....	76
5.8.1. Mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja	76
5.8.2. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa <i>Salmonella</i> Enteritidis SE53	76
5.8.3. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa <i>Salmonella</i> Typhimurium ST35.....	80
5.8.4. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa <i>Listeria monocytogenes</i> UB2-01-2 (1).....	85
5.8.5. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa <i>Yersinia enterocolitica</i> Y4/1	88
5.9. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA SENZORSKA SVOJSTVA USITNJENOG MESA SVINJA.....	92

5.10. BARANYI I ROBERTOVI MODELI RASTA PATOGENIH BAKTERIJA PRENOSIVIH HRANOM.....	97
5.10.1. Baranyi i Robertov model rasta <i>Salmonella</i> Enteritidis u usitnjenom mesu svinja	97
5.10.2. Baranyi i Robertov model rasta <i>Salmonella</i> Typhimurium u usitnjenom mesu svinja .	99
5.10.3. Baranyi i Robertov model rasta <i>Listeria monocytogenes</i> u usitnjenom mesu svinja...	102
5.10.4. Baranyi i Robertov model rasta <i>Yersinia enterocolitica</i> u usitnjenom mesu svinja	104
6. DISKUSIJA	107
7. ZAKLJUČCI.....	127
8. LITERATURA.....	129
9. PRILOZI	153
PRILOG A. SPEKTRI MALDI-TOF MASENE SPEKTROMETRIJE ISPITANIH IZOLATA	153
PRILOG B. HROMATOGRAMI ETARSKIH ULJA	161

1. UVOD

Uzročnici vodećih bolesti prenosivih hranom, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*, su prema izveštajima Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority*) i Evropskog centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease Prevention and Control*) od velikog zdravstvenog i socio-ekonomskog značaja na globalnom nivou. Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*) procenjuje pojavu preko 600 miliona slučajeva hranom prenosivih bolesti godišnje na globalnom nivou od kojih se 420 000 završi smrtnim ishodom. Ukupno 30% smrtnih slučajeva javlja se kod dece mlađe od pet godina.

Savremena industrija mesa, uprkos napretku koji je ostvarila na polju bezbednosti hrane i higijene procesa proizvodnje, kroz primenu dobre proizvođačke, dobre higijenske prakse, HACCP (eng. *Hazard Analysis Critical Control Points*) i drugih sistema bezbednosti hrane, i dalje se suočava sa problemom kontrole hranom prenosivih patogenih bakterija, kao što su *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*. Ove, hranom prenosiive patogene bakterije, pored toga što su odgovorne za veliki broj hospitalizovanih ljudi širom sveta, utiču i na smanjenje roka trajanja mesa i proizvoda od mesa. Produženje roka trajanja, između ostalog, se postiže i upotrebom aditiva. Uprkos dokazanim efektima redukcije mikroorganizama, česta upotreba aditiva dovodi do akumulacije štetnih rezidua u lancu hrane, a samim tim i do štetnih efekata na zdravlje ljudi. Zabrinutost potrošača o negativnim efektima hemijskih aditiva i soli na zdravlje, pored rezistencije na antimikrobne lekove, nameće potrebu za iznalaženje novih preparata sa antimikrobnim delovanjem.

Pored toga, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* su sposobne da formiraju biofilmove na površinama opreme u pogonima industrije mesa, čime predstavljaju stalan izvor kontaminacije, koja može nastupiti u svim fazama proizvodnje (tokom klanja, obrade trupova, prerade, skladištenja i distribucije mesa i proizvoda od mesa). Primena standardnih operativnih procedura čišćenja i dezinfekcije često nije dovoljno efikasna u borbi protiv biofilmova.

Upotreba biljaka kao začina datira iz davnina. Još je u preantičkom i antičkom periodu primećeno da dodavanje određenih biljaka hrani, pored toga što poboljšava njen ukus i miris, sprečava njeno kvarenje i produžava joj rok trajanja. Poslednjih godina se za redukciju broja patogenih, hranom prenosivih mikroorganizama, kao i bakterija koje izazivaju kvarenje namirnica, koriste etarska ulja kao nova, alternativna jedinjenja. Etarska ulja predstavljaju kompleksne mešavine, često na stotine individualnih komponenti biljaka. Hemijski sastav etarskih ulja utiče na njihove antimikrobne osobine i varira u zavisnosti od geografskog porekla biljke, sastava zemljišta, faza razvoja i delova biljaka.

Antibakterijsko dejstvo etarskih ulja zasniva se na više različitih mehanizama delovanja na ćelije bakterija. Njihova potencijalna aplikacija u meso i proizvode od mesa, u cilju stvaranja bezbednijeg

i dugotrajnijeg proizvoda, kao i smanjenja incidencije novih oboljenja izazvanih patogenim bakterijama prenosivih hranom poslednjih decenija je predmet istraživanja.

Potencijal upotrebe komercijalno dostupnih etarskih ulja u industriji mesa proučavan je kroz eksperimentalni deo ove doktorske disertacije, čime je postignut doprinos dosadašnjim saznanjima na poljima antibakterijske aktivnosti etarskih ulja, delovanja etarskih ulja na biofilmove i bakterijske ćelije, kao i njihov efekat na mikrobiološki i senzorski status usitnjenog mesa svinja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. BOLESTI PRENOSIVE HRANOM

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. *World Health Organization* – WHO) bolesti prenosive hranom obuhvataju širok spektar različitih oboljenja, kao rezultat ingestije hrane kontaminirane mikroorganizmima ili hemijskim reziduama. Do kontaminacije hrane može doći u bilo kojoj fazi procesa proizvodnje, od „farme do trpeze“ (WHO, 2015).

Bolesti prenosive hranom predstavljaju veliku brigu za javno zdravlje širom sveta doprinoseći zdravstvenom i socio-ekonomskom opterećenju, razvijenih i manje razvijenih zemalja, kroz troškove nadzora, prevencije i lečenja. Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da je na globalnom nivou 420 000 smrtnih slučajeva posledica bolesti prenosivih hranom. Ipak, pun obim i teret nebezbedne hrane još uvek nije u potpunosti istražen (WHO, 2015).

Epidemiološki podaci o bolestima prenosivim hranom često ostaju oskudni, posebno u zemljama u razvoju. Pojave ovih bolesti neretko ostaju neprijavljene ili nedovoljno istražene (WHO, 2015), naročito kod individualnih slučajeva (Gould i sar., 2013) kada su jedini simptomi gastrointestinalnog karaktera (dijareja i povraćanje) (Riley, 2020). Dodatno, hranom prenosivi patogeni mikroorganizmi mogu da izazovu ekstraintestinalne infekcije, koje kao takve ostaju nezabeležene kao bolesti prenosive hranom. Ekstraintestinalne infekcije, poput infekcije krvotoka, meningitis i infekcije drugih organa, izazvane *Salmonella* spp. pojavljuju se kod nešto manje od 5% ne-tifoidnih salmoneloza u razvijenim zemljama. Meningitis uzrokovan *Listeria monocytogenes* i postinfektivni reaktivni artritis čiji je uzročnik *Yersinia enterocolitica* takođe spadaju u ekstraintestinalne infekcije (Riley, 2020). Izveštaj Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority* – EFSA) i Evropskog centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease Prevention and Control* – ECDC) ističe kampilobakteriozu, salmonelozu, listeriozu i jersiniozu kao vodeće bolesti čiji se uzročnici prenose hranom (EFSA i ECDC, 2019).

Na području Evropske unije (EU), tokom 2019. godine, prijavljeno je 5 175 epidemija bolesti prenosive hranom, odnosno 49 463 slučajeva, od kojih je 3 859 hospitalizovano, a 60 završilo smrtnim ishodom. Uzročnik je identifikovan u 3 101 (59,9%) epidemiji, odnosno u 35 969 (72,7%) slučajeva od kojih je 3 290 (85,3%) hospitalizovano, a 54 (90,0%) završilo smrtnim ishodom. Bakterije su bile uzročnik 1 364 (26,4%) epidemije (EFSA i ECDC, 2021).

Kod 716 (13,8%) epidemija utvrđeni su čvrsti dokazi pojave (EFSA i ECDC, 2021). Čvrsti dokazi ukazuju da uzročnik epidemije direktno potiče iz hrane, njene komponente ili okoline, odnosno da nije došlo do naknadne i/ili slučajne kontaminacije (EFSA, 2014). Meso i proizvodi od mesa bili su izvor 151 epidemije, što čini 21,2% epidemija kod kojih je utvrđen čvrst dokaz pojave (Tabela 2.1) (EFSA i ECDC, 2021).

Tabela 2.1. Prikaz podataka epidemija izazvanih kontaminiranim mesom i/ili proizvodima od mesa na području Evropske unije tokom 2019. godine (EFSA i ECDC, 2021).

Meso i proizvodi od mesa	Broj epidemija	% od ukupnih epidemija	Broj slučajeva	% od ukupnih slučajeva	Stopa pojavljivanja na 100 000 stanovnika
Meso i proizvodi od mesa, neodređeni	41	5,7	770	5,6	0,008
Svinjsko meso	42	5,9	575	4,2	0,008
Pileće meso	38	5,3	870	6,4	0,007
Goveđe meso	14	2,0	319	2,3	0,003
Ovčije meso	2	0,3	89	0,7	< 0,001
Ostalo	14	2,0	112	0,8	0,003
Ukupno	151	21,2	2 735	20	0,030

2.2. *SALMONELLA* SPP. KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM

Rod *Salmonella* predstavljaju Gram negativne, fakultativno anaerobne bakterije (Cheng i sar., 2019) iz familije *Enterobacteriaceae* (Gast i Porter, 2020). Danas su poznate dve vrste, *Salmonella enterica* i *S. bongori*, sa preko 2600 serovarijeteta (Cheng i sar., 2019). Tradicionalna klasifikacija salmonela zasniva se na *Kauffmann-White*-ovoj šemi, baziranoj na određivanju somatskih i flagelarnih antigena (Gast i Porter, 2020).

Morfološki, salmonele su pravi, nesporogeni štapići, veličine $0,7 - 1,5 \times 2,0 - 5,0 \mu\text{m}$. Kao fakultativno anaerobne bakterije rastu u aerobnim i anaerobnim uslovima. Iako je optimalna temperatura rasta salmonela 37°C , ove bakterije mogu da rastu u temperaturnom rasponu od 5°C do 45°C . Optimalna pH vrednost za rast i razmnožavanje salmonela iznosi 6,5 do 7,5. Međutim, mogu da rastu i pri rasponu pH od 4,0 do 9,0 (Gast i Porter, 2020). Ove bakterije mogu da rastu i razmnožavaju se pri koncentracijama natrijum-hlorida od 0,4% do 4%. Za rast, salmonele zahtevaju visoku aktivnost vode (a_w 0,99 – 0,94). Prestanak rasta salmonela uočava se na temperaturama ispod 7°C , $\text{pH} < 3,8$ i $a_w < 0,94$ (Pui i sar., 2011).

Bakterije iz roda *Salmonella* mogu ući u lanac ishrane u bilo kojoj fazi proizvodnje hrane za životinje, primarne proizvodnje, proizvodnje, prerade i maloprodaje hrane, kao i prilikom pripremanja hrane u ugostiteljskim objektima ili domaćinstvima.

Naime, salmonele su široko rasprostranjene u spoljašnjoj sredini i gastrointestinalnom traktu životinja. Farmske životinje se najčešće inficiraju konzumiranjem kontaminirane hrane za životinje (Milanov i sar., 2015) ili iz spoljašnje sredine. Dalje, u pogonima za klanje i preradu mesa kontaminacija trupova svinja neretko nastaje kao posledica grešaka obrade, loše higijene i unakrsnom kontaminacijom (Kureljušić, 2017). U pogonima za klanje i preradu mesa, hvatajući se za kontaktne površine i formirajući biofilme, salmonele predstavljaju stalan izvor unakrsne kontaminacije (Pui i sar., 2011). Potom, neadekvatna obrada hrane, konzumiranje nedovoljno termički obrađene hrane i unakrsna kontaminacija sirove i termički obrađene hrane u domaćinstvima jesu osnovni izvori salmonela kod ljudi.

Salmoneloza predstavlja drugu po učestalosti gastrointestinalnu infekciju, nakon kampilobakterioze. Procenjuje se da su ne-tifoidne salmonele uzročnici 93 miliona crevnih infekcija na globalnom nivou, uzrokujući 155 000 smrtnih slučajeva godišnje (Majowicz i sar., 2010).

U većini slučajeva infekcije ne-tifoidnim salmonelama, naročito serovarijetetima *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*, izazivaju privremeni gastroenteritis, koji obično ne zahteva terapiju (Mahmoud, 2012). Infektivna doza je u većini slučajeva između 10^5 i 10^{10} mikroorganizama. Međutim, ona može nekada biti i manja od 100 mikroorganizama (Kothary i Babu, 2001). Inkubacioni period se kreće između 5 časova i 7 dana, dok znakovi kliničke slike počinju za 12 do 36 časova nakon ingestije kontaminirane hrane. Klinička slika se manifestuje pojavom dijareje, mučnine, bolova u abdomenu i groznice (Gal-Mor i sar., 2014). Ukoliko infekcija postane invazivna povraćanje, glavobolja, dehidracija i anoreksija takođe mogu da se jave. Sindrom obično traje od 2 do 7 dana. Komplikacije se javljaju u vidu sistemskih infekcija, i to najčešće kod imunokompromitovanih osoba, starijih lica i dece (Forshell i Wierup, 2006).

Tokom 2019. godine u EU je prijavljeno 90 105 slučajeva salmoneloze, od kojih je 87 923 potvrđeno, pri čemu je stopa incidencije iznosila 20,0 slučajeva na 100 000 stanovnika, što je na sličnom nivou kao i 2018. godine (20,1 slučaj na 100 000 stanovnika). Iste godine zabeleženo je 926 (17,9%) epidemija u kojima je hrana bila put prenosa salmonela, odnosno 9 169 slučajeva od kojih je 1 915 hospitalizovanih i 7 smrtnih ishoda. Kao i prethodnih godina, *S. Enteritidis* (72,4%)

je najčešći prijavljeni serovarijetet, praćen *S. Typhimurium* (14%), monofaznom *S. Typhimurium* (2%) i *S. Infantis* (1,7%) (EFSA i ECDC, 2021).

Na teritoriji Republike Srbije zabeleženo je 1 260 slučajeva salmoneloza tokom 2019. godine, sa stopom incidencije 18,14 na 100 000 stanovnika (IZJZS, 2020).

Prema izveštajima uočava se stabilizacija trenda pojava salmoneloza u periodu od pet godina (od 2015. do 2019. godine) u EU (EFSA i ECDC, 2021), odnosno blagi trend opadanja incidencije u Republici Srbiji u desetogodišnjem periodu (od 2010. do 2019. godine) (IZJZS, 2020).

2.3. *LISTERIA MONOCYTOGENES* KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM

Rod *Listeria* obuhvata 22 vrste (*L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. costaricensis*, *L. denitrificans*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. thailandensis*, *L. weihenstephanensis* i *L. welshimeri*) (LPSN, 2020), od kojih su *L. monocytogenes* i *L. innocua* najzastupljenije (Kaszoni-Rückerl i sar., 2020). *L. monocytogenes* je Gram pozitivna, široko rasprostranjena bakterija. Veličina ove fakultativno anaerobne, štapičaste bakterije iznosi $0,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ (Liu, 2006). *L. monocytogenes* ima sposobnost razmnožavanja u širokom temperaturnom opsegu ($2 - 45^\circ\text{C}$), opsegu pH vrednosti između 4,6 i 9,5, kao i pri a_w od 0,92 (Thévenot i sar., 2006; Gandhi i Chikindas, 2007; Carpentier i Cerf, 2011). Iako je optimalna temperatura rasta ove bakterije između 30°C i 37°C , ona poseduje sposobnost rasta na temperaturi frižidera. Istraživanja pokazuju da minimalna prosečna temperatura rasta iznosi $1,7^\circ\text{C}$, bez obzira na soj ove bakterije i njen izvor. Tolerancija niskih temperatura posledica je delovanja genetskih i fizioloških faktora *L. monocytogenes* (Jemmi i Stephan, 2006). Čelije *L. monocytogenes* akumuliraju krioprotektore glicin, betain i karnitin. Uz to, proizvode proteine hladnog šoka (Csps) i protein za aklimatizaciju (Caps). Lipidi membrane ove bakterije se nalaze u tzv. fluidnom stanju koje je značajno za održavanje funkcija membrane. Promena temperature izaziva izmenu kompozicije lipida membrane u cilju postizanja idealne fluidnosti za normalnu enzimsku aktivnost i transport kroz membranu. Glavna izmena jeste povećanje $C_{15,0}$ masnih kiselina uz utrošak $C_{17,0}$ masnih kiselina. Ove promene nastupaju pri temperaturi $< 7^\circ\text{C}$. Na ovaj način se stvara veći broj nezasićenih masnih kiselina koje pomažu u održavanju fluidnosti membrane (Gandhi i Chikindas, 2007).

L. monocytogenes je široko rasprostranjena u prirodi. Iako se hrana spremna za konzumiranje smatra glavnim putem prenosa *L. monocytogenes* (Buchanan i sar., 2017), ova bakterija je često prisutna u proizvodnim pogonima na opremi i površinama koje dolaze u dodir sa hranom, kao i u sirovoj hrani biljnog i životinjskog porekla (WHO i FAO, 2004).

Epidemiološki podaci pokazuju da je 98% epidemija listerioze povezano sa tri serotipa *L. monocytogenes*, i to 1/2a, 1/2b i 4b (Liu, 2006; Jemmi i Stephan, 2006), uprkos činjenici da je 13 serotipova sposobno da izazove infekcije kod ljudi. Listerioza kod ljudi je primarno rezultat konzumiranja kontaminirane hrane. Minimalna infektivna doza za ljude nije određena, ali istraživanja pokazuju da se kreće između 10^2 i 10^9 CFU (eng. *Colony Forming Unit*) i zavisi od imunološkog statusa domaćina. Inkubacioni period traje od 11 do 70 dana (prosečno 21 dan) (Jemmi i Stephan, 2006).

U ranoj fazi listerioze javljaju se nespecifični simptomi, poput simptoma gripa (umor, hladnoća, glavobolja, malaksalost). Ova bakterija može da izazove blagi gastroenteritis ili teška invazivna oboljenja, septikemiju, meningitis, encefalitis, abortus i smrt (Liu, 2006; Carpentier i Cerf, 2011).

Najpodložniji listeriozi su imunokompromitovane osobe, starija lica, trudnice i odojčad (Thévenot i sar., 2006; Buchanan i sar., 2017).

U zemljama EU tokom 2019. godine je prijavljeno i potvrđeno 2 621 slučaj listerioze, sa stopom pojavljivanja od 0,46 slučajeva na 100 000 stanovnika. Od toga, 21 epidemija je povezana sa hranom kao putem prenosa *L. monocytogenes*, u kojima je obolelo 349 osoba. U periodu od 2015. do 2019. godine zabeležen je stabilan trend potvrđenih listerioza u zemljama EU (EFSA i ECDC, 2021).

U Republici Srbiji u 2017. godini prijavljena su dva slučaja listerioze sa stopom incidencije od 0,021 na 100 000 stanovnika, od kojih je jedan završio smrtnim ishodom (IZJZS, 2018), dok je u 2018. godini prijavljeno 8 slučajeva listerioze sa stopom incidencije od 0,12 na 100 000 stanovnika, od kojih je jedan završio smrtnim ishodom (IZJZS, 2019). Tokom 2019. godine prijavljeno je 15 slučajeva listerioze u Republici Srbiji, sa stopom incidencije od 0,2 na 100 000 stanovnika, od kojih je pet završilo smrtnim ishodom (IZJZS, 2020).

2.4. *YERSINIA ENTEROCOLITICA* KAO UZROČNIK BOLESTI PRENOSIVIH HRANOM

Trenutno rod *Yersinia* čini 21 vrsta (*Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. canariae*, *Y. enterocolitica*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. hibernica*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. pestis*, *Y. philomiragia*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis* i *Y. wautersii*) (LPSN, 2020) bakterija koje pripadaju familiji *Enterobacteriaceae*. *Y. enterocolitica* je Gram negativna, mala, pleomorfna štapičasta bakterija, veličine $0,5 \times 1 - 2 \mu\text{m}$. Biohemijski, na osnovu somatskih antigena, *Y. enterocolitica* može da se podeli na šest biotipova (1A, 1B, 2, 3, 4 i 5) (Fredriksson-Ahomaa, 2017).

Biotipovi 1B, 2, 3, 4 i 5 se smatraju patogenim, a za ljude naročito 1B. Optimalna temperatura za rast i razmnožavanje ove bakterije kreće se od 22 °C do 29 °C. Ipak, može da raste i pri temperaturama između 0 °C i 45 °C. Kao psihrotrofne bakterije mogu da rastu i razmnožavaju se pri temperaturi frižidera, kao i da preživljavaju u zamrznutoj hrani. Međutim, osetljive su na visoke temperature, tako da ih temperatura pasterezacije uništava. Optimalna pH vrednost za opstanak *Y. enterocolitica* kreće se između 7 i 8, dok rast prestaje pri $\text{pH} < 4$ (Zadernowska i sar., 2014). Ove fakultativno anaerobne bakterije sposobne su da rastu čak i u modifikovanoj atmosferi sa visokim nivoom ugljen-dioksida (CO_2) (Fredriksson-Ahomaa, 2017).

Slično ostalim bakterijama iz familije *Enterobacteriaceae* i *Y. enterocolitica* je široko rasprostranjena u prirodi. Svinje mogu biti asimptomatski nosioci *Y. enterocolitica*, što predstavlja predisponirajući faktor za kontaminaciju trupova prilikom klanja (Laukkanen-Ninios i sar., 2014) i dospevanje ove bakterije, preko mesa, na trpeze ljudi. Najčešće izolovani serotip iz mesa svinja i proizvoda od mesa, naročito usitnjenog mesa i fermentisanih kobasica, jeste B4:03 (Fredriksson-Ahomaa, 2017).

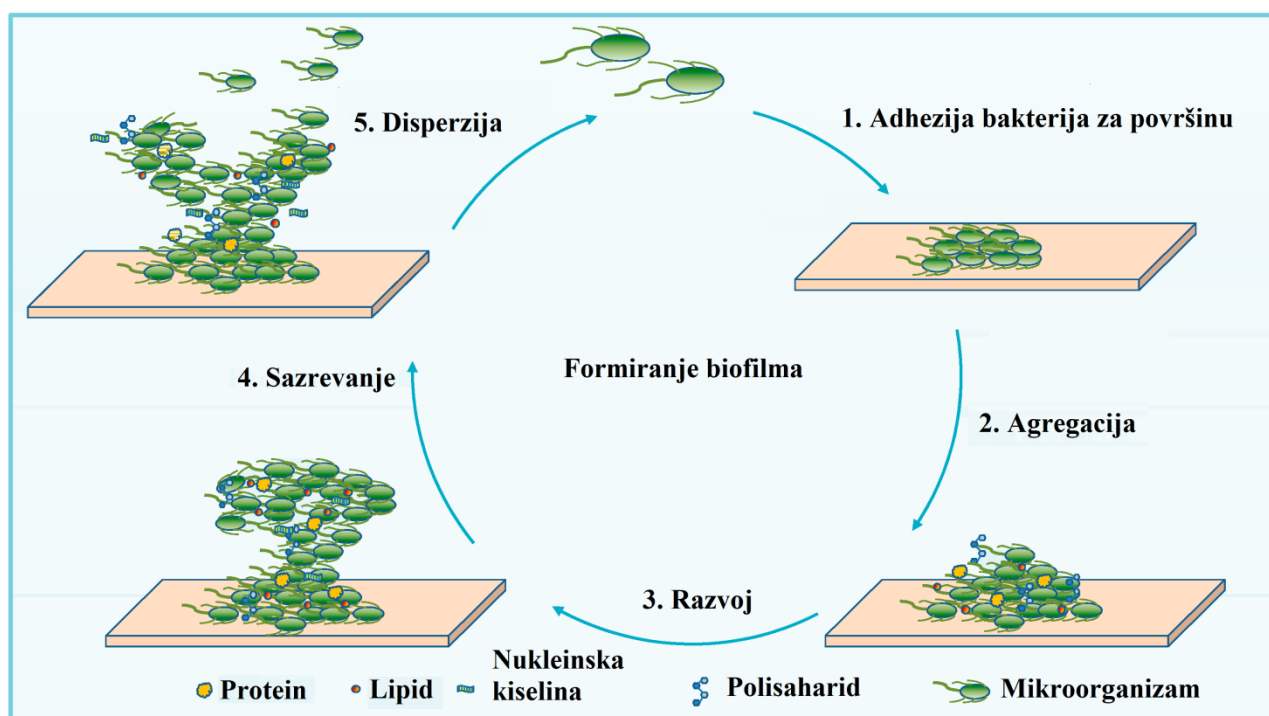
Enteropatogena *Yersinia* spp., *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, kao značajne patogene bakterije prenosive hranom, uglavnom izazivaju samolimitirajući enteritis kod ljudi (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2018). Jersinioza obično ne zahteva antibiotsku terapiju. Akutna dijareja i groznica javljaju se kod dece mlađe od 5 godina, dok se kod odraslih, pored dijareje, pojavljuju reaktivni artritis i osip po koži koji mogu da traju mesecima. Kod imunokompromitovanih osoba moguća je pojava sepse (Fredriksson-Ahomaa, 2017).

Jersinioza je četvrta po učestalosti zoonoza prijavljena kod ljudi tokom 2019. godine u zemljama EU sa ukupno 6 961 potvrđenim slučajem. Od toga 149 slučajeva bilo je povezano sa hranom kao putem prenosa uzročnika u 15 epidemija. Tokom petogodišnjeg perioda (od 2015. do 2019. godine) uočava se stabilan trend pojava jersinioze (EFSA i ECDC, 2021). U Republici Srbiji prijavljeno je 14 slučajeva jersinioze tokom 2017. godine (IZJZS, 2018), 20 slučajeva tokom 2018. godine (IZJZS, 2019) i 14 slučajeva tokom 2019. godine, sa stopom incidencije od 0,2 na 100 000 stanovnika (IZJZS, 2020).

2.5. FORMIRANJE BIOFILMOVA I NJIHOV ZNAČAJ U INDUSTRIJI MESA

U pogonima industrije mesa površine prostorija i opreme čine idealna mesta za razvoj i održavanje organizovanih ekosistema bakterija, tzv. biofilma (Bridier i sar., 2015). Biofilm čine skupine ćelija mikroorganizama u matriksu, od ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS), koji same proizvode (Donlan, 2002; Flemming i sar., 2016). U ovakvim zajednicama količina mikroorganizama iznosi manje od 10%, dok matriks čini više od 90% (Satpathy i sar., 2016). Glavna komponenta matriksa jeste voda (do 97%), u kojoj se nalaze strukturne i funkcionalne komponente, poput polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina, lipida i drugih biopolimera (Flemming i sar., 2016; Toyofuku i sar., 2016).

Uobičajeno je biofilm skupina mikroorganizama više vrsta, a njegovo formiranje predstavlja dinamičan proces koji zavisi od mnogobrojnih faktora, uključujući dostupnost hranljivih materija, pH, temperaturu, sintezu i sekreciju ekstracelularnog materijala, stres i konkurenciju drugih organizama (Flemming i sar., 2016). Složen proces formiranja biofilma se odigrava u pet faza (Slika 2.1) (Satpathy i sar., 2016).



Slika 2.1. Prikaz procesa formiranja biofilma (Yin i sar., 2019).

Prilikom približavanja planktonske ćelije površini, koja poseduje određene fizičko-hemijske karakteristike, i njihovom interakcijom nastaje prva faza formiranja biofilma, odnosno reverzibilna

adhezija bakterija za površinu. Pridržavanjem ćelijskih struktura (fimbrija, flagela i pila) za kondicionirani sloj površine i uticajem sila kratkog dometa (kovalentne, jonske i vodonične veze) nastaje ireverzibilna adhezija (Čabarkapa i sar., 2013). Faza agregacije podrazumeva akumulaciju, rast i razmnožavanje bakterija, kao i proizvodnju ekstracelularnih komponenti u cilju formiranja mikrokolonija i višeslojnog biofilma (Cappitelli i sar., 2014). Unutar mikrokolonije međusobno povezane bakterije komuniciraju putem hemijskih signalnih molekula (autoinducera) u procesu zvanom *quorum sensing* (QS). Ovaj proces omogućava bakterijama sinhronizaciju ponašanja na populacijskom nivou, pri čemu funkcionišu kao višćelijski organizam (Waters i Bassler, 2005). Formiranje biofilma regulisano je QS, kao i sa nekoliko fizioloških aktivnosti poput ispoljavanja virulencije i disperzije (Cappitelli i sar., 2014). Razmnožavanjem bakterija i akumulacijom EPS zajednica prerasta u trodimenzionalnu strukturu i sazreva. Složeni matriks zrelog biofilma služi kao njegov štit od uticaja spoljašnje sredine i antimikrobnih supstanci (Renner i Weibel, 2011; Bridier i sar., 2015). Poslednja faza biofilma jeste disperzija, koja se karakteriše odvajanjem ćelija od biofilma. Ova faza može biti aktivna i pasivna. Bakterije mogu da iniciraju aktivnu disperziju usled smanjenja hranljivih materija, kao deo preživljavanja. Dok je pasivna disperzija prouzrokovana spoljašnjim silama, poput čišćenja (Cappitelli i sar., 2014). Čelije koje se odvoje sposobne su da stvore biofilmove na novim mestima (Renner i Weibel, 2011).

Biofilmovi se brzo formiraju u okruženjima prehrambene industrije (Galie i sar., 2018) i to najčešće na teško dostupnim mestima, poput pukotina, zaptivača, ventila i spojeva opreme (Cappitelli i sar., 2014), gde su čišćenje i dezinfekcija otežani. Biofilmovi patogenih bakterija stvaraju se na gotovo svim materijalima od kojih je oprema napravljena (nerđajući čelik, plastika, guma, i dr.) (Wang, 2019), odakle predstavljaju izvor kontaminacije sirovina i proizvoda.

Upotreba standardnih procedura čišćenja i dezinfekcije, iako je strategija u kontroli patogenih mikroorganizama u industrijskim pogonima, nije dovoljno efikasno u borbi protiv biofilmova. Uz to, može rezultirati i pojavom rezistentnosti prema dezinfekcionim sredstvima. Procena prirodnih jedinjenja, etarskih ulja i njihovih komponenti, u suzbijanju biofilmova patogenih mikroorganizama je od velikog značaja. Njihov potencijal se ogleda u sposobnosti da penetriraju u strukturu biofilmova i izazovu visok nivo letaliteta patogenih bakterija. Pored toga, ova jedinjenja su lako razgradiva (Bridier i sar., 2015), što doprinosi i zaštiti životne sredine.

2.6. ETARSKA ULJA

Etarska ulja (EO), poznata još i kao esencijalna ili eterična ulja, predstavljaju koncentrovane uljane tečnosti koje sadrže isparljiva aromatična jedinjenja, karakterističnog mirisa (Burt, 2004). Prema definiciji ISO (eng. *the International Organization for Standardization*) standarda EO su proizvodi od prirodnih sirovina biljnog porekla, dobijeni destilacijom pomoću vodene pare, mehaničkim presovanjem epikarpa (kore) citrusnog voća ili suvom destilacijom nakon odvajanja vodene faze fizičkim procesom (SRPS EN ISO 9235, 2021).

Ova ulja se prilikom sekundarnog metabolizma sintetišu u svim delovima biljaka (Akthar i sar., 2014), uključujući cvetove, pupoljke, listove, koru, seme, plodove i korenje, i skladište unutar sekretornih ćelja, šupljina, kanala i ćelija epiderma (Burt, 2004).

Visoko koncentrovana EO se iz delova biljaka mogu dobiti na više načina, između ostalog hidrodestilacijom, hladnim presovanjem, ekstrakcijom pomoću rastvarača i nadkritičnom ekstrakcijom. Najzastupljeniji način dobijanja EO jeste destilacija vodenom parom (Rao i sar., 2019). Prinos EO zavisi od brojnih faktora. Mlađe biljke daju nešto veći prinos, dok starije biljke proizvode gušća i tamnija EO (Barbieri i Borsotto, 2018). Isto važi i za kultivisane biljke, u

poređenju sa divljim, odnosno samorastućim (Giacometti i sar., 2018). Metoda dobijanja EO takođe utiče na njihov prinos. Za postizanje maksimalnog prinosa bitna je dužina trajanja destilacije (Zheljazkov i sar., 2012), kao i temperatura ekstrakcije (Tekin i sar., 2015).

Etarska ulja su rastvorljiva u lipidima i organskim rastvaračima (Akthar i sar., 2014), dok su u vodi slabo rastvorljiva (Rios, 2016). Na sobnoj temperaturi su uglavnom tečne konzistencije (Dhifi i sar., 2016).

Hemijski sastav i kvalitet EO iste biljne vrste zavise od genotipa, oblasti gde se biljka gaji, klimatskih uslova, vegetativne faze i delova biljaka koji se koriste za dobijanje EO, uslova skladištenja, kao i metode dobijanja EO (Rios, 2016; Ribeiro-Santos i sar., 2017). Izraz hemotip koristi se u opisivanju EO iste biljne vrste koja variraju u hemijskom sastavu. Obično su EO smeše različitog broja komponenti, najčešće između 20 i 80 (Rao i sar., 2019) od kojih se neke nalaze u tragovima, dok su druge zastupljene u preko 85% ukupnog sastava (Tabela 2.2) (Burt, 2004; Jayasena i Jo, 2013). Ove komponente se svrstavaju u grupe jedinjenja, kao što su terpeni, terpenoidi, aromatična i alifatična jedinjenja male molekulske mase koja određuju biološka svojstva EO (Bakkali i sar., 2008; Rao i sar., 2019).

Tabela 2.2. Glavne komponente odabranih etarskih ulja i njihova zastupljenost (Jayasena i Jo, 2013).

Naziv komponente	Etarsko ulje	Sadržaj (%)
Karvakrol	Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	6 – 80
	Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	2 – 19
Timol	Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	10 – 64
	Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	22 – 64
Eugenol	Karanfilić (<i>Syzygium aromaticum</i>)	75 – 85
gama-Terpinen	Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	1 – 52
	Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	2 – 31
1,8-Cineol	Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	3 – 89
p-Cimen	Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	u tragovima – 64
	Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	10 – 56
Bornil acetat	Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	0 – 17
Limonen	Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	22
trans-Cinamaldehyd	Cimet (<i>Cinnamomum zeylandicum</i>)	65

Danas je poznato preko 3 000 EO, dok je oko 300 od komercijalnog značaja (Bakkali i sar., 2008). Vodeće zemlje u proizvodnji EO su Kina i Indija, praćene Indonezijom, Šri Lankom i Vijetnamom. U Evropi najveću količinu EO proizvedu Francuska i Nemačka, nakon kojih slede Španija, Grčka i Velika Britanija. Najveće količine EO upotrebe se u prehrambenoj i industriji pića (35%), kozmetici

i aromaterapiji (29%), proizvodima za domaćinstvo (16%) i farmaceutskoj industriji (15%) (Barbieri i Borsotto, 2018).

Široka upotreba EO u različitim domenima ukazala je na potrebu postavljanja kriterijuma kvaliteta. Pored ISO standarda (SRPS EN ISO 9235, 2021) mnoga udruženja i kompanije, poput *Association Française for Normalization*, *Generally Recognized As Safe* (GRAS), *Fragrance Materials Association*, *the International Fragrance Association*, *Bundesinstitut für Risikobewertung*, *Research Institute for Fragrance Materials* i *Scientific Committee on Consumer Safety* postavili su svoje kriterijume sastava i kvaliteta (Rios, 2016). Preduslov za upotrebu EO u prehrambenoj industriji, prema GRAS-u, jeste hemijska identifikacija i čistoća supstance, kao i utvrđivanje prisustva sekundarnih komponenti. Stoga su razvijene i pouzdane metode za analizu EO. Primena tehnika gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) su najčešće u analizi EO danas (Adams, 2007). Ove metode omogućavaju utvrđivanje hemijskog sastava EO i koncentracije njihovih jedinjenja. Različite šarže komercijalnih EO mogu da se razlikuju po hemijskom sastavu. Stoga je, prema GRAS-u, neophodno definisati maksimalno dozvoljenu koncentraciju određenih jedinjenja (Smith i sar., 2005). U prehrambenoj industriji je dozvoljena upotreba velikog broja EO, između ostalog i EO anđeličke (*Angelica archangelica*), anisa (*Pimpinella anisum* L.), bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), korijandera (*Coriandrum sativum* L.), fenela (*Foeniculum vulgare* Mill.), đumbira (*Zingiber officinale* Rosc.), lavande (*Lavandula officinalis* Chaix.), limuna (*Citrus limon*), crnog bibera (*Piper nigrum* L.), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), origana (*Origanum vulgare*), žalfije (*Salvia officinalis* L.) i timijana (*Thymus vulgaris*) (FDA, 2021).

Delovanja EO su mnogobrojna. Istraživanja pokazuju njihova antimikrobna (Dimić i sar., 2009; Sakkas i Papadopoulou, 2017), antibakterijska (Šojić i sar., 2018; Tian i sar., 2020), antifungalna (Kocić-Tanackov i sar., 2011; Kocić-Tanackov i sar., 2012; Kocić-Tanackov i sar., 2014; Kocić-Tanackov i sar., 2020), antivirusna (Flechas i sar., 2018; Battistini i sar., 2019), antioksidativna (Šojić i sar., 2017; Šojić i sar., 2018), antikancerogena (Blowman i sar., 2018), insekticidna (Tian i sar., 2020), repelentna (Tian i sar., 2020) i mnoga druga svojstva.

2.7. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA

Povećanje bakterijske rezistencije na antibiotike i nedostatak novih antibiotika rezultiralo je potrebom za pronalazak alternativnih strategija u borbi protiv bakterija (Chouhan i sar., 2017). Dejstvo EO na bakterije ogleda se u inhibiciji njihovog rasta (bakteriostatsko delovanje) ili uništenju bakterijske ćelije (baktericidno delovanje) (Faleiro, 2011; Böhme i sar., 2014; Swamy i sar., 2016). Antibakterijska aktivnost se, na osnovu navedenih dejstava, meri minimalnom inhibitornom koncentracijom (eng. *Minimal Inhibitory Concentration* – MIC) ili minimalnom baktericidnom koncentracijom (eng. *Minimal Bactericidal Concentration* – MBC) (Burt, 2004). Za procenu antibakterijske aktivnosti EO ne postoji standardna metoda. U ovu svrhu prilagođeni su vodiči NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) i EUCAST (*the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) primarno razvijeni za procenu aktivnosti antibiotika (Rao i sar., 2019). Različiti tipovi *in vitro* testova se primenjuju u cilju utvrđivanja antibakterijske aktivnosti EO, a njihov izbor zavisi od nekoliko karakteristika, od kojih su zahtevnost tehnike i cena izvođenja najzastupljenije (Faleiro, 2011). Brzo utvrđivanje antibakterijske aktivnosti EO se obično vrši agar-difuzionom ili disk-difuzionom metodom, kada se EO dodaju u bunarčice napravljene u agaru ili na diskeve filter papira koji se nalaze na površini agara koji sadrži inokulisani ciljani bakterijski izolat.

Nakon inkubacije pojavljuje se zona inhibicije (ZI) rasta mikroorganizma, koja predstavlja antibakterijsku aktivnost (Swamy i sar., 2016).

Jačina antibakterijske aktivnosti najčešće se utvrđuje razblaživanjem EO u bujonu primenom mikrodilucione metode. Ovaj način ispitivanja antibakterijske aktivnosti EO je osetljiviji, a utvrđivanje MIC se zasniva na merenju optičke gustine (eng. *Optical Density* – OD), brojanju preživelih kolonija bakterija ili upotrebi resazurina kao indikatora (Burt, 2004).

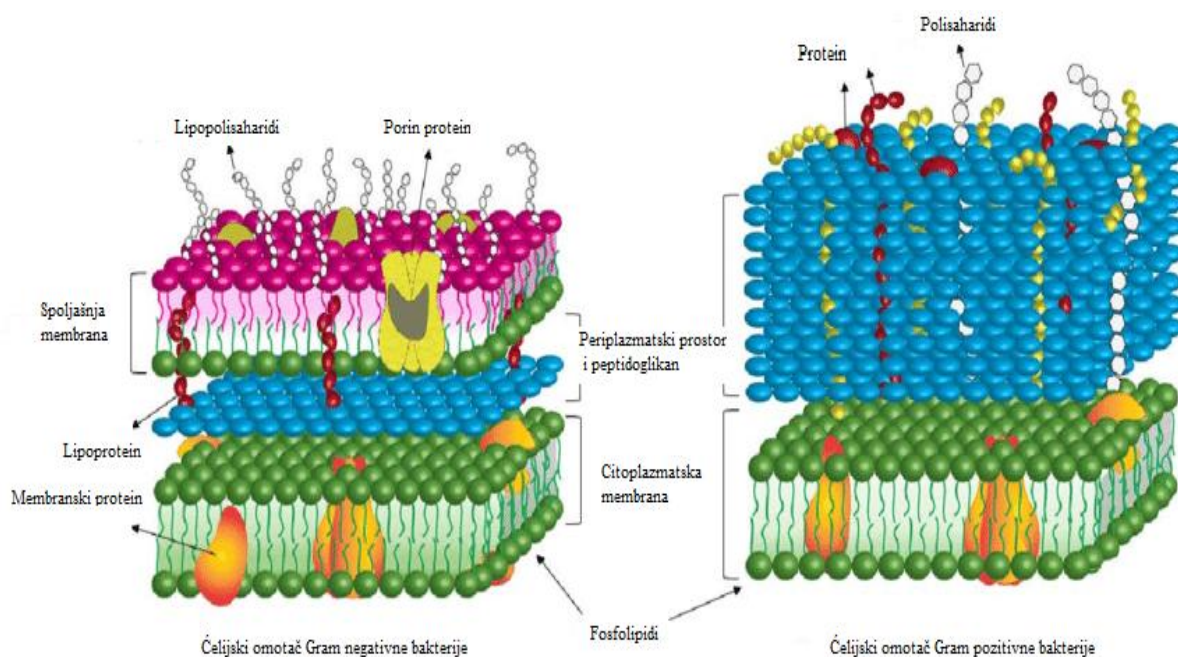
Pored nestandardizovanosti metoda, poteškoće u određivanju antibakterijskih aktivnosti EO posledica su njihove nerastvorljivosti u vodi i isparljivosti. Od posebne važnosti jeste hidrofobnost i visok viskozitet EO, koji uzrokuju nepravilnu distribuciju kroz medijum prilikom primene difuzione metode, kao i nejednaku rastvorljivost kod dilucionih metoda. Ovo se može izbeći upotrebom rastvarača poput etanola, metanola, Tween-20, Tween-80, acetona, dimetil sulfoksida (DMSO), *n*-heksana i propilen glicerola (Burt, 2004).

Rezultati ispitivanja osetljivosti mikroorganizama na EO zavise od primenjene metode, vrste i količine hranljivog medijuma, koncentracije inokuluma, temperature i vremena inkubacije (Kalemba i Kunicka, 2003) i porekla korišćenih EO.

2.8. MEHANIZMI DELOVANJA ETARSKIH ULJA NA BAKTERIJE

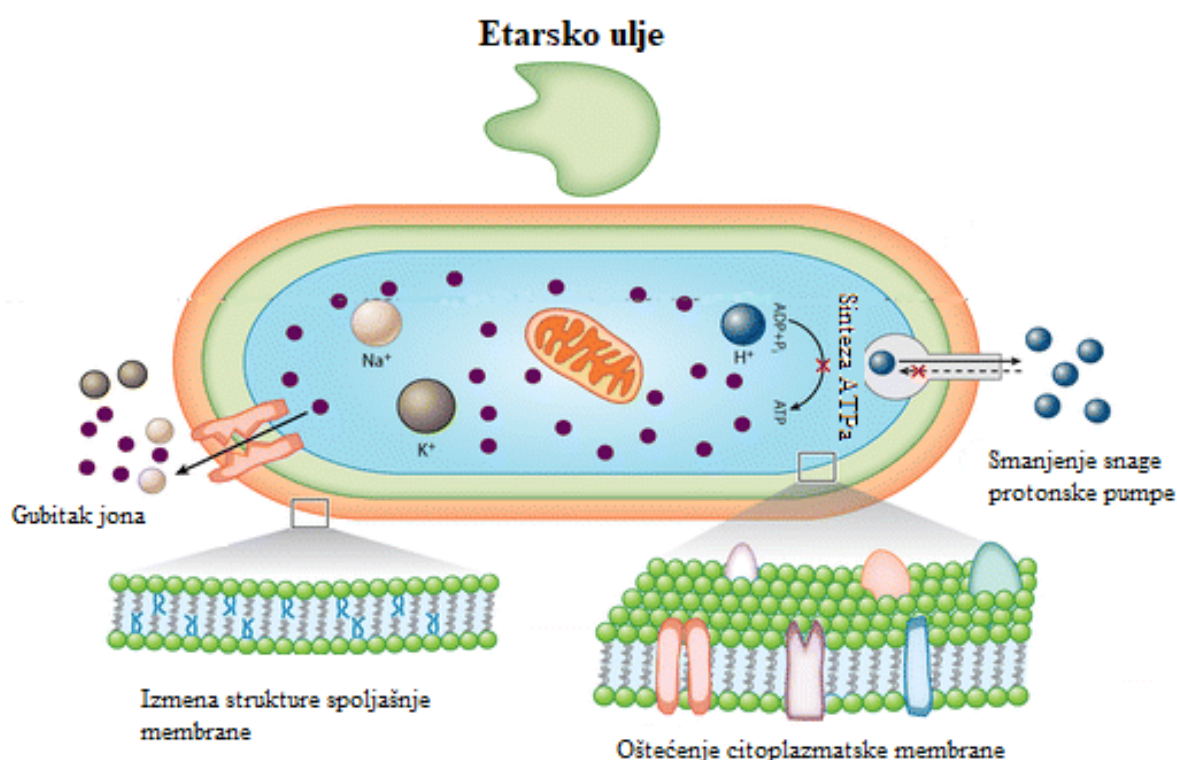
Uprkos mnogobrojnim ispitivanjima antibakterijskog delovanja EO njihovi mehanizmi još nisu u potpunosti objašnjeni. Generalno, ovi mehanizmi se mogu pripisati fizičkim, hemijskim ili biohemijskim promenama bakterija izloženih EO. Različite komponente mogu da deluju različitim mehanizmima i mogu za cilj imati različite vrste bakterija.

Gram negativne bakterije su se pokazale kao manje osetljive na EO u odnosu na Gram pozitivne bakterije (Burt, 2004), što je rezultat razlika u njihovoj građi (Slika 2.2).



Slika 2.2. Prikaz razlika u građi ćelijskih omotača Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija (Liu i sar., 2015).

Građa ćelijskog zida Gram negativnih bakterija je kompleksnija. Tanak sloj peptidoglikana obavijen je spoljašnjom membranom. Ove dve strukture čvrsto su povezane Braunovim lipoproteinima. Spoljašnja membrana Gram negativnih bakterija građena je od lipidnog dvosloja povezanog polisaharidima sa unutrašnjom membranom. Spoljašnja membrana stvara barijeru i štiti ćeliju od EO (Burt, 2004; Böhme i sar., 2014). Ipak, mali hidrofilni rastvori mogu da prođu kroz spoljašnju membranu preko porin proteina koji služe kao hidrofilni transmembranski kanali. S druge strane, struktura ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija dozvoljava laku penetraciju hidrofobnih molekula. Ovakvi molekuli, poput EO, deluju na ćelijski zid i unutar citoplazme (Nazzaro i sar., 2013). Ono što je zajedničko, bez obzira na građu, jeste da EO, kao tipični lipofili, prolaze kroz ćelijski zid i citoplazmatsku membranu, remeteći strukturu polisaharida, masnih kiselina i fosfolipida. Oštećenje citoplazmatske membrane uzrokuje njenu propustljivost i curenje ćelijskog sadržaja, gubitak jona, kolaps protonske pumpe, trošenje adenozin trifosfata (ATP) i ćelijsku lizu (Slika 2.3) (Burt, 2004; Bakkali i sar., 2008; Böhme i sar., 2014; Rao i sar., 2019).



Slika 2.3. Mehanizmi delovanja etarskih ulja i njihova ciljana mesta na bakterijskoj ćeliji (Rao i sar., 2019).

Bakterijske ćelije mogu da prežive kada su izložene niskim i subletalnim koncentracijama EO. Pod takvim uslovima ćelijska membrana je još uvek u stanju da održi svoju fluidnost kroz sisteme samoodbrane koji uključuju promene stepena zasićenosti masnih kiselina, dužinu ugljenikovih lanaca, položaj grananja, cis/trans izomerizaciju i konverziju nezasićenih masnih kiselina u ciklopropane ćelijske membrane (Rao i sar., 2019).

Tretiranje izolata *S. Typhimurium* cinamaldehydom, timolom, karvakrolom i limonenom uzrokuje modifikacije ćelijskog omotača, vidljive skeniranjem elektronskom mikroskopijom (SEM). Modifikacije najverovatnije nastaju zbog izmene masno kiselog profila ćelijske membrane penetracijom jedinjenja (Di Pasqua i sar., 2007). SEM omogućava posmatranje promena ćelijske membrane, oticanje i curenje citoplazme i membrane jezgra (Bakkali i sar., 2008).

Način delovanja karvakrola i timola, najzastupljenijih komponenti EO origana i timijana, privukao je najveću pažnju istraživača. Ova jedinjenja su u stanju da razgrade spoljašnju membranu Gram negativnih bakterija oslobađajući lipopolisaharide i povećavajući propustljivost citoplazmatske membrane za ATP (Burt, 2004).

Burt i sar. (2007) su prvi opisali delovanje jedinjenja EO na sintezu proteina. Karvakrol i p-cimen indukuju sintezu proteina toplotnog stresa (eng. *Heat Shock Proteins* – HSPs) koji su uključeni u različite procese sinteze i oslobađanja polipeptida. Kod ćelija *Escherichia coli* O157:H7 tretirane karvakrolom dolazi do značajnog povećanja količine proteina toplotnog stresa (GroEL) i do inhibicije sinteze flagelina što rezultira nepokretljivošću ćelija. Ćelije *Salmonella* tretirane subletalnim koncentracijama timola sintetisu set proteina šaperona (DnaK, GroEL, HtpG), proteine spoljašnje membrane (OmpX, OmpA) i proteine koji su direktno ili indirektno uključeni u metabolizam citrata i sintezu ATP-a. Ova različita delovanja kategorišu timol kao velikog stresora za ćelije *Salmonella* (Di Pasqua i sar., 2010).

Istraživanja pokazuju i smanjenje pH vrednosti bakterijskih ćelija izloženih delovanju EO. Tretiranjem ćelija *S. Typhi* MIC etarskog ulja slačice pH vrednost se sa 6,59 smanjuje na 5,44, a kod *E. coli* O157:H7 sa 6,23 na 5,20 (Turgis i sar., 2009). Vrednost pH *E. coli* O157:H7 smanjuje i EO kineskog cimeta sa $7,25 \pm 0,20$ na $5,16 \pm 0,05$, kao i EO španskog origana sa $7,25 \pm 0,20$ na $6,68 \pm 0,37$ (Oussalah i sar., 2006).

Uzimajući u obzir veliki broj različitih grupa hemijskih jedinjenja koja čine EO, najverovatnije je da njihovo antibakterijsko dejstvo ne može da se pripiše jednom mehanizmu, nego da postoji nekoliko meta u ćeliji. Takođe, uprkos velikom broju hemijskih komponenti koje čine EO, antibakterijska dejstva se obično pripisuju najzastupljenijoj komponenti, ili pak sinergističnom delovanju više komponenti (Burt, 2004).

2.9. PRIMENA ETARSKIH ULJA U INDUSTRIJI MESA

Meso je nutritivno vredna namirnica. Ipak, delovanjem endogenih enzima, temperature skladištenja, vlage, atmosferskog kiseonika, svetlosti i mikroorganizama postaje lako kvarljivo. U očuvanju njegovih fizičko-hemijskih osobina od davnina se koriste razne metode konzervisanja. Naši drevni preci su meso sušili na suncu i dimili iznad vatre. Kasnije u upotrebu dolazi so, koja „isušuje“ meso. Zabeleženo je da su, pre 4 000 godina, u Indiji meso konzervisali vinom i vinskim sirćetom. Na ovaj način se smanjivala pH vrednost mesa (Chivandi i sar., 2016).

Danas, moderna tehnologija primenjuje temperaturni režim i razne konzervanse, poput sintetskih aditiva. Kako ovi aditivi mogu da budu kancerogeni, ukoliko se ne ispoštuju principi dobre proizvođačke prakse (DPP), zabrinutost potrošača je velika. Zabrinutost potrošača za zdravlje i trendovi prirodne ishrane doprinose iznalaženju novih, alternativnih konzervanasa mesa i proizvoda od mesa. Stoga su istraživanja poslednjih godina usmerena ka prirodnim i bezbednim zamenama.

Primena EO, kao konzervanasa mesa i proizvoda od mesa, zahteva dobro poznavanje njihovih osobina, načina delovanja, antimikrobni potencijal i interakciju sa komponentama matriksa. Sadržaj masti, proteina, aktivnost vode, pH i enzimi mogu da smanje potencijalni efekat EO u matriksu mesa i proizvoda od mesa (Burt, 2004; Böhme i sar., 2014). Visoke koncentracije masti, proteina i ugljenih hidrata mogu da zaštite bakterije stvarajući zaštitni omotač i absorbujući EO. Ovim se smanjuje njihova koncentracija i efektivnost u vodenoj fazi (Smith-Palmer i sar., 2001; Gutierrez i sar., 2008). S druge strane, visok sadržaj vode i/ili soli pospešuje delovanje EO (Burt, 2004), kao i niža vrednost pH, 5 u poređenju sa 6 i 7 (Gutierrez i sar., 2008).

Iako mnoga *in vitro* testiranja pokazuju odlične antibakterijske aktivnosti EO, potrebna je veća koncentracija istih prilikom primene u hrani (Burt, 2004). Dvostruko veće koncentracije su potrebne u poluobranom mleku (Karatzas i sar., 2001), desetostruko u svinjskoj jetrenoj kobasici (Pandit i Shelef, 1994), a 25- do 100-struko u mekom siru (Mendoza-Yepes i sar., 1997). Etarsko ulje peršuna naneto na modelu pršute svoju antimikrobnu aktivnost pokazuje pri koncentraciji od 6%, dok je u *in vitro* testu MIC iznosila 0,018% (Gill i sar., 2002).

S druge strane, visoka koncentracija EO na/u mesu i proizvodima od mesa može da utiče na njihova organoleptička svojstva. Etarska ulja poseduju intenzivnu aromu čak i u veoma niskim koncentracijama (Chivandi i sar., 2016). Smanjenje organoleptičkog efekta dodatih EO u matriks mesa ili proizvoda od mesa može se postići inkapsulacijom EO u nanoemulziju. Ovaj način povećava stabilnost isparljivih komponenti, štiteći ih od interakcije sa matriksom mesa uz povećanje antimikrobne aktivnosti kroz povećanje pasivnog ćelijskog usvajanja (Donsi i sar., 2011; Pan i sar., 2014). Smanjenje koncentracije EO, bez narušavanja njegove antimikrobne aktivnosti, u modelima hrane, može se postići kombinacijom dva ili više EO ili njihovih jedinjenja. Na ovaj način se postiže sinergistično delovanje (Gutierrez i sar., 2008; Turgis i sar., 2012). Zapaženo je sinergistično delovanje EO drveta mastike (*Pistacia lenticus*) i vreska (*Satureja montana*) u modelu usitnjenog goveđeg mesa protiv *Listera monocytogenes* (Djenane i sar., 2011), kao i EO bosiljka i ruzmarina u pilećem mesu protiv *Salmonella* Enteritidis (Stojanović-Radić i sar., 2018). Praktična primena EO u mesu i proizvodima od mesa često je limitirana i visokom cenom EO u odnosu na cenu sintetskih aditiva (Mani-Lopez i sar., 2018).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je utvrđivanje antimikrobnih aktivnosti različitih etarskih ulja i njihov uticaj na rast *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* izolovanih iz različitih faza proizvodnje mesa i proizvoda od mesa, u uslovima *in vitro* i na modelu usitnjenog mesa svinja.

Shodno cilju ispitivanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Formiranje kolekcije mikroorganizama (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*).
2. Hemijska analiza etarskih ulja uključenih u ispitivanja.
3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja na izolate *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* primenom disk difuzione metode.
4. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) etarskih ulja primenom mikrodilucione metode.
5. Utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma ispitivanih vrsta bakterija.
6. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formiranje biofilmove izolata *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*.
7. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na mikromorfološke promene izolata bakterija.
8. Primena odabranih etarskih ulja na modelu usitnjenog mesa svinja kontaminiranog odabranim izolatima bakterija.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Izolati patogenih bakterija prenosivih hranom

Izolati *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* su izolovani iz različitih faza proizvodnje mesa i proizvoda od mesa. Kolekciju patogenih mikroorganizama čine sledeći izolati: četiri izolata *Salmonella* Enteritidis i isto toliko izolata *Salmonella* Typhimurium (Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“, Kraljevo, Republika Srbija); pet izolata *Listeria monocytogenes* (Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Republika Srbija); i tri izolata *Yersinia enterocolitica* (Veterinarski specijalistički institut „Niš“, Niš, Republika Srbija) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Prikaz odabranih izolata patogenih bakterija i njihovo poreklo.

Redni broj	Mikroorganizam	Oznaka izolata	Poreklo izolata
1.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE53	Pileća jetra
2.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE56	Pileće mehanički separisano meso
3.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE132	Pileće meso
4.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE144	Pileće meso
5.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST28	Pljeskavica
6.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST35	Usitnjeno svinjsko meso
7.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST48	Usitnjeno mešano meso
8.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST49	Usitnjeno svinjsko meso
9.	<i>Listeria monocytogenes</i>	L1	Suva domaća kobasica
10.	<i>Listeria monocytogenes</i>	UB2-02-4 (L5)	Bris slivnika
11.	<i>Listeria monocytogenes</i>	L17	Bris daske
12.	<i>Listeria monocytogenes</i>	L18	Bris poda

13.	<i>Listeria monocytogenes</i>	UB2-01-2 (1)	Bris testere za rasecanje
14.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y4/1	Tonzile svinja
15.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y9	Tonzile svinja
16.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y14	Tonzile svinja

Pre svakog ispitivanja, u cilju dobijanja pojedinačnih kolonija i isključivanja kontaminacije, izolati su umnožavani tehnikom retkog zasejavanja na XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*, CM0469, Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo) agaru (izolati *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*), ALOA (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*, CM1084, Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo) agaru (izolati *L. monocytogenes*) i CIN agaru (*Yersinia selective agar base*, CM0653; i *Yersinia selective supplement*, SR0109, Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo) (izolati *Y. enterocolitica*), a potom inkubirani na 37 °C 24 časa, odnosno 48 časa.

4.1.2. Etarska ulja

U ispitivanje je uključeno ukupno 18 EO. Etarska ulja bosiljka (*Ocimum basilicum*), crnog bibera (*Piper nigrum*), tajlandskog đumbira (*Zingiber cassumunar*), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum* nees), limuna (*Citrus limonum*), karanfilića (*Syzygium aromaticum* L.), fenela (*Foeniculum vulgare*), lavande (*Lavandula angustifolia*), mirte (*Myrtus communis*), origana (*Origanum vulgare*), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), smilja (*Helichrysum italicum*), timijana (*Thymus vulgaris*) i žalfije (*Salvia officinalis*) nabavljena su od kompanije Terra co doo (Novi Sad, Republika Srbija), dok su EO hajdučke trave (*Achillea millefolium*), anđelike (*Angelica archangelica*), vreska (*Satureja montana*) i miloduha (*Hyssopus officinalis*) nabavljena od Siempreviva oils (PG Milica Stanković, Niš, Republika Srbija). Sva EO su skladištena u neprozirnim staklenim bočicama na temperaturi frižidera od 4 ± 1 °C.

4.1.3. Meso

U ogledu je korišćeno ohlađeno usitnjeno svinjsko meso I kategorije poreklom od svinja farmskog uzgoja, telesne mase između 110 i 115 kg. Meso je usitnjeno na mašini za mlevenje promera 4 mm i ispunjavalo je kriterijume kvaliteta za usitnjeno meso sa manje masti prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa („Službeni glasnik RS“, br. 50/2019). Odnosno, sadržaj masti iznosio je ≤ 7%, odnos kolagena i proteina bio je ≤ 12%, a sadržaj soli manji od 1%. Sadržaj proteina ovog mesa bio je minimalno 18%.

Ohlađeno i upakovano usitnjeno meso svinja je od proizvođača Industrije mesa „Đurđević“, sa sedištem u Subotištu (Pećinci, Republika Srbija), do laboratorije Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ (Novi Sad, Republika Srbija) dopremljeno poštujući hladan lanac na dan proizvodnje.

4.2. METODE

4.2.1. Potvrđivanje izolata *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*

4.2.1.1. Potvrđivanje izolata patogenih bakterija MALDI-TOF masenom spektrometrijom

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) masena spektrometrija izvršena je upotrebom Microflex BioTyper spektrometra (Bruker Daltonics, Nemačka) opremljenim azotnim laserom pod kontrolom operativnog sistema Flexcontrol ver. 3.4 (Bruker Daltonics, Nemačka) na svim izolatima *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* primenom dve metode (metodom direktnog transfera kolonija na ploču i metodom proteinske ekstrakcije).

Metoda direktnog transfera kolonija na ploču: Upotrebom sterilnog štapića bakterijske kulture su nanešene, u tanke filmove, na nosač, odnosno poliranu, čeličnu pločicu sa 96 mesta (Bruker Daltonics GmbH, Lajpcig, Nemačka). Ovako nanešene bakterijske kulture su ostavljene na sobnoj temperaturi u trajanju od jedne minute da se osuše. Potom je, na osušenu bakterijsku kulturu nanešen 1 µl matrice koja se sastoji od rastvora zasićene α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (Bruker Daltonics, Nemačka) u 50% acetonitrila (Sigma-Aldrich, Nemačka) i 2,5% trifluorosirćetne kiseline (Sigma-Aldrich, Nemačka). Ovako pripremljena pločica je ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se postigla kokristalizacija između uzorka (bakterijskog izolata) i matrice, a zatim bila podvrgnuta ispitivanju.

Metoda proteinske ekstrakcije: Bakterijska kultura je suspendovana u 300 µl destilovane vode do gustine jednake 2 McFarland standarda. Potom je dodato 900 µl etanola. Pripremljena suspenzija je zatim dobro izvortexirana i centrifugirana 2 minute na $20\,000 \times g$. Supernatant je odbačen, dok se preostali talog sušio na 55 °C 30 minuta. Zatim je dodato 50 µl formalne kiseline i pipetom dobro promešano. U ovo je dodato još i 50 µl acetonitrila i centrifugirano 2 minute na $20\,000 \times g$. Supernatant u količini od 1 µl je prenešen na pločicu i ostavljen 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se osušio. Na osušen supernatant doliven je rastvor matrice (1,5 µl), kao u proceduri opisanoj za direktan transfer kolonija na ploču.

Spektri su snimljeni u opsegu molekulskih masa od 2 do 20 kDa upotrebom Auto Execute akumulirajući 240 laserskih impulsa (laserska frekvencija 60 Hz; izvor jona prvog napon 19,9 kV; izvor jona drugog napon 18,53 kV; napon sočiva 6 kV) stečenih sa 30% do 40% od maksimalne laserske moći.

Dobijeni spektri su potom upoređivani sa bazom podataka integrisanog softvera koji iskazuje identifikaciju i logaritamsku vrednost rezultata između 0,00 i 3,00. Vrednosti iznad 2,0 predstavljaju visok nivo identifikacije (+++), odnosno identifikaciju na nivou vrste. Vrednosti između 1,70 i 1,99 predstavljaju identifikaciju na nivou roda (++) , dok se vrednosti ispod 1,69 smatraju nedovoljnim za identifikaciju (-) (Anderson i sar., 2012; Pavlović i sar., 2013).

4.2.1.2. Potvrđivanje izolata *Salmonella Enteritidis* i *Salmonella Typhimurium* upotrebom real-time PCR metode

Primenom *real-time* PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) metode izvršena je detekcija genoma četiri izolata *S. Enteritidis* i četiri izolata *S. Typhimurium* upotrebom prajmera i proba (Metabion, Nemačka) njihovih genskih regiona prema autorima Maurischat i sar. (2015). Za ciljanu sekvencu *safA* gena (*S. Enteritidis*) upotrebljeni su nizvodni prajmer GGT TGC TAA CAC GAC ACTG, uzvodni prajmer TGG GGC ATT GGT ATC AAA G i fluorescentna proba 5'-FAM-CTC CTC CCA TTC CAC ATT TGC G-BHQ1-3', dok su za ciljanu sekvencu *fliA*-IS200 gena (*S.*

Typhimurium) upotrebljeni nizvodni prajmer CAT TAC ACC TTC AGC GGT AT, uzvodni prajmer CTG GTA AGA GAG CCT TAT AGG i fluorescentna proba 5'-HEX-CGG CAT GAT TAT CCG TTT CTA CAG AGG-BHQ1-3'.

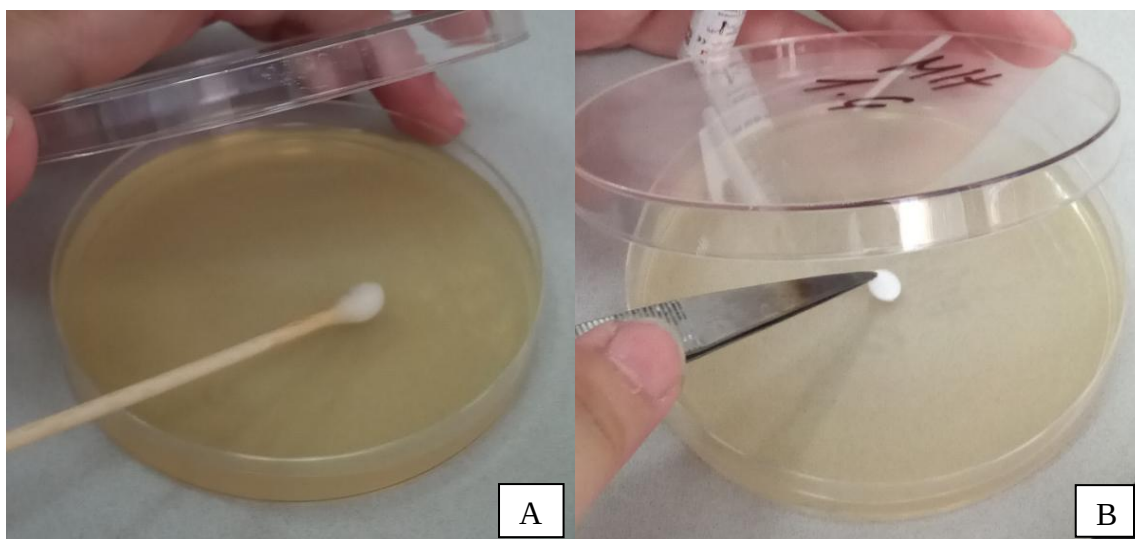
Metoda *real-time* PCR izvršena je primenom ukupne količini reakcione smeše od 25 μ l ($2 \times$ Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), po 400 nM svakog prajmera, po 250 nM svake probe i 2 μ l pročišćene dezoksiribonukleinske kiseline (DNK)). Protokol se sastojao od aktivacije DNK polimeraze na 95 °C u trajanju od 3 minute, nakon čega je usledilo 45 ciklusa (denaturacije na temperaturi od 95 °C tokom 15 sekundi i produženja na temperaturi od 61 °C tokom 30 sekundi) (Dmitrić i sar., 2018). Nivo emisije fluorescencije analiziran je upotrebom softvera *real-time* PCR aparata (Stratagene Mx3005P PCR System, Agilent Technologies, SAD).

4.2.2. Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja

Etarska ulja su analizirana primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). GC-MS analize su izvedene na gasnom hromatografu GC 7890B opremljenim sa kapilarnom kolonom HP-5MS (30 m $\times$ 0,25 mm, debljina filma 0,25 μ m) i maseno spektrometrijskim detektorom MSD 5977A (Agilent Technologies, SAD). Kao gas nosač korišćen je helijum visoke čistoće (99,999%) sa protokom od 1 ml/min. Hromatografisanje je izvedeno primenom sledećeg temperaturnog programa: temperatura injektora 250 °C, početna temperatura kolone od 70 °C održavana je 2 minute, nakon čega je sledio porast temperature brzinom od 4 °C/min do konačne temperature od 220 °C koja je održavana narednih 10 minuta. Maseni spektri su snimani u SCAN režimu, u opsegu od 50 do 450 m/z i pri energiji jonizacije od 70 eV. Uzorci EO su rastvoreni u heksanu (1:10 v/v) i 1 μ l rastvora je injektovan pri split odnosu 1:80. Identifikacija komponenti EO izvršena je poređenjem njihovih masenih spektara sa masenim spektrima baze podataka (Wiley 10th & NIST 2011 MS Library), kao i retencionih indeksa sa literaturnim podacima (Davies, 1990; Adams, 2007). Linearni retencionni indeksi (RI) su određeni u odnosu na homologi niz *n*-alkana. Relativni udeli komponenti određeni su na osnovu površina pikova metodom normalizacije. Analize su izvedene u dva ponavljanja i prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost.

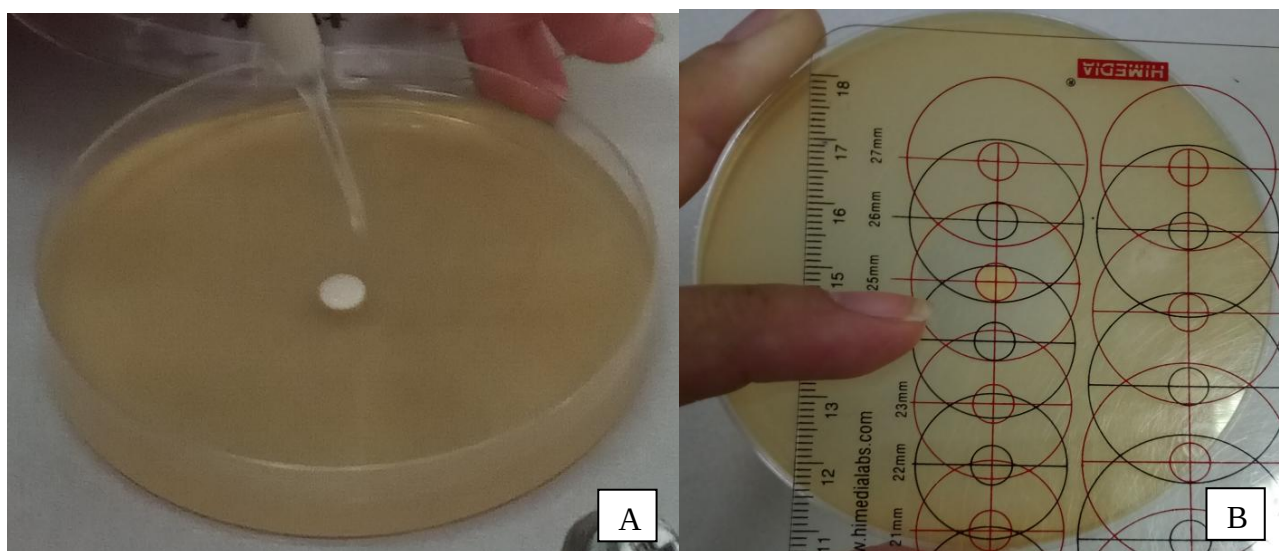
4.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja na izolate *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* primenom disk difuzione metode

Disk difuziona metoda (CLSI, 2012a) je primenjena za ispitivanje osetljivosti bakterijskih izolata na izabrana EO. Bakterijski izolati su najpre presejani na hranljivi agar (Biokar Diagnostics, Bove, Francuska), a potom čuvani na 4 °C i presejavani nedeljno na sveže kose hranljive agare do završetka primene disk difuzione metode. Za pripremu inokulata korišćen je sterilni fiziološki rastvor (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbaj, Indija) i 24 h bakterijske kulture. Suspenzija inokulata je podešena do gustine jednake 0,5 McFarland (DEN-1, Biosan, Latvija) standardu, sa finalnom koncentracijom od 1 do 2×10^8 CFU/ml. U ovu suspenziju uronjen je sterilni pamučni bris, a potom je višak tečnosti oceden lakim pristiskom o zid epruvete. Gustim potezima brisa u tri smeru, rotirajući ploče za 60°, jednako je raspoređen inokulum po celoj površini Mueller Hinton agara (MHA) (Biokar Diagnostics, Bove, Francuska), sa završnim potezom po obodu agara uz rub Petri ploče (Slika 4.1.A). Na ovaj način se postiže ravnomerna raspoređenost mikroorganizama po površini MHA. Ploče su ostavljene 3 do 5 minuta na sobnoj temperaturi, a ne duže od 15 minuta, kako bi agar absorbovao inokulum. Sterilni papirni filter diskovi (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbaj, Indija) prečnika 6 mm su postavljeni na MHA ploče, po jedan na centar, sterilnom pincetom (Slika 4.1.B).



Slika 4.1. Nanošenje suspenzije inokulata na Mueller Hinton agar (A). Nanošenje papirnog filter diska na Mueller Hinton agar (B).

Na diskove je nanešeno 5 i 10 μl EO (Slika 4.2.A). Kao negativna kontrola korišćeni su sterilni diskovi bez EO. Ploče su, bez prevrtanja, inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 časa, a potom je izmerena zona oko diska bez vidljivog rasta mikroorganizama plastičnim lenjirom u milimetrima (mm) (Slika 4.2.B). Bakterijski izolati su klasifikovani prema dijimetru zona inhibicije (ZI), i to kao: neosetljivi (-) za dijametar manji od 8 mm; osetljivi (+) za dijametar između 9 i 14 mm; veoma osetljivi (++) za dijametar od 15 do 19 mm; i izuzetno osetljivi (+++) za dijametar veći od 20 mm (Ponce i sar., 2003). Ispitivanje je izvedeno u triplicatu.

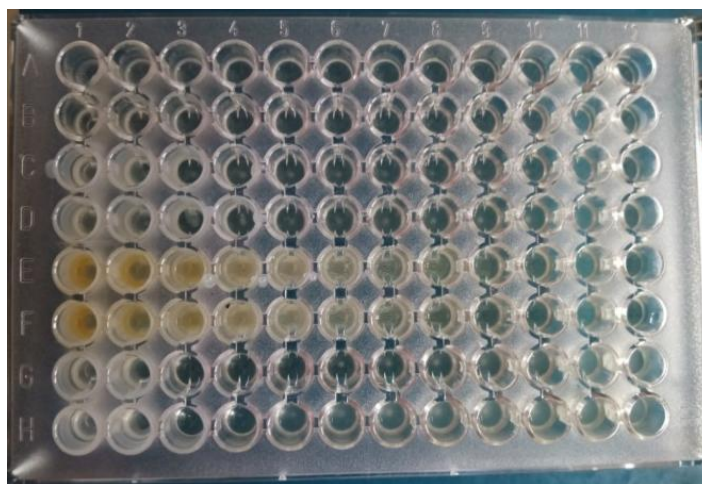


Slika 4.2. Nanošenje etarskog ulja na papirni filter disk (A). Merenje zone inhibicije (B).

4.2.4. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih baktericidnih koncentracija etarskih ulja primenom mikrodilucione metode.

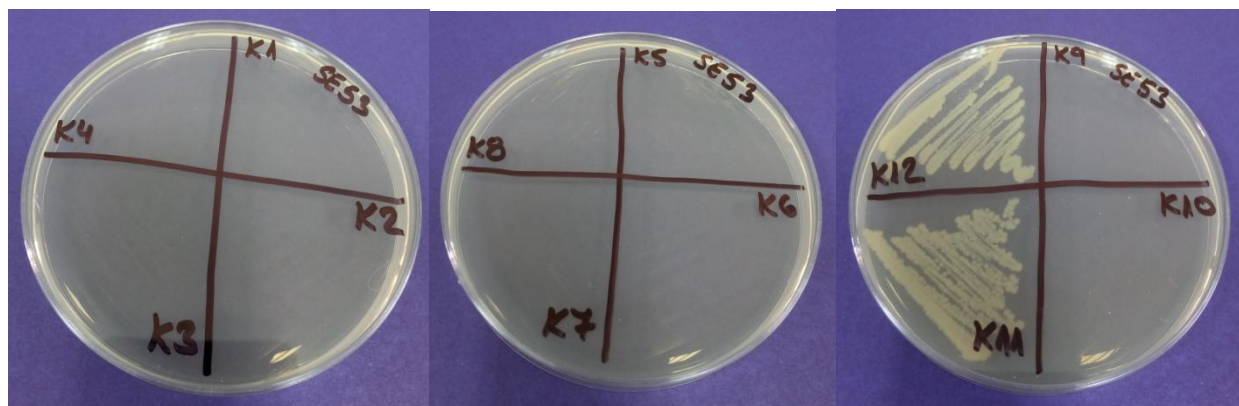
Etarska ulja i bakterijski izolati, kod kojih su zapažene inhibitorne zone, su podvrgnuti daljim ispitivanjima u cilju utvrđivanja minimalnih inhibitornih (MIC) i minimalnih baktericidnih (MBC)

koncentracija modifikovanom metodom prema CLSI (2012b) i Kocić-Tanackov i sar. (2017). U testu su korišćene sterilne mikrotitar ploče sa 96 udubljenja U oblika i poklopcem (Nuova Aptaca SRL, Kaneli, Italija). Sva udubljenja su inokulisana sa 100 μ l Muller Hinton bujona (MHB) (Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo). Prema prethodno napravljenoj šemi, ispitivano EO (100 μ l) je inokulisano u prvo udubljenje. Laganim mešanjem mikropipetom i prenošenjem 100 μ l u sledeća udubljenja pravljena su razređenja 1:1 do kolone broj 12. Iz poslednjeg udubljenja je odbačeno 100 μ l. Na ovaj način se dobijaju razređenja od 454,54 do 0,22 μ l/ml. U svako udubljenje je inokulisana suspenzija ispitivanog mikroorganizma (10^8 CFU/ml) u količini od 10 μ l. Zavisno od preliminarnih rezultata, EO cimeta, karanfilića, origana, timijana i vreska su dodatno razređena u 10% dimetil sulfoksidu (DMSO) (Lach-Ner sro, Češka Republika), odnosno u 50% (EO origana). Pozitivna kontrola je postavljena upotrebom MHB i bakterijske suspenzije, dok je negativna kontrola postavljena upotrebom MHB i EO. Kontrole su postavljene i sa DMSO u količinama koje su odgovarale testiranim. Mikrotitar ploče su potom inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 časa (Slika 4.3).



Slika 4.3. Prikaz mikrotitar ploče nakon inkubacije.

Nakon inkubacije, sterilnom ezom, sadržaj iz svakog udubljenja je zasejan na MHA i inkubiran na 37 °C 24 časa. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta mikroorganizama je definisana kao MBC, dok je MIC ona gde se uočava slab rast mikroorganizama (Slika 4.4). Test je rađen u duplikatu.



Slika 4.4. Prikaz minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije etarskog ulja karanfilića izolata *Salmonella* Enteritidis SE53.

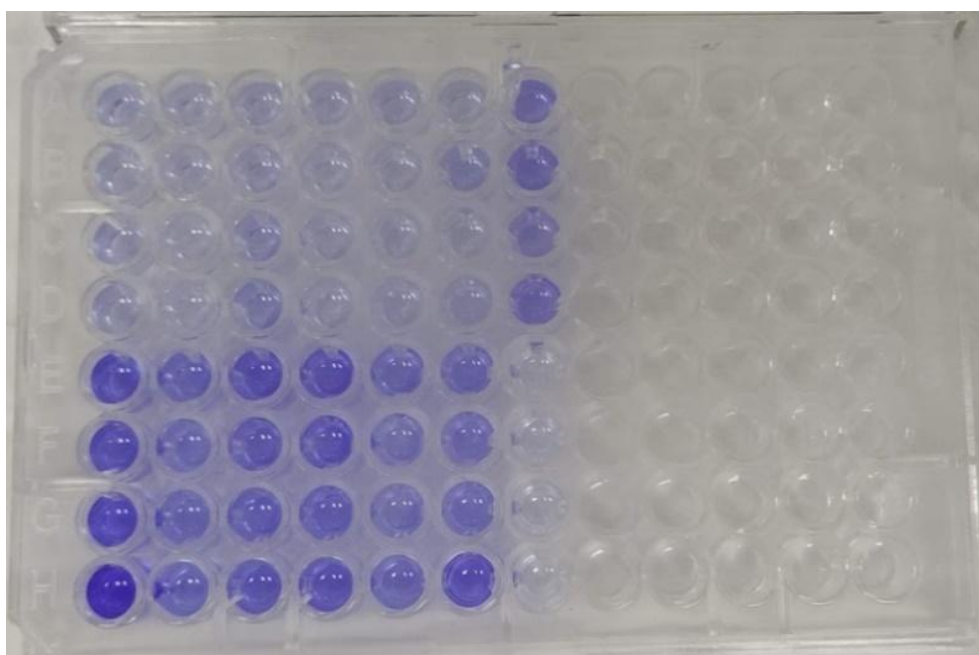
4.2.5. Utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma ispitivanih vrsta bakterija

4.2.5.1. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma na polistirenskim mikrotitar pločama

Utvrđivanje sposobnosti ispitivanih izolata patogenih bakterija da formiraju biofilme sprovedeno je primenom indirektno kvantitativne metode na mikrotitar pločama upotrebom kristal violet testa (Prunić, 2017) uz modifikacije.

Jedna do dve jasno formirane tipične kolonije ispitivanih izolata su sa XLD, ALOA ili CIN agara sterilnom ezom inokulisane u 3 ml tripton soja bujonu (TSB) (Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo) i inkubirane tokom 24 časa na temperaturi od 37 ± 1 °C. Nakon homogenizacije ove suspenzije 100 µl je inokulisano u 3,9 ml sveže pripremljene tri vrste hranljivih podloga: TSB, mesni bujon (MB) (Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo) i Luria Bertani (LB) bujon bez soli (Oxoid, Bejzingstouk, Ujedinjeno Kraljevstvo). Na ovaj način dobijeno je razređenje u odnosu 1:40 u odgovarajućem bujonu za dalje ispitivanje.

Za ispitivanje su korišćene sterilne polistirenske mikrotitar ploče (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) sa 96 udubljenja ravnog dna i sa sterilnim poklopcem. Prema prethodno pripremljenoj šemi u udubljenja je inokulisano po 200 µl pripremljene određene bakterijske kulture u odgovarajućem bujonu (TSB, MB i LB). Negativne kontrole su predstavljala udubljenja inokulisana samo sa bujonom. Nakon inkubacije na temperaturama 37 ± 1 °C, 15 ± 1 °C i 5 ± 1 °C tokom 48 časova, udubljenja su ispražnjena pipetiranjem, a potom isprana tri puta sa 250 µl sterilnog fiziološkog rastvora. Energičnim protresanjem ploče uklonjen je i ostatak sadržaja, nakon čega su ploče ostavljene na sobnoj temperaturi da se osuše u obrnutom položaju. Preostale, vezane, bakterije su potom fiksirane sa 250 µl 96% etanola (Reahem, Srbobran, Republika Srbija) tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena sadržaj iz udubljenja je uklonjen pipetiranjem. Bojenje u trajanju od 20 minuta je izvršeno dodavanjem 250 µl 0,3% rastvora kristal violeta (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemačka) u fiziološkom rastvoru sa dodatkom 1% alkohola u cilju boljeg rastvaranja. Višak boje uklonjen je ispiranjem ploča pod laganim mlazom tekuće vode. Nakon sušenja ploča na sobnoj temperaturi, boja vezana za bakterije je rastvorena dodavanjem 250 µl 96% etanola (Slika 4.5). Intenzitet boje izmeren je nakon 5 minuta na čitaču ASYS Expert Plus Microtitration Reader (Biochrom, Kembridž, Velika Britanija) upotrebom filtera talasne dužine 550 nm.



Slika 4.5. Prikaz mikrotitar ploče u fazi rastvaranja kristal violet boje.

Svi bakterijski izolati su klasifikovani u kategorije na osnovu srednje vrednosti izmerenih optičkih gustina (eng. *Optical Density* – OD) (Tabela 4.2). Granična vrednost OD_C (*Cut-off*) definisana je kao tri standardne devijacije iznad srednje vrednosti OD negativne kontrole. Za sve bakterijske izolate test je rađen u triplicatu sa po četiri ponavljanja.

Tabela 4.2. Prikaz kriterijuma za klasifikaciju ispitanih izolata kao biofilm producera (Stepanović i sar., 2007).

Kriterijumi	Klasifikacija biofilm producera
$OD > (4 \times OD_C)$	Jaki
$(2 \times OD_C) < OD \leq (4 \times OD_C)$	Umereni
$OD_C \leq OD \leq (2 \times OD_C)$	Slabi
$OD \leq OD_C$	Ne produkuju biofilm

4.2.5.2. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma na nerđajućem čeliku

Za utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilмова na nerđajućem čeliku izabran je po jedan izolat, kao predstavnik od svake grupe patogenih bakterija (SE144, ST28, UB2-01-2 (1) i Y9). Korišćeni su kuponi nerđajućeg čelika (SS 304) veličine $1 \times 1 \times 0,1$ cm. Prethodno su kuponi prokuvani u rastvoru deterdženta tokom 15 minuta i isprani destilovanom vodom. Ovako pripremljeni kuponi čuvani su u 96% etanolu do početka ispitivanja, kada je izvršeno njihovo opaljivanje na plamenu i postavljanje u udubljenja sterilne polistirenske ploče (Thermo Fisher Scientific, Koreja) sa 12 udubljenja. Suspenzije izabranih izolata pripremljene su na način opisan u Poglavlju 4.2.5.1. Na površinu kupona je inokulisana suspenzija ispitivanog izolata u količini od 100 μ l (Slika 4.6).



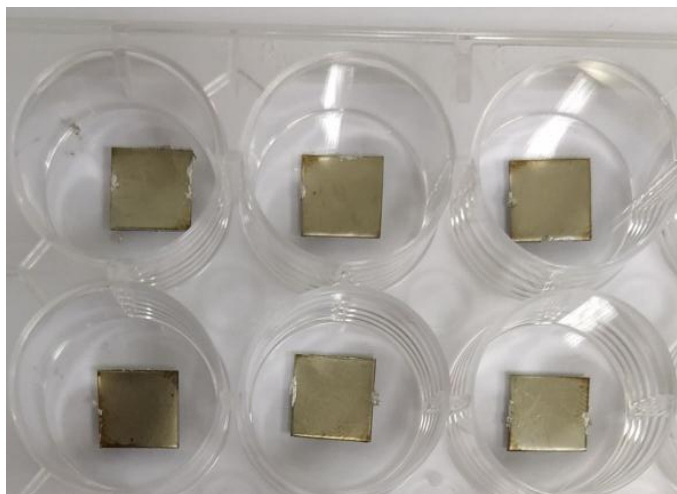
Slika 4.6. Prikaz površine kupona nerđajućeg čelika inokulisane suspenzijom izolata *Salmonella* Typhimurium ST28 u količini od 100 μ l.

Adherencija bakterijskih ćelija omogućena je inkubacijom na 37 ± 1 °C tokom 3 časa, nakon čega su kuponi isprani sa 3 ml sterilnog fiziološkog rastvora. U svako udubljenje sa kuponom dodato je 2 ml LB bujona i izvršeno inkubiranje na temperaturi od 37 ± 1 °C tokom 24 časa (Slika 4.7).



Slika 4.7. Prikaz kupona nerđajućeg čelika u Luria Bertani bujonu nakon inkubacije (levo – sa inokulisanim izolatom *Salmonella* Typhimurium ST28; desno – samo Luria Bertani bujon).

Po završetku inkubacionog perioda kuponi su isprani po tri puta sa sterilnim fiziološkim rastvorom u cilju uklanjanja slobodnih bakterijskih ćelija. Fiksiranje kupona izvršeno je potapanjem istih u 4% rastvor glutaraldehida (Centrohem, Republika Srbija) tokom noći na 5 ± 1 °C. Dvostruko ispiranje kupona sterilnim fiziološkim rastvorom prethodilo je potapanju kupona u rastuće koncentracije etanola (30%, 50%, 60%, 70% i 90%) po 5 minuta. Kuponi su dodatno potapani u 96% etanol tri puta po 10 minuta, a potom ostavljeni da se osuše. Pre mikroskopiranja kuponi su napareni zlatom (Slika 4.8) na uređaju Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN (WD = 50 mm, za 90 s, struja 30 mA) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV (napon ubrzanja 25 KV na WD od 20 do 8 mm).



Slika 4.8. Kuponi nerđajućeg čelika napareni zlatom.

4.2.6. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirane biofilmove izolata *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*

Kako bi se izvršilo ispitivanje uticaja EO na formirane biofilmove isti su formirani u sterilnim polistirenskim mikrotitar pločama (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) sa 96 udubljenja ravnog dna. U udubljenja je inokulisano po 200 µl pripremljene određene bakterijske kulture u ispitivanom bujonu (TSB, MB i LB bujon). Inkubacija je izvršena na temperaturama 37 ± 1 °C i 15 ± 1 °C u trajanju od 48 časova, nakon čega su udubljenja ispražnjena pipetiranjem. Potom je izvršeno ispiranje

udubljenja fiziološkim rastvorom ($3 \times 250 \mu\text{l}$) kako bi se uklonile nevezane bakterije. Biofilmovi su zatim tretirani MBC etarskih ulja, tako što je po $200 \mu\text{l}$ određenog rastvora EO dodato u udubljenja (Orhan-Yanikan i sar., 2019). Ovako pripremljene ploče su inkubirane 48 časova na temperaturama $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije izvršeno je ispiranje udubljenja i bojenje 0,3% rastvorom kristal violeta (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemačka) tokom 20 minuta. Višak boje uklonjen je ispiranjem ploča pod laganim mlazom tekuće vode. Nakon sušenja ploča na sobnoj temperaturi boja vezana za bakterije je rastvorena dodavanjem $250 \mu\text{l}$ 96% etanola. Intenzitet boje izmeren je nakon 5 minuta na čitaču ASYS Expert Plus Microtitration Reader (Biochrom, Kembridž, Velika Britanija) upotrebom filtera talasne dužine 550 nm. Test je rađen u triplikatu sa po četiri ponavljanja, a procena inhibicije u procentima (%) izvršena je primenom formule (Schillaci i sar., 2008):

$$\frac{\text{OD kontrola} - \text{OD uzorak}}{\text{OD kontrola}} \times 100$$

gde je:

OD kontrola – srednja vrednost izmerenih OD formiranih biofilmova;

OD uzorak – srednja vrednost izmerenih OD nakon tretiranja biofilmova EO.

4.2.7. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na mikromorfološke promene izolata bakterija

Bakterijski izolati pripremljeni su na način opisan u Poglavlju 4.2.5.2. do dela kada je omogućena adhezija bakterijskih ćelija na kupone nerđajućeg čelika, nakon čega je pipetiranjem uklonjen LB bujon i nevezane ćelije iz svakog udubljenja. Ispiranje kupona izvršeno je sterilnim fiziološkim rastvorom. Rastvori odabranih EO (MIC vrednosti) su dodati u udubljenja, a ploče inkubirane na $37 \pm 1^\circ\text{C}$ tokom 24 časa. Ispiranje, fiksiranje, dehidracija, naparavanje zlatom i posmatranje SEM izvršeno je prema opisu iz Poglavlja 4.2.5.2.

4.2.8. Primena odabranih etarskih ulja na modelu usitnjenog mesa svinja kontaminiranog odabranim izolatima bakterija

Usitnjeno meso svinja (Slika 4.9) prethodno je ispitano na prisustvo patogenih mikroorganizama *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579-1, 2017), *L. monocytogenes* (SRPS EN ISO 11290-1, 2017) i *Y. enterocolitica* (SRPS EN ISO 10273, 2017). Dodatno, izvršeno je određivanje broja aerobnih mezofilnih kolonija, *Escherichia coli* i *Enterobacteriaceae*.



Slika 4.9. Usitnjeno meso svinja spremno za veštačku kontaminaciju ciljanim mikroorganizmima.

Četiri izolata patogenih bakterija (SE53, ST35, UB2-01-2 (1) i Y4/1) i dva EO (origana i timijana), koja su pokazala najjača antibakterijska dejstva u prethodnim ispitivanjima, izabrana su za primenu na modelu usitnjenog mesa svinja u cilju ispitivanja mikrobiološkog statusa (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Prikaz grupa uzoraka formiranih za mikrobiološka ispitivanja.

Redni broj	Sadržaj
1.	Sveže usitnjeno meso svinja
2.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana MIC (0,04 µl/g) + SE53
3.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana MIC (0,09 µl/g) + ST35
4.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana MIC (0,18 µl/g) + UB2-01-2 (1)
5.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana MIC (0,09 µl/g) + Y4/1
6.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana 2MIC (0,08 µl/g) + SE53
7.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana 2MIC (0,18 µl/g) + ST35
8.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana 2MIC (0,36 µl/g) + UB2-01-2 (1)
9.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana 2MIC (0,18 µl/g) + Y4/1
10.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana MIC (0,23 µl/g) + SE53
11.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana MIC (0,23 µl/g) + ST35
12.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana MIC (0,36 µl/g) + UB2-01-2 (1)
13.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana MIC (0,23 µl/g) + Y4/1
14.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana 2MIC (0,46 µl/g) + SE53
15.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana 2MIC (0,46 µl/g) + ST35
16.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana 2MIC (0,72 µl/g) + UB2-01-2 (1)
17.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana 2MIC (0,46 µl/g) + Y4/1
18.	Sveže usitnjeno meso svinja + SE53
19.	Sveže usitnjeno meso svinja + ST35
20.	Sveže usitnjeno meso svinja + UB2-01-2 (1)
21.	Sveže usitnjeno meso svinja + Y4/1

Veštačka kontaminacija uzoraka izvršena je ciljanim patogenim mikroorganizmima (ca. $10^4 - 10^5$ CFU/g), a odabrana EO dodata su u koncentracijama MIC i 2MIC.

Pored toga, formirano je 10 grupa uzoraka (Tabela 4.4) u svrhu ispitivanja uticaja EO origana i timijana na modelu usitnjenog mesa svinja na senzorske parametre.

Tabela 4.4. Prikaz grupa uzoraka formiranih za senzorska ispitivanja.

Redni broj	Sadržaj
1.	Sveže usitnjeno meso svinja
2.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana u koncentraciji od 0,04 µl/g
3.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana u koncentraciji od 0,08 µl/g
4.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana u koncentraciji od 0,09 µl/g
5.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana u koncentraciji od 0,18 µl/g
6.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO origana u koncentraciji od 0,36 µl/g
7.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana u koncentraciji od 0,23 µl/g
8.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana u koncentraciji od 0,36 µl/g
9.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana u koncentraciji od 0,46 µl/g
10.	Sveže usitnjeno meso svinja + EO timijana u koncentraciji od 0,71 µl/g

Homogenizacija je izvršena mešanjem sterilnim staklenim štapićem. Svi uzorci su do ispitivanja čuvani u frižideru na temperaturi 4 ± 1 °C. Praćenje mikrobiološkog statusa (određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija, određivanje broja *Enterobacteriaceae*, određivanje broja β-glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* i određivanje broja ciljanih mikroorganizama: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*) i senzorskih parametara vršeno je 0., 1., 2., 3. i 4. dana.

4.2.8.1. Mikrobiološka ispitivanja uzoraka

Početna suspenzija pripremljena je dodavanjem 90 ml pepton slanog rastvora (Biokar Diagnostics, Bove, Francuska) u stomaher kesu sa 10 g uzorka i homogenizovanjem tokom 2 minute u *Stomacher* homogenizatoru (Mayo International SRL, Italija). Dalja decimalna razblaženja pravljena su prebacivanjem 1 ml suspenzije u 9 ml slanog peptonskog rastvora ([SRPS EN ISO 6887-1, 2017](#)). Iz decimalnih razblaženja izvršeno je zasejavanje podloga prema standardnim mikrobiološkim metodama. Sva ispitivanja su izvršena u triplikatu sa po dva ponavljanja.

Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija izvršeno je prema standardnoj metodi Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – Deo 1: Brojanje kolonija na 30 °C tehnikom nalivanja ploče ([SRPS EN ISO 4833-1, 2014](#)). Ukratko 1 ml od svakog decimalnog razblaženja prenet je u sterilne Petrijeve ploče, u duplikatu. U svaku Petrijevu ploču naliveno je oko 12 do 15 ml agara za ukupan broj mikroorganizama (eng. *Plate Count Agar* – PCA, CM0325, Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) na temperaturi od 44 °C do 47 °C.

Inokulat je pažljivo izmešan sa podlogom kružnim pomeranjem Petrijeve ploče u horizontalnoj ravni. Ostavljanjem Petrijevih ploča na hladnoj horizontalnoj površini omogućeno je očvršćavanje smeše. Potom je izvršeno obrtanje i inkubiranje ploča na 30 °C tokom 72 ± 3 časa.

Određivanje broja *Enterobacteriaceae* izvršeno je prema standardnoj metodi Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* – Deo 2: Tehnika brojanja kolonija (SRPS EN ISO 21528-2, 2017). Naime, 1 ml od svakog decimalnog razblaženja prenet je u sterilne Petrijeve ploče, u duplikatu. U svaku Petrijevu ploču naliveno je oko 15 ml VRBG agara (eng. *Violet Red Bile Glucose*, CM1082, Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) temperature od 47 °C do 50 °C. Pažljivim kružnim pokretima na horizontalnoj površini inokulat je izmešan sa podlogom i ostavljen da očvrstne. Dodatnim nalivanjem 5 do 10 ml VRBG agara postignuti su poluanaerobni uslovi i sprečavanje širenja kolonija. Nakon očvršćavanja ploče su, u obrnutom položaju, inkubirane na 37 °C tokom 24 ± 2 časa. Po inkubiranju izvršeno je brojanje karakterističnih ružičastih do crveno ljubičastih kolonija i njihovo potvrđivanje biohemijskim testovima (oksidaza test i fermentacija glukoze).

Određivanje broja β -glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* izvršeno je prema standardnoj metodi Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja β -glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* – Deo 2: Tehnika brojanja kolonija na 44 °C pomoću 5-bromo-4-hloro-3-indolil β -D-glukuronida (SRPS ISO 16649-2, 2008). Jedan ml decimalnih razblaženja prelišen je sa 15 ml tripton-žuč-glukuronid agara (eng. *Tryptone Bile X-glucuronide medium* – TBX, CM0945, Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) temperature 44 °C do 47 °C. Kružnim pokretima izvršeno je mešanje inokulata sa podlogom, nakon čega su iste ostavljene da očvrstnu. Ploče su inkubirane na 44 °C tokom 18 do 24 časa u obrnutom položaju.

Određivanje ciljanih mikroorganizama izvršeno je inokulacijom 0,1 ml razblaženja na selektivne podloge. Određivanje broja *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* izvršeno je na XLD agaru, *L. monocytogenes* na ALOA agaru, a *Y. enterocolitica* na CIN agaru.

Potvrđivanje dobijenih kolonija ciljanih mikroorganizama izvršeno je biohemijskim i drugim potvrdnim testovima prema odgovarajućim ISO standardima (SRPS EN ISO 6579-1, 2017; SRPS EN ISO 11290-2, 2017; SRPS EN ISO 10273, 2017).

Izračunavanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* izvršeno je prema SRPS EN ISO 7218 (2008), a rezultati su izraženi u $\log_{10}$ CFU/g.

Uzimajući u obzir da je limit detekcije 1 log CFU/g (10 CFU/g) vrednosti manje od 1 log CFU/g, a veće od 0 log CFU/g ukazuju na to da je ustanovljen broj navedenih mikroorganizama u jednom ili više ponavljanja.

4.2.8.2. Senzorska svojstva

Senzorska svojstva, odnosno ocena mirisa koji ukazuje na kvar i diskoloracije, praćena su kod uzoraka usitnjenog mesa svinja, usitnjenog mesa svinja sa EO origana ili timijana u količinama MIC i 2MIC. Ispitivanja su izvršena u triplikatu.

Prema Hedonskoj skali od 5 tačaka (Tabela 4.5) izvršeno je ocenjivanje uzoraka od strane šest obučanih ocenjivača sa Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ (Novi Sad, Republika Srbija) u prostorijama Odeljenja za mikrobiološka i senzorska ispitivanja namirnica projektovanim prema zahtevima standarda SRPS EN ISO 8589 (2015).

Tabela 4.5. Prikaz parametara senzorskih osobina, njihov opis i bodovanje.

Parametar	Opis	Broj bodova
Miris (odnosi se na intenzitet mirisa koji ukazuje na kvar)	nema	1
	neznatno	2
	malo	3
	umereno	4
	izuzetno	5
Diskoloracija (odnosi se na % diskoloracije prisutne na površini uzorka)	nema	1
	0 – 10%	2
	11 – 20%	3
	21 – 60%	4
	61 – 100%	5

4.2.9. Primena DMFit programa u cilju izrade Baranyi i Robertovog modela

Matematički modeli predviđanja ponašanja patogenih bakterija *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* pod uticajem EO origana i timijana na modelu usitnjenog mesa svinja izvedeni su upotrebom *DMFit* programa verzije 3.5, koji predstavlja dodatak *Microsoft Excel*-a, razvijenog na Institutu za ispitivanje hrane u Velikoj Britaniji (Institute of Food Research, Norič, Ujedinjeno Kraljevstvo). Upotrebom prethodno dobijenih mikrobioloških rezultata (log CFU/g) i vremena (h) dobija se Baranyi i Robertov model rasta. Validacija ovog modela izvršena je na osnovu dva parametra, i to koeficijenta determinacije (R^2) i standardne greške (SE).

4.2.10. Statistička obrada dobijenih rezultata i njihova uporedna analiza

Prikazivanje i analiza rezultata istraživanja izvršeni su upotrebom *Microsoft Excel 2010* sa dodatkom *Data Analysis* i upotrebom statističkog softvera *R version 3.2.2* (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija). Rezultati su prikazani tabelama i grafikonima, kojima je prethodila statistička obrada podataka, kada su korišćeni deskriptivni statistički pokazatelji i ispitivanje značajnosti između tretmana upotrebom ANOVA (*Analysis of Variance*) i *Duncan* testa na nivou $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. POTVRDA IZABRANIH IZOLATA *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, *LISTERIA MONOCYTOGENES* I *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

5.1.1. Potvrda izabranih izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom

U Tabeli 5.1 su prikazane najbolje vrednosti rezultata dobijenih direktnim transferom kolonija na ploču i primenom proteinske ekstrakcije u pripremi izolata za MALDI-TOF MS, dok su spektri dobijeni nakon proteinske ekstrakcije svih ispitanih izolata prikazani u Prilogu A.

Tabela 5.1. Rezultati MALDI-TOF masene spektrometrije.

Metoda	Direktni transfer kolonija		Proteinska ekstrakcija	
Oznaka uzorka	Identifikacija	Rezultat*	Identifikacija	Rezultat*
SE53	<i>Salmonella</i> sp.	1,86	<i>Salmonella</i> sp.	2,18
SE56	Identifikacija nije moguća	0,00	<i>Salmonella</i> sp.	2,30
SE132	<i>Salmonella</i> sp.	2,15	<i>Salmonella</i> sp.	2,43
SE144	<i>Salmonella</i> sp.	2,19	<i>Salmonella</i> sp.	2,19
ST28	<i>Salmonella</i> sp.	1,99	<i>Salmonella</i> sp.	2,47
ST35	Identifikacija nije moguća	1,43	<i>Salmonella</i> sp.	2,24
ST48	<i>Salmonella</i> sp.	2,32	<i>Salmonella</i> sp.	2,49
ST49	<i>Salmonella</i> sp.	2,22	<i>Salmonella</i> sp.	2,49
L1	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,22	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,30
UB2-02-4 (L5)	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,08	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,27
L17	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,27	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,34
L18	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,31	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,39
UB2-01-2 (1)	Identifikacija nije moguća	1,32	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,75

Y4/1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,40	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,48
Y9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,42	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,59
Y14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,49	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,54

Legenda: *Rezultat je iskazan kao logaritamska vrednost između 0,00 i 3,00.

Primenom metode direktnog transfera kolonija nije bila moguća identifikacija tri ispitana izolata (18,75%) (-), i to po jedan izolat *S. Enteritidis* (SE56), *S. Typhimurium* (ST35) i *L. monocytogenes* (UB2-01-2 (1)). Dva izolata (12,50%), *S. Enteritidis* (SE53) i *S. Typhimurium* (ST28), su identifikovana sa niskim nivoom poverenja (++), dok je kod preostalih izolata (68,75%) utvrđen visok nivo poverenja (+++), sa ocenom > 2,08.

Proteinska ekstrakcija bakterijskih ćelija uticala je na povećanje vrednosti rezultata kod svih ispitanih izolata. Od tri izolata, koje nije bilo moguće identifikovati direktnim transferom kolonija, kod dva (SE56 i ST35) su zabeležene vrednosti rezultata > 2,00, dok je izolat UB2-01-2 (1) identifikovan kao *L. monocytogenes* sa niskim nivoom poverenja (++). Visok nivo poverenja (+++) zabeležen je kod 93,75% ispitanih izolata. Ipak, svi ispitani izolati *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* identifikovani su samo do nivoa roda, kao *Salmonella* sp., iako su vrednosti rezultata bili visoki (> 2,18). Ovakvi rezultati su bili očekivani, s obzirom da MALDI Biotyper daje upozorenje da *Salmonella* može biti identifikovana samo do nivoa roda.

Uprkos tome, u okviru rezultata prikazana su i najbolja podudaranja ispitanih izolata sa izolatima iz baze podataka. Nakon proteinske ekstrakcije *Salmonella* sp. (Choleraesuis) 08 LAL bila je najbolje podudaranje za četiri izolata (SE53, SE56, SE144 i ST35), *Salmonella* sp. (*enterica* st Anatum) 11 LAL za tri izolata (SE132, ST28 i ST49), a *Salmonella* sp. (Typhimurium) 12 LAL za jedan izolat (ST48).

MALDI-TOF MS se pokazala kao najuspešnija kod identifikacije izolata *Y. enterocolitica*, bez obzira na metodu pripreme bakterijske kulture, sa koeficijentima pouzdanosti > 2,40.

5.1.2. Potvrda izolata *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium metodom *real-time* PCR

Rezultati ispitivanja izolata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* *real-time* PCR metodom ukazuju da su svi ispitani izolati uspešno potvrđeni (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Prikaz rezultata ispitanih izolata *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium primenom *real-time* PCR metode.

Oznaka izolata <i>S. Enteritidis</i>	Cq vrednost	Oznaka izolata <i>S. Typhimurium</i>	Cq vrednost
SE53	15,76	ST28	16,55
SE56	15,77	ST35	15,10
SE132	13,90	ST48	16,33
SE144	15,96	ST49	17,77

Ciklus u kom je moguća detekcija fluorescencije označen je kao kvantitativni ciklus (eng. *Quantitation Cycle* – Cq), odnosno prelomna vrednost. U ovom slučaju Cq iznosio je 39, a rezultati ispitivanja označeni su kao pozitivni u slučaju $Cq \leq 39$, odnosno kao negativni kada je $Cq \geq 39$.

5.2. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA

Primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) izvršena su kvalitativna i kvantitativna ispitivanja EO, čiji rezultati su predstavljeni tabelarno, dok su hromatogrami prikazani u Prilogu B.

Hemijski sastavi EO bosiljka, crnog bibera, tajlandskog đumbira, cimeta, limuna i karanfilića prikazani su u Tabeli 5.3. Kod EO bosiljka utvrđeno je prisustvo 18 različitih komponenti koje čine 100% ukupnog sastava. Rezultati pokazuju da najveći deo ovog ulja čini estragol, sa udelom od 69,52%. Nakon estragola najveći udeo ima linalol (24,77%), dok su ostale komponente zastupljene u koncentracijama nižim od 1,5%.

Hemijskom karakterizacijom EO crnog bibera utvrđeno je prisustvo 33 komponente koje čine 98,52% ukupnog sastava. Najzastupljenija komponenta bila je beta-pinen (19,31%), praćena limonenom (13,73%), sabinenom (13,55%) i alfa-pinenom (10,75%). Zastupljenost ostalih komponenti manji je od 10%.

Ukupno 15 identifikovanih komponenti čine 99,64% ukupnog sastava EO tajlandskog đumbira. Od toga su sabinen i terpinen-4-ol najzastupljenije komponente, ukupnog udela u iznosu od 38,17%, odnosno 35,90%.

Od ukupno 21 identifikovane komponente ukupnog udela od 98,96% EO cimeta, cinamaldehyd je najzastupljenija i čini 74,93%. Nakon cinamaldehyda, najveći udeo u hemijskom sastavu ispitivanog EO cimeta ima askabin (9,01%).

Etarsko ulje limuna čini 27 identifikovanih jedinjenja (98,85%). Limonen (79,72%) čini najveći udeo, praćen 3-karenom (4,11%). Zastupljenost ostalih jedinjenja bio je manji od 2%.

Hemijskom analizom EO karanfilića identifikovano je 99,50% celokupnog udela, odnosno 9 jedinjenja. Ispitano ulje bogato je eugenolom (85,14%). Po zastupljenosti drugo po redu jedinjenje jeste kariofilen, koji čini 10,20% od sume identifikovanih jedinjenja.

Tabela 5.3. Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja bosiljka (*Ocimum basilicum*) (EO1), crnog bibera (*Piper nigrum*) (EO2), tajlandskog đumbira (*Zingiber cassumunar*) (EO3), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum nees*) (EO4), limuna (*Citrus limonum*) (EO5) i karanfilića (*Syzygium aromaticum* L.) (EO6).

Redni broj	RT ¹	RI ²	Jedinjenje ³	EO1	EO2	EO3	EO4	EO5	EO6
1.	4,334	926	alfa-Tujen	-	1,82	-	-	-	-
2.	4,497	932	alfa-Pinen	-	10,75	1,13	0,89	1,41	-
3.	4,800	942	Kamfen	-	0,18	-	0,40	0,17	-
4.	5,022	950	Benzaldehid	-	-	-	4,34	-	-

5.	5,323	960	Sabinen	-	13,55	38,17	-	0,31	-
6.	5,408	963	beta-Pinen	-	19,31	8,23	0,40	1,11	-
7.	5,566	969	Sulkaton	0,04	-	-	-	-	-
8.	5,653	972	beta-Mircen	-	0,48	-	-	1,54	-
9.	5,947	982	Oktanal	-	-	-	-	0,11	-
10.	6,020	985	alfa-Felandren	-	0,36	0,11	-	-	-
11.	6,177	990	3-Karen	-	7,49	-	-	4,11	-
12.	6,327	995	alfa-Terpinen	-	8,08	1,04	-	-	-
13.	6,537	1003	p-Cimen	-	2,52	2,75	1,15	0,28	-
14.	6,653	1007	Limonen	-	13,93	0,28	0,61	79,72	-
15.	6,730	1009	1,8-Cineol	0,24	0,61	0,80	0,23	-	-
16.	7,121	1023	beta-Ocimen	0,08	-	-	-	-	-
17.	7,452	1034	gama-Terpinen	-	0,85	10,06	0,07	0,12	-
18.	8,288	1063	alfa-Terpinolen	-	0,59	0,47	-	0,45	-
19.	8,620	1075	Linalol	24,77	1,01	-	1,83	0,82	-
20.	9,620	1109	Dihidrolinalol	0,13	-	-	-	-	-
21.	9,654	1111	cis-Limonen oksid	-	-	-	-	0,32	-
22.	9,789	1115	trans-Limonen oksid	-	-	-	-	0,11	-
23.	10,018	1123	Kamfor	-	0,12	0,09	-	-	-
24.	10,284	1132	Menton	-	0,29	-	-	-	-
25.	10,381	1136	izo Borneol	-	-	-	0,25	0,09	-
26.	10,587	1143	Sirćetna kiselina fenilmetil ester	-	-	-	0,96	-	-
27.	10,855	1152	DL-Mentol	0,23	0,32	-	-	-	-
28.	11,022	1158	Terpinen-4-ol	-	1,03	35,90	0,10	-	-

29.	11,455	1173	alfa-Terpineol	1,30	0,08	0,39	-	1,47	-
30.	11,750	1183	Estragol	69,52	-	-	-	-	-
31.	11,889	1188	Dekanal	-	-	-	-	0,20	-
32.	12,338	1203	Karveol	-	-	-	-	0,10	-
33.	12,609	1213	Citronelol	-	0,23	-	-	0,07	-
34.	13,049	1228	alfa-Citral	0,22	-	-	-	1,49	-
35.	13,143	1231	Karvon	-	0,30	-	-	0,20	-
36.	13,384	1240	Kavikol	-	-	-	-	-	0,06
37.	13,457	1242	Geraniol	-	0,19	-	-	0,10	-
38.	13,994	1261	beta-Citral	0,30	-	-	-	1,75	-
39.	14,291	1271	Cinamaldehyd	-	-	-	74,93	-	-
40.	14,627	1283	Safrol	-	-	-	0,06	-	-
41.	16,519	1348	alfa-Kubeben	-	0,35	-	-	-	-
42.	16,611	1351	Citronelol acetat	-	-	-	-	0,40	-
43.	16,804	1358	Eugenol	-	0,96	-	3,10	-	85,14
44.	17,365	1378	Kopaen	-	3,74	-	-	-	0,11
45.	17,583	1385	Geranil acetat	-	-	-	-	0,10	-
46.	17,800	1393	Germakren D	-	0,23	-	-	-	-
47.	18,016	1400	Vanilin	-	-	-	0,24	-	-
48.	18,282	1409	Longifolen	-	0,98	-	-	-	-
49.	18,420	1414	alfa-Gurjunen	-	-	-	0,13	-	-
50.	18,741	1425	Kariofilen	0,32	7,15	-	0,15	1,98	10,20
51.	19,205	1441	alfa-Bergamoten	0,52	-	-	-	-	-
52.	19,456	1450	Cinamil acetat	-	-	-	0,05	-	-

53.	19,757	1460	alfa-Humulen	0,17	0,23	0,07	-	-	2,64
54.	19,835	1463	beta-Farnesen	0,18	-	-	-	-	-
55.	20,609	1490	Germakren	0,26	-	-	-	-	-
56.	21,397	1517	beta-Bisabolen	0,06	-	-	-	-	-
57.	21,835	1532	Kalamenen	-	-	0,16	-	-	-
58.	21,843	1533	delta-Kadinen	-	0,59	-	-	-	0,23
59.	21,943	1536	Acetileugenol	-	-	-	0,05	-	0,21
60.	22,398	1552	alfa-Bisabolen	1,43	-	-	-	-	-
61.	23,087	1576	p-Metoksicinamaldehyd	0,22	-	-	-	-	-
62.	23,587	1593	Kariofilen oksid	-	0,11	-	-	0,33	0,82
63.	24,335	1619	Humulen epoksid	-	-	-	-	-	0,10
64.	28,529	1764	Askabin	-	0,07	-	9,01	-	-
Suma identifikovanih jedinjenja (%)				100,00	98,52	99,64	98,96	98,85	99,50
Suma neidentifikovanih jedinjenja (%)				0,00	1,48	0,36	1,04	1,15	0,50

Legenda: ¹RT – Retenciono vreme; ²RI – Linearni retencioni indeksi; ³Zastupljenost jedinjenja izražena je u procentima (%).

Kvalitativni i kvantitativni sastavi EO fenela, mirte, origana, ruzmarina i smilja prikazani su Tabelom 5.4. Etarsko ulje fenela bogato je anetolom koji čini 88,42% udela ukupno identifikovanih jedinjenja (96,35%). Estragol (metil kavikol), iako drugi po zastupljenosti, nalazi se u znatno nižoj količini (2,97%), praćen limonenom (2,13%) i fenonom (1,24%), dok su ostale komponente zastupljene manje od 1%.

Hemijskom karakterizacijom EO lavande utvrđeno je prisustvo 31 komponente koje čine 98,05% ukupnog sastava. Linalil acetat (25,33%) i linalol (23,88%) su najzastupljenije komponente EO lavande, praćene alfa-terpinenil acetatom (12,58%) i izononil acetatom (10,05%).

Etarsko ulje mirte čini 29 identifikovanih komponenti, odnosno 95,11% ukupnog udela. Najzastupljenija komponenta jeste alfa-pinen sa 35,47%, dok je 1,8-cineol druga po redu sa 19,58%.

Od 18 identifikovanih jedinjenja EO origana, karvakrol je najdominantnije jedinjenje i čini 81,00% udela identifikovanih jedinjenja (99,87%). Nakon karvakrola slede timol sa 7,74% i kariofilen sa 6,69%.

Hemijskim ispitivanjem EO ruzmarina identifikovano je 27 jedinjenja, odnosno 99,19%. Najzastupljenija jedinjenja ispitivanog ulja su alfa-pinen (28,23%) i borneol (24,87%), praćena alfa-terpineolom (11,86%) i 1,8-cineolom (11,54%).

Analizom EO smilja utvrđeno je prisustvo 40 komponenti što predstavlja 89,62% masenog udela. Kariofilen (21,48%), neril acetat (18,15%) i beta-himahalen (13,34%) su najzastupljenije komponente.

Tabela 5.4. Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja fenela (*Foeniculum vulgare*) (EO7), lavande (*Lavandula angustifolia*) (EO8), mirte (*Myrtus communis*) (EO9), origana (*Origanum vulgare*) (EO10), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) (EO11) i smilja (*Helichrysum italicum*) (EO12).

Redni broj	RT ¹	RI ²	Jedinjenje ³	EO7	EO8	EO9	EO10	EO11	EO12
1.	4,334	926	alfa-Tujen	-	-	0,31	-	0,12	0,04
2.	4,497	932	alfa-Pinen	0,24	1,36	35,47	0,29	28,23	3,77
3.	4,800	942	Kamfen	-	0,07	0,44	0,05	3,44	0,06
4.	5,399	963	dihidro-Kamfen	0,04	-	-	-	-	-
5.	5,408	963	beta-Pinen	-	0,63	1,02	0,19	3,16	0,09
6.	5,543	968	3-Oktanon	-	0,65	-	-	-	-
7.	5,653	972	beta-Mircen	-	0,30	0,24	0,09	0,16	0,19
8.	5,740	975	3-Oktanol	-	0,15	-	-	-	-
9.	6,020	985	alfa-Felandren	-	-	-	-	0,06	0,30
10.	6,177	990	3-Karen	-	0,43	8,80	-	0,22	-
11.	6,327	995	alfa-Terpinen	-	-	0,22	-	-	-
12.	6,537	1003	p-Cimen	0,18	1,65	2,41	1,61	2,04	0,43
13.	6,653	1007	Limonen	2,13	2,72	0,56	0,14	3,43	1,48
14.	6,730	1009	1,8-Cineol	-	1,13	19,58	0,23	11,54	-
15.	7,121	1023	beta-Ocimen	-	0,04	-	-	-	-
16.	7,452	1034	gama-Terpinen	0,07	-	1,13	0,13	0,34	0,27
17.	7,850	1048	Linalol oksid	-	0,59	-	-	-	-
18.	8,288	1063	alfa-	0,05	-	0,79	-	0,36	0,45

			Terpinolen						
19.	8,308	1064	Fenon	1,24	-	-	-	-	-
20.	8,620	1075	Linalol	-	23,88	6,28	0,18	1,03	1,21
21.	8,909	1085	izo-Fenol	-	-	-	-	0,46	-
22.	9,573	1108	Limona keton	-	-	-	-	-	0,23
23.	10,018	1123	Kamfor	0,06	2,82	0,32	0,10	1,23	-
24.	10,284	1132	Menton	-	-	0,15	-	-	-
25.	10,381	1136	izo-Borneol	-	1,73	-	-	-	-
26.	10,471	1139	Borneol	-	-	-	-	24,87	-
27.	10,658	1145	endo- Borneol	-	0,12	-	-	0,31	-
28.	10,855	1152	DL-Mentol	-	-	0,27	-	-	-
29.	10,926	1155	izo-Nonil acetat	-	10,05	-	-	-	-
30.	11,022	1158	Terpinen-4- ol	-	-	0,85	-	0,65	-
31.	11,455	1173	alfa- Terpineol	-	1,71	5,02	0,24	11,86	-
32.	11,665	1180	gama- Terpineol	-	0,27	0,88	-	1,57	-
33.	11,750	1183	Estragol	2,97	-	-	-	-	-
34.	12,648	1214	Nerol	-	-	-	-	-	3,66
35.	12,823	1220	Fenil acetat	0,12		-		-	-
36.	13,143	1231	Karvon	-	-	0,42	-	-	-
37.	13,457	1242	Geraniol	-	-	0,40	-	0,45	0,08
38.	13,474	1243	Anis aldehyd	0,72	-	-	-	-	-
39.	13,574	1246	Linalil acetat	-	25,33	0,87	-	0,21	-

40.	14,525	1279	Borneol acetat	-	1,84	-	-	1,30	-
41.	14,716	1286	Timol	-	-	-	7,74	-	-
42.	14,766	1288	Anetol	88,42	-	-	-	-	-
43.	15,081	1299	Karvakrol	-	-	-	81,00	-	-
44.	15,094	1299	Limonen dioksid	-	-	1,52	-	-	-
45.	16,519	1348	alfa-Kubeben	-	-	-	-	-	0,27
46.	16,539	1349	alfa- Terpinenil acetat	-	12,58	-	-	1,23	-
47.	16,804	1358	Eugenol	-	-	0,61	-	-	0,09
48.	17,000	1365	Neril acetat	-	0,29	-	-	-	18,15
49.	17,365	1378	Kopaen	-	0,11	0,76	0,13	-	0,65
50.	17,583	1385	Geranil acetat	-	0,05	0,60	-	-	0,11
51.	17,589	1385	Anisik keton	0,10	-	-	-	-	-
52.	18,282	1409	Longifolen	-	0,06	0,88	-	0,25	0,34
53.	18,741	1425	Kariofilen	-	5,21	3,79	6,69	0,63	21,48
54.	19,011	1435	beta- Kubeben	-	-	-	-	-	0,17
55.	19,196	1441	Kumarin	-	1,43	-	-	-	-
56.	19,205	1441	alfa- Bergamoten	-	-	-	-	-	1,33
57.	19,654	1457	alfa- Himahalen	-	-	-	-	-	5,34
58.	19,757	1460	alfa- Humulen	-	0,57	0,49	0,66	0,07	3,08
59.	20,525	1487	gama- Himahalen	-	-	-	-	-	3,34

60.	20,605	1490	alfa-Kedren	-	-	-	-	-	0,83
61.	21,252	1512	beta-Himahalen	-	-	-	-	-	13,34
62.	21,397	1517	beta-Bisabolen	-	-	-	-	-	0,19
63.	21,843	1533	delta-Kadinen	-	0,07	-	0,09	-	0,30
64.	22,398	1552	alfa-Bisabolen	-	-	-	-	-	0,70
65.	22,596	1559	Elemol	-	-	-	-	-	0,16
66.	22,993	1573	Nerolidol	-	-	-	-	-	0,30
67.	23,587	1593	Kariofilen oksid	-	0,21	-	0,31	-	0,74
68.	23,963	1606	Longiborneol	-	-	-	-	-	0,16
69.	24,950	1640	gama-Eudesmol	-	-	-	-	-	0,43
70.	25,147	1647	Tujopsen	-	-	-	-	-	0,19
71.	25,390	1656	alfa-Kedren	-	-	-	-	-	0,56
72.	25,461	1658	beta-Eudesmol	-	-	-	-	-	0,34
73.	28,837	1775	alfa-Atlanton	-	-	-	-	-	4,76
Suma identifikovanih jedinjenja (%)				96,35	98,05	95,11	99,87	99,19	89,62
Suma neidentifikovanih jedinjenja (%)				3,65	1,95	4,89	0,13	0,81	10,38

Legenda: ¹RT – Retenciono vreme; ²RI – Linearni retencioni indeksi; ³Zastupljenost jedinjenja izražena je u procentima (%).

Hemijski sastavi EO timijana, žalfije, hajdučke trave, anđelike, vreska i miloduha prikazani su Tabelom 5.5. Ispitivanjem EO timijana identifikovano je 15 jedinjenja koja čini 99,17%. p-cimen (40,91%) i timol (40,36%) se nalaze u gotovo identičnom nivou i čine dva najzastupljenija jedinjenja. Potom sledi gama-terpinen (10,37%) i linalol (2,18%). Ostala jedinjenja se nalaze u količinama manjim od 2%.

U EO žalfije identifikovano je 21 jedinjenje, što čini 97,06% celokupnog udela. Najzastupljenija komponenta ovog EO jeste linalil acetat sa udelom od 56,41%. Potom sledi linalol sa udelom od 23,95%. Ostale komponente se nalaze u količinama manjim od 5%.

Primenom GC/MS identifikovano je 40 komponenti (95,91%) EO hajdučke trave. Najzastupljenije komponente su sabinen (22,70%), germakren D (14,10%), kariofilen (11,69%) i beta-pinen (11,47%).

Hemijskom karakterizacijom EO anđelike identifikovane su 33 komponente. Ukupno je identifikovano 94,79% ukupnog sadržaja ovog ulja. Sa 41,57% beta-felandren je najdominantnija komponenta, praćena alfa-pinenom (13,27%).

Ispitivanjem EO vreska GC/MS identifikovane su 33 komponente koje čine 98,94% ukupnog sadržaja ulja. U EO vreska dominirao je karvakrol (50,45%), praćen p-cimenom (15,73%) i gama-terpinenom (11,43%).

Ispitivanjem EO miloduha identifikovano je ukupno 47 komponenti koje čine 95,44% ispitanog EO. Kao najdominantnija komponenta istakao se cis-pinokamfon sa 27,42%. Ovu komponentu, prema zastupljenosti, pratili su beta-pinen (13,16%) i trans-pinokamfon (7,44%).

Tabela 5.5. Prikaz kvantitativnog i kvalitativnog hemijskog sastava etarskih ulja timijana (*Thymus vulgaris*) (EO13), žalfije (*Salvia officinalis*) (EO14), hajdučke trave (*Achillea millefolium*) (EO15), anđelike (*Angelica archangelica*) (EO16), vreska (*Satureja montana*) (EO17) i miloduha (*Hyssopus officinalis*) (EO18).

Redni broj	RT ¹	RI ²	Jedinjenje ³	EO13	EO14	EO15	EO16	EO17	EO18
1.	3,936	912	Santolina trien	-	-	0,21	-	-	-
2.	4,334	926	alfa-Tujen	0,06	-	0,55	1,64	1,79	0,37
3.	4,497	932	alfa-Pinen	0,40	-	2,28	13,27	1,06	1,01
4.	4,800	942	Kamfen	0,07	-	0,20	8,72	0,43	0,17
5.	5,323	960	Sabinen	-	-	22,70	1,68	-	1,97
6.	5,354	962	1-Okten-3-ol	-	-	-	-	1,37	-
7.	5,408	963	beta-Pinen	1,28	-	11,47	0,80	-	13,16
8.	5,543	968	3-Oktanon	-	-	-	-	-	-
9.	5,653	972	beta-Mircen	0,64	0,96	0,60	3,54	1,33	1,51
10.	5,740	975	3-Oktanol	-	-	-	-	-	-
11.	6,020	985	alfa-Felandren	0,18	0,35	0,10	4,53	0,29	-
12.	6,177	990	3-Karen	-	-	-	4,59	0,08	-
13.	6,327	995	alfa-Terpinen	-	-	0,63	-	2,26	0,38
14.	6,537	1003	p-Cimen	40,91	0,16	0,37	2,37	15,73	0,27

15.	6,653	1007	Limonen	0,39	0,94	-	-	0,59	-
16.	6,670	1007	beta-Felandren	-	-	1,00	41,57	-	5,58
17.	6,730	1009	1,8-Cineol	0,06	-	3,06	-	0,33	0,47
18.	6,843	1013	alfa-Ocimen	-	0,29	0,20	0,37	-	0,13
19.	6,907	1015	o-Cimen	0,07	-	-	-	-	-
20.	7,121	1023	beta-Ocimen	-	-	0,51	0,84	-	0,47
21.	7,452	1034	gama-Terpinen	10,37	-	-	0,20	11,43	0,64
22.	7,509	1036	Artemisia keton	-	-	7,37	-	-	-
23.	8,119	1057	Artemisia alkohol	-	-	0,17	-	-	-
24.	8,288	1063	alfa-Terpinolen	-	0,49	0,27	0,28	0,16	0,19
25.	8,620	1075	Linalol	2,18	23,95	0,37	-	1,06	2,97
26.	8,828	1082	beta-Tujon	-	-	-	-	-	0,11
27.	9,620	1109	Dihidrolinalol	-	0,32	-	-	-	-
28.	10,018	1123	Kamfor	-	-	0,32	-	-	0,10
29.	10,534	1141	trans-Pinokamfon	-	-	-	-	-	7,44
30.	10,658	1145	endo-Borneol	-	0,10	-	-	1,26	-
31.	10,855	1152	DL-Mentol	-	-	-	-	-	-
32.	11,022	1158	Terpinen-4-ol	0,76	-	2,11	0,19	0,81	-
33.	11,054	1159	cis-Pinokamfon	-	-	-	-	-	27,42
34.	11,315	1168	Kripton	-	-	-	1,00	-	-
35.	11,455	1173	alfa-Terpineol	-	4,77	0,33	-	0,18	0,18
36.	11,665	1180	gama-Terpineol	-	0,66	-	-	-	-
37.	11,750	1183	Estragol	-	-	-	-	-	4,13
38.	12,648	1214	Nerol	-	0,08	-	-	-	-

39.	12,823	1220	Fenil acetat	-	-	-	-	-	-
40.	13,007	1227	Kumaldehid	-	-	-	0,22	-	-
41.	13,457	1242	Geraniol	-	-	-	-	-	0,21
42.	13,574	1246	Linalil acetat	-	56,41	-	-	-	-
43.	14,525	1279	Borneol acetat	-	-	-	0,47	-	-
44.	14,618	1282	Kuminol	-	-	-	0,14	-	-
45.	14,636	1283	Lavandulil acetat	-	-	0,42	-	-	-
46.	14,716	1286	Timol	40,36	-	-	-	0,28	-
47.	14,766	1288	Anetol	-	-	-	-	-	-
48.	15,081	1299	Karvakrol	1,44	-	0,44	-	50,45	-
49.	16,804	1358	Eugenol	-	-	-	-	-	0,21
50.	17,000	1365	Neril acetat	-	1,51	0,32	-	0,10	-
51.	17,087	1368	Ciklosativen	-	-	-	0,19	-	-
52.	17,239	1373	Karvakril acetat	-	-	-	-	0,44	-
53.	17,365	1378	Kopaen	-	-	0,17	2,08	0,13	0,19
54.	17,583	1385	Geranil acetat	-	2,29	-	-	-	-
55.	17,589	1385	Anisik keton	-	-	-	-	-	-
56.	17,649	1387	beta-Burbonen	-	-	0,55	-	0,11	2,19
57.	17,865	1395	beta-Element	-	-	-	0,31	-	1,40
58.	18,226	1407	beta-Kurkumen	-	-	0,11	-	-	-
59.	18,235	1408	Metileugenol	-	-	-	-	-	0,26
60.	18,282	1409	Longifolen	-	0,10	-	-	-	-
61.	18,420	1414	alfa-Gurjunen	-	-	-	-	-	0,27
62.	18,741	1425	Kariofilen	-	2,13	11,69	-	2,68	3,35

63.	19,011	1435	beta-Kubeben	-	-	-	0,36	-	0,24
64.	19,205	1441	alfa-Bergamoten	-	-	-	-	-	0,32
65.	19,295	1444	alfa-Guaien	-	-	-	-	-	0,87
66.	19,757	1460	alfa-Humulen	-	0,35	1,73	0,41	0,10	1,09
67.	19,835	1463	beta-Farnesen	-	-	0,14	-	-	-
68.	19,977	1468	Aromandendren	-	-	-	-	-	1,33
69.	20,459	1485	gama-Murolen	-	-	-	-	0,19	-
70.	20,609	1490	Germakren D	-	-	14,10	-	1,39	4,50
71.	20,623	1490	Kurkumen	-	-	-	0,82	-	-
72.	20,758	1495	beta-Selinen	-	-	0,20	-	0,14	-
73.	21,009	1504	Zingiberen	-	-	0,92	0,59	-	-
74.	21,060	1506	Izobiciklogermakren	-	-	0,54	-	0,57	2,19
75.	21,162	1509	alfa-Murolen	-	-	-	0,65	-	-
76.	21,332	1515	alfa-Bulnesen	-	-	-	-	-	2,27
77.	21,389	1517	Farnesen	-	-	0,25	-	-	-
78.	21,397	1517	beta-Bisabolen	-	-	-	0,48	1,44	-
79.	21,575	1523	gama-Kadinen	-	-	-	-	0,14	1,10
80.	21,835	1532	Kalamenen	-	0,72	-	-	-	-
81.	21,843	1533	delta-Kadinen	-	-	0,55	0,40	0,30	0,24
82.	22,095	1541	Kadina-1,4-dien	-	0,07	-	-	-	-
83.	22,356	1551	alfa-Kopaen-11-ol	-	-	-	0,28	-	-
84.	22,596	1559	Elemol	-	-	-	-	-	1,22
85.	22,993	1573	Nerolidol	-	-	0,32	-	-	
86.	23,419	1587	Spatulenol	-	-	-	0,59	-	0,37

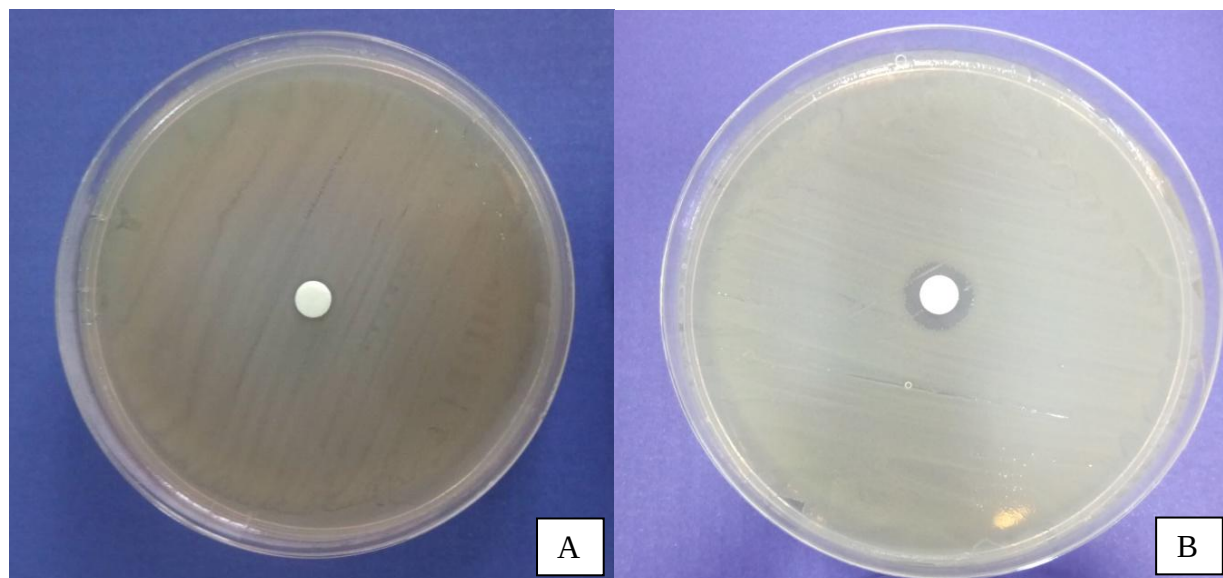
87.	23,587	1593	Kariofilen oksid	-	0,41	1,81	-	0,33	0,87
88.	24,160	1613	Ledol	-	-	-	-	-	0,10
89.	24,833	1636	Tridekanolid	-	-	-	0,89	-	-
90.	24,950	1640	gama-Eudesmol	-	-	-	-	-	0,20
91.	25,207	1649	T-Murolol	-	-	-	-	-	1,34
92.	25,390	1656	alfa-Kedren	-	-	-	-	-	-
93.	25,461	1658	beta-Eudesmol	-	-	0,13	-	-	0,23
94.	25,551	1661	alfa-Eudesmol	-	-	-	-	-	0,21
95.	27,643	1734	Kamazulen	-	-	6,70	-	-	-
96.	30,201	1822	Pentadekanolid	-	-	-	0,31	-	-
Suma identifikovanih jedinjenja (%)				99,17	97,06	95,91	94,79	98,94	95,44
Suma neidentifikovanih jedinjenja (%)				0,83	2,94	4,09	5,21	1,06	4,56

Legenda: ¹RT – Retenciono vreme; ²RI – Linearni retencioni indeksi; ³Zastupljenost jedinjenja izražena je u procentima (%).

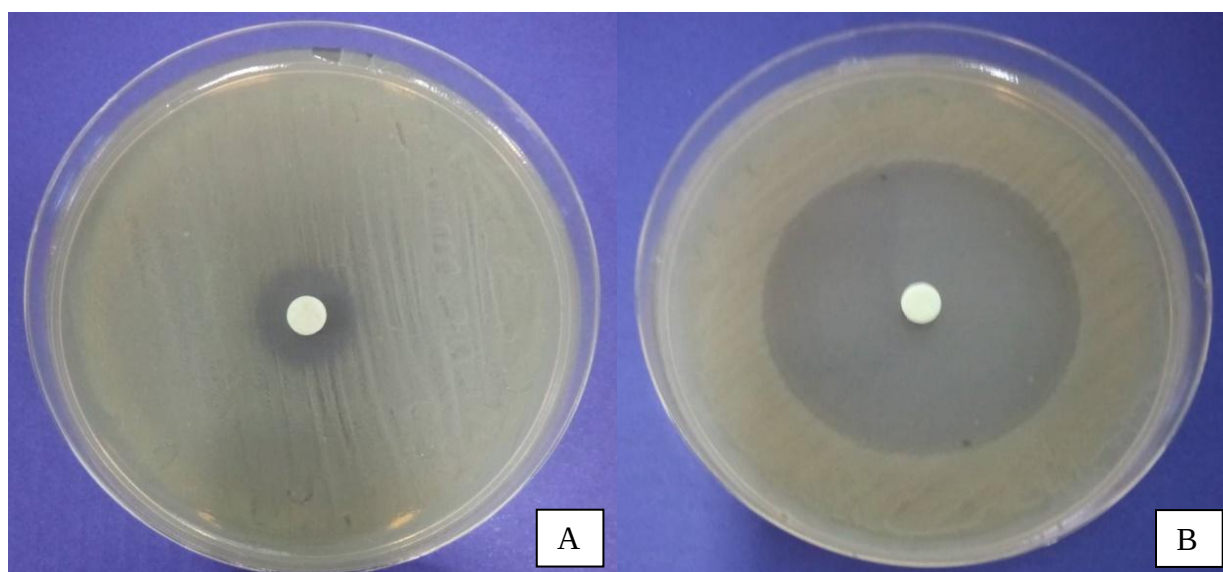
Generalno, relativni udeo identifikovanih jedinjenja EO kretao se od 89,62% (EO smilja) do 100% (EO origana), a broj identifikovanih jedinjenja između 9 (EO karanfilića) i 47 (EO miloduha).

5.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA

In vitro antibakterijska aktivnost 18 EO prema Gram negativnim (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*) i Gram pozitivnim (*L. monocytogenes*) bakterijskim izolatima određena je upotrebom disk difuzione metode, čiji rezultati su predstavljeni Tabelama 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 i 5.10. Različiti stepeni inhibicije uočeni su u ovom istraživanju (Slike 5.1 i 5.2).



Slika 5.1. Prikaz različitih dijametara zone inhibicije: antibakterijska aktivnost EO lavande (5 μ l/disk) prema izolatu *Salmonella* Enteritidis SE53 (ZI < 6 mm) (neosetljiv (-)) (A); antibakterijska aktivnost EO tajlandskog đumbira (5 μ l/disk) prema izolatu *Salmonella* Typhimurium ST28 (ZI = $11,67 \pm 1,15$ mm) (osetljiv (+)) (B).



Slika 5.2. Prikaz različitih dijametara zone inhibicije: antibakterijska aktivnost EO karanfilića (10 μ l/disk) prema izolatu *Salmonella* Typhimurium ST35 (ZI = $17,00 \pm 0,00$ mm) (veoma osetljiv (++)) (A); antibakterijska aktivnost EO timijana (10 μ l/disk) prema izolatu *Salmonella* Enteritidis SE144 (ZI = $50,67 \pm 2,08$ mm) (izuzetno osetljiv (+++)) (B).

Izuzetnu osetljivost (+++) bez obzira na primenjenu količinu EO (5 ili 10 μ l/disk) svi bakterijski izolati (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*) ispoljavaju prema EO timijana i origana, kao i izolati *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* prema EO cimeta i vreska, odnosno izolati *Y. enterocolitica* prema EO karanfilića. Slični rezultati (ZI ≥ 20 mm) zabeleženi su i kod pojedinih izolata *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* prilikom upotrebe EO tajlandskog đumbira. Neki izolati *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* izuzetnu osetljivost pokazuju i prema EO cimeta i vreska, kao i neki izolati *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* prema EO ruzmarina. Izuzetna osetljivost na EO miloduha uočena je kod dva izolata *L. monocytogenes*.

Etarsko ulje timijana najefikasnije je delovalo ($p < 0,05$) na sve bakterijske izolate, izuzev na ST28 gde je svoju efikasnost delio sa EO origana (5 μ l/disk) i vreska (10 μ l/disk). Izuzeci su zabeleženi i

kod tri izolata *L. monocytogenes* (L1, L17 i L18) gde je EO origana u količini od 5 µl/disku bilo statistički efikasnije ($p < 0,5$), kao i kod izolata L18 i Y9 kada je na prvom mestu bilo EO cimeta u količini od 5 µl/disku.

S druge strane, neosetljivost (-) na EO fenela je uočeno kod svih ispitanih izolata. Gram negativni mikroorganizmi (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*) neosetljivi su bili još i prema EO anđelike, smilja i hajdučke trave. Pored navedenih EO izolati *Salmonella* su bili rezistentni i prema EO crnog bibera, limuna, lavande, žalfije i miloduha.

Izolati *L. monocytogenes* su se pokazali kao najosetljiviji prema ispitanim EO. Na njih je inhibitorno delovalo ukupno 17 od 18 EO, dok je na izolate *Y. enterocolitica* delovalo 14. Izolati *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* su se pokazali kao najotporniji, inhibisani od strane 9 EO.

Tabela 5.6. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* Enteritidis na etarska ulja primenom disk difuzione metode.

Etarsko ulje	SE53		SE56		SE132		SE144	
	5 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l
Bosiljak	10,00 $\pm$ 0,00 ^e	11,00 $\pm$ 0,00 ^f	8,33 $\pm$ 0,58 ^f	10,00 $\pm$ 0,00 ^{fg}	7,00 $\pm$ 0,00 ^g	9,00 $\pm$ 1,00 ^h	7,00 $\pm$ 00 ^e	8,67 $\pm$ 1,15 ^f
Crni biber	-	-	-	-	-	-	-	-
Tajlandski đumbir	16,33 $\pm$ 0,58 ^c	25,00 $\pm$ 1,73 ^c	12,33 $\pm$ 0,58 ^e	22,33 $\pm$ 2,08 ^d	12,67 $\pm$ 0,58 ^e	20,00 $\pm$ 0,00 ^d	13,67 $\pm$ 0,58 ^d	23,33 $\pm$ 1,15 ^c
Cimet	23,33 $\pm$ 0,58 ^b	28,67 $\pm$ 1,15 ^b	20,33 $\pm$ 1,15 ^b	23,33 $\pm$ 1,15 ^{cd}	18,33 $\pm$ 1,15 ^d	25,33 $\pm$ 1,15 ^c	17,67 $\pm$ 1,15 ^c	21,33 $\pm$ 1,15 ^d
Limun	-	-	-	-	-	-	-	-
Karanfilić	12,67 $\pm$ 2,08 ^d	14,67 $\pm$ 0,58 ^d	14,67 $\pm$ 0,58 ^d	15,00 $\pm$ 0,00 ^e	11,33 $\pm$ 0,58 ^f	15,67 $\pm$ 0,58 ^e	15,67 $\pm$ 0,58 ^{cd}	16,67 $\pm$ 0,58 ^e
Fenel	-	-	-	8,00 $\pm$ 0,00 ^h	-	-	-	7,00 $\pm$ 0,00 ^f
Lavanda	-	-	-	-	-	7,00 $\pm$ 0,00 ⁱ	-	7,17 $\pm$ 0,29 ^f
Mirta	7,00 $\pm$ 0,00 ^f	12,67 $\pm$ 0,58 ^e	-	-	7,00 $\pm$ 0,00 ^g	13,33 $\pm$ 0,58 ^f	-	8,67 $\pm$ 1,15 ^f
Origano	25,00 $\pm$ 1,00 ^b	26,50 $\pm$ 1,32 ^c	23,67 $\pm$ 2,08 ^a	24,67 $\pm$ 1,53 ^c	24,67 $\pm$ 0,58 ^b	29,67 $\pm$ 1,53 ^b	34,33 $\pm$ 1,53 ^a	36,33 $\pm$ 2,08 ^b
Ruzmarin	7,83 $\pm$ 0,76 ^f	8,33 $\pm$ 1,15 ^g	7,67 $\pm$ 1,15 ^f	10,67 $\pm$ 1,53 ^f	7,00 $\pm$ 0,00 ^g	11,67 $\pm$ 1,15 ^g	-	7,17 $\pm$ 0,29 ^f
Smilje	-	-	-	-	-	-	-	-
Timijan	27,33 $\pm$ 0,58 ^a	38,33 $\pm$ 1,53 ^a	25,00 $\pm$ 0,00 ^a	30,67 $\pm$ 0,58 ^a	29,00 $\pm$ 1,00 ^a	44,00 $\pm$ 1,00 ^a	36,67 $\pm$ 3,06 ^a	50,67 $\pm$ 2,08 ^a

Rezultati

Suzana L. Vidaković Knežević

Doktorska disertacija

Žalfija	-	-	-	-	-	-	-	-
Andelika	-	$7,00 \pm 0,00^h$	-	$7,00 \pm 0,00^h$	-	$7,00 \pm 0,00^i$	-	$7,00 \pm 0,00^f$
Vresak	$17,67 \pm 1,53^c$	$29,33 \pm 0,58^b$	$17,67 \pm 0,58^c$	$27,00 \pm 0,00^b$	$20,33 \pm 0,58^c$	$20,67 \pm 0,58^d$	$29,67 \pm 2,52^b$	$35,67 \pm 1,53^b$
Hajdučka trava	-	-	-	-	-	-	-	-
Miloduh	-	-	$7,00 \pm 0,00^f$	$8,33 \pm 1,53^{gh}$	-	$7,33 \pm 0,58^i$	-	$7,00 \pm 0,00^f$

Legenda: Zone inhibicije su izražene u mm (uključujući 6 mm papirnog diska). „-“ zona inhibicije nije uočena ($ZI < 6$ mm). Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 5.7. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* Typhimurium na etarska ulja primenom disk difuzione metode.

Etarsko ulje	ST28		ST28		ST48		ST49	
	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl
Bosiljak	-	8,00 ± 0,00 ^{ef}	8,67 ± 0,58 ^e	9,00 ± 0,00 ^e	8,50 ± 1,32 ^g	12,17 ± 1,76 ^e	7,17 ± 0,29 ^e	13,00 ± 1,00 ^f
Crni biber	-	-	-	-	-	-	-	-
Tajlandski đumbir	11,67 ± 1,15 ^d	19,33 ± 1,53 ^d	12,33 ± 0,58 ^d	18,33 ± 0,58 ^c	14,33 ± 0,58 ^f	25,67 ± 0,58 ^c	13,00 ± 0,00 ^d	20,67 ± 0,58 ^c
Cimet	17,00 ± 1,00 ^c	25,67 ± 3,21 ^c	24,67 ± 0,58 ^a	26,00 ± 1,00 ^b	25,67 ± 1,15 ^b	28,67 ± 0,58 ^b	16,33 ± 1,53 ^c	21,33 ± 0,58 ^c
Limun	-	-	-	-	-	-	-	-
Karanfilić	16,67 ± 0,58 ^c	18,00 ± 0,00 ^d	15,67 ± 0,58 ^c	17,00 ± 0,00 ^c	16,00 ± 1,00 ^e	16,67 ± 1,15 ^d	15,67 ± 0,58 ^c	18,33 ± 0,58 ^d
Fenel	-	-	-	-	-	-	-	8,00 ± 0,00 ^h
Lavanda	-	-	-	-	-	8,83 ± 0,29 ^f	-	7,67 ± 0,58 ^h
Mirta	7,67 ± 0,58 ^e	10,67 ± 1,53 ^e	8,33 ± 0,58 ^e	11,33 ± 0,58 ^d	8,50 ± 1,32 ^g	13,33 ± 0,58 ^e	7,67 ± 0,58 ^e	9,33 ± 0,58 ^g
Origano	26,67 ± 1,15 ^a	29,67 ± 1,53 ^b	22,67 ± 1,53 ^b	26,67 ± 2,52 ^b	23,17 ± 0,29 ^c	25,00 ± 1,00 ^c	22,33 ± 1,53 ^b	24,00 ± 0,00 ^b
Ruzmarin	-	-	-	8,00 ± 0,00 ^e	7,83 ± 0,29 ^g	8,83 ± 0,29 ^f	-	-
Smilje	-	-	-	-	-	-	-	-
Timijan	26,00 ± 1,73 ^a	34,33 ± 2,08 ^a	25,33 ± 0,58 ^a	34,67 ± 1,53 ^a	34,00 ± 0,00 ^a	35,33 ± 0,58 ^a	25,67 ± 0,58 ^a	35,00 ± 1,73 ^a

Rezultati

Suzana L. Vidaković Knežević

Doktorska disertacija

Žalfija	-	-	-	-	-	-	-	-
Andelika	-	-	-	-	-	$7,00 \pm 0,00^g$	-	-
Vresak	$19,33 \pm 0,58^b$	$33,67 \pm 1,53^a$	$15,33 \pm 0,58^c$	$16,67 \pm 1,53^c$	$18,67 \pm 1,15^d$	$25,33 \pm 2,08^c$	$16,33 \pm 0,58^c$	$17,00 \pm 0,00^e$
Hajdučka trava	-	-	-	-	-	-	-	-
Miloduh	-	$7,00 \pm 0,00^f$	-	$7,00 \pm 00^e$	-	$7,67 \pm 0,58^{fg}$	-	$8,00 \pm 0,00^h$

Legenda: Zone inhibicije su izražene u mm (uključujući 6 mm papirnog diska). „-“ zona inhibicije nije uočena ($ZI < 6$ mm). Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 5.8. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Listeria monocytogenes* na etarska ulja (5 µl) primenom disk difuzione metode.

Etarsko ulje	L1	UB2-02-4 (L5)	L17	L18	UBL2-01-2 (1)
	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Bosiljak	-	7,33 ± 0,58 ^{gh}	9,67 ± 0,58 ^{de}	9,67 ± 0,58 ^{de}	-
Crni biber	10,00 ± 0,00 ^{de}	7,00 ± 0,00 ^h	12,00 ± 1,00 ^{cd}	12,00 ± 0,00 ^d	10,68 ± 0,58 ^{ef}
Tajlandski đumbir	10,33 ± 1,15 ^{de}	11,33 ± 1,15 ^e	11,33 ± 0,58 ^d	10,33 ± 0,58 ^{de}	7,00 ± 0,00 ^g
Cimet	34,67 ± 1,15 ^b	31,00 ± 1,00 ^c	30,33 ± 0,58 ^b	38,33 ± 1,53 ^a	34,67 ± 0,58 ^b
Limun	7,67 ± 1,15 ^{fg}	11,00 ± 2,65 ^e	9,33 ± 1,53 ^{de}	10,00 ± 0,00 ^{de}	8,33 ± 1,53 ^{fg}
Karanfilić	11,33 ± 1,15 ^d	15,67 ± 0,58 ^d	14,67 ± 1,53 ^c	15,00 ± 0,00 ^c	15,33 ± 1,15 ^d
Fenel	-	-	-	-	-
Lavanda	9,00 ± 1,00 ^{ef}	10,00 ± 0,00 ^{ef}	9,00 ± 0,00 ^{de}	10,00 ± 0,00 ^{de}	8,00 ± 0,00 ^g
Mirta	8,00 ± 0,00 ^{fg}	9,00 ± 1,00 ^{fg}	11,67 ± 0,58 ^{cd}	11,33 ± 0,58 ^{de}	11,67 ± 1,15 ^e
Origano	40,00 ± 0,00 ^a	40,33 ± 0,58 ^a	37,33 ± 2,89 ^a	37,67 ± 1,15 ^a	34,00 ± 1,73 ^b
Ruzmarin	7,00 ± 0,00 ^g	7,67 ± 0,58 ^{gh}	-	10,67 ± 1,15 ^{de}	8,00 ± 0,00 ^g
Smilje	9,67 ± 1,53 ^{de}	10,33 ± 0,58 ^{ef}	-	9,00 ± 2,00 ^e	-
Timijan	32,67 ± 1,53 ^c	34,33 ± 0,58 ^b	30,33 ± 4,93 ^b	31,67 ± 4,62 ^b	45,00 ± 3,61 ^a

Žalfija	-	$10,33 \pm 1,15^{ef}$	$11,33 \pm 1,53^d$	$10,00 \pm 0,00^{de}$	$8,33 \pm 0,58^{fg}$
Andelika	-	-	-	-	-
Vresak	$32,00 \pm 00^c$	$31,33 \pm 0,58^c$	$28,33 \pm 0,58^b$	$33,33 \pm 0,58^b$	$30,33 \pm 2,31^c$
Hajdučka trava	$10,33 \pm 0,58^{de}$	$8,00 \pm 0,00^{gh}$	$7,00 \pm 0,00^e$	-	$8,00 \pm 0,00^g$
Miloduh	-	$9,67 \pm 0,58^{ef}$	$10,00 \pm 0,00^{de}$	-	$8,67 \pm 1,15^{fg}$

Legenda: Zone inhibicije su izražene u mm (uključujući 6 mm papirnog diska). „-“ zona inhibicije nije uočena ($ZI < 6$ mm). Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 5.9. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Listeria monocytogenes* na etarska ulja (10 µl) primenom disk difuzione metode.

Etarsko ulje	L1	UB2-02-4 (L5)	L17	L18	UBL2-01-2 (1)
	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Bosiljak	8,68 ± 1,15 ^{jk}	10,33 ± 0,58 ^{kl}	11,00 ± 3,61 ^{ef}	13,00 ± 2,00 ^{fg}	8,00 ± 0,00 ⁱ
Crni biber	14,33 ± 1,15 ^{gh}	16,33 ± 0,58 ^{fg}	14,33 ± 3,21 ^{def}	15,00 ± 2,65 ^{fg}	15,00 ± 0,00 ^{efg}
Tajlandski đumbir	18,00 ± 0,00 ^e	18,00 ± 2,00 ^f	18,00 ± 2,00 ^d	21,00 ± 1,00 ^d	16,00 ± 1,73 ^{ef}
Cimet	35,67 ± 1,15 ^c	33,33 ± 1,15 ^d	33,67 ± 1,53 ^c	41,00 ± 1,73 ^c	36,33 ± 2,31 ^c
Limun	15,67 ± 0,58 ^{fg}	16,33 ± 1,15 ^{fg}	12,67 ± 3,06 ^{ef}	14,33 ± 2,08 ^{fg}	15,67 ± 1,15 ^{ef}
Karanfilić	17,00 ± 1,00 ^{ef}	16,67 ± 0,58 ^{fg}	15,33 ± 2,52 ^{def}	17,33 ± 1,15 ^{def}	16,67 ± 1,15 ^e
Fenel	-	-	-	-	-
Lavanda	14,00 ± 1,73 ^{gh}	15,00 ± 0,00 ^{gh}	13,33 ± 0,58 ^{ef}	13,33 ± 1,15 ^{fg}	13,33 ± 1,15 ^{fg}
Mirta	11,67 ± 0,58 ⁱ	13,33 ± 0,58 ^{hij}	15,67 ± 1,15 ^{de}	13,67 ± 0,58 ^{fg}	13,67 ± 1,15 ^{efg}
Origano	43,67 ± 1,53 ^b	42,67 ± 3,21 ^b	40,67 ± 1,15 ^b	46,00 ± 5,57 ^b	35,33 ± 0,58 ^c
Ruzmarin	8,00 ± 0,00 ^k	13,33 ± 1,15 ^{hij}	-	20,00 ± 0,00 ^{de}	10,33 ± 0,58 ^{hi}
Smilje	14,67 ± 0,58 ^{gh}	11,00 ± 1,00 ^{jkl}	12,33 ± 1,53 ^{ef}	15,33 ± 1,15 ^{efg}	-
Timijan	69,00 ± 1,00 ^a	54,00 ± 2,65 ^a	65,00 ± 5,57 ^a	64,67 ± 8,08 ^a	67,00 ± 2,65 ^a

Rezultati

Suzana L. Vidaković Knežević

Doktorska disertacija

Žalfija	$13,67 \pm 1,53^h$	$14,67 \pm 0,58^{ghi}$	$12,33 \pm 1,15^{ef}$	$14,67 \pm 0,58^{fg}$	$12,33 \pm 0,58^{gh}$
Anđelika	$10,00 \pm 0,00^{ij}$	$9,00 \pm 0,00^l$	$11,33 \pm 1,15^{ef}$	$11,00 \pm 0,00^g$	-
Vresak	$33,33 \pm 1,53^d$	$36,67 \pm 2,08^c$	$43,00 \pm 2,65^b$	$42,67 \pm 2,31^{bc}$	$39,67 \pm 0,58^b$
Hajdučka trava	$16,67 \pm 1,15^{ef}$	$12,33 \pm 0,58^{ijk}$	$10,67 \pm 1,15^f$	$11,00 \pm 0,00^g$	$15,00 \pm 3,61^{efg}$
Miloduh	$11,33 \pm 1,15^i$	$21,33 \pm 1,15^e$	$13,33 \pm 1,15^{ef}$	$12,67 \pm 0,58^{fg}$	$24,00 \pm 2,00^d$

Legenda: Zone inhibicije su izražene u mm (uključujući 6 mm papirnog diska). „-“ zona inhibicije nije uočena ($ZI < 6$ mm). Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 5.10. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Yersinia enterocolitica* na etarska ulja primenom disk difuzione metode.

Etarsko ulje	Y4/1		Y9		Y14	
	5μl	10μl	5μl	10μl	5μl	10μl
Bosiljak	10,33 ± 0,58 ^{fg}	19,33 ± 0,58 ^e	13,00 ± 1,00 ^f	19,00 ± 0,00 ^{fg}	13,00 ± 2,65 ^{def}	19,33 ± 3,06 ^e
Crni biber	-	6,67 ± 0,58 ^j	7,83 ± 0,29 ^h	10,33 ± 0,58 ^j	7,67 ± 0,58 ^g	10,00 ± 0,00 ^{gh}
Tajlandski đumbir	14,33 ± 1,15 ^e	23,00 ± 1,00 ^d	13,67 ± 0,58 ^f	21,67 ± 1,53 ^{ef}	13,67 ± 1,15 ^{de}	21,33 ± 0,58 ^e
Cimet	39,67 ± 1,15 ^b	42,33 ± 1,15 ^b	48,00 ± 2,00 ^a	50,67 ± 4,16 ^b	42,33 ± 3,21 ^a	49,33 ± 7,02 ^b
Limun	9,33 ± 0,58 ^{gh}	13,67 ± 0,58 ^g	8,00 ± 0,00 ^h	11,33 ± 0,58 ^{ij}	9,67 ± 0,58 ^{fgh}	13,33 ± 1,53 ^{fg}
Karanfilić	23,00 ± 2,65 ^d	27,67 ± 1,53 ^c	26,67 ± 1,53 ^d	31,33 ± 1,53 ^d	22,33 ± 2,52 ^c	28,33 ± 1,53 ^d
Fenel	-	-	-	7,00 ± 0,00 ^k	-	8,33 ± 1,53 ^h
Lavanda	-	8,67 ± 1,15 ⁱ	10,33 ± 0,58 ^g	14,00 ± 0,00 ^{hi}	7,00 ± 0,00 ^g	11,67 ± 1,53 ^{gh}
Mirta	12,67 ± 0,58 ^{ef}	18,33 ± 0,58 ^{ef}	8,67 ± 0,58 ^{gh}	16,67 ± 1,53 ^{gh}	11,33 ± 0,58 ^{efg}	19,33 ± 1,53 ^e
Origano	37,33 ± 2,08 ^b	43,33 ± 1,53 ^b	40,67 ± 1,15 ^b	43,67 ± 0,58 ^c	33,33 ± 0,58 ^b	38,00 ± 0,00 ^c
Ruzmarin	15,33 ± 0,58 ^e	17,33 ± 0,58 ^f	16,00 ± 1,00 ^e	22,67 ± 2,52 ^e	15,67 ± 0,58 ^d	17,00 ± 0,00 ^{ef}
Smilje	-	-	-	-	-	-
Timijan	42,67 ± 4,04 ^a	59,00 ± 1,00 ^a	39,33 ± 1,15 ^b	58,00 ± 3,61 ^a	43,67 ± 3,51 ^a	57,33 ± 4,04 ^a

Žalfija	$7,33 \pm 0,58^{gh}$	$9,33 \pm 0,58^i$	$7,67 \pm 0,58^h$	$9,67 \pm 0,58^{jk}$	$7,00 \pm 0,00^g$	$8,00 \pm 1,00^h$
Anđelika	-	-	-	-	-	-
Vresak	$29,00 \pm 1,73^c$	$42,00 \pm 2,00^b$	$34,33 \pm 1,15^c$	$40,67 \pm 2,08^c$	$32,67 \pm 0,58^b$	$40,33 \pm 1,53^c$
Hajdučka trava	-	-	-	-	-	-
Miloduh	$7,00 \pm 0,00^h$	$11,67 \pm 0,58^h$	-	$10,00 \pm 0,00^{jk}$	-	$10,33 \pm 0,58^{gh}$

Legenda: Zone inhibicije su izražene u mm (uključujući 6 mm papirnog diska). „-“ zona inhibicije nije uočena ($ZI < 6$ mm). Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

5.4. MINIMALNE INHIBITORNE I MINIMALNE BAKTERICIDNE KONCENTRACIJE ETARSKIH ULJA

Etarska ulja kod kojih su uočene ZI > 8 mm prilikom ispitivanja osjetljivosti izolata testiranih patogenih bakterija disk difuzionom metodom su podvrgnuta daljem ispitivanju, odnosno određivanju MIC i MBC bujon mikrodilucionom metodom.

Na osnovu rezultata mikrodilucione metode uočava se da su sva ispitivana EO delovala inhibitorno u koncentracijama od 0,04 do 227,27 µl/ml, odnosno baktericidno u opsegu od 0,09 do 454,54 µl/ml na testirane izolate *S. Enteritidis* (Grafikon 5.1), *S. Typhimurium* (Grafikon 5.2), *L. monocytogenes* (Grafikoni 5.3 i 5.4) i *Y. enterocolitica* (Grafikoni 5.5 i 5.6). Kao i u disk difuzionoj metodi EO origana je pokazalo izuzetnu antibakterijsku aktivnost, inhibirajući rast ispitanih izolata sa MIC vrednostima u opsegu od 0,04 do 0,71 µl/ml. Najosetljiviji na ovo ulje bio je izolat *S. Enteritidis* SE53, dok je najotporniji bio izolat *L. monocytogenes* L1.

Svoju izuzetnu antibakterijsku aktivnost pokazali su i EO cimeta (MIC od 0,09 do 0,89 µl/ml), timijana (MIC od 0,12 do 0,89 µl/ml) i vreska (MIC od 0,17 do 1,42 µl/ml). Na delovanje EO cimeta najosetljiviji su bili izolati *Y. enterocolitica* (Y4/1, Y9 i Y14), dok je najotpornija bila *S. Typhimurium* ST28. *Salmonella* (SE56 i ST49) su bile najrezistentnije na delovanje EO timijana, dok je Gram pozitivna *L. monocytogenes* L17 bila najosetljivija. Interesantno je da su izolati *L. monocytogenes* prema EO vreska bili i najosetljiviji (L18 i UB2-01-2 (UBL1)) i najotporniji (L5 i L17). Slično navedenim EO, ulje karanfilica inhibiralo je rast hranom prenosivih patogenih bakterija u opsegu od 0,23 do 1,78 µl/ml. Pored ovog, EO ružmarina inhibitorno dejstvo ispoljilo je u MIC vrednostima između 0,23 i 7,11 µl/ml, što je interesantno s obzirom na male, odnosno izostanak ZI kod pojedinih izolata.

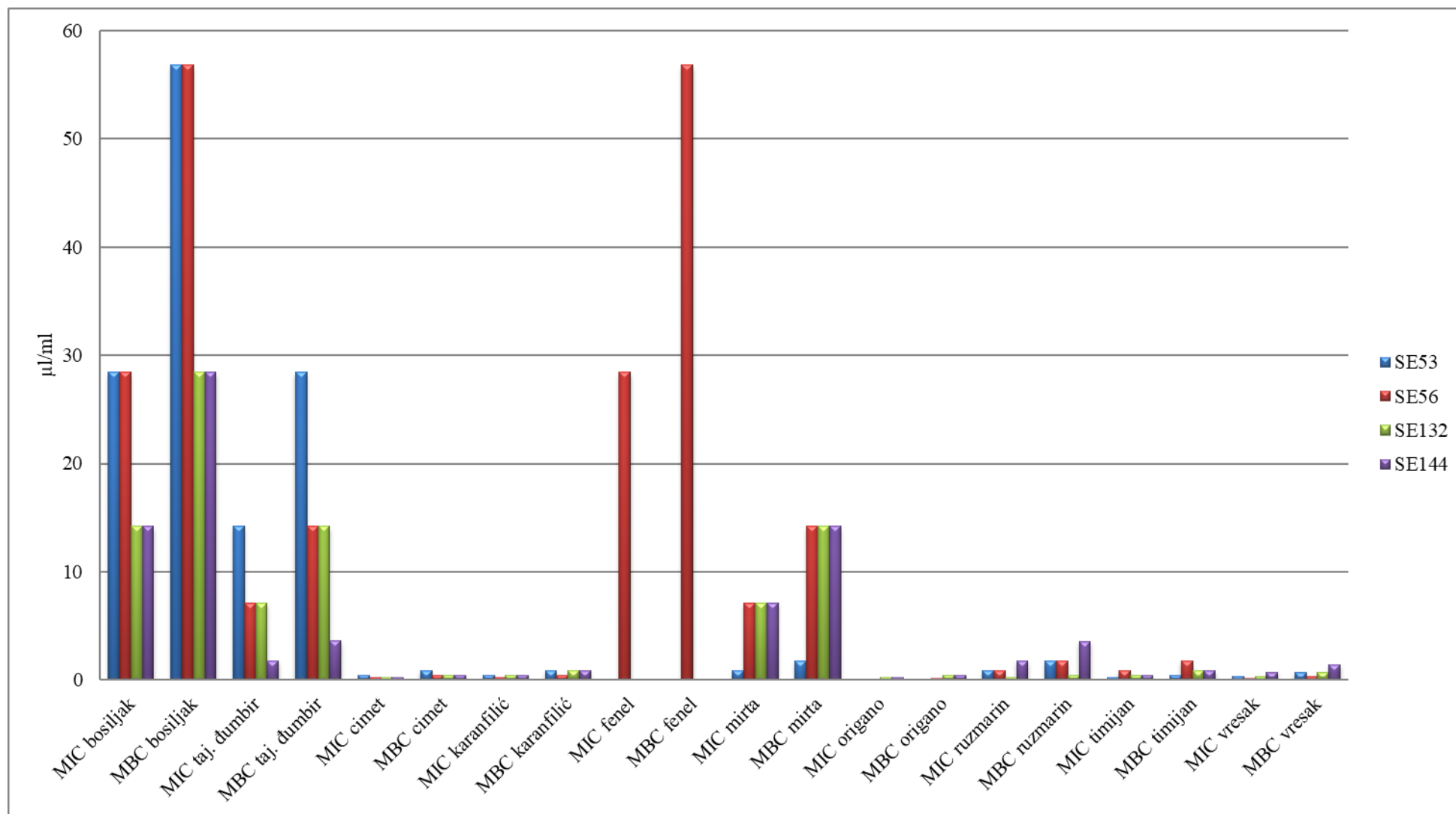
Najširi opseg inhibitornog dejstva ispoljilo je EO mirte. Inhibicija izolata *S. Enteritidis* SE53 postignuta je sa 0,89 µl/ml, dok je za inhibiciju izolata *L. monocytogenes* L1 i L18 bilo potrebno 113,64 µl/ml EO.

Među najefikasnijim EO prosečno su EO cimeta, origana i timijana najefikasnije inhibitorno delovala na izolate *Y. enterocolitica*, a EO vreska na oba serovarijeteta *Salmonella*. S druge strane, EO origana i vreska prosečno najslabije dejstvo pokazala su prema izolatima *L. monocytogenes*. Slična dejstva ispoljila su EO cimeta i timijana prema izolatima *S. Typhimurium*, odnosno *S. Enteritidis*.

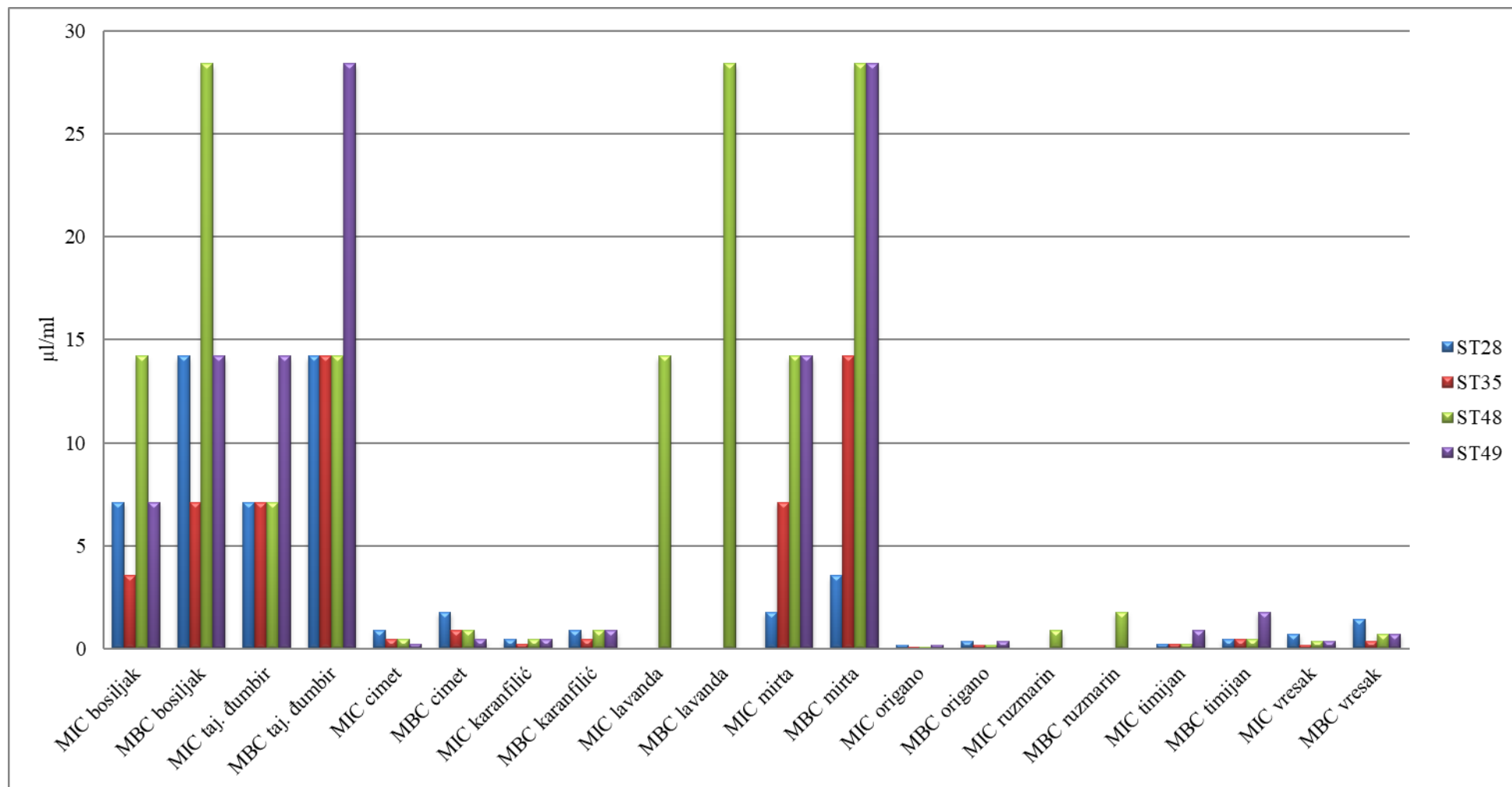
Etarsko ulje tajlandskog đumbira efikasnije je delovalo prema Gram negativnim bakterijama nego prema Gram pozitivnim bakterijama. Isti efekat (posmatrajući izolate *Y. enterocolitica* i *L. monocytogenes*) zapaža se i kod EO bosiljka, crnog bibera, lavande, mirte, žalfije i miloduha.

Najveće MIC vrednosti zabeležene su kod EO crnog bibera, lavande, smilja i žalfije (MIC > 113,64 µl/ml) prilikom ispitivanja antibakterijske aktivnosti izolata *L. monocytogenes*. Slično je zabeleženo i kod EO bosiljka i hajdučke trave (MIC > 56,82 µl/ml), odnosno EO žalfije, mirte i tajlandskog đumbira (MIC > 28,41 µl/ml). Ovim MIC vrednosti potvrđuju rezultate dobijene disk difuzionom metodom.

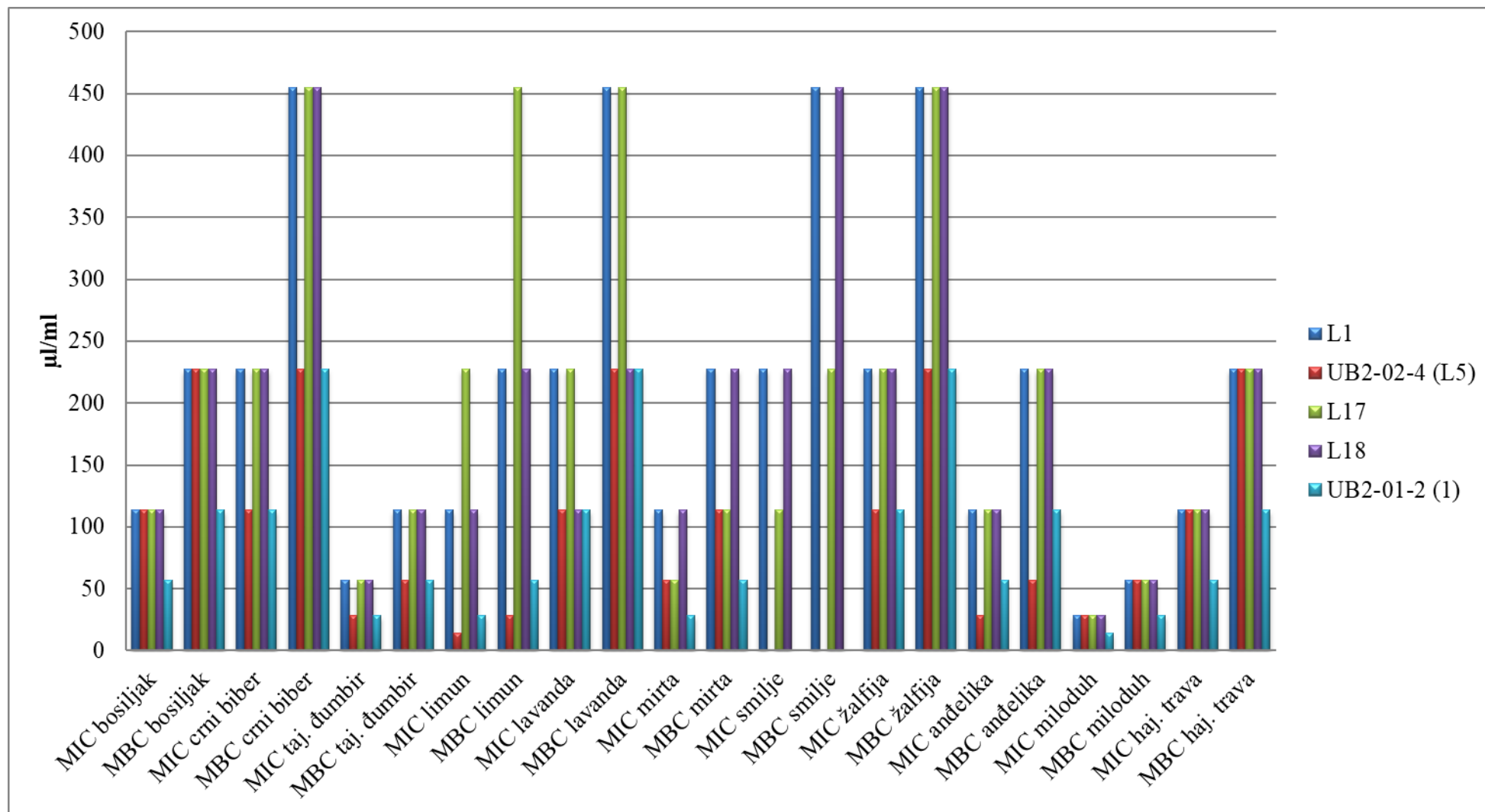
Antibakterijska aktivnost DMSO nije uočena prema testiranim izolatima.



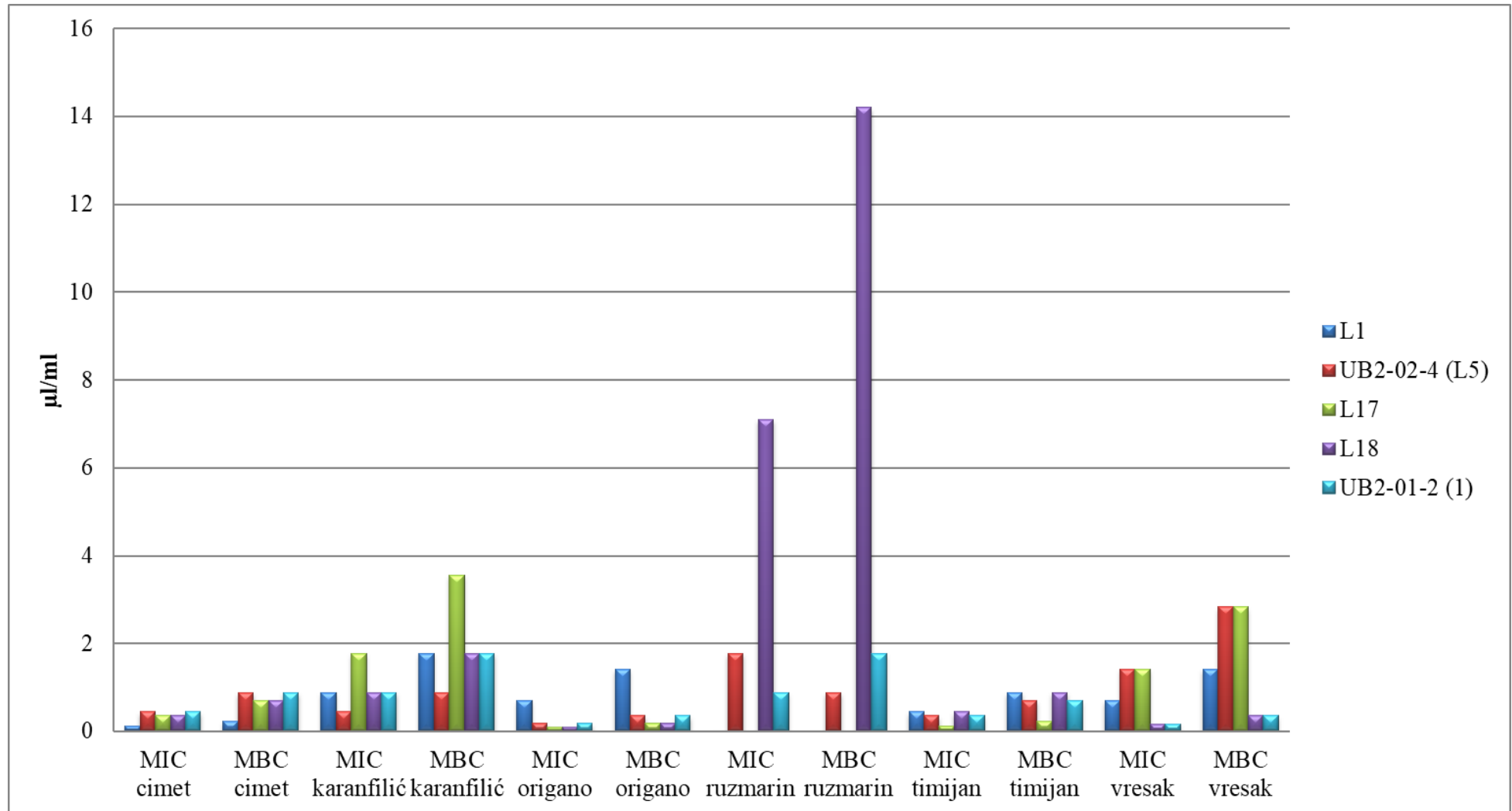
Grafikon 5.1. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) deset izabranih etarskih ulja na izolate *Salmonella Enteritidis*.



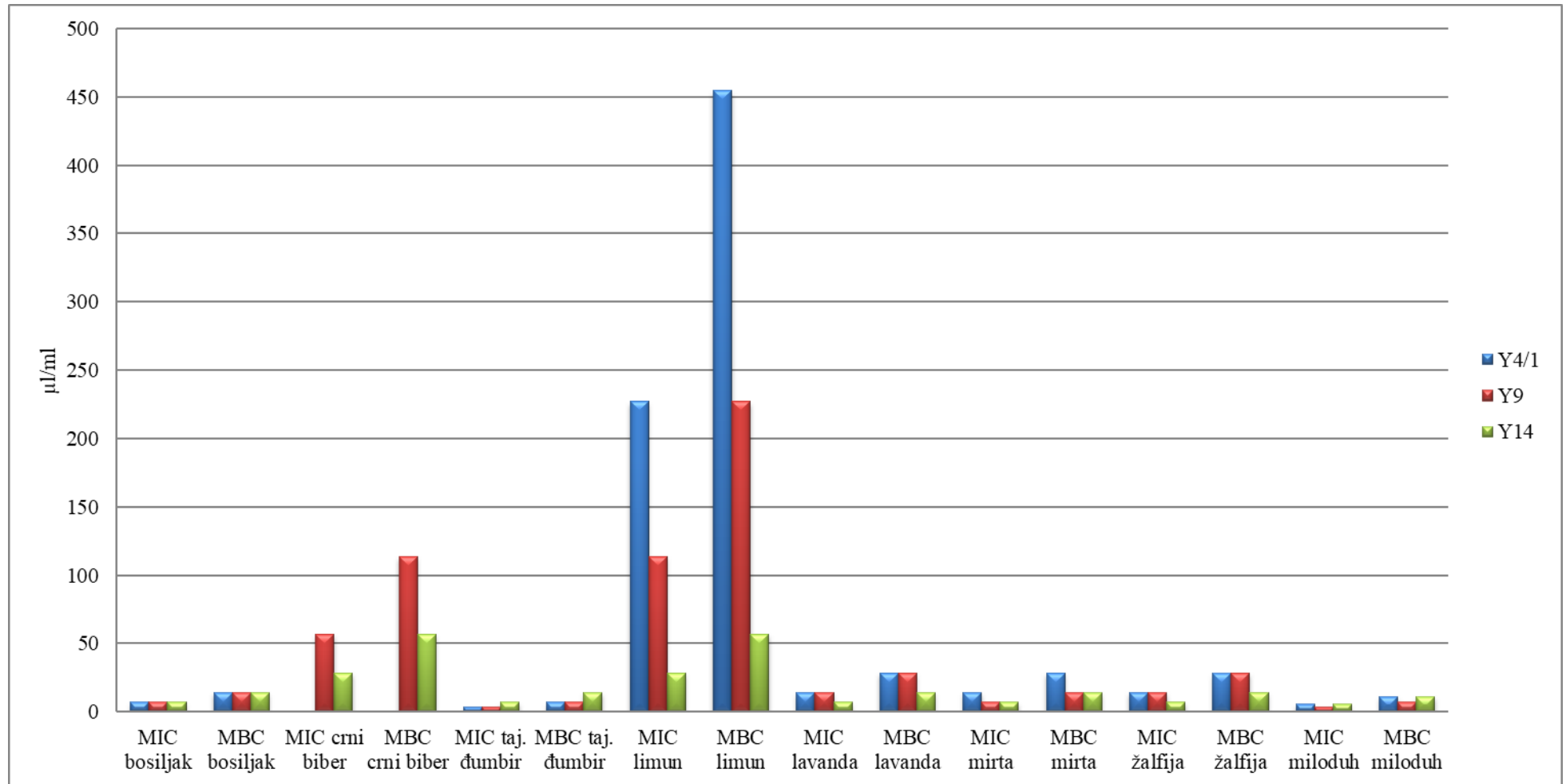
Grafikon 5.2. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) deset izabranih etarskih ulja na izolate *Salmonella Typhimurium*.



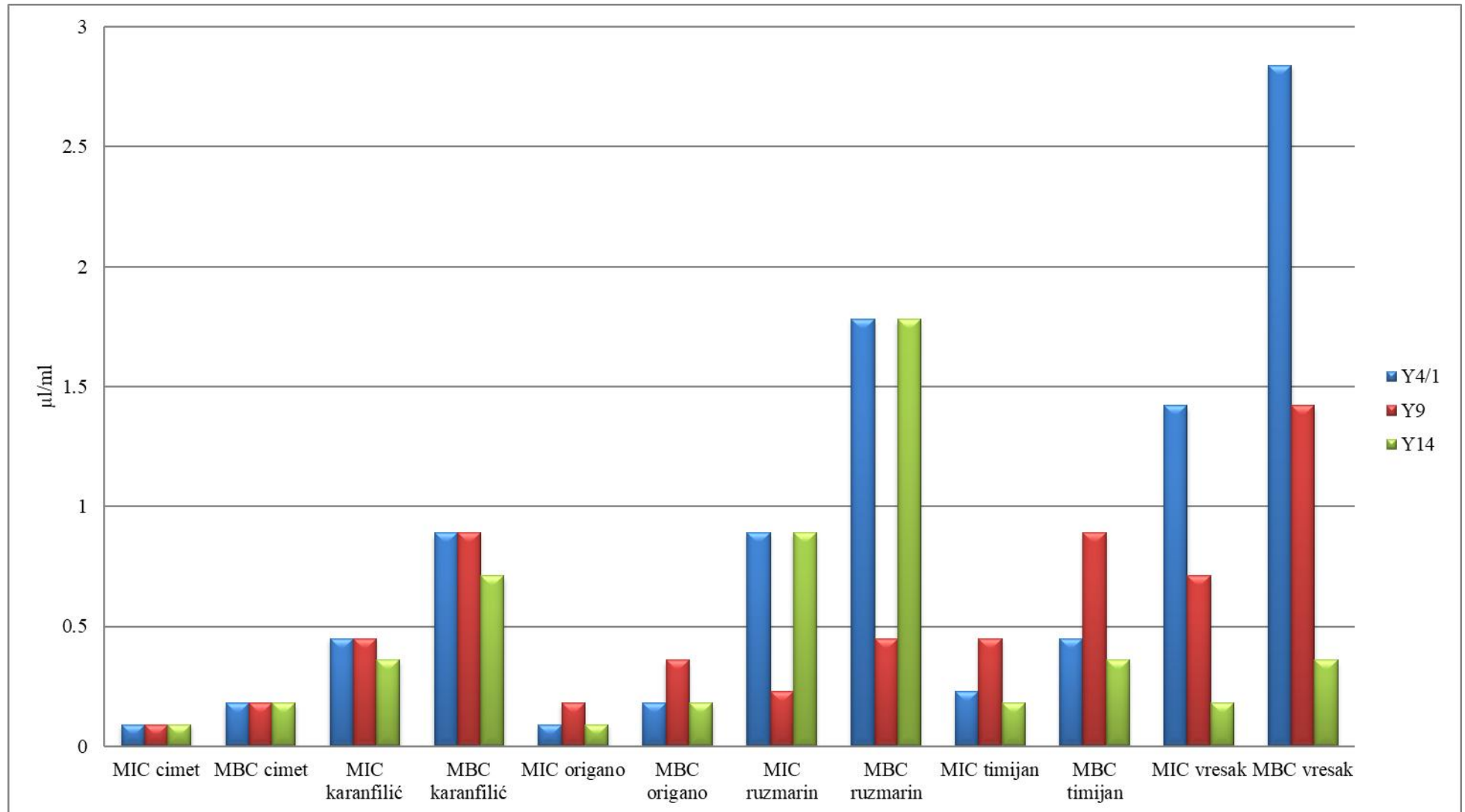
Grafikon 5.3. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) 11 izabranih etarskih ulja na izolate *Listeria monocytogenes*.



Grafikon 5.4. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) šest izabranih etarskih ulja na izolate *Listeria monocytogenes*.



Grafikon 5.5. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) osam izabranih etarskih ulja na izolate *Yersinia enterocolitica*.



Grafikon 5.6. Prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) šest izabranih etarskih ulja na izolate *Yersinia enterocolitica*.

5.5. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA

5.5.1. Formiranje biofilмова na polistirenskim mikrotitar pločama

Rezultati sposobnosti formiranja biofilмова na polistirenskim mikrotitar pločama u tri bujona (TSB, MB i LB bujon) i na tri temperature (37 ± 1 °C, 15 ± 1 °C i 5 ± 1 °C) tokom 48 časovne inkubacije ispitanih izolata *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* pokazuju da ispitani izolati imaju sposobnost formiranja biofilмова, dok njihov kvantitet zavisi od uslova sredine, odnosno bujona i/ili temperature.

Na temperaturi od 37 ± 1 °C, u TSB, MB i LB bujonu, ispitani izolati su formirali četiri (8,33%) jaka biofilma, 17 (35,42%) umerenih biofilмова, 16 (33,33%) slabih biofilмова, dok u 11 (22,92%) slučajeva nije došlo do formiranja biofilma (Tabela 5.11).

Table 5.11. Sposobnost formiranja biofilмова testiranih izolata patogenih bakterija na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 37 ± 1 °C.

Oznaka izolata	Sposobnost formiranja biofilмова ^a		
	TSB	MB	LB
SE53	$0,282 \pm 0,061^{**}$	$0,185 \pm 0,005^{*}$	$0,225 \pm 0,014^{*}$
SE56	$0,291 \pm 0,073^{**}$	$0,215 \pm 0,018^{*}$	$0,464 \pm 0,062^{**}$
SE132	$0,136 \pm 0,013^{*}$	$0,215 \pm 0,035^{*}$	$0,481 \pm 0,092^{**}$
SE144	$0,192 \pm 0,034^{*}$	$0,174 \pm 0,010^{*}$	$0,530 \pm 0,084^{***}$
ST28	$0,301 \pm 0,066^{**}$	$0,132 \pm 0,019^{\circ}$	$0,703 \pm 0,064^{***}$
ST35	$0,184 \pm 0,029^{*}$	$0,107 \pm 0,008^{\circ}$	$0,293 \pm 0,042^{**}$
ST48	$0,204 \pm 0,039^{*}$	$0,096 \pm 0,008^{\circ}$	$0,771 \pm 0,112^{***}$
ST49	$0,238 \pm 0,071^{**}$	$0,127 \pm 0,027^{\circ}$	$0,455 \pm 0,067^{**}$
L1	$0,349 \pm 0,046^{**}$	$0,290 \pm 0,72^{**}$	$0,129 \pm 0,022^{*}$
UB2-02-4 (L5)	$0,341 \pm 0,047^{**}$	$0,324 \pm 0,086^{**}$	$0,149 \pm 0,010^{*}$
L17	$0,285 \pm 0,037^{**}$	$0,279 \pm 0,033^{**}$	$0,105 \pm 0,012^{\circ}$
L18	$0,316 \pm 0,070^{**}$	$0,232 \pm 0,075^{*}$	$0,109 \pm 0,015^{\circ}$
UB2-01-2 (1)	$0,519 \pm 0,047^{***}$	$0,242 \pm 0,026^{*}$	$0,142 \pm 0,018^{*}$

Y4/1	$0,197 \pm 0,089^*$	$0,109 \pm 0,024^o$	$0,144 \pm 0,043^*$
Y9	$0,382 \pm 0,062^{**}$	$0,104 \pm 0,031^o$	$0,115 \pm 0,034^o$
Y14	$0,295 \pm 0,070^{**}$	$0,113 \pm 0,016^o$	$0,115 \pm 0,028^o$

Legenda: ^aVrednosti su izražene kao prosek $OD_{550} \pm SD$.

Biofilm producer: *** – jak; ** – umeren; * – slab; ^o – nije; na osnovu:

TSB: ODc = 0,108;

jak biofilm producer: $OD > 0,432$;

umeren biofilm producer: $0,216 < OD < 0,432$;

slab biofilm producer: $0,108 < OD < 0,216$;

nije biofilm producer: $OD < 0,108$.

MB: ODc = 0,133;

jak biofilm producer: $OD > 0,533$;

umeren biofilm producer: $0,267 < OD < 0,533$;

slab biofilm producer: $0,133 < OD < 0,267$;

nije biofilm producer: $OD < 0,133$.

LB bujon: ODc = 0,123;

jak biofilm producer: $OD > 0,491$;

umeren biofilm producer: $0,246 < OD < 0,491$;

slab biofilm producer: $0,123 < OD < 0,246$;

nije biofilm producer: $OD < 0,123$.

Na temperaturi od 15 ± 1 °C, u TSB, MB i LB bujonu, ispitani izolati su formirali tri (6,25%) jaka biofilma, 11 (22,92%) umerenih biofilmova, 18 (37,50%) slabih biofilmova, dok u 16 (33,33%) slučajeva nije došlo do formiranja biofilma (Tabela 5.12).

Table 5.12. Spособnost formiranja biofilmova testiranih izolata patogenih bakterija na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 15 ± 1 °C.

Oznaka izolata	Spособnost formiranja biofilmova ^a		
	TSB	MB	LB
SE53	$0,188 \pm 0,010^*$	$0,173 \pm 0,008^*$	$0,240 \pm 0,051^*$
SE56	$0,186 \pm 0,011^*$	$0,210 \pm 0,015^*$	$0,196 \pm 0,016^*$
SE132	$0,445 \pm 0,087^{**}$	$0,191 \pm 0,014^*$	$0,406 \pm 0,051^{**}$
SE144	$0,163 \pm 0,007^o$	$0,162 \pm 0,007^o$	$0,161 \pm 0,017^*$
ST28	$0,703 \pm 0,081^{***}$	$0,126 \pm 0,015^o$	$1,081 \pm 0,092^{***}$
ST35	$0,540 \pm 0,093^{**}$	$0,113 \pm 0,009^o$	$1,194 \pm 0,119^{***}$
ST48	$0,404 \pm 0,087^{**}$	$0,131 \pm 0,021^o$	$0,373 \pm 0,040^{**}$
ST49	$0,582 \pm 0,098^{**}$	$0,162 \pm 0,038^o$	$0,524 \pm 0,067^{**}$
L1	$0,221 \pm 0,031^*$	$0,243 \pm 0,051^*$	$0,124 \pm 0,021^o$

UB2-02-4 (L5)	0,584 ± 0,081**	0,221 ± 0,038*	0,442 ± 0,100**
L17	0,144 ± 0,034°	0,211 ± 0,075*	0,139 ± 0,011°
L18	0,124 ± 0,011°	0,143 ± 0,025°	0,122 ± 0,013°
UB2-01-2 (1)	0,259 ± 0,030*	0,178 ± 0,024*	0,382 ± 0,058*
Y4/1	0,264 ± 0,060*	0,131 ± 0,015°	0,350 ± 0,055**
Y9	0,411 ± 0,090**	0,133 ± 0,008°	0,138 ± 0,012°
Y14	0,305 ± 0,090*	0,163 ± 0,026°	0,254 ± 0,081*

Legenda: ^aVrednosti su izražene kao prosek OD₅₅₀ ± SD.

Biofilm producer: *** – jak; ** – umeren; * – slab; ° – nije; na osnovu:

TSB: OD_c = 0,173;

jak biofilm producer: OD > 0,693;

umeren biofilm producer: 0,347 < OD < 0,693;

slab biofilm producer: 0,173 < OD < 0,347;

nije biofilm producer: OD < 0,173.

MB: OD_c = 0,167;

jak biofilm producer: OD > 0,670;

umeren biofilm producer: 0,335 < OD < 0,670;

slab biofilm producer: 0,167 < OD < 0,335;

nije biofilm producer: OD < 0,167.

LB bujon: OD_c = 0,159;

jak biofilm producer: OD > 0,635;

umeren biofilm producer: 0,317 < OD < 0,635;

slab biofilm producer: 0,159 < OD < 0,317;

nije biofilm producer: OD < 0,159.

Na temperaturi od 5 ± 1 °C, u TSB, MB i LB bujonu, ispitani izolati nisu formirali jake i umerene biofilmove. U 15 (31,25%) slučajeva su formirali slabe biofilmove, a u 33 (68,75%) slučajeva nije došlo do formiranja biofilma (Tabela 5.13).

Table 5.13. Sposobnost formiranja biofilмова testiranih izolata patogenih bakterija prenosivih hranom na polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturi od 5 ± 1 °C.

Oznaka izolata	Sposobnost formiranja biofilмова ^a		
	TSB	MB	LB
SE53	0,247 ± 0,018*	0,199 ± 0,025*	0,185 ± 0,015*
SE56	0,222 ± 0,009*	0,208 ± 0,020*	0,157 ± 0,014*
SE132	0,187 ± 0,010*	0,214 ± 0,025*	0,170 ± 0,014*
SE144	0,159 ± 0,011*	0,145 ± 0,006°	0,128 ± 0,009*
ST28	0,186 ± 0,018*	0,136 ± 0,011°	0,194 ± 0,046*

ST35	$0,172 \pm 0,024^*$	$0,141 \pm 0,019^\circ$	$0,163 \pm 0,021^*$
ST48	$0,123 \pm 0,005^\circ$	$0,111 \pm 0,011^\circ$	$0,083 \pm 0,037^\circ$
ST49	$0,149 \pm 0,009^\circ$	$0,124 \pm 0,008^\circ$	$0,062 \pm 0,028^\circ$
L1	$0,111 \pm 0,010^\circ$	$0,121 \pm 0,007^\circ$	$0,076 \pm 0,007^\circ$
UB2-02-4 (L5)	$0,103 \pm 0,006^\circ$	$0,138 \pm 0,009^\circ$	$0,081 \pm 0,009^\circ$
L17	$0,110 \pm 0,008^\circ$	$0,116 \pm 0,015^\circ$	$0,076 \pm 0,010^\circ$
L18	$0,095 \pm 0,007^\circ$	$0,095 \pm 0,010^\circ$	$0,081 \pm 0,008^\circ$
UB2-01-2 (1)	$0,111 \pm 0,016^\circ$	$0,122 \pm 0,011^\circ$	$0,080 \pm 0,011^\circ$
Y4/1	$0,102 \pm 0,008^\circ$	$0,092 \pm 0,006^\circ$	$0,016 \pm 0,004^\circ$
Y9	$0,099 \pm 0,008^\circ$	$0,092 \pm 0,008^\circ$	$0,011 \pm 0,005^\circ$
Y14	$0,108 \pm 0,010^\circ$	$0,097 \pm 0,009^\circ$	$0,015 \pm 0,006^\circ$

Legenda: ^aVrednosti su izražene kao prosek OD₅₅₀ ± SD.

Biofilm producer: *** – jak; ** – umeren; * – slab; ° – nije; na osnovu:

TSB: ODc = 0,150;

jak biofilm producer: OD > 0,600;

umeren biofilm producer: 0,300 < OD < 0,600;

slab biofilm producer: 0,150 < OD < 0,300;

nije biofilm producer: OD < 0,150.

MB: ODc = 0,161;

jak biofilm producer: OD > 0,643;

umeren biofilm producer: 0,321 < OD < 0,643;

slab biofilm producer: 0,161 < OD < 0,321;

nije biofilm producer: OD < 0,161.

LB bujon: ODc = 0,113;

jak biofilm producer: OD > 0,453;

umeren biofilm producer: 0,226 < OD < 0,453;

slab biofilm producer: 0,113 < OD < 0,226;

nije biofilm producer: OD < 0,113.

Ukupno pet izolata bili su jaki biofilm produceri. Od toga tri pripadaju *S. Typhimurium* i po jedan *S. Enteritidis* i *L. monocytogenes*. Izolat *S. Typhimurium* ST28 procenjen je jakim biofilm producerom u tri uslova inkubacije. Nijedan izolat *Y. enterocolitica* nije bio jak biofilm producer. Generalno, ovi izolati bili su najslabiji biofilm produceri. U MB nisu uspeali formirati biofilmove bez obzira na temperaturu inkubacije izolati *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*. Prilikom inkubacije na temperaturi od 5 ± 1 °C nije došlo do formiranja biofilмова ni u jednom bujonu izolata *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*.

Za formiranje biofilмова izolata *S. Enteritidis* nije utvrđena statistička značajnost između temperatura inkubacije u bujonima TSB ($p = 0,073$) i MB ($p = 0,071$), dok je prosečna vrednost OD₅₅₀ pri temperaturi od 37 ± 1 °C bila statistički veća ($p < 0,05$) od OD₅₅₀ vrednosti druge dve temperature prilikom formiranja biofilмова u LB bujonu (Tabela 5.14).

Tabela 5.14. Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Salmonella* Enteritidis.

Temperatura	Bujon		
	TSB	MB	LB
37 ± 1 °C	0,225 ± 0,081 ^{Ba}	0,197 ± 0,027 ^{Ba}	0,425 ± 0,135 ^{Aa}
15 ± 1 °C	0,246 ± 0,123 ^{Aa}	0,184 ± 0,021 ^{Ba}	0,251 ± 0,101 ^{Ab}
5 ± 1 °C	0,204 ± 0,036 ^{Aa}	0,191 ± 0,033 ^{Aa}	0,160 ± 0,025 ^{Bc}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek OD₅₅₀ ± SD (n = 48). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između različitih bujona. Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između različitih temperatura inkubacije.

Kvantiteti formiranih biofilmova izolata *S. Typhimurium* statistički su najveći (p < 0,05) pri temperaturi od 15 ± 1 °C u TSB i LB bujonu (Tabela 5.15).

Tabela 5.15. Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Salmonella* Typhimurium.

Temperatura	Bujon	
	TSB	LB
37 ± 1 °C	0,232 ± 0,068 ^{Bb}	0,555 ± 0,205 ^{Ab}
15 ± 1 °C	0,558 ± 0,137 ^{Ba}	0,793 ± 0,360 ^{Aa}
5 ± 1 °C	0,157 ± 0,028 ^{Ac}	0,126 ± 0,064 ^{Bc}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek OD₅₅₀ ± SD (n = 48). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između različitih bujona. Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između različitih temperatura inkubacije.

Izolatima *L. monocytogenes* statistički je najviše (p < 0,05) pogodovala temperatura od 37 ± 1 °C prilikom inkubacije u TSB i MB, odnosno 15 ± 1 °C u LB bujonu (Tabela 5.16).

Tabela 5.16. Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilmova izolata *Listeria monocytogenes*.

Temperatura	Bujon		
	TSB	MB	LB
37 ± 1 °C	0,362 ± 0,095 ^{Aa}	0,273 ± 0,069 ^{Ba}	0,127 ± 0,023 ^{Cb}
15 ± 1 °C	0,266 ± 0,172 ^{Ab}	0,199 ± 0,057 ^{Bb}	0,242 ± 0,149 ^{ABa}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek OD₅₅₀ ± SD (n = 60). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B, C) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između različitih bujona.

Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između različitih temperatura inkubacije.

Izolatima *Y. enterocolitica* statistički ($p < 0,05$) je najbolje odgovarala temperatura od 15 ± 1 °C za formiranje biofilмова u TSB i LB bujonu. Međutim, TSB je za izolate *Y. enterocolitica* bio pogodniji ($p < 0,05$) za formiranje biofilмова u odnosu na LB bujon (Tabela 5.17).

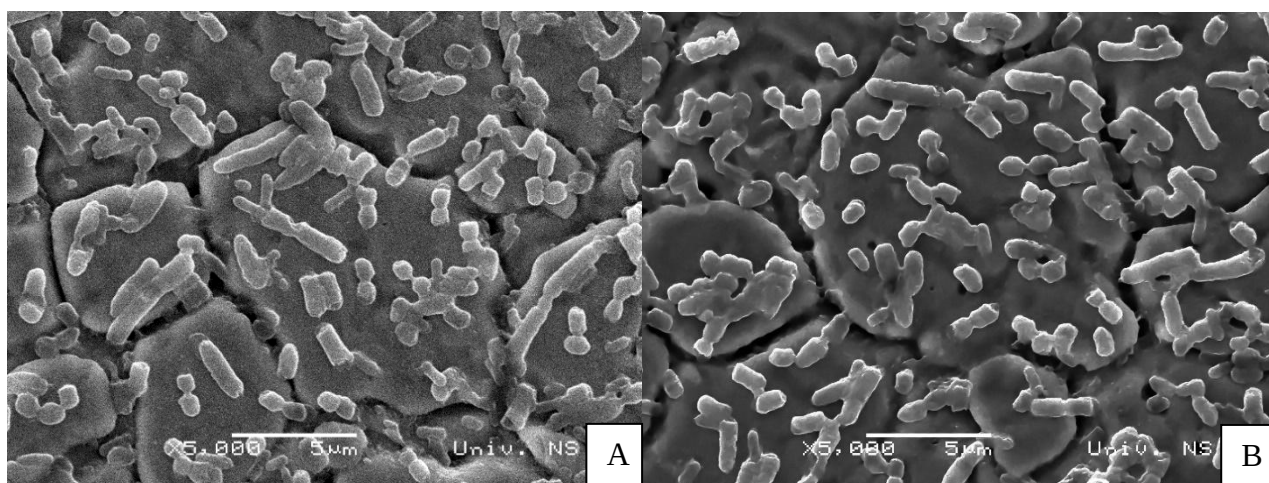
Tabela 5.17. Uticaj različitih bujona i različitih temperatura inkubacije na formiranje biofilмова izolata *Yersinia enterocolitica*.

Temperatura	Bujon	
	TSB	LB
37 ± 1 °C	$0,292 \pm 0,104^{Ab}$	$0,125 \pm 0,037^{Bb}$
15 ± 1 °C	$0,327 \pm 0,099^{Aa}$	$0,248 \pm 0,103^{Ba}$

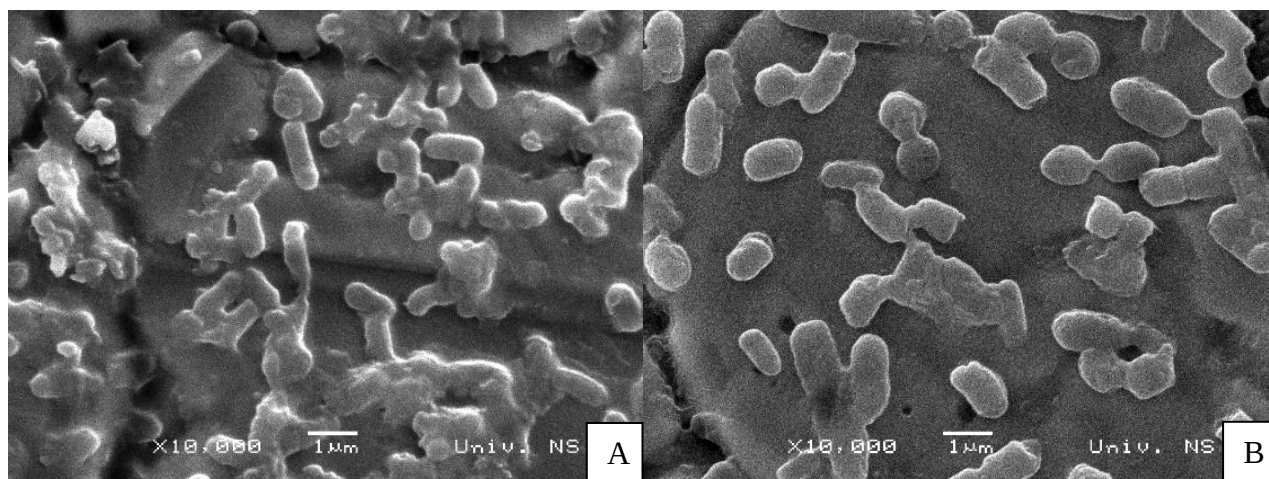
Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek $OD_{550} \pm SD$ ($n = 36$). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između različitih bujona. Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između različitih temperatura inkubacije.

5.5.2. Formiranje biofilмова na nerđajućem čeliku

Skening elektronski mikrofotografije ispitanih izolata SE144, ST28, UB2-01-2 (1) i Y9 prikazani su na Slikama 5.3 i 5.4. Nakon 24 h inkubacije uočava se vezivanje bakterijskih ćelija za površinu nerđajućeg čelika. Bakterijske ćelije su uglavnom sporadično raspoređene u vidu monosloja. Na mikrofotografima su zabeleženi i trodimenzionalni pojedinačni ćelijski agregati. Određen broj ćelija nalazi se u binarnoj deobi, sa jasno vidljivom podelom jedne ćelije na dva dela, što ukazuje na dalje moguće stvaranje mikrokolonija.



Slika 5.3. Skening elektronski mikrofotografije biofilмова izolata *Salmonella* Enteritidis (SE144) (A) i *Salmonella* Typhimurium (ST28) (B) na površini nerđajućeg čelika nakon 24 h inkubacije u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 37 ± 1 °C. Skala = 5 μm, uveličanje = 5000.



Slika 5.4. Skening elektronski mikrografi biofilмова izolata *Listeria monocytogenes* (UB2-01-2 (1)) (A) i *Yersinia enterocolitica* (Y9) (B) na površini nerđajućeg čelika nakon 24 h inkubacije u tripton soja bujonu na temperaturi od 37 ± 1 °C. Skala = 1 μm, uveličanje = 10 000.

5.6. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA FORMIRANE BIOFILMOVE

Izolati *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* koji su bili umereni i jaki biofilm produceri na polistirenskim mikrotitar pločama podvrgnuti su daljem ispitivanju u cilju utvrđivanja uticaja izabranih EO na formirane biofilmove. Redukcija biomase biofilмова izolata *S. Enteritidis* kretala se u rasponu od 35,65% do 75,97% (Tabela 5.18). Interesantno je da su i minimalna i maksimalna redukcija postignute uticajem EO vreska kod izolata SE132, ali u različitim uslovima inkubiranja.

Tabela 5.18. Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Salmonella* Enteritidis.

Izolat	Uslovi ispitivanja	% inhibicije biofilмова					
		Etarska ulja					
		Origano	Vresak	Cimet	Ruzmarin	Karanfilic	Timijan
SE53	TSB 37 °C	52,30 ^b	56,99 ^{ab}	45,09 ^a	46,10 ^{ab}	48,79 ^{ab}	43,91 ^a
SE56	TSB 37 °C	53,81 ^b	43,67 ^a	48,85 ^{ab}	53,09 ^b	51,49 ^{ab}	48,42 ^{ab}
SE56	LB 37 °C	48,33 ^{ab}	47,84 ^{ab}	44,97 ^a	50,14 ^{ab}	55,62 ^b	50,57 ^{ab}
SE132	LB 37 °C	48,48 ^b	35,65 ^a	42,33 ^{ab}	40,07 ^{ab}	44,68 ^{ab}	44,77 ^{ab}
SE132	TSB 15 °C	74,83 ^{cd}	75,97 ^d	72,45 ^{bc}	65,75 ^a	71,57 ^b	72,79 ^{bc}
SE132	LB 15 °C	71,61 ^d	66,26 ^c	60,14 ^b	54,99 ^a	70,83 ^d	69,05 ^{cd}
SE144	LB 37 °C	47,06 ^b	50,91 ^{bc}	36,98 ^a	50,86 ^{bc}	58,18 ^c	52,47 ^{bc}

Legenda: Vrednosti su izražene kao procenat inhibicije (%) izračunat na osnovu srednje vrednosti OD₅₅₀ (n = 12). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim slovima (a, b, c, d) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Kod izolata *S. Typhimurium* redukcija biomase biofilmova kretala se od 30,93%, postignuta uticajem EO timijana, do 90,28%, postignuta uticajem EO vreska (Tabela 5.19).

Tabela 5.19. Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Salmonella Typhimurium*.

Izolat	Uslovi ispitivanja	% inhibicije biofilmova				
		Etarska ulja				
		Origano	Vresak	Cimet	Karanfilić	Timijan
ST28	TSB 37 °C	59,30 ^b	43,08 ^a	61,66 ^b	61,46 ^b	34,83 ^a
ST28	TSB 15 °C	86,12 ^b	85,76 ^b	85,31 ^b	86,38 ^b	44,04 ^a
ST28	LB 37 °C	84,21 ^e	46,51 ^b	55,28 ^c	71,40 ^d	30,93 ^a
ST28	LB 15 °C	88,64 ^c	84,50 ^c	68,83 ^b	86,53 ^c	60,42 ^a
ST35	TSB 15 °C	76,79 ^b	76,94 ^b	65,37 ^a	76,34 ^b	75,46 ^b
ST35	LB 37 °C	59,16 ^c	49,77 ^{abc}	47,44 ^{ab}	60,53 ^{bc}	40,39 ^a
ST35	LB 15 °C	89,66 ^c	90,28 ^c	85,55 ^b	89,54 ^c	80,51 ^a
ST48	TSB 15 °C	77,60 ^b	77,56 ^b	77,95 ^b	78,58 ^b	64,23 ^a
ST48	LB 37 °C	76,39 ^c	52,15 ^a	50,17 ^a	77,26 ^c	57,01 ^b
ST48	LB 15 °C	67,45 ^{bc}	54,36 ^a	52,64 ^a	71,85 ^c	63,00 ^b
ST49	TSB 37 °C	58,12 ^c	52,70 ^{bc}	42,61 ^a	51,79 ^{bc}	45,87 ^{ab}
ST49	TSB 15 °C	88,53 ^c	81,17 ^b	79,42 ^a	80,87 ^b	79,34 ^a
ST49	LB 37 °C	69,56 ^b	70,26 ^b	65,02 ^b	48,13 ^a	70,66 ^b
ST49	LB 15 °C	75,49 ^{ab}	76,07 ^b	68,10 ^a	76,13 ^b	67,94 ^a

Legenda: Vrednosti su izražene kao procenat inhibicije (%) izračunat na osnovu srednje vrednosti OD₅₅₀ (n = 12). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim slovima (a, b, c, d, e) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Biofilmovi izolata *L. monocytogenes* redukovani su u opsegu od 32,61% EO timijana do 78,62% EO origana i vreska (Tabela 5.20).

Tabela 5.20. Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Listeria monocytogenes*.

Izolat	Uslovi ispitivanja	% inhibicije biofilмова				
		Etarska ulja				
		Origano	Vresak	Cimet	Karanfilić	Timijan
L1	TSB 37 °C	51,72 ^a	64,92 ^{cd}	57,16 ^{ab}	61,44 ^{bc}	69,25 ^d
L1	MB 37 °C	56,72 ^{ab}	62,64 ^c	59,20 ^{bc}	55,57 ^{ab}	53,76 ^a
UB2-02-4 (L5)	TSB 37 °C	62,41 ^{ab}	66,01 ^b	59,70 ^a	64,76 ^b	58,06 ^a
UB2-02-4 (L5)	TSB 15 °C	69,72 ^c	66,05 ^b	59,63 ^a	67,54 ^{bc}	66,32 ^b
UB2-02-4 (L5)	MB 37 °C	46,58 ^b	42,03 ^b	42,90 ^b	41,02 ^b	32,61 ^a
UB2-02-4 (L5)	LB 15 °C	78,62 ^b	78,62 ^b	77,85 ^b	76,75 ^b	66,82 ^a
L17	TSB 37 °C	42,87 ^{ab}	51,64 ^b	44,01 ^{ab}	41,35 ^a	38,98 ^a
L17	MB 37 °C	43,88 ^a	44,44 ^{ab}	51,28 ^b	48,57 ^{ab}	46,86 ^{ab}
L18	TSB 37 °C	44,38 ^a	40,77 ^a	38,63 ^a	42,46 ^a	41,24 ^a
UB2-01-2 (1)	TSB 37 °C	55,19 ^a	58,04 ^a	58,77 ^{ab}	63,31 ^b	54,32 ^a

Legenda: Vrednosti su izražene kao procenat inhibicije (%) izračunat na osnovu srednje vrednosti OD₅₅₀ (n = 12). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim slovima (a, b, c, d) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Redukcija biomase biofilмова kod izolata *Y. enterocolitica* postignuta u rasponu od 45,34% do 78,89% delovanje EO timijana, odnosno EO origana (Tabela 5.21).

Tabela 5.21. Uticaj izabranih etarskih ulja na biofilmove izolata *Yersinia enterocolitica*.

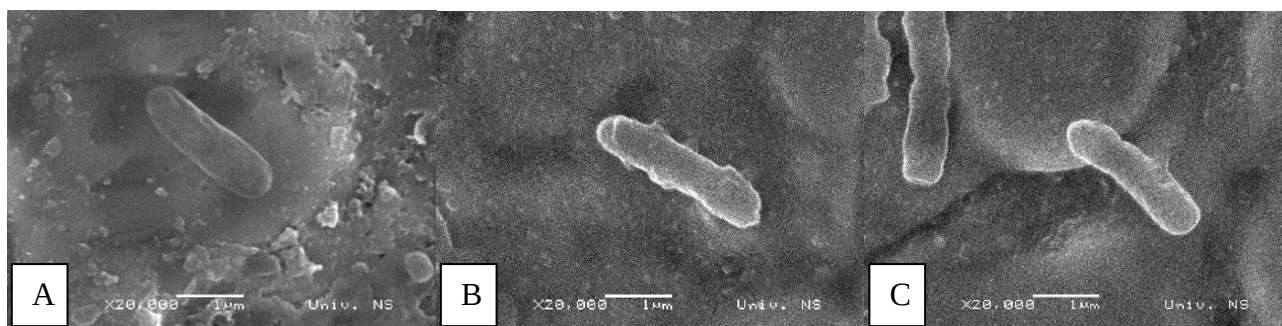
Izolat	Uslovi ispitivanja	% inhibicije biofilмова					
		Etarska ulja					
		Origano	Vresak	Cimet	Ruzmarin	Karanfilić	Timijan
Y4/1	LB 15 °C	72,07 ^{bc}	70,21 ^b	66,90 ^a	71,12 ^{bc}	73,45 ^c	72,17 ^{bc}
Y9	TSB 37 °C	54,73 ^a	59,62 ^{ab}	62,94 ^{bc}	67,32 ^c	60,65 ^{ab}	57,57 ^{ab}
Y9	TSB 15 °C	78,89 ^a	76,42 ^a	78,59 ^a	78,45 ^a	76,87 ^a	78,14 ^a
Y14	TSB 37 °C	70,37 ^b	62,51 ^b	62,46 ^b	62,01 ^b	63,70 ^b	45,34 ^a

Legenda: Vrednosti su izražene kao procenat inhibicije (%) izračunat na osnovu srednje vrednosti OD₅₅₀ (n = 12). Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim slovima (a, b, c) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Redukcija biomase biofilмова ispitanih izolata *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* kretala se između 30,93% i 90,28%.

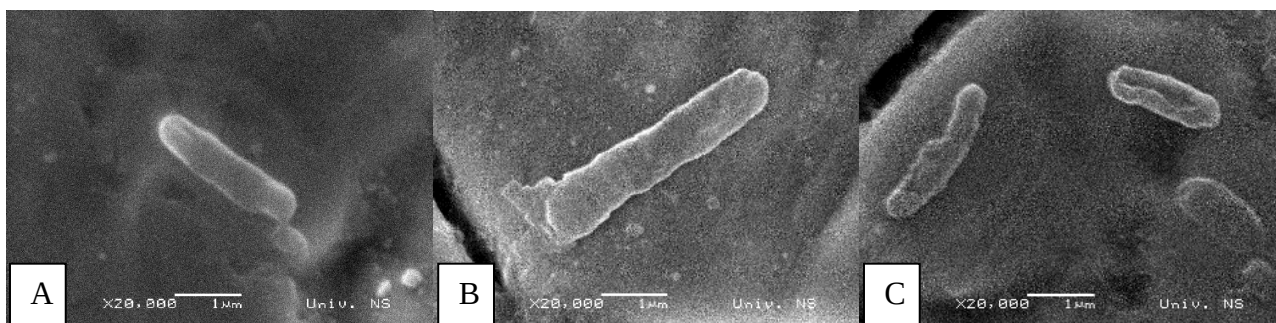
5.7. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA MIKROMORFOLOŠKE PROMENE IZOLATA BAKTERIJA

Na SEM mikrografima se uočava razlika u ćelijskim strukturama netretiranih (kontrolnih) bakterija i bakterija tretiranih EO origana i timijana. Netretirane ćelije bakterija *S. Enteritidis* (Slika 5.5.A), *S. Typhimurium* (Slika 5.6.A), *L. monocytogenes* (Slika 5.7.A) i *Y. enterocolitica* (Slika 5.8.A) poseduju svoju tipičnu građu. Suprotno, bakterijske ćelije tretirane MIC EO origana (Slike 5.5.B, 5.6.B, 5.7.B i 5.8.B) i timijana (Slike 5.5.C, 5.6.C, 5.7.C i 5.8.C) pretrpile su znatne morfološke promene. Oba EO prouzrokovala su narušavanje ćelijskog integriteta i povećanje permeabilnosti ćelijskih membrana. Na mikrografima se uočavaju rupture ćelijske membrane, nedovršen i deformisan oblik bakterijskih ćelija, kao i liza ćelije.

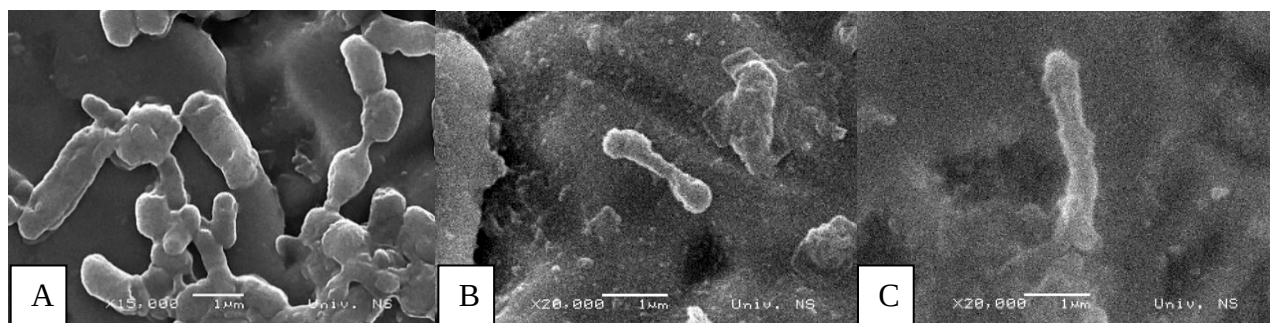


Slika 5.5. Skening elektronski mikrografi ćelija *Salmonella Enteritidis* (SE144): (A) kontrola (skala = 1 μm, uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 μm,

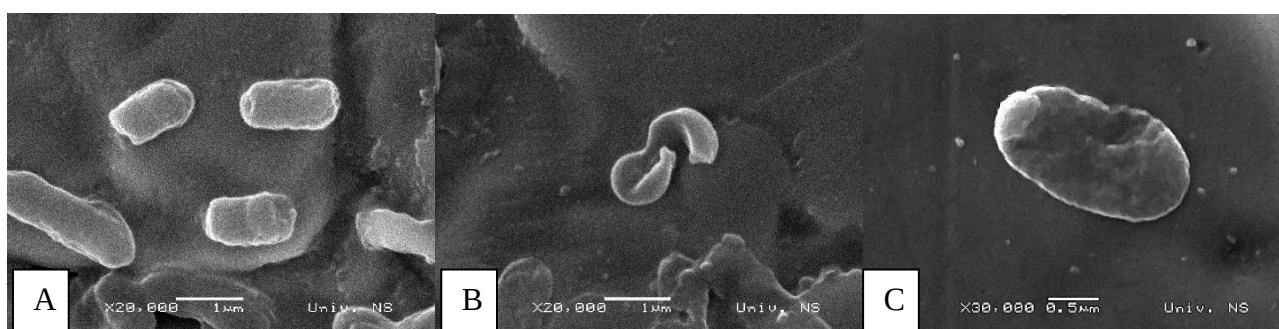
uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000).



Slika 5.6. Skening elektronski mikrografi ćelija *Salmonella* Typhimurium (ST28): (A) kontrola (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000).



Slika 5.7. Skening elektronski mikrografi ćelija *Listeria monocytogenes* (UB2-01-2 (1)): (A) kontrola (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000).



Slika 5.8. Skening elektronski mikrografi ćelija *Yersinia enterocolitica* (Y9): (A) kontrola (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (B) tretirane MIC etarskog ulja origana tokom 24 h (skala = 1 μm , uveličanje = 20 000); (C) tretirane MIC etarskog ulja timijana tokom 24 h (skala = 0,5 μm , uveličanje = 30 000).

5.8. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA MIKROBIOLOŠKI STATUS USITNJENOG MESA SVINJA

5.8.1. Mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja

Svi rezultati (Tabela 5.22) usitnjenog mesa svinja namenjenog za ogled, uzimajući u obzir propisane mikrobiološke kriterijume higijene u procesu proizvodnje za ukupan broj aerobnih mezofilnih kolonija ($m = 5 \times 10^5$ CFU/g (5,70 log CFU/g) i $M = 5 \times 10^6$ CFU/g (6,70 log CFU/g)) i broj *E. coli* ($m = 50$ CFU/g (1,70 log CFU/g) i $M = 500$ CFU/g (2,70 log CFU/g)) prema Pravilniku o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Službeni glasnik RS“, br. 72/2010 i 62/2018), su bili zadovoljavajući. U uzorcima svežeg usitnjenog mesa svinja nije utvrđeno prisustvo patogenih bakterija *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*.

Tabela 5.22. Rezultati mikrobioloških ispitivanja usitnjenog mesa svinja namenjenog za ogled.

Faze ogleda	Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (log CFU/g)	<i>E. coli</i> (log CFU/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (log CFU/g)
I	5,32 ± 0,17	0,67 ± 0,58	3,05 ± 0,07
II	5,66 ± 0,03	0,82 ± 0,70	3,02 ± 0,07
III	4,68 ± 0,06	0,48 ± 0,61	2,18 ± 0,10
IV	5,58 ± 0,06	0,86 ± 0,47	3,72 ± 0,03

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek ± standardna devijacija (n = 5).

5.8.2. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella Enteritidis* SE53

Rezultati ispitivanja usitnjenog mesa svinja veštački kontaminiranog izolatom *S. Enteritidis* SE53 prikazani su Tabelom 5.23.

Početna populacija ukupnog broja aerobnih kolonija kretala se od 5,41 do 5,55 log CFU/g bez statističke značajnosti ($p = 0,628$) među grupama. Dodavanje EO origana i timijana dovelo je do značajnog ($p < 0,05$) smanjenja broja aerobnih mezofilnih kolonija u odnosu na kontrolnu grupu 1., 2. i 3. dana ispitivanja, kao i 4. dana, sem u grupi gde je primenjeno EO timijana u količini od 0,23 µl/g. Redukcija broja aerobnih mezofilnih bakterija kretala se između 0,25 i 0,75 log CFU/g.

Tokom ove faze ispitivanja nisu zapažene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) broja *E. coli* između različitih dana ispitivanja u okviru grupa (Tabela 5.24), kao ni između grupa ogleda tokom skladištenja na 4 ± 1 °C (Tabela 5.25).

Inicijalna populacija *Enterobacteriaceae* kretala se između 4,85 i 4,96 log CFU/g bez statističke značajnosti među tretmanima ($p = 0,305$). Do kraja ispitivanja statistička značajnost nije zapažena ($p > 0,05$) između kontrolne grupe i tretmana gde je primenjena MIC (0,04 µl/g) količina EO origana. Kod ostalih tretmana uočene su značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu svih dana ispitivanja sem početnog. Posmatrajući dane skladištenja, uočava se da je broj *Enterobacteriaceae* stabilan u grupama gde je primenjeno EO origana (MIC = 0,04 µl/g, $p = 0,929$; 2MIC = 0,08 µl/g, $p = 0,628$).

Prva dva dana ispitivanja ne uočava se statistička značajnost u broju *S. Enteritidis* između tretmana (nulti dan $p = 0,207$; prvi dan $p = 0,096$). Dodavanjem EO origana u MIC i 2MIC količini nije uočena redukcija broja *S. Enteritidis* ($p > 0,05$) tokom skladištenja, sem poslednjeg dana ispitivanja, kada je postignuta značajna redukcija broja *S. Enteritidis* za $0,15 \log \text{CFU/g}$, odnosno $0,18 \log \text{CFU/g}$. Broj *S. Enteritidis* bio je stabilan tokom skladištenja na $4 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ primenom EO origana u MIC ($p = 0,961$) i 2MIC ($p = 0,503$) količini.

Bez obzira na primenjenu količinu EO timijana redukcija broja *S. Enteritidis* se uočava već drugog dana ispitivanja i traje do kraja skladištenja. Primenom EO timijana u MIC i 2MIC količini postignuta je značajna redukcija broja *S. Enteritidis* za $0,44 \log \text{CFU/g}$, odnosno $0,55 \log \text{CFU/g}$ u odnosu na broj *S. Enteritidis* u kontrolnom uzorku.

Tabela 5.23. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella* Enteritidis SE53 i skladištenog na 4 ± 1 °C.

Mikrobiološki parametri (log CFU/g)	Grupa	Dani ispitivanja				
		0.	1.	2.	3.	4.
Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	Kontrola	$5,55 \pm 0,16^{aE}$	$6,22 \pm 0,17^{aD}$	$6,48 \pm 0,12^{aC}$	$7,35 \pm 0,12^{aB}$	$7,86 \pm 0,17^{aA}$
	SEMICO (0,04 µl/g)	$5,51 \pm 0,04^{aE}$	$5,89 \pm 0,14^{bD}$	$6,23 \pm 0,09^{bC}$	$7,02 \pm 0,31^{bB}$	$7,28 \pm 0,23^{cA}$
	SE2MICO (0,08 µl/g)	$5,47 \pm 0,25^{aD}$	$5,82 \pm 0,08^{bC}$	$5,88 \pm 0,17^{cC}$	$6,62 \pm 0,10^{cB}$	$7,11 \pm 0,21^{cA}$
	SEMICT (0,23 µl/g)	$5,45 \pm 0,13^{aD}$	$5,60 \pm 0,19^{cD}$	$6,22 \pm 0,12^{bC}$	$6,72 \pm 0,08^{cB}$	$7,68 \pm 0,16^{abA}$
	SE2MICT (0,46 µl/g)	$5,41 \pm 0,15^{aD}$	$5,47 \pm 0,05^{cD}$	$5,87 \pm 0,12^{cC}$	$6,71 \pm 0,12^{cB}$	$7,53 \pm 0,07^{bA}$
<i>Escherichia coli*</i>	Kontrola	$0,32 \pm 0,50$	$0,48 \pm 0,53$	$0,16 \pm 0,39$	$0,32 \pm 0,50$	$0,58 \pm 0,64$
	SEMICO (0,04 µl/g)	$0,16 \pm 0,39$	$0,32 \pm 0,50$	$0,00 \pm 0,00$	$0,48 \pm 0,53$	$0,32 \pm 0,50$
	SE2MICO (0,08 µl/g)	$0,32 \pm 0,50$	$0,42 \pm 0,68$	$0,49 \pm 0,53$	$0,32 \pm 0,50$	$0,32 \pm 0,50$
	SEMICT (0,23 µl/g)	$0,00 \pm 0,00$	$0,32 \pm 0,50$	$0,53 \pm 0,59$	$0,16 \pm 0,39$	$0,37 \pm 0,58$
	SE2MICT (0,46 µl/g)	$0,56 \pm 0,64$	$0,32 \pm 0,50$	$0,21 \pm 0,51$	$0,24 \pm 0,59$	$0,37 \pm 0,58$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	$4,90 \pm 0,15^{aB}$	$4,87 \pm 0,07^{abB}$	$4,88 \pm 0,14^{abB}$	$4,96 \pm 0,09^{aAB}$	$5,05 \pm 0,09^{aA}$
	SEMICO (0,04 µl/g)	$4,96 \pm 0,11^{aA}$	$4,92 \pm 0,13^{aA}$	$4,91 \pm 0,09^{aA}$	$4,92 \pm 0,10^{abA}$	$4,96 \pm 0,13^{aA}$
	SE2MICO (0,08 µl/g)	$4,87 \pm 0,06^{aA}$	$4,81 \pm 0,04^{bA}$	$4,79 \pm 0,10^{bcA}$	$4,82 \pm 0,12^{bA}$	$4,80 \pm 0,13^{bA}$

	SEMICT (0,23 µl/g)	4,85 ± 0,06 ^{aA}	4,58 ± 0,04 ^{cC}	4,69 ± 0,07 ^{cdB}	4,59 ± 0,09 ^{cC}	4,59 ± 0,05 ^{cC}
	SE2MICT (0,46 µl/g)	4,86 ± 0,05 ^{aA}	4,55 ± 0,11 ^{cB}	4,61 ± 0,07 ^{dB}	4,56 ± 0,13 ^{cB}	4,57 ± 0,10 ^{cB}
Salmonella Enteritidis	Kontrola	4,81 ± 0,11 ^{aB}	4,85 ± 0,17 ^{aAB}	4,88 ± 0,14 ^{aAB}	4,90 ± 0,15 ^{aAB}	5,01 ± 0,07 ^{aA}
	SEMICO (0,04 µl/g)	4,82 ± 0,06 ^{aA}	4,84 ± 0,07 ^{aA}	4,84 ± 0,10 ^{aA}	4,86 ± 0,17 ^{aA}	4,86 ± 0,08 ^{bA}
	SE2MICO (0,08 µl/g)	4,77 ± 0,05 ^{aA}	4,77 ± 0,14 ^{aA}	4,81 ± 0,04 ^{aA}	4,83 ± 0,05 ^{aA}	4,83 ± 0,07 ^{bA}
	SEMICT (0,23 µl/g)	4,83 ± 0,07 ^{aA}	4,74 ± 0,07 ^{aAB}	4,61 ± 0,10 ^{bC}	4,62 ± 0,13 ^{bBC}	4,57 ± 0,13 ^{cC}
	SE2MICT (0,46 µl/g)	4,73 ± 0,07 ^{aA}	4,69 ± 0,08 ^{aA}	4,53 ± 0,16 ^{bB}	4,49 ± 0,14 ^{bB}	4,46 ± 0,13 ^{cB}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek ± standardna devijacija (n = 6). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c, d) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između koncentracija primenjenih etarskih ulja. Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B, C, D) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između dana skladištenja. *Ispitivanjem broja *E. coli* nisu utvrđene statističke razlike ($p > 0,05$) između koncentracija primenjenih etarskih ulja, odnosno između dana skladištenja. Iz tog razloga su u superskriptu izostavljena slova.

Tabela 5.24. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.

Grupe	Vreme skladištenja p – vrednost
Kontrola	0,673
SEMICO (0,04 µl/g)	0,386
SE2MICO (0,08 µl/g)	0,974
SEMICT (0,23 µl/g)	0,361
SE2MICT (0,46 µl/g)	0,835

Tabela 5.25. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa oglada.

Dani ispitivanja	Grupe oglada p – vrednost
0.	0,319
1.	0,977
2.	0,248
3.	0,853
4.	0,924

5.8.3. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella Typhimurium* ST35

Promene mikrobiološke populacije tokom ove faze ispitivanja prikazane su Tabelom 5.26. Populacija aerobnih mezofilnih bakterija na početku oglada kretala se između 5,85 i 5,96 log CFU/g bez statističke značajnosti između grupa ($p = 0,303$). Prvog i drugog dana ispitivanja uočena je redukcija broja aerobnih mezofilnih bakterija ($p < 0,05$) tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Izjednačenje broja aerobnih mezofilnih bakterija između tretmana uočava se trećeg ($p = 0,113$) i četvrtog dana ($p = 0,845$).

Tokom ove faze ispitivanja nisu zapažene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) broja *E. coli* između različitih dana ispitivanja u okviru grupa (Tabela 5.27), kao ni između grupa oglada tokom skladištenja (Tabela 5.28).

Broj *Enterobacteriaceae* na početku oglada kretao se između 4,51 i 4,62 log CFU/g, bez statističke značajnosti između tretmana ($p = 0,619$). Statistička značajnost nije uočena drugog ($p = 0,441$) i

trećeg ($p = 0,163$) dana ispitivanja. Redukcija broja *Enterobacteriaceae* zapaža se samo u grupama gde je primenjeno EO origana.

Na populaciju *S. Typhimurium* u usitnjenom mesu svinja nisu značajno ($p > 0,05$) uticale primenjene količine EO origana i timijana tokom skladištenja na 4 ± 1 °C (Tabela 5.29). Broj *S. Typhimurium* je do kraja ispitivanja ostao stabilan u kontrolnoj grupi ($p = 0,761$) i grupi gde je primenjeno EO timijana u MIC količini ($p = 0,222$). U ostalim grupama se uočava porast broja *S. Typhimurium* između 0,19 i 0,23 log CFU/g do kraja skladištenja u odnosu na broj *S. Typhimurium* na početku skladištenja.

Tabela 5.26. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Salmonella* Typhimurium ST35 i skladištenog na 4 ± 1 °C.

Mikrobiološki parametri (log CFU/g)	Grupa	Dani ispitivanja				
		0.	1.	2.	3.	4.
Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	Kontrola	$5,96 \pm 0,12^{aE}$	$6,71 \pm 0,13^{aD}$	$7,59 \pm 0,22^{aC}$	$7,96 \pm 0,16^{aB}$	$9,18 \pm 0,08^{aA}$
	STMICO (0,09 µl/g)	$5,85 \pm 0,04^{aE}$	$6,56 \pm 0,12^{bD}$	$7,13 \pm 0,28^{bC}$	$8,10 \pm 0,10^{aB}$	$9,16 \pm 0,11^{aA}$
	ST2MICO (0,18 µl/g)	$5,88 \pm 0,03^{aE}$	$6,57 \pm 0,10^{bD}$	$7,20 \pm 0,17^{bC}$	$7,96 \pm 0,14^{aB}$	$9,17 \pm 0,10^{aA}$
	STMICT (0,23 µl/g)	$5,86 \pm 0,05^{aE}$	$6,54 \pm 0,12^{bD}$	$7,57 \pm 0,29^{aC}$	$8,16 \pm 0,16^{aB}$	$9,19 \pm 0,12^{aA}$
	ST2MICT (0,46 µl/g)	$5,86 \pm 0,16^{aE}$	$6,47 \pm 0,12^{bD}$	$7,36 \pm 0,21^{abC}$	$7,96 \pm 0,23^{aB}$	$9,12 \pm 0,13^{aA}$
<i>Escherichia coli</i> *	Kontrola	$0,86 \pm 0,73$	$0,53 \pm 0,59$	$0,56 \pm 0,64$	$0,82 \pm 0,68$	$0,65 \pm 0,74$
	STMICO (0,09 µl/g)	$0,65 \pm 0,74$	$0,61 \pm 0,69$	$0,52 \pm 0,81$	$0,61 \pm 0,69$	$0,93 \pm 0,82$
	ST2MICO (0,18 µl/g)	$0,81 \pm 0,92$	$0,37 \pm 0,58$	$0,81 \pm 0,90$	$0,52 \pm 0,83$	$0,78 \pm 0,91$
	STMICT (0,23 µl/g)	$0,79 \pm 0,93$	$0,66 \pm 0,75$	$0,16 \pm 0,39$	$0,61 \pm 0,69$	$0,97 \pm 1,06$
	ST2MICT (0,46 µl/g)	$0,45 \pm 0,70$	$0,81 \pm 0,89$	$0,67 \pm 0,78$	$0,72 \pm 0,79$	$0,99 \pm 0,79$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	$4,62 \pm 0,07^{aB}$	$4,57 \pm 0,16^{abB}$	$4,58 \pm 0,14^{aB}$	$4,69 \pm 0,14^{aB}$	$5,26 \pm 0,16^{aA}$
	STMICO (0,09 µl/g)	$4,55 \pm 0,08^{aC}$	$4,41 \pm 0,13^{bC}$	$4,47 \pm 0,13^{aC}$	$4,71 \pm 0,12^{aB}$	$4,90 \pm 0,13^{bA}$
	ST2MICO (0,18 µl/g)	$4,55 \pm 0,13^{aB}$	$4,17 \pm 0,14^{cC}$	$4,45 \pm 0,10^{aB}$	$4,71 \pm 0,12^{aA}$	$4,78 \pm 0,10^{bA}$
	STMICT (0,23 µl/g)	$4,51 \pm 0,18^{aC}$	$4,60 \pm 0,15^{aC}$	$4,51 \pm 0,17^{aC}$	$4,81 \pm 0,15^{aB}$	$5,24 \pm 0,06^{aA}$

	ST2MICT (0,46 µl/g)	4,59 ± 0,13 ^{aB}	4,56 ± 0,09 ^{abB}	4,48 ± 0,12 ^{aB}	4,61 ± 0,14 ^{aB}	5,22 ± 0,17 ^{aA}
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Kontrola	4,35 ± 0,13 ^{aA}	4,34 ± 0,05 ^{aA}	4,38 ± 0,11 ^{aA}	4,40 ± 0,06 ^{aA}	4,41 ± 0,16 ^{aA}
	STMICO (0,09 µl/g)	4,21 ± 0,15 ^{aB}	4,23 ± 0,16 ^{aB}	4,40 ± 0,10 ^{aA}	4,47 ± 0,11 ^{aA}	4,43 ± 0,17 ^{aA}
	ST2MICO (0,18 µl/g)	4,29 ± 0,10 ^{aB}	4,25 ± 0,08 ^{aB}	4,34 ± 0,13 ^{aB}	4,36 ± 0,10 ^{aAB}	4,48 ± 0,11 ^{aA}
	STMICT (0,23 µl/g)	4,24 ± 0,12 ^{aA}	4,36 ± 0,08 ^{aA}	4,37 ± 0,09 ^{aA}	4,36 ± 0,21 ^{aA}	4,44 ± 0,19 ^{aA}
	ST2MICT (0,46 µl/g)	4,30 ± 0,16 ^{aB}	4,35 ± 0,11 ^{aB}	4,45 ± 0,15 ^{aAB}	4,42 ± 0,15 ^{aAB}	4,53 ± 0,04 ^{aA}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek ± standardna devijacija (n = 6). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između koncentracija primenjenih etarskih ulja. Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B, C, D, E) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između dana skladištenja. *Ispitivanjem broja *E. coli* nisu utvrđene statističke razlike ($p > 0,05$) između koncentracija primenjenih etarskih ulja, odnosno između dana skladištenja. Iz tog razloga su u superskriptu izostavljena slova.

Tabela 5.27. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.

Grupe	Vreme skladištenja p – vrednost
Kontrola	0,882
STMICO (0,09 µl/g)	0,902
ST2MICO (0,18 µl/g)	0,841
STMICT (0,23 µl/g)	0,503
ST2MICT (0,46 µl/g)	0,826

Tabela 5.28. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.

Dani ispitivanja	Grupe ogleda p – vrednost
0.	0,906
1.	0,868
2.	0,618
3.	0,962
4.	0,952

Tabela 5.29. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Salmonella* Typhimurium između grupa ogleda.

Dani ispitivanja	Grupe ogleda p – vrednost
0.	0,444
1.	0,103
2.	0,606
3.	0,631
4.	0,605

5.8.4. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Listeria monocytogenes* UB2-01-2 (1)

Status populacije mikororganizama u usitnjenom mesu svinja tokom ove faze ispitivanja prikazan je Tabelom 5.30.

Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija nije statistički varirao između tretmana nultog ($p = 0,885$), prvog ($p = 0,307$) i drugog ($p = 0,203$) dana skladištenja na 4 ± 1 °C. Značajne ($p < 0,05$) redukcije broja aerobnih mezofilnih bakterija se uočavaju tek trećeg i četvrtog dana skladištenja i to kod grupe gde je primenjena 2MIC količina EO timijana.

Tokom ispitivanja nisu zapažene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) broja *E. coli* između različitih dana ispitivanja u okviru grupa (Tabela 5.31), kao ni između grupa oglada tokom skladištenja (Tabela 5.32).

Početna populacija *Enterobacteriaceae* u ovoj fazi oglada bila je u rasponu od 2,15 do 2,20 log CFU/g bez statističke značajnosti ($p = 0,954$) između tretmana. Do kraja skladištenja populacija *Enterobacteriaceae* dostigla je vrednosti u opsegu od 3,19 do 3,64 log CFU/g. Najznačajnija redukcija broja ovih bakterija postignuta je primenom 2MIC količine EO origana.

Broj *L. monocytogenes* nultog dana ispitivanja kretao se između 4,18 i 4,23 log CFU/g, bez značajnosti u broju između tretmana ($p = 0,858$). Sledećeg dana ispitivanja i dalje se ne uočava značajnost ($p = 0,336$) između kontrole i grupa usitnjenog mesa svinja u kojima je dodato EO origana i timijana. Od drugog dana skladištenja do kraja oglada uočava se značajna ($p < 0,05$) redukcija broja *L. monocytogenes*. U odnosu na kontrolni uzorak, dodatak EO origana i timijana, značajno ($p < 0,05$) je redukovalo broj *L. monocytogenes*, za 0,25 log CFU/g i 0,51 log CFU/g, odnosno 0,22 log CFU/g i 0,29 log CFU/g.

Tabela 5.30. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Listeria monocytogenes* UB2-01-2 (1) i skladištenog na 4 ± 1 °C.

Mikrobiološki parametri (log CFU/g)	Grupa	Dani ispitivanja				
		0.	1.	2.	3.	4.
Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	Kontrola	$4,87 \pm 0,07^{aE}$	$5,56 \pm 0,09^{aD}$	$5,81 \pm 0,10^{aC}$	$7,15 \pm 0,32^{aB}$	$8,53 \pm 0,15^{aA}$
	LMMICO (0,18 µl/g)	$4,87 \pm 0,10^{aD}$	$5,60 \pm 0,14^{aC}$	$5,76 \pm 0,15^{aC}$	$7,15 \pm 0,28^{aB}$	$8,48 \pm 0,11^{aA}$
	LM2MICO (0,36 µl/g)	$4,86 \pm 0,08^{aD}$	$5,51 \pm 0,10^{aC}$	$5,65 \pm 0,14^{aC}$	$7,08 \pm 0,14^{aB}$	$8,36 \pm 0,10^{aA}$
	LMMICT (0,36 µl/g)	$4,85 \pm 0,10^{aE}$	$5,58 \pm 0,14^{aD}$	$5,79 \pm 0,13^{aC}$	$7,02 \pm 0,20^{abB}$	$8,37 \pm 0,10^{aA}$
	LM2MICT (0,72 µl/g)	$4,82 \pm 0,08^{aE}$	$5,47 \pm 0,05^{aD}$	$5,75 \pm 0,07^{aC}$	$6,74 \pm 0,19^{bB}$	$7,79 \pm 0,19^{bA}$
<i>Escherichia coli</i> *	Kontrola	$0,40 \pm 0,64$	$0,83 \pm 0,93$	$0,78 \pm 0,85$	$0,55 \pm 0,86$	$0,82 \pm 0,92$
	LMMICO (0,18 µl/g)	$0,48 \pm 0,53$	$0,78 \pm 0,85$	$0,77 \pm 0,87$	$0,70 \pm 0,81$	$1,03 \pm 0,86$
	LM2MICO (0,36 µl/g)	$0,58 \pm 0,90$	$0,78 \pm 0,85$	$1,00 \pm 0,83$	$0,76 \pm 0,83$	$0,90 \pm 0,98$
	LMMICT (0,36 µl/g)	$1,02 \pm 0,86$	$0,86 \pm 0,70$	$0,64 \pm 0,72$	$0,53 \pm 0,59$	$0,53 \pm 0,59$
	LM2MICT (0,72 µl/g)	$0,76 \pm 0,89$	$0,96 \pm 0,78$	$0,74 \pm 0,59$	$0,83 \pm 0,71$	$0,77 \pm 0,90$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	$2,17 \pm 0,12^{aD}$	$2,34 \pm 0,14^{abC}$	$2,59 \pm 0,09^{aB}$	$2,69 \pm 0,11^{aB}$	$3,57 \pm 0,10^{abA}$
	LMMICO (0,18 µl/g)	$2,20 \pm 0,09^{aD}$	$2,43 \pm 0,11^{aC}$	$2,49 \pm 0,09^{aC}$	$2,74 \pm 0,10^{aB}$	$3,47 \pm 0,10^{abA}$
	LM2MICO (0,36 µl/g)	$2,18 \pm 0,08^{aC}$	$2,27 \pm 0,11^{bC}$	$2,32 \pm 0,15^{bC}$	$2,64 \pm 0,13^{abB}$	$3,19 \pm 0,22^{cA}$
	LMMICT (0,36 µl/g)	$2,18 \pm 0,09^{aD}$	$2,40 \pm 0,17^{abC}$	$2,57 \pm 0,17^{aC}$	$2,77 \pm 0,09^{aB}$	$3,64 \pm 0,16^{aA}$

	LM2MICT (0,72 µl/g)	2,15 ± 0,10 ^{aC}	2,11 ± 0,09 ^{cC}	2,22 ± 0,16 ^{bC}	2,52 ± 0,10 ^{bB}	3,39 ± 0,16 ^{bA}
<i>Listeria monocytogenes</i>	Kontrola	4,18 ± 0,08 ^{aD}	4,18 ± 0,06 ^{aD}	4,56 ± 0,17 ^{aC}	4,85 ± 0,07 ^{aB}	5,28 ± 0,11 ^{aA}
	LMMICO (0,18 µl/g)	4,20 ± 0,05 ^{aC}	4,20 ± 0,14 ^{aC}	4,54 ± 0,15 ^{aB}	4,65 ± 0,17 ^{bB}	5,03 ± 0,24 ^{bA}
	LM2MICO (0,36 µl/g)	4,23 ± 0,10 ^{aC}	4,16 ± 0,10 ^{aC}	4,30 ± 0,07 ^{bC}	4,60 ± 0,13 ^{bcB}	4,77 ± 0,15 ^{cA}
	LMMICT (0,36 µl/g)	4,21 ± 0,04 ^{aB}	4,10 ± 0,06 ^{aC}	4,29 ± 0,03 ^{bB}	4,42 ± 0,23 ^{cdB}	5,06 ± 0,12 ^{bA}
	LM2MICT (0,72 µl/g)	4,19 ± 0,09 ^{aC}	4,13 ± 0,08 ^{aC}	4,14 ± 0,05 ^{cC}	4,30 ± 0,10 ^{dB}	4,99 ± 0,13 ^{bA}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek ± standardna devijacija (n = 6). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c, d) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između koncentracija primenjenih etarskih ulja. Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B, C, D, E) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između dana skladištenja. *Ispitivanjem broja *E. coli* nisu utvrđene statističke razlike (p > 0,05) između koncentracija primenjenih etarskih ulja, odnosno između dana skladištenja. Iz tog razloga su u superskriptu izostavljena slova.

Tabela 5.31. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.

Grupe	Vreme skladištenja p – vrednost
Kontrola	0,873
LMMICO (0,18 µl/g)	0,829
LM2MICO (0,36 µl/g)	0,938
LMMICT (0,36 µl/g)	0,686
LM2MICT (0,72 µl/g)	0,989

Tabela 5.32. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.

Dani ispitivanja	Grupe ogleda p – vrednost
0.	0,661
1.	0,995
2.	0,949
3.	0,950
4.	0,892

5.8.5. Uticaj etarskih ulja na mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Yersinia enterocolitica* Y4/1

Tabelom 5.33 prikazan je mikrobiološki status usitnjenog mesa svinja tokom ove faze ispitivanja.

Početna populacija aerobnih mezofilnih bakterija kretala se između 5,61 i 5,75 log CFU/g bez statističke značajnosti ($p = 0,676$) između kontrolne grupe i grupa usitnjenog mesa svinja tretiranog EO origana i timijana. Razlika ($p = 0,418$) se ne uočava ni narednog dana. Broj aerobnih mezofilnih bakterija drastično je rastao do kraja skladištenja.

Tokom ispitivanja nisu zapažene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) broja *E. coli* između različitih dana ispitivanja u okviru grupa (Tabela 5.34), kao ni između grupa ogleda u okviru dana ispitivanja (Tabela 5.35).

Broj *Enterobacteriaceae* u prva tri dana ispitivanja nije statistički varirao između tretmana (nultog dana $p = 0,566$; prvog dana $p = 0,0899$; drugog dana $p = 0,71$). Inicijalna populacija kretala se između 4,91 i 5,03 log CFU/g, dok je na kraju skladištenja populacija *Enterobacteriaceae* bila između 5,66 i 6,44 log CFU/g, čime se uočava značajan ($p < 0,05$) porast.

Inicijalna populacija *Y. enterocolitica* kretala se od 4,31 do 4,46 log CFU/g u svim grupama. Razlika u broju *Y. enterocolitica* nije uočena nultog ($p = 0,134$) i prvog ($p = 0,936$) dana ispitivanja. Etarsko ulje origana, u koncentracijama 0,09 $\mu\text{l/g}$ i 0,18 $\mu\text{l/g}$, nije uticalo na smanjenje broja *Y. enterocolitica*, dok je EO timijana u koncentracijama 0,23 $\mu\text{l/g}$ i 0,46 $\mu\text{l/g}$ uticalo na značajno smanjenje broja za 0,38 log CFU/g, odnosno 0,64 log CFU/g, u odnosu na broj *Y. enterocolitica* u kontrolnom uzorku.

Tabela 5.33. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na mikrobiološku populaciju (log CFU/g) svežeg usitnjenog mesa svinja inokulisanog sa *Yersinia enterocolitica* Y4/1 i skladištenog na 4 ± 1 °C.

Mikrobiološki parametri (log CFU/g)	Grupa	Dani ispitivanja				
		0.	1.	2.	3.	4.
Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	Kontrola	$5,67 \pm 0,15^{aE}$	$6,26 \pm 0,07^{aD}$	$7,67 \pm 0,16^{aC}$	$8,08 \pm 0,13^{abB}$	$9,06 \pm 0,13^{aA}$
	YEMICO (0,09 µl/g)	$5,75 \pm 0,18^{aE}$	$6,15 \pm 0,21^{aD}$	$7,53 \pm 0,28^{aC}$	$8,16 \pm 0,19^{aB}$	$9,03 \pm 0,20^{aA}$
	YE2MICO (0,18 µl/g)	$5,61 \pm 0,07^{aE}$	$6,18 \pm 0,06^{aD}$	$7,40 \pm 0,24^{aC}$	$8,13 \pm 0,26^{aB}$	$8,73 \pm 0,24^{bA}$
	YEMICT (0,23 µl/g)	$5,65 \pm 0,18^{aE}$	$6,24 \pm 0,14^{aD}$	$7,40 \pm 0,23^{aC}$	$7,87 \pm 0,17^{bcB}$	$8,72 \pm 0,13^{bA}$
	YE2MICT (0,46 µl/g)	$5,68 \pm 0,16^{aE}$	$6,14 \pm 0,14^{aD}$	$6,98 \pm 0,25^{bC}$	$7,64 \pm 0,21^{cB}$	$8,40 \pm 0,24^{cA}$
<i>Escherichia coli</i> *	Kontrola	$0,37 \pm 0,58$	$0,26 \pm 0,64$	$0,40 \pm 0,64$	$0,60 \pm 0,70$	$0,69 \pm 0,55$
	YEMICO (0,09 µl/g)	$0,61 \pm 0,69$	$0,56 \pm 0,64$	$0,70 \pm 0,78$	$0,53 \pm 0,84$	$0,63 \pm 0,72$
	YE2MICO (0,18 µl/g)	$0,53 \pm 0,59$	$0,74 \pm 0,83$	$0,48 \pm 0,53$	$0,44 \pm 0,71$	$0,70 \pm 0,81$
	YEMICT (0,23 µl/g)	$0,78 \pm 0,85$	$0,37 \pm 0,58$	$0,42 \pm 0,68$	$0,42 \pm 0,68$	$0,87 \pm 0,70$
	YE2MICT (0,46 µl/g)	$0,56 \pm 0,64$	$0,61 \pm 0,69$	$0,53 \pm 0,59$	$0,69 \pm 0,76$	$0,97 \pm 0,82$
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	$5,03 \pm 0,14^{aC}$	$5,03 \pm 0,09^{aC}$	$5,48 \pm 0,12^{aB}$	$5,59 \pm 0,11^{bB}$	$6,34 \pm 0,22^{aA}$
	YEMICO (0,09 µl/g)	$4,91 \pm 0,13^{aD}$	$4,92 \pm 0,15^{aD}$	$5,40 \pm 0,13^{aC}$	$5,91 \pm 0,20^{aB}$	$6,44 \pm 0,06^{aA}$
	YE2MICO (0,18 µl/g)	$4,95 \pm 0,17^{aD}$	$5,12 \pm 0,20^{aD}$	$5,55 \pm 0,21^{aC}$	$5,86 \pm 0,20^{aB}$	$6,43 \pm 0,20^{aA}$
	YEMICT (0,23 µl/g)	$4,96 \pm 0,10^{aC}$	$4,95 \pm 0,16^{aC}$	$5,46 \pm 0,21^{aB}$	$5,53 \pm 0,18^{bB}$	$6,33 \pm 0,29^{aA}$

	YE2MICT (0,46 µl/g)	4,92 ± 0,10 ^{aC}	4,90 ± 0,16 ^{aC}	5,42 ± 0,27 ^{aB}	5,44 ± 0,14 ^{bB}	5,66 ± 0,15 ^{bA}
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kontrola	4,39 ± 0,11 ^{aC}	4,55 ± 0,27 ^{aC}	5,32 ± 0,13 ^{aB}	5,49 ± 0,20 ^{aB}	5,84 ± 0,07 ^{aA}
	YEMICO (0,09 µl/g)	4,41 ± 0,07 ^{aD}	4,62 ± 0,25 ^{aD}	5,23 ± 0,08 ^{aC}	5,50 ± 0,24 ^{aB}	5,79 ± 0,23 ^{aA}
	YE2MICO (0,18 µl/g)	4,46 ± 0,14 ^{aC}	4,54 ± 0,21 ^{aC}	5,40 ± 0,15 ^{aB}	5,51 ± 0,23 ^{aB}	5,75 ± 0,19 ^{aA}
	YEMICT (0,23 µl/g)	4,36 ± 0,10 ^{aC}	4,60 ± 0,23 ^{aB}	5,32 ± 0,12 ^{aA}	5,37 ± 0,19 ^{aA}	5,46 ± 0,15 ^{bA}
	YE2MICT (0,46 µl/g)	4,31 ± 0,08 ^{aD}	4,63 ± 0,25 ^{aC}	4,95 ± 0,26 ^{bB}	5,07 ± 0,10 ^{bAB}	5,20 ± 0,12 ^{cA}

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek ± standardna devijacija (n = 6). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između koncentracija primenjenih etarskih ulja. Vrednosti unutar istog reda obeležene različitim velikim slovima (A, B, C, D, E) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05) između dana skladištenja. *Ispitivanjem broja *E. coli* nisu utvrđene statističke razlike (p > 0,05) između koncentracija primenjenih etarskih ulja, odnosno između dana skladištenja. Iz tog razloga su u superskriptu izostavljena slova.

Tabela 5.34. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* tokom skladištenja.

Grupe	Vreme skladištenja p - vrednost
Kontrola	0,753
YEMICO (0,09 µl/g)	0,996
YE2MICO (0,18 µl/g)	0,922
YEMICT (0,23 µl/g)	0,630
YE2MICT (0,46 µl/g)	0,826

Tabela 5.35. Prikaz statističkih značajnosti (p vrednost) rezultata broja *Escherichia coli* između grupa ogleda.

Dani ispitivanja	Grupe ogleda p - vrednost
0.	0,887
1.	0,746
2.	0,935
3.	0,966
4.	0,923

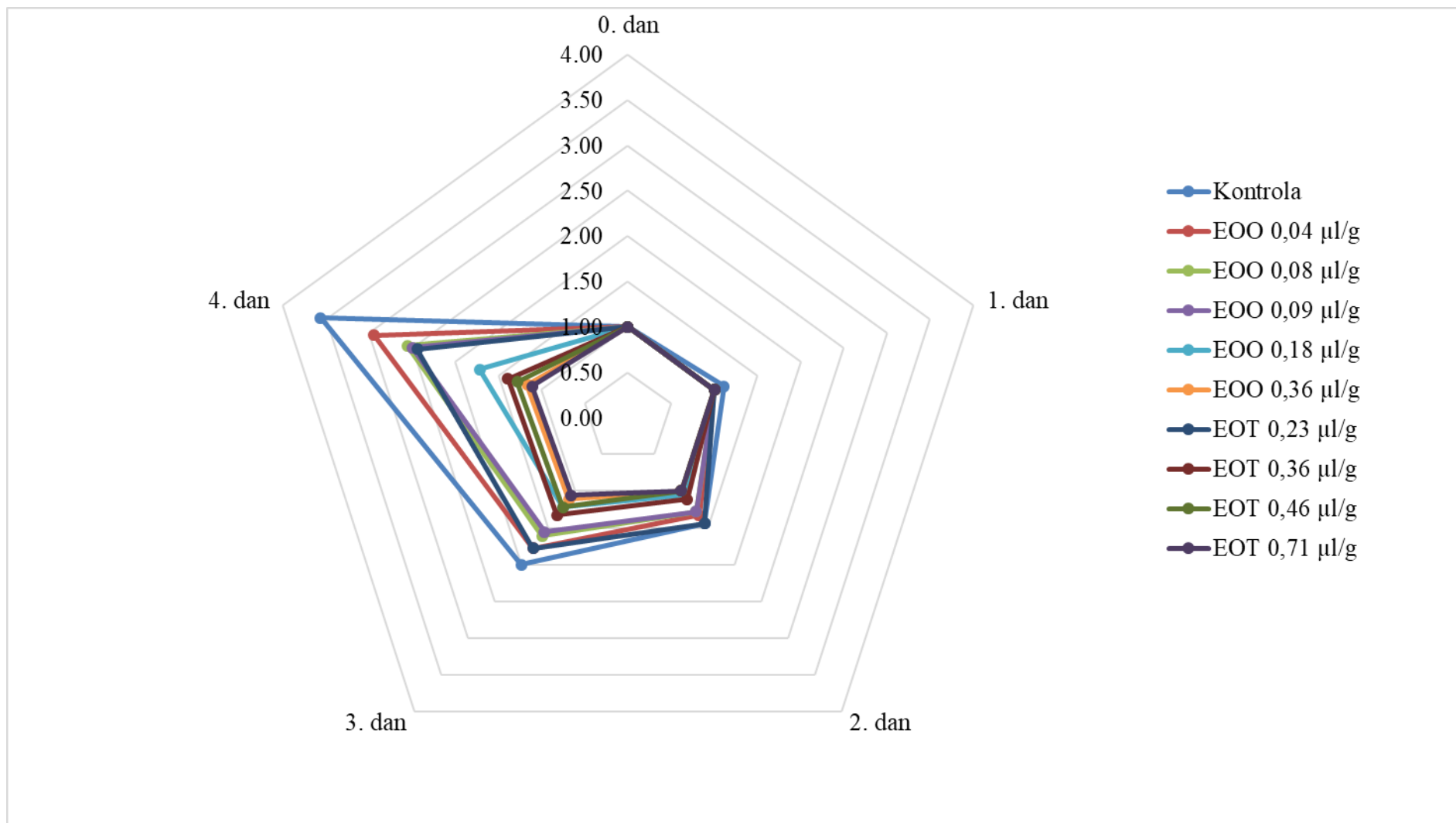
5.9. UTICAJ ETARSKIH ULJA NA SENZORSKA SVOJSTVA USITNJENOG MESA SVINJA

Rezultati senzorskih svojstava mirisa koji ukazuje na kvar i promenu boje predstavljeni su kao prosečna ocena panelista za svaki uzorak. Prema Hedonskoj skali od 5 tačaka, gde 1 predstavlja poželjnu, a 5 nepoželjnu ocenu, vrednosti iznad 3 uzete su kao organoleptički neprihvatljive. Uzimajući u obzir miris koji ukazuje na kvar prve značajne ($p < 0,05$) promene između kontrolne grupe i grupa tretiranih različitim koncentracijama EO origana i timijana se uočavaju već nakon 24 h skladištenja (Tabela 5.36 i Grafikon 5.7). Nakon 4 dana skladištenja kontrolna grupa ocenjena je kao neprihvatljiva ($p < 0,05$) sa rezultatom $3,56 \pm 0,90$, u odnosu na tretirane grupe. Najbolji rezultati uočeni su u grupama gde je primenjena najveća količina EO, i to 0,36 µl/g EO origana i od 0,36 µl/g do 0,71 µl/g EO timijana. Iako se prilikom ocenjivanja mirisa obraćala pažnja samo na miris koji ukazuje na kvar, panelisti su istakli prijatan miris oba EO primenom najvećih količina istih.

Tabela 5.36. Uticaj etarskih ulja origana (EOO) i timijana (EOT) na intenzitet mirisa koji ukazuje na kvar* usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.

Grupa	Dan				
	0.	1.	2.	3.	4.
Kontrola	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,11 \pm 0,00^a$	$1,44 \pm 0,50^a$	$2,00 \pm 0,75^a$	$3,56 \pm 0,90^a$
EOO 0,04 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,33 \pm 0,47^{ab}$	$1,78 \pm 0,71^{ab}$	$2,94 \pm 0,97^b$
EOO 0,08 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,28 \pm 0,56^{abc}$	$1,61 \pm 0,59^{abc}$	$2,56 \pm 0,68^{bc}$
EOO 0,09 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,28 \pm 0,45^{abc}$	$1,56 \pm 0,60^{bc}$	$2,50 \pm 0,60^{bc}$
EOO 0,18 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,06 \pm 0,23^{bc}$	$1,22 \pm 0,42^{cd}$	$1,72 \pm 0,73^d$
EOO 0,36 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,00 \pm 0,00^c$	$1,11 \pm 0,31^d$	$1,17 \pm 0,37^e$
EOT 0,23 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,44 \pm 0,76^a$	$1,78 \pm 0,85^{ab}$	$2,44 \pm 0,83^c$
EOT 0,36 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,11 \pm 0,31^{bc}$	$1,33 \pm 0,58^{cd}$	$1,39 \pm 0,59^{de}$
EOT 0,46 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,00 \pm 0,00^c$	$1,22 \pm 0,53^{cd}$	$1,28 \pm 0,45^{de}$
EOT 0,71 µl/g	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,00 \pm 0,00^c$	$1,06 \pm 0,23^d$	$1,11 \pm 0,31^e$

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 18$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c, d, e) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$). *1 = nema; 2 = neznatno; 3 = malo; 4 = umereno; 5 = izuzetno.



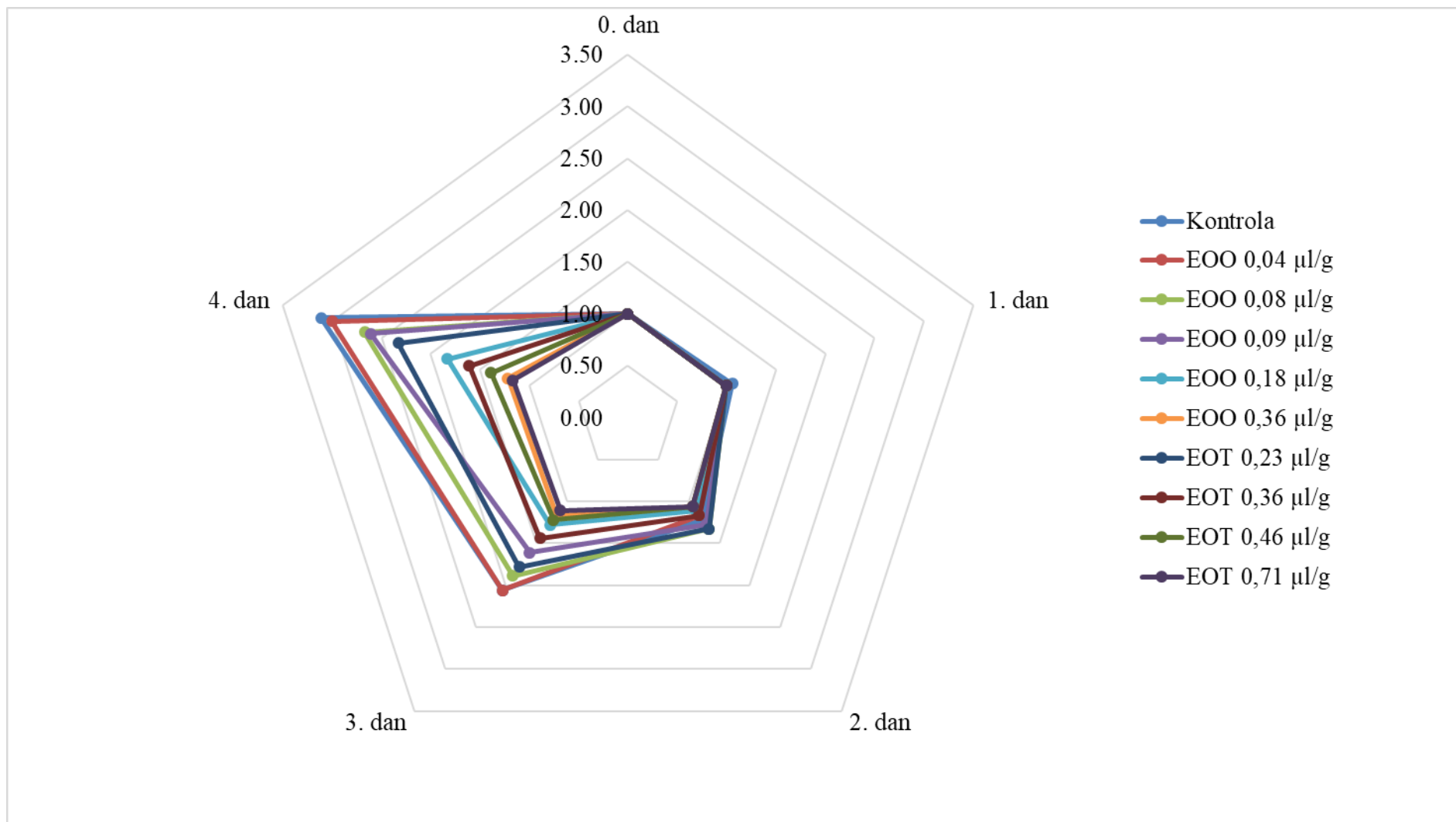
Grafikon 5.7. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na intenzitet mirisa koji ukazuje na kvar usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.

Diskoloracija je uočena već prvog dana ispitivanja kada se vrednost od $1,06 \pm 0,23$ kontrolnog uzorka statistički značajno ($p < 0,5$) razlikovala od grupa u kojima je primenjeno neko od EO. Drugog dana ispitivanja, iako su panelisti uočili različite stepene diskoloracije u svim grupama, promene nisu bile statistički značajne ($p = 0,139$). Na kraju skladištenja uočava se da su grupe sa najvećim koncentracijama EO origana i timijana statistički ($p < 0,05$) vrednovane sa manjom ocenom u odnosu na kontrolnu grupu i grupe gde je primenjena manja količina EO (Tabela 5.37 i Grafikon 5.8). Organoleptički neprihvatljive, u pogledu stepena diskoloracije četvrtog dana ispitivanja, bile su kontrolna grupa i grupa sa najnižom koncentracijom EO origana. Grupa gde je primenjeno EO origana u količini od $0,08 \mu\text{l/g}$ jeste na granici prihvatljivog i neprihvatljivog, sa ocenom $2,67 \pm 0,67$.

Tabela 5.37. Uticaj etarskih ulja origana (EOO) i timijana (EOT) na diskoloraciju* usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi $4 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Grupa	Dan				
	0.	1.	2.	3.	4.
Kontrola	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,06 \pm 0,23^a$	$1,22 \pm 0,42^a$	$2,06 \pm 0,62^a$	$3,11 \pm 0,74^a$
EOO $0,04 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,17 \pm 0,37^a$	$2,06 \pm 0,62^a$	$3,00 \pm 0,88^{ab}$
EOO $0,08 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,33 \pm 0,47^a$	$1,89 \pm 0,57^{ab}$	$2,67 \pm 0,67^{abc}$
EOO $0,09 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,28 \pm 0,45^a$	$1,61 \pm 0,59^{bcd}$	$2,61 \pm 0,59^{bc}$
EOO $0,18 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,11 \pm 0,31^a$	$1,28 \pm 0,45^{de}$	$1,83 \pm 0,76^d$
EOO $0,36 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,06 \pm 0,23^a$	$1,17 \pm 0,37^e$	$1,22 \pm 0,42^e$
EOT $0,23 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,33 \pm 0,47^a$	$1,78 \pm 0,79^{abc}$	$2,33 \pm 0,58^c$
EOT $0,36 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,17 \pm 0,37^a$	$1,44 \pm 0,60^{cde}$	$1,61 \pm 0,68^{de}$
EOT $0,46 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,06 \pm 0,23^a$	$1,22 \pm 0,42^{de}$	$1,39 \pm 0,59^{de}$
EOT $0,71 \mu\text{l/g}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,06 \pm 0,23^a$	$1,11 \pm 0,31^e$	$1,17 \pm 0,37^e$

Legenda: Vrednosti su izražene kao prosek $\pm$ standardna devijacija ($n = 18$). Vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim malim slovima (a, b, c, d, e) u superskriptu ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$). *1 = nema; 2 = 0 – 10%; 3 = 11 – 20%; 4 = 21 – 60%; 5 = 61 – 100%.

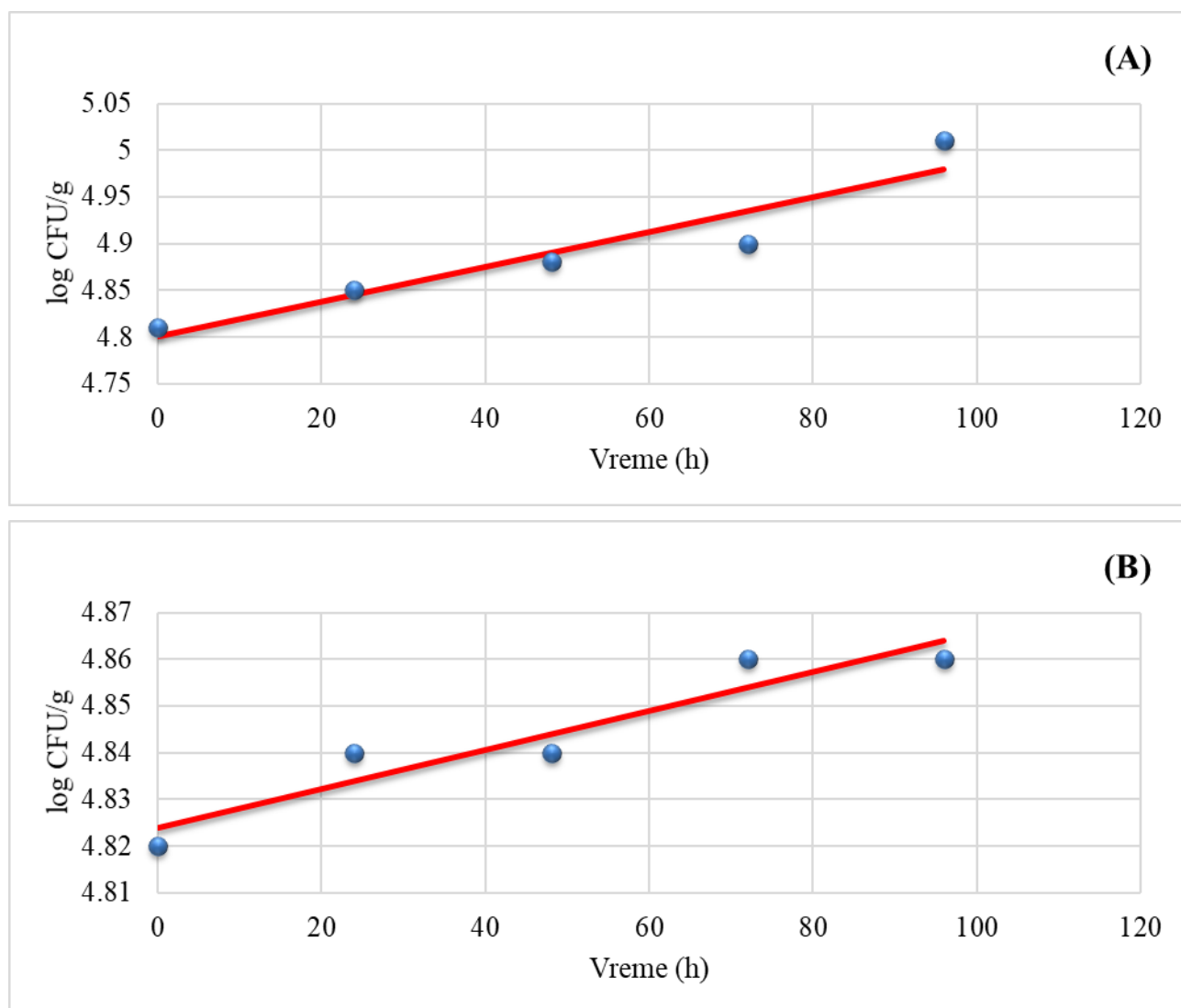


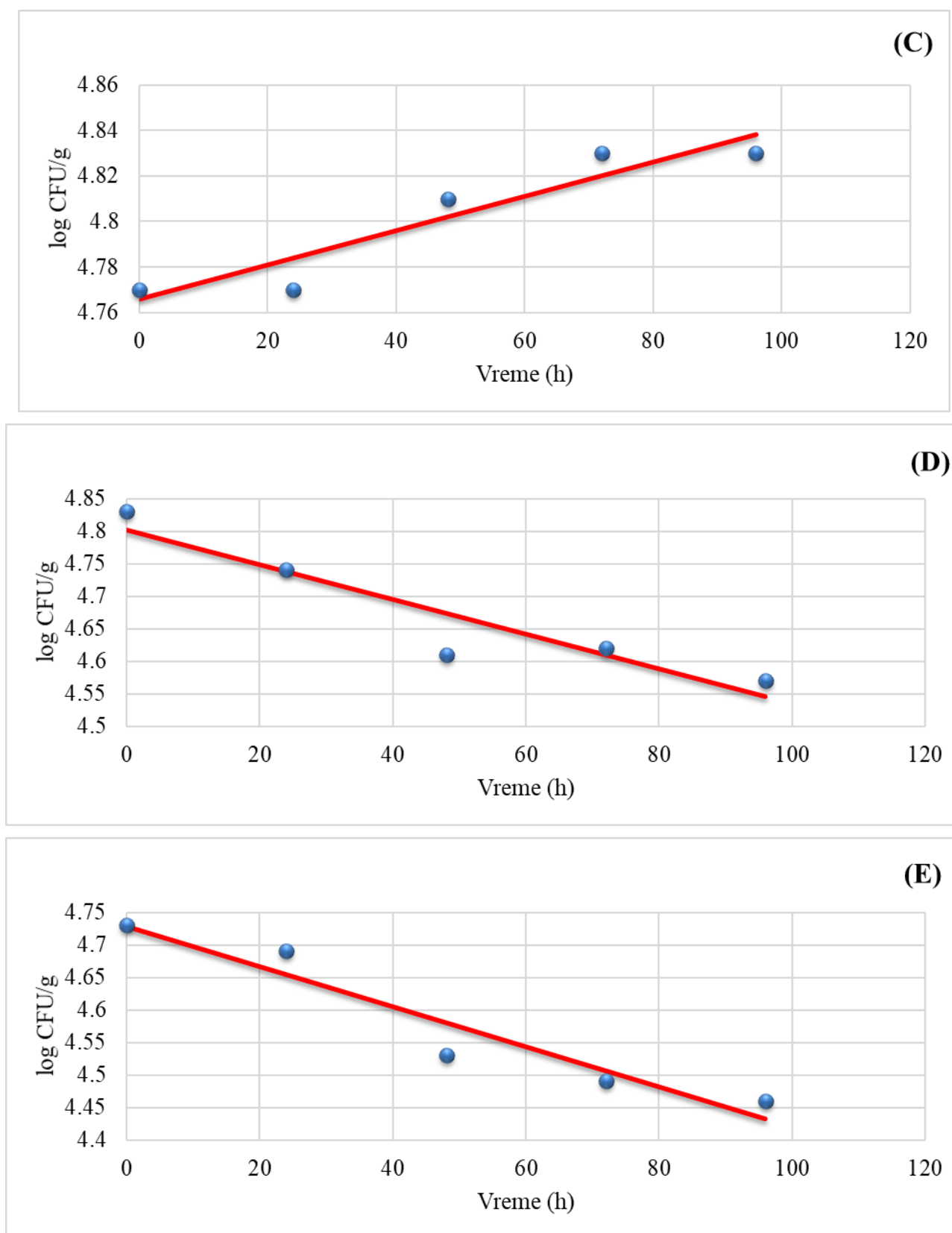
Grafikon 5.8. Uticaj etarskih ulja origana i timijana na diskoloraciju usitnjenog mesa svinja skladištenog na temperaturi 4 ± 1 °C.

5.10. BARANYI I ROBERTOVI MODELI RASTA PATOGENIH BAKTERIJA PRENOSIVIH HRANOM

5.10.1. Baranyi i Robertov model rasta *Salmonella* Enteritidis u usitnjenom mesu svinja

Prediktivni Baranyi i Robertov model uticaja EO origana i timijana na populaciju *S. Enteritidis* u usitnjenom mesu svinja prikazan je Grafikonom 5.9 i Tabelom 5.38.





Grafikon 5.9. Prikaz krive *Salmonella* Enteritidis (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,04 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,08 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz oglada; (—) Baranyi i Robertov model.

Vrednosti $\mu_{\max}$ (maksimalne stope rasta) za *S. Enteritidis* se kreću između -0,00308 log CFU/g/h (SE2MICT) i 0,001875 log CFU/g/h (kontrolna grupa). Negativne vrednosti uočene su prilikom primene EO timijana, što ukazuje na značajno smanjenje broja ovih patogenih bakterija u usitnjenom mesu svinja. Koeficijenti determinacije (R^2), sa vrednostima od 0,84058 do 0,891723, ukazuju na dobru pogodnost primenjenih modela.

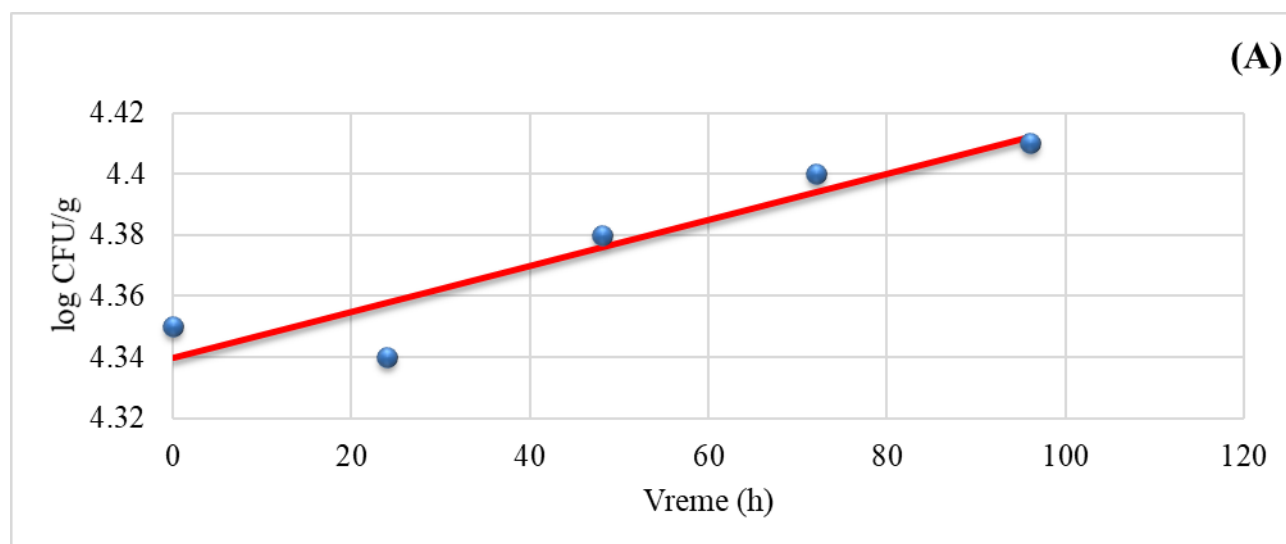
Tabela 5.38. Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Salmonella* Enteritidis u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskog ulja origana i timijana.

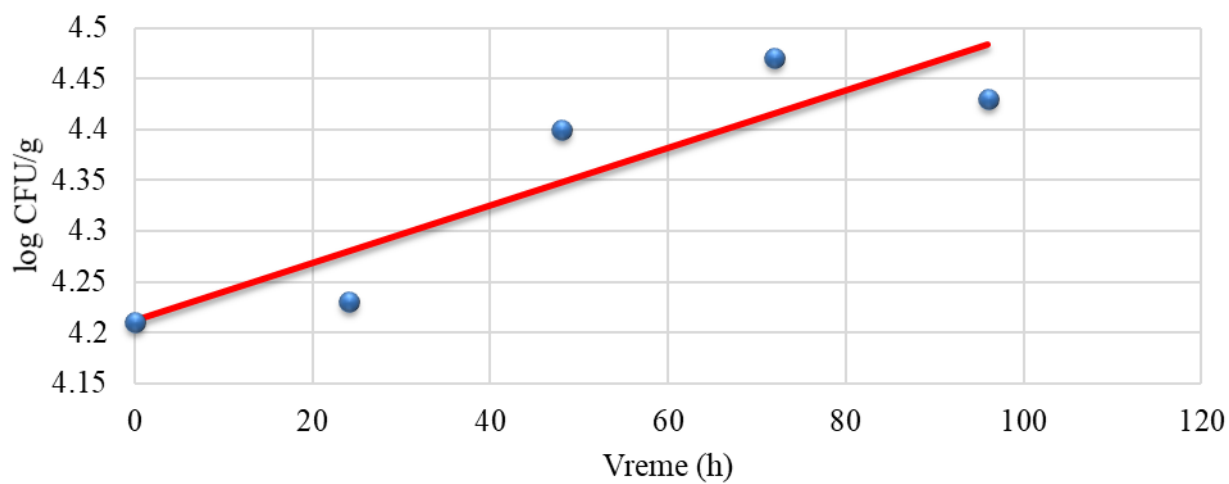
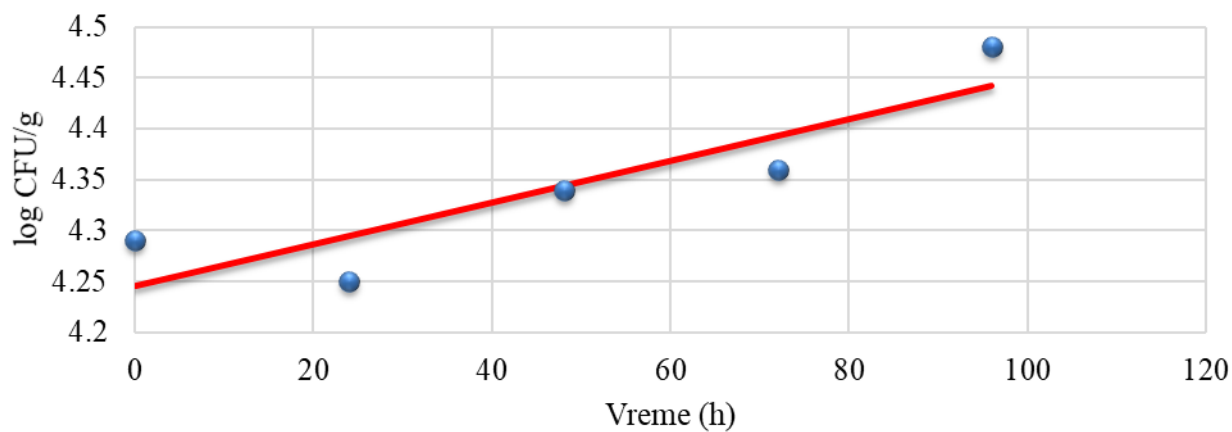
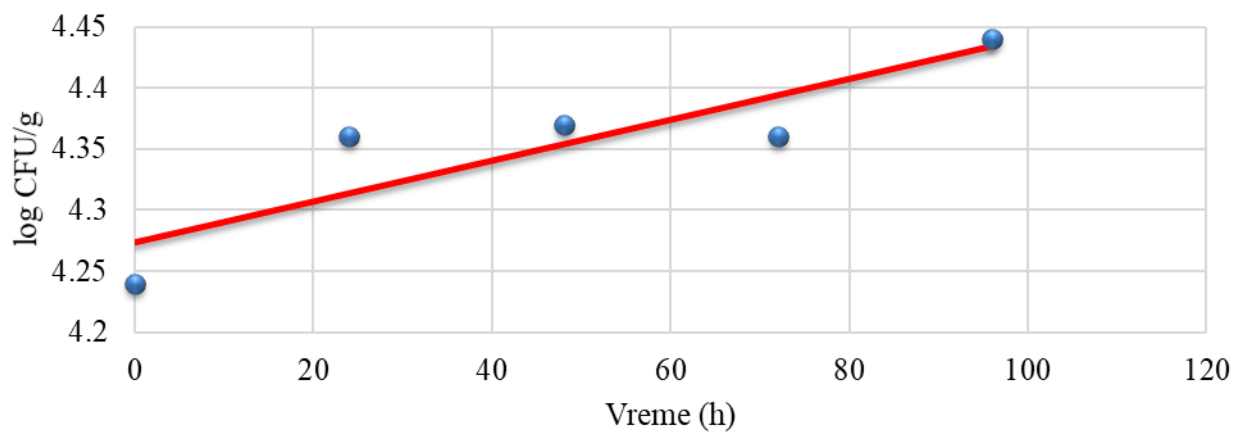
Grupa	y0	$\mu_{\max}$	SE	R^2
Kontrola	4,8	0,001875	0,027988	0,861357
SEMICO (0,04 μ l/g)	4,824	0,000417	0,006325	0,857143
SE2MICO (0,08 μ l/g)	4,766	0,00075	0,012111	0,84058
SEMICT (0,23 μ l/g)	4,802	-0,00267	0,04305	0,840642
SE2MICT (0,46 μ l/g)	4,728	-0,00308	0,040166	0,891723

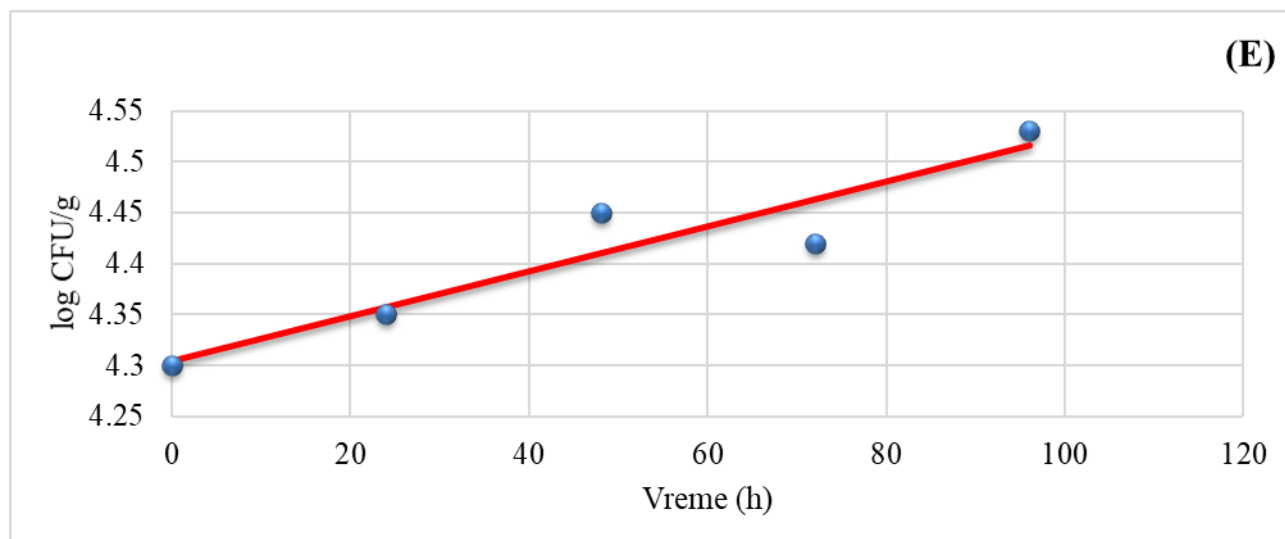
Legenda: y0 – inicijalna vrednost mikrobiološke populacije (log CFU/g); $\mu_{\max}$ – maksimalna stopa rasta/inaktivacije bakterija (log CFU/g/h); SE – standardna greška; R^2 – koeficijent determinacije.

5.10.2. Baranyi i Robertov model rasta *Salmonella* Typhimurium u usitnjenom mesu svinja

Prediktivni Baranyi i Robertov model uticaja EO origana i timijana na populaciju *S. Typhimurium* u usitnjenom mesu svinja prikazan je Grafikonom 5.10 i Tabelom 5.39.



(B)**(C)****(D)**



Grafikon 5.10. Prikaz krive *Salmonella* Typhimurium (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,09 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,18 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz ogleđa; (–) Baranyi i Robertov model.

Pozitivne vrednosti $\mu_{\max}$ ukazuju da EO origana i timijana, u primenjenim koncentracijama, nisu delovala na smanjenje broja *S. Typhimurium*. Koeficijent determinacije u rasponu od 0,696268 do 0,844444 ukazuje na dobru pogodnost modela. Najmanja standardna greška (SE) uočena je u grupi gde je primenjena 2MIC EO timijana, dok je najveća bila u kontrolnoj grupi.

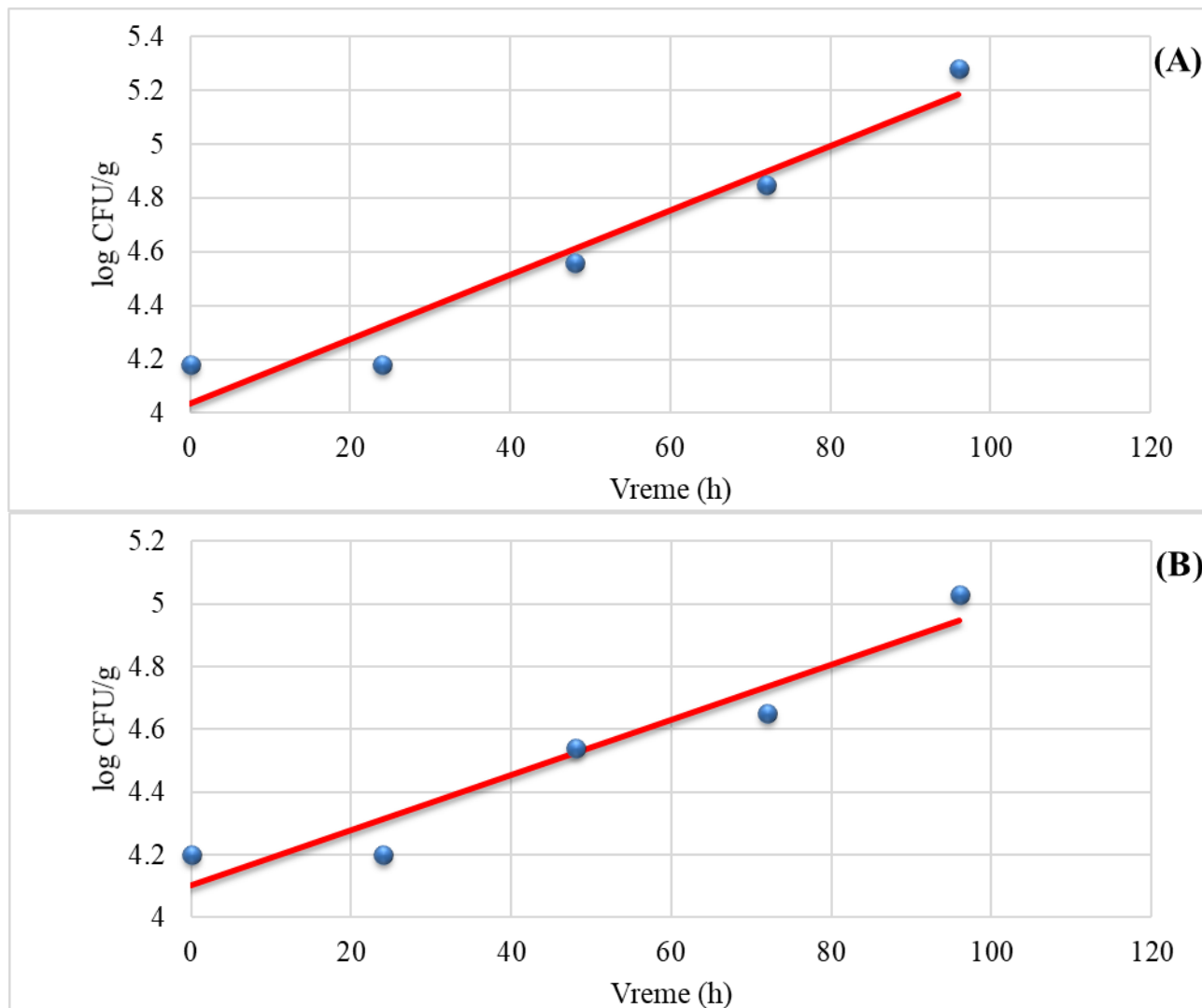
Tabela 5.39. Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Salmonella* Typhimurium u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.

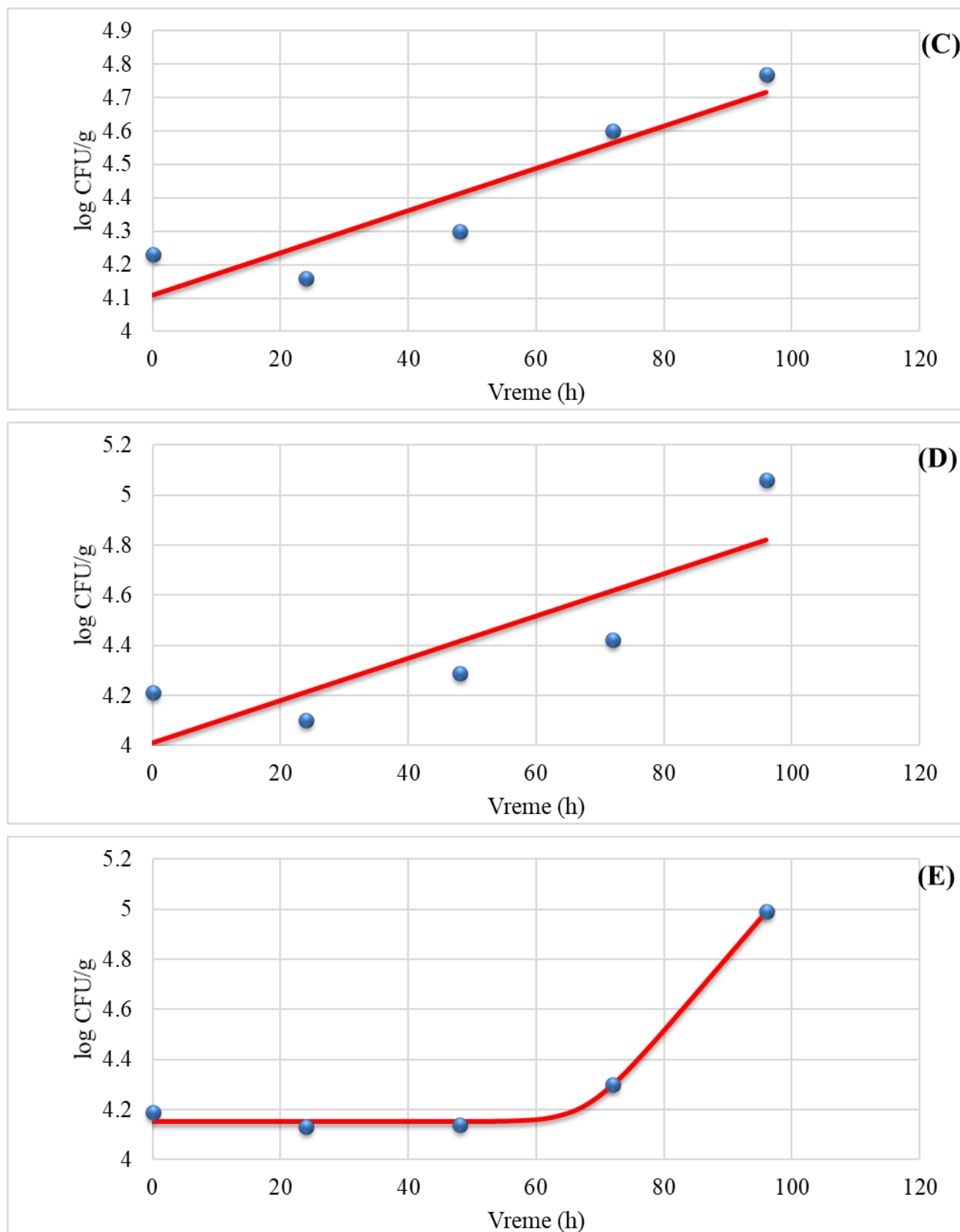
Grupa	y0	$\mu_{\max}$	SE	R ²
Kontrola	4,34	0,00075	0,12649	0,827957
STMICO (0,09 µl/g)	4,212	0,002833	0,060663	0,743017
ST2MICO (0,18 µl/g)	4,246	0,002042	0,046583	0,715596
STMICT (0,23 µl/g)	4,274	0,001667	0,039665	0,696268
ST2MICT (0,46 µl/g)	4,304	0,002208	0,035166	0,844444

Legenda: y0 – inicijalna vrednost mikrobiološke populacije (log CFU/g); $\mu_{\max}$ – maksimalna stopa rasta/smrti bakterija (log CFU/g/h); SE – standardna greška; R² – koeficijent determinacije.

5.10.3. Baranyi i Robertov model rasta *Listeria monocytogenes* u usitnjenom mesu svinja

Krive rasta *L. monocytogenes* u usitnjenom mesu svinja bez i sa dodatkom EO origana i timijana prikazani su Grafikonom 5.11 koji predstavlja prikaz Baranyi i Robertovog modela.





Grafikon 5.11. Prikaz krive *Listeria monocytogenes* (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,18 μ l/g); (C) 2MIC EO origana (0,36 μ l/g); (D) MIC EO timijana (0,36 μ l/g); (E) 2MIC EO timijana (0,72 μ l/g); (•) vrednosti iz oglada; (–) Baranyi i Robertov model.

Parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *L. monocytogenes* prikazani su Tabelom 5.40. Kod svih tretmana uočava se manja inicijalna vrednost broja *L. monocytogenes* u modelu u odnosu na vrednosti dobijene prilikom ogleda. U tretmanu gde je primenjena 2MIC koncentracija EO timijana izražena je lag vrednost, odnosno vreme prilagođavanja bakterijske populacije na faktore sredine. Lag vrednost iznosila je 67,84 h. Maksimalna stopa rasta kretala se, u ovoj fazi ogleda, između 0,006333 log CFU/g/h (LM2MICO) i 0,0029717 log CFU/g/h (LM2MICT). Najmanji koeficijent determinacije zabeležen je u grupi gde je primenjeno EO timijana u MIC količini ($R^2=0,616282$), a najviši u grupi gde je primenjeno isto ulje u količini dvostruke MIC vrednosti ($R^2=0,992184$).

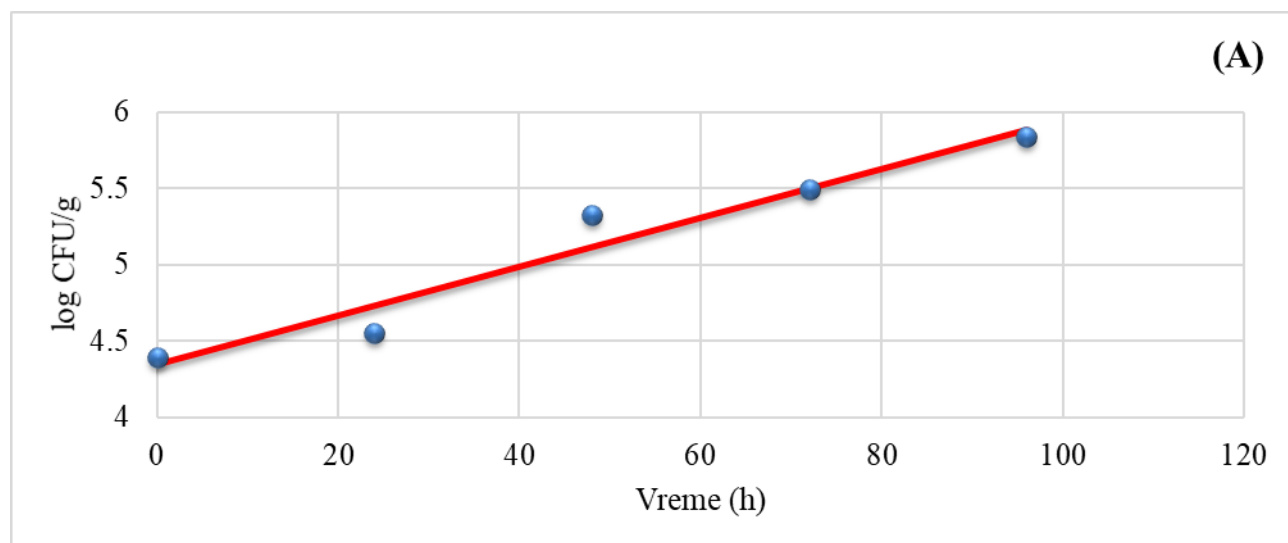
Tabela 5.40. Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Listeria monocytogenes* u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.

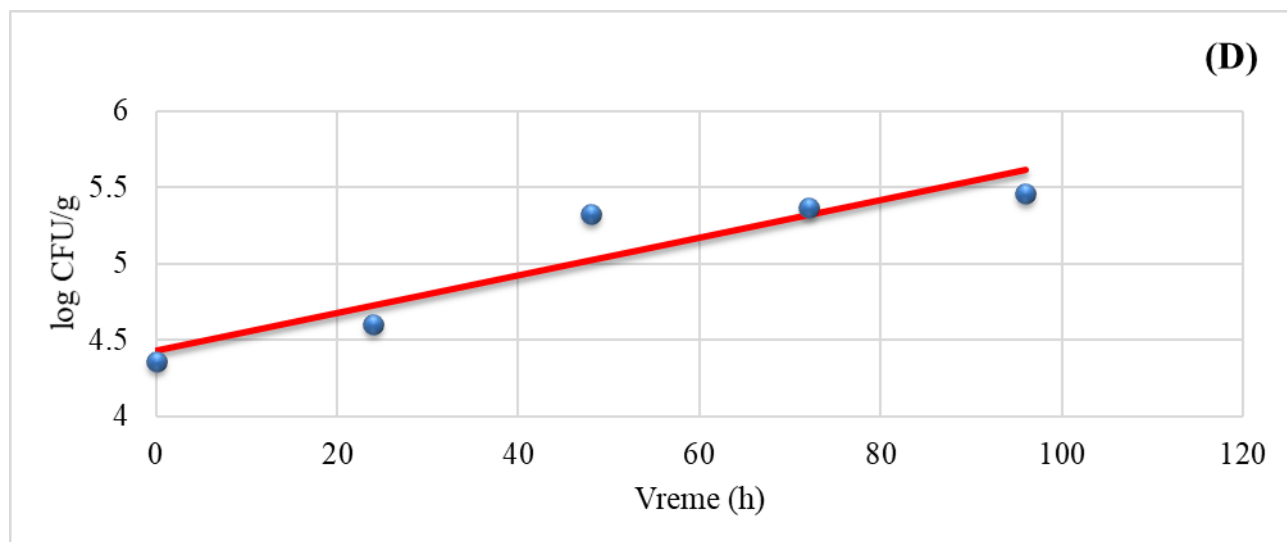
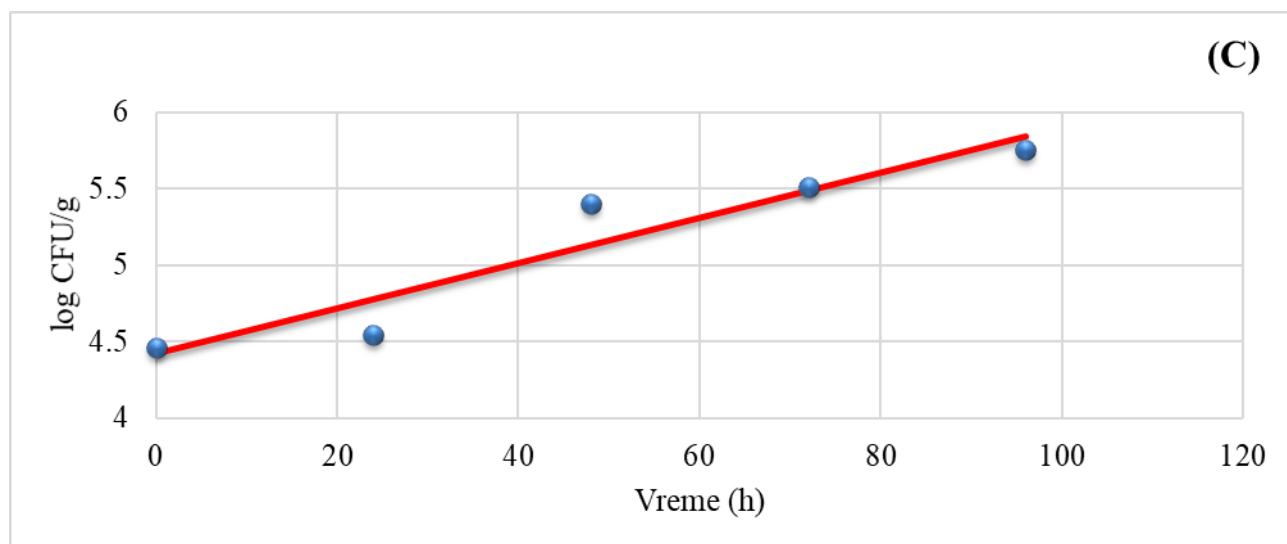
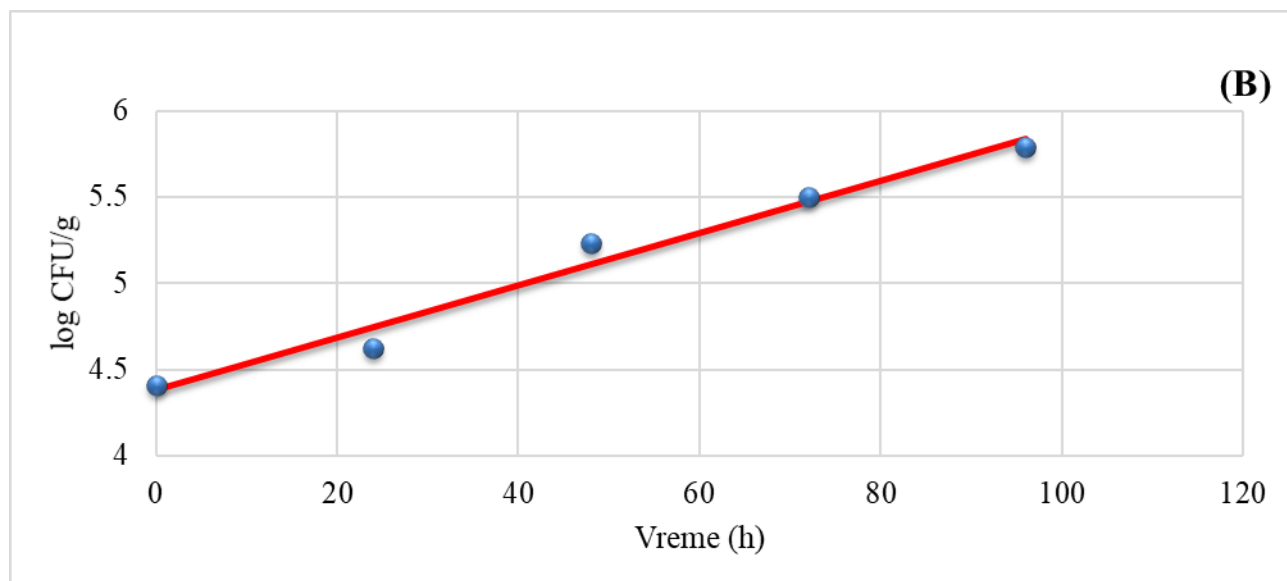
Grupa	y0	$\mu_{\max}$	SE	R^2
Kontrola	4,036	0,011958	0,135536	0,916386
LMMICO (0,18 μ l/g)	4,102	0,008792	0,11092	0,897923
LM2MICO (0,36 μ l/g)	4,108	0,006333	0,117813	0,796391
LMMICT (0,36 μ l/g)	4,012	0,008417	0,234435	0,616282
LM2MICT (0,72 μ l/g)	4,153275	0,029717	0,032187	0,992184

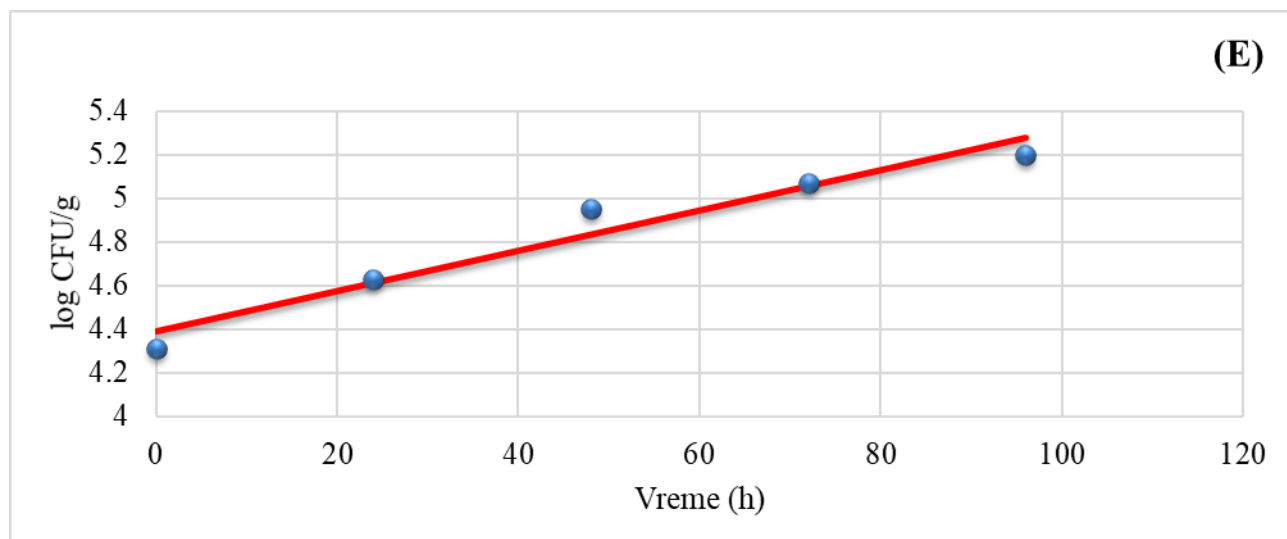
Legenda: y0 – inicijalna vrednost mikrobiološke populacije (log CFU/g); $\mu_{\max}$ – maksimalna stopa rasta/smrti bakterija (log CFU/g/h); SE – standardna greška; R^2 – koeficijent determinacije.

5.10.4. Baranyi i Robertov model rasta *Yersinia enterocolitica* u usitnjenom mesu svinja

Grafikonom 5.12 prikazane su krive rasta *Y. enterocolitica* iz DMFit programa prema Baranyi i Robertovom modelu.







Grafikon 5.12. Prikaz krive *Yersinia enterocolitica* (log CFU/g) u vremenu (h), u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C. (A) kontrola; (B) MIC EO origana (0,09 µl/g); (C) 2MIC EO origana (0,18 µl/g); (D) MIC EO timijana (0,23 µl/g); (E) 2MIC EO timijana (0,46 µl/g); (•) vrednosti iz ogleđa; (–) Baranyi i Robertov model.

Najveća stopa rasta bakterija *Y. enterocolitica* zabeležena je u kontrolnoj grupi, dok je najmanja zabeležena u grupi gde je primenjeno EO timijana u dvostrukoj MIC količini. Vrednosti $R^2 > 0,8219$ ukazuju na prikladnost Baranyi i Robertovog modela (Tabela 5.41).

Tabela 5.41. Kinetički parametri Baranyi i Robertovog modela rasta *Yersinia enterocolitica* u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C uz dodatak etarskih ulja origana i timijana.

Grupa	y0	$\mu_{\max}$	SE	R^2
Kontrola	4,35	0,016	0,161782	0,93259
YEMICO (0,09 µl/g)	4,382	0,015167	0,106521	0,966603
YE2MICO (0,18 µl/g)	4,422	0,014792	0,21481	0,868037
YEMICT (0,23 µl/g)	4,428	0,012375	0,212908	0,8219
YE2MICT (0,46 µl/g)	4,388	0,00925	0,093879	0,932111

Legenda: y0 – inicijalna vrednost mikrobiološke populacije (log CFU/g); $\mu_{\max}$ – maksimalna stopa rasta/smrti bakterija (log CFU/g/h); SE – standardna greška; R^2 – koeficijent determinacije.

6. DISKUSIJA

Upotreba MALDI-TOF masene spektrometrije u potvrđivanju izolata patogenih bakterija prenosivih hranom iz vrsta *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* se pokazala primenjiva i uspešna. Ova metoda je poslednjih godina postala revolucionarna metoda u detekciji i identifikaciji mikroorganizama (Elbehiry i sar., 2017). U bakteriologiji, ona se zasniva na generisanju profila spektra proteoma, odnosno malih proteina i peptida koji uglavnom potiču od ribozoma. Ribozomalni proteini, u opsegu molekulskih masa između 2 i 20 kDa, dobro jonizuju i daju tačne spektre (Sparbier i sar., 2012; Wieser i sar., 2012; Pavlović i sar., 2013). Pored ovih, manji deo pikova potiče od strukturalnih proteina (Ryzhov i Fenselau, 2001). Zabeleženi spektri su karakteristični i čine otisak (eng. *fingerprint*) ispitujućeg roda, vrste ili soja (Böhme i sar., 2016). Na osnovu sličnosti ispitujućeg spektra i baze podataka softver izražava numeričku vrednost rezultata, odnosno koeficijent pouzdanosti. Ova vrednost rezultata pruža informacije o validnosti identifikacije. Osim toga, softver prikazuje dodatne rezultate pored najboljeg rezultata za proveru verodostojnosti (Wieser i sar., 2012).

Rezultati, odnosno vrednosti koeficijenata pouzdanosti svih ispitanih izolata, pokazuju da je identifikacija izolata bila uspešnija primenom proteinske ekstrakcije u poređenju sa metodom direktnog transfera, o čemu svedoče i istraživanja drugih autora (Böhme i sar., 2010; Alatoom i sar., 2011). U ovom istraživanju, upotrebom metode direktnog transfera visok nivo pouzdanosti zabeležen je kod 68,75% ispitanih izolata, odnosno kod 93,75% prilikom primene proteinske ekstrakcije. Alatoom i sar. (2011) su primenom proteinske ekstrakcije identifikovali 95% izolata do nivoa roda i 69% izolata do nivoa vrste, za razliku od direktnog transfera kolonija kada su 56% izolata identifikovali do nivoa roda i 20% do nivoa vrste.

Ekstrakcija podrazumeva liziranje bakterijskih ćelija pomoću hemikalija ili enzima u cilju oslobađanja proteina (Alatoom i sar., 2011). Ova metoda se koristi kod bakterija sa kompleksnijim ćelijskim zidom, gde primenjena formalna kiselina lizira ćeliju, a acetonitril utiče na precipitaciju proteina (Anderson i sar., 2012). Priprema uzoraka na ovaj način zahteva dodatno vreme, reagens i opremu. U ovom istraživanju neki izolati (SE56, ST35 i UB2-01-2 (1)) su zahtevali dodatnu pripremu, bez koje nije bilo moguće izvršiti njihovu identifikaciju.

Bruker Biotyper baza podataka za MALDI-TOF MS inicijalno je razvijena sa fokusom na kliničku dijagnostiku. Međutim, poslednjih godina ona se proširila na patogene bakterije prenosive hranom (Wenning i sar., 2014). Dobijeni rezultati, kao i literaturni podaci pokazuju MALDI-TOF MS kao pouzdanu metodu za identifikaciju patogenih bakterija prenosivih hranom, kao što su *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* (Mazzeo i sar., 2006; Stephan i sar., 2011; Elbehiry i sar., 2017; Jadhav i sar., 2018; Yan i sar., 2020). Ipak, upotreba MALDI-TOF MS u rutinskoj identifikaciji hranom prenosivih bakterija zavisi od mnogobrojnih faktora. Prednosti MALDI-TOF masene spektrometrije su tačnost, brzina, jednostavnost, osetljivost i reproduktivnost. Brzina koju ova metoda poseduje od ključnog je značaja za kvalitet i bezbednost hrane, naročito u situacijama pojave trovanja hranom kada su brza detekcija i identifikacija od izuzetnog značaja za zdravlje ljudi. Zavisno od kvaliteta i čistoće uzorka, kao i obima baze podataka identifikacija izolata može biti završena za nekoliko minuta (Stephan i sar., 2011; Elbehiry i sar., 2017). Mala količina reagenasa i njihova pristupačna cena predstavljaju još jednu prednost ove metode. Ipak, veliki

nedostatak MALDI-TOF MS jeste cena instrumenta (Pavlović i sar., 2013), kao i nemogućnost serotipizacije bakterija iz roda *Salmonella* (Kang i sar., 2017), što je uočeno i u ovom istraživanju, zbog upotrebe karakterističnih otisaka, zasnovanih na ribozomalnim proteinima, a ne na specifičnim biomarkerima (Dieckmann i sar., 2008). Polimorfizmi aminokiselina, koji potencijalno mogu poslužiti za serotipizaciju, često se nalaze u drugim klasama proteina, a ne u ribozomalnim, sa nepoznatim funkcijama. Maseni pik na m/z (eng. *mass-to-charge ratio*; masa/naelektrisanje) 6,036 jedinstven je za identifikaciju serotipa *S. Enteritidis*, dok je maseni pik na m/z 7,097 za neokarakterisan protein YaiA jedinstven za identifikaciju serotipa *S. Typhimurium* (Dieckmann i Malorny, 2011).

Međutim, ne postoje komercijalno dostupne baze podataka i paketi za analizu koji bi uspešno mogli identifikovati bakterije *Salmonella* na nivou serotipa (Mangmee i sar., 2020).

Metoda *real-time* PCR, odnosno kvantitativni PCR (qPCR), primenjena je u cilju potvrđivanja izolata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, s obzirom da njihova serotipizacija nije bila moguća primenom MALDI-TOF MS. *Real-time* PCR metoda je bazirana na merenju fluorescencije, nakon svakog ciklusa, čiji intenzitet predstavlja količinu DNK amplikona (proizvoda faze pojačanja, odnosno replikacije) u uzorku u određenom vremenu. Vizuelizacija DNK fragmenata omogućena je fluorescentno obeleženim oligonukleotidnim probama (Kralik i Ricchi, 2017).

U ovom istraživanju, za potvrđivanje izolata *S. Enteritidis* upotrebljena je *safA* ciljna sekvenca, dok je za potvrđivanje izolata *S. Typhimurium* upotrebljena ciljna sekvenca *fliA*-IS200. Gen *safA* jeste jedan od četiri gena, pored *safB*, *safC* i *safD*, koji čine *saf* (eng. *Salmonella atypical fimbria*) operon. Ovi geni kodiraju fimbrijalne subjediniice, periplazmatske šaperone (posebne proteinske molekule) i membranske proteine (Folkesson i sar., 1999) i specifični su za detekciju *S. Enteritidis* (Maurischat i sar., 2015; Reis i sar., 2018). Gen *fliA* predstavlja jedan od gena uključenih u regulaciju flagela, odnosno kodira flagela-specifični sigma faktor (σ^{28}) kod *S. Typhimurium* (Ohnishi i sar., 1990; Ikebe i sar., 1999; Plitnick i sar., 2021).

Sva četiri izolata *S. Enteritidis* i isto toliko izolata *S. Typhimurium* uspešno su potvrđena upotrebom *real-time* PCR metode. Upotreba ciljnih sekvenci *safA* i *fliA*-IS200 u identifikaciji ova dva serotipa *Salmonella* i ranije je uspešno primenjivana (Maurischat i sar., 2015; Reis i sar., 2018; Dmitrić, 2018).

Real-time PCR metoda omogućava brzo dobijanje rezultata, odnosno detekciju, kvantifikaciju i tipizaciju bakterija, u odnosu na standardne mikrobiološke metode (Bohaychuk i sar., 2007). Specifičnost ove metode omogućava razlikovanje ciljnih izolata bakterija od genetički sličnih (Kralik i Ricchi, 2017).

Hromatografske tehnike povezane sa različitim sistemima su najčešće korišćene metode za identifikovanje hemijskih komponenti EO. Gasna hromatografija (GC) je jedna od najefikasnijih metoda ispitivanja, jer omogućava odvajanje vrlo malih količina materijala i koristi se za kvantitativnu analizu, dok gasna hromatografija povezana sa masenom spektrometrijom (GC-MS) omogućava dobijanje masenog spektra svakog jedinjenja. Za ispitivanje hemijskog sastava EO, u cilju dobijanja kvalitativnih i kvantitativnih rezultata, najčešće se primenjuje GC-MS. Kvalitativna identifikacija jedinjenja EO vrši se poređenjem njihovih masenih spaktara sa masenim spektrima sadržanim u bazi podataka i poređenjem njihovih retencionih indeksa sa literaturnim podacima. Određivanjem količine svake identifikovane komponente postiže se kvantitativna karakterizacija ispitujućeg EO (Reyes-Jurado i sar., 2020).

Broj identifikovanih jedinjenja u određenom EO može znatno da varira. Mnoga jedinjenja su prisutna u više EO. Tako je u ovom istraživanju identifikovano 17 jedinjenja u više od 50% ispitanih EO ($n = 18$). Odnosno, 10 jedinjenja identifikovano je u preko 70% EO, i to: p-cimen ($n = 16$), alfa-pinen ($n = 15$), linalol ($n = 14$), kariofilen ($n = 14$), alfa-humulen ($n = 14$), kamfen ($n = 13$), beta-pinen ($n = 13$), limonen ($n = 13$), gama-terpinen ($n = 13$) i beta-mircen ($n = 13$).

Često dva do pet jedinjenja zajedno čine više od 50% ukupnog udela EO, dok u nekim EO dominantna komponenta čini više od polovine ukupnog sastava (De Groot i Schmidt, 2016), kao što je slučaj u ispitanim EO bosiljka (estragol), cimeta (cinamaldehyd), limuna (limonen), karanfilića (eugenol), fenela (anetol), origana (karvakrol), žalfije (linalil acetat) i vreska (karvakrol). Prema dominantnim komponentama u svom sastavu EO se dele na hemotipove.

Prema autorima Telci i sar. (2006) EO bosiljka se dele na 7 hemotipova, i to: 1) linalol, 2) metil cinamat, 3) metil cinamat/linalol, 4) metil eugenol, 5) citral, 6) metil kavikol i 7) metil kavikol/citral. Visok sadržaj estragola (69,52%), odnosno metil kavikola svrstava ispitano EO bosiljka u metil kavikolski (estragolski) hemotip. Hemijski sastav EO bosiljka može biti povezan sezonskim promenama temperature i vlage, kao i metaboličkim aktivnostima različitih delova biljaka (Hussain i sar., 2008). Chalchat i Özcan (2008) ističu da EO poreklom od različitih delova biljke bosiljka sadrže različite količine estragola. Estragol se u EO cveta bosiljka nalazio u količini od 58,26%, u listu nešto manje (52,60%), dok se u stabljici nalazio znatno manje (15,91%). Bosiljak iz Mađarske sadržao je estragol u količinama od 0,53% do 62,62% (Bernhardt i sar., 2015), a sa teritorije Republike Srbije u rasponu od 2,49% do 18,97% (Jelačić i sar., 2011). Telci i sar. (2006) takođe navode estragol (68,3%) kao najzastupljeniju komponentu EO bosiljka poreklom iz Turske.

Najzastupljenija jedinjenja ispitnog EO crnog bibera su beta-pinen, limonen, sabinen i alfa-pinen. Sličnog sastava jeste i EO poreklom iz Brazila sa beta-pinenom u rasponu od 20,3% do 48,0%, i limonenom u rasponu od 24,3% do 38,1%, dok je EO crnog bibera sa Madagaskara bilo nešto drugačijeg sastava: alfa-pinen (5,1 – 28,7%), beta-kariofilen (8,7 – 25,6%), limonen (15,1 – 19,5%), beta-pinen (9,1 – 15,3%) i delta-3-karen (9,0 – 12,8%) (Dosoky i sar., 2019). Karofilen (7,15%) je, takođe, identifikovan kao jedan od dominantnih jedinjenja EO crnog bibera (Menon i sar., 2000; Menon i sar., 2003; Menon i Padmakumari, 2005; Kapoor i sar., 2009; Li i sar., 2020).

Hemijski profil EO tajlandskog đumbira, sa sabinenom i terpinen-4-olom, kao najzastupljenijim komponentama, sličan je onima prikazanim u prethodnim ispitivanjima (Taroeni i sar., 1991; Pongprayoon i sar., 1997; Chooluck i sar., 2012; Chaiyana i sar., 2017). Odnos ova dva najzastupljenija jedinjenja često varira, što je slučaj i u istraživanjima Chaiyana i sar. (2017) gde je udeo terpinen-4-ola $40,5 \pm 6,6\%$, a sabinena $17,4 \pm 1,4\%$. Razlike u zastupljenosti dominantnih komponenti pokazuju Sukatta i sar. (2009) u čijim istraživanjima se udeo sabinena kreće između 36,71% i 53,50%, a terpinen-4-ola između 21,85% i 29,96%.

Etarsko ulje cimeta, bogato cinamaldehydom, sličnog je sastava EO autora Stević i sar. (2014) i Gende i sar. (2008) koji takođe navode cinamaldehyd kao glavnu komponentu, udela preko 70%. Zavisno od dela biljke, EO cimeta varira u svom sastavu. Jayaprakasha i sar. (2002) navode alfa-bergamoten (27,4%) i alfa-kopaen (23,1%) kao glavne komponente EO cimeta poreklom iz pupoljaka, dok su Wang i sar. (2009) u najvećem procentu identifikovali eugenol (79,75%) i trans-cinamaldehyd (16,25%) u EO poreklom iz listova. Iz EO cveta cimeta (E)-cinamil acetat (41,98%), trans-alfa-bergamoten (7,97%) i kariofilen oksid (7,2%) su identifikovani u najvećem udelu (Jayaprakasha i sar., 2000). Etarsko ulje kore cimeta najbogatije je cinamaldehydom (50,5%), dok je EO korena cimeta najbogatije kamforom (47,42%) (Paranagama i sar., 2001).

Ovde korišćeno EO limuna pokazuje sličan sastav, ali sa nešto drugačijim udelom komponenti, ranijim istraživanjima (Bertuzzi i sar., 2013; Murbach Teles Andrade i sar., 2014; Vinturelle i sar., 2017). Dominantnu komponentu ispitnog EO limuna čini limonen (79,72%), što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima gde je ova komponenta činila 53,61% (Ahmad i sar., 2006), 54,6% (Bertuzzi i sar., 2013), odnosno 66% (Inouye i sar., 2006).

Eugenol i kariofilen se smatraju glavnim komponentama EO karanfilića, zastupljenim u različitim odnosima (Srivastava i sar., 2005; Prashar i sar., 2006; Chaieb i sar., 2007; Lee i sar., 2009). Ispitano EO karanfilića je primarno bogato eugenolom (85,14%), dok je, iako zastupljen u tek

10,20%, kariofilen druga po zastupljenosti komponenta. Značajno manji udeo kariofilena (7,5%) u odnosu na eugenol (49,0%) slučaj je i u istraživanjima [Lee i sar. \(2009\)](#), čije EO sadrži isti broj jedinjenja kao i ispitano, međutim u nešto drugačijem odnosu.

[Mimica-Dukić i sar. \(2003\)](#) su u svojim ispitivanjima identifikovali iste komponente EO fenela kao i kod EO korišćenog u ovom istraživanju, ali u drugačijem odnosu. U njihovim istraživanjima (E)-anetol se kretao između 72,27% i 74,18%, odnosno u nešto manjem udelu. U EO semena fenela identifikovano je 68,53% trans-anetola, 10,42% estragola, 6,24% limonena i 5,45% fenona ([Diao i sar., 2014](#)). Uticaj godišnjeg doba, kao i delova biljke od kojih je EO dobijeno prikazuju autori iz Brazila ([Stefanini i sar., 2006](#)). U ovom istraživanju navode da je najbolje godišnje doba za dobijanje trans-anetola iz suvog semena leto (78,25%), za limonen iz listova biljke proleće (42,30%), dok su za dobijanje fenona iz zelenog semena jesen (16,98%) i leto (15,08%).

Rezultati [Mirjalili i sar. \(2019\)](#) ukazuju da različite metode sušenja ne utiču na proporciju glavnih komponenti EO lavande. Literaturni podaci pokazuju da su linalil acetat i linalol najzastupljenija jedinjenja EO lavande ([D'auria i sar., 2005](#); [Da Porto i sar., 2009](#); [Yang i sar., 2010](#); [Mirjalili i sar., 2019](#)), što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja.

[Hennia i sar. \(2019\)](#) prikazuju razlike u hemijskom sastavu i udelu glavnih komponenti EO mirte korišćenih u različitim istraživanjima. Najčešće EO mirte potiču iz listova, a potom iz plodova, sa alfa-pinenom, 1,8-cineolom, linalolom, limonenom i mirtenil acetatom kao glavnim komponentama različitog udela, što je slučaj i sa ispitanim EO. Ovo potvrđuju i istraživači iz Albanije ([Asllani, 2000](#)), Italije ([Maggio i sar., 2019](#)), Grčke ([Gardeli i sar., 2008](#)), Turske ([Özek i sar., 2000](#)), Alžira ([Bekhechi i sar., 2019](#)), Irana ([Yadegarinia i sar., 2006](#)) i Tunisa ([Hsouna i sar., 2019](#)).

Uprkos činjenici da je ispitano EO origana bogato karvakrolom (81,00%), rezultati autora [De Mastro i sar. \(2017\)](#) ukazuju da EO origana može da se razlikuje u prisutnosti dominantne komponente. Karvakrol se, iz 25 EO origana poreklom iz Italije, kretao u rasponu od 0,20% do 70,8%, dok se timol kretao u rasponu od 0,20% do 62,40%. Visok sadržaj ovih fenolnih jedinjenja može biti posledica klimatskih uslova, poput visokih temperatura ([Vokou i sar., 1993](#)).

Sličan hemijski sastav ispitnog EO ruzmarina, u nešto drugačijem odnosu najzastupljenijih jedinjenja, pokazuju EO iz nekoliko zemalja. Etarsko ulje ruzmarina iz Španije bogato je alfa-pinenom (19,4 – 24,7%), 1,8-cineolom (19,0 – 21,8%) i kamforom (16,3 – 18,9%), dok je EO poreklom iz Francuske sadržavalo alfa-pinen (19,9 – 35,1%), 1,8-cineol (5,3 – 24,8%) i bornil acetat (1,2 – 14,3%) u najvećem procentu. Marokansko EO ruzmarina najbogatije je bilo 1,8-cineolom (43,5 – 57,7%) ([Chalchat i sar., 1993](#)). [Jamshidi i sar. \(2009\)](#) u istraživanju EO ruzmarina poreklom iz dve provincije Irana pokazuju male razlike u hemijskom sastavu.

Kariofilen, neril acetat i beta-himahalen su najzastupljenije komponente ispitnog EO smilja. [Leonardi i sar. \(2013\)](#) u svojoj studiji prikazuju nešto drugačiji sastav EO smilja. Oni ističu da period uzorkovanja ne utiče bitno na hemijski sastav ovog ulja, dok su velike razlike uočene u uzorcima sa različitih lokaliteta, što je u vezi sa sastavom zemljišta.

Odnos dominantnih jedinjenja, p-cimena i timola, ispitnog EO timijana je gotovo jednak. Slične rezultate u odnosu jedinjenja, ali sa nešto manjim udelom, dobili su [Grigore i sar. \(2010\)](#). Generalno, literaturni podaci pokazuju da su jedinjenja p-cimen, timol i gama-terpinen najdominantnije komponente EO timijana ([Piccaglia i sar., 1993](#); [Richter i Schellenberg, 2007](#); [Rota i sar., 2008](#); [Shmeit i sar., 2020](#)), što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Literaturni podaci pokazuju značajne varijacije u hemijskom sastavu EO žalfije. Etarsko ulje divlje žalfije poreklom iz Tunisa bogato je kamforom (33,61%), koga prate 1,8-cineol (22,22%) i alfa-tujon (21,43%) ([El Euch i sar., 2019](#)), kao i EO poreklom iz Španije ([Cutillas i sar., 2017](#)). Dok je EO žalfije poreklom iz Italije bilo sličnog sastava, u nešto drugačijem odnosu: alfa-tujon (7,8 – 20,1%), kamfor (8,4 – 20,8%), borneol (2,5 – 16,9%), gama-murolen (2,9 – 13,8%) i sklareol (5,9 –

23,1%) (Russo i sar., 2013). Da hemijski sastav EO žalfije zavisi i od dela biljke svedoče istraživanja Veličković i sar. (2003). Upoređivanjem sadržaja svakog dela biljke odvojeno, ovi autori ističu da je EO cveta žalfije najbogatije alfa-pinenom i 1,8-cineolom. Kamfen, limonen, cis-tujon, trans-tujon, kamfor, bornil acetat i alfa-humulen su najzastupljeniji u ulju iz lista, dok je linalol najdominantniji u EO stabljike.

Istraživanja pokazuju da hemijski profil EO hajdučke trave varira zavisno od geografskog porekla, vegetativnog statusa biljke i perioda žetve. Tako je EO poreklom sa Kube bogato kariofilen oksidom (Pino i sar., 1998), iz Rusije kamazulenom i beta-kariofilenom (Orth i sar., 1999), iz Turske eukaliptolom, kamforom, alfa-terpineolom, beta-pinenom i borneolom (Candan i sar., 2003), a iz Grčke 1,8-cineolom, kamforom, borneolom i lavandulolom (Kokkalou i sar., 1992). Najsličnije ispitanoj EO hajdučke trave bilo je EO poreklom iz Norveške, bogato sabinenom i beta-pinenom (Rohloff i sar., 2000). Autori iz Norveške ističu da starost biljke utiče na odnos monoterpena i seskuiterpena, kao i da se odnos samih monoterpena menja sa razvojem biljke kada dolazi do povećanja sadržaja pinena i tujona, odnosno smanjenja sabinena, kamfora, borneola i bornil acetata. Autori iz Srbije, ispitujući EO hajdučke trave poreklom sa tri lokaliteta Vojvodine, iznose da su velike razlike u sastavu i prinosu EO posledica genetske strukture, populacije i specifičnih uslova životne sredine, pre svega zemljišta (Stevanović i sar., 2015).

U EO anđelike ističu se beta-felandren (41,57%) i alfa-pinen (13,27%) kao najdominantnije komponente. Slične rezultate dobili su Nivinskienė i sar. (2005) ispitujući EO semena (ploda) anđelike. U njihovim istraživanjima sadržaj beta-felandrena se kretao između 33,6% i 63,4%, dok je sadržaj alfa-pinena bio u opsegu između 4,2% i 12,8%. U ispitanoj ulju, treće po zastupljenosti jedinjenje bilo je kamfen (8,72%). Za razliku od EO semena, ulje korena anđelike najčešće sadrži nešto drugačiji odnos jedinjenja, gde se kao dominantna komponenta ističe alfa-pinen (Chalchat i Garry, 1997; Fraternale i sar., 2014).

U EO vreska dominirao je karvakrol (50,45%), praćen p-cimenom (15,73%) i gama-terpinenom (11,43%). Sličan sastav posedovala su i EO vreska sa planina južne Francuske (Miladi i sar., 2013) i poreklom iz Dalmacije (Republika Hrvatska) (Skočibuašić i Bezić, 2004). Da lokalitet ima uticaja na sadržaj karvakrola (5,58 – 84,19%) pokazuju istraživanja sprovedena u Republici Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini (Kustrak i sar., 1996).

Kao najdominantnija komponenta EO miloduha istakao se cis-pinokamfon (27,42%). Ovu komponentu, prema zastupljenosti, pratili su beta-pinen (13,16%) i trans-pinokamfon (7,44%). Pinokamfon, u svojim raznim oblicima, praćen beta-pinenom, čini najdominantniju komponentu EO miloduha i u drugim istraživanjima (Garg i sar., 1999; Mitić i Đorđević, 2000; Soković i sar., 2008).

Uporednom analizom rezultata dobijenih GC/MS ispitanih EO sa literaturnim podacima uočavaju se razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu. Ove razlike su posledica uticaja endogenih i egzogenih faktora. Endogeni faktori podrazumevaju anatomske i fiziološke karakteristike biljaka, tj. genetiku biljaka (vrstu, ekotip, hemotip), poreklo biljaka, sezonu, vegetativnu fazu i delove biljaka, fiziološke i biohemijske puteve, stepen razvijenosti i metaboličke procese biljaka. Egzogeni faktori uključuju faktore spoljašnje sredine, odnosno klimu i uslove staništa (temperatura, vlažnost, vetrovitost, sastav zemljišta, geografsko poreklo), uslove kultivacije, odnosno agrotehničke mere (način i vreme žetve) i tehnike primenjene nakon žetve (metode sušenja, ekstrakcije, vreme destilacije, uslovi čuvanja) (Barra, 2009; Moghaddam i Mehdizadeh, 2017).

U početnoj fazi studije ispitana je potencijalna antimikrobna aktivnost odabranih EO na najznačajnije patogene bakterije prenosive hranom, uključujući *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*. Preliminarni rezultati pokazuju da je većina ispitanih bakterijskih izolata osetljiva prema više EO.

Najefikasniji inhibitor svih izolata bilo je EO timijana, sa ZI u opsegu od 25,00 mm do 45,00 mm (5 μ l/disk), odnosno između 30,67 mm i 69,00 mm (10 μ l/disk). Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Rota i sar., 2008; Rusenova i Parvanov, 2009; Mith i sar., 2014; Maksimov, 2017; Aljabeili i sar., 2018; Olaimat i sar., 2019), gde je EO timijana ispoljilo izuzetnu antibakterijsku aktivnost prema *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*. Snažno antibakterijsko delovanje EO timijana može se pripisati visokom sadržaju p-cimena (40,91%) i timola (40,36%). Hidrofobno jedinjenje p-cimen, prekursor karvakrola, uzrokuje oticanje citoplazmatske membrane (Ultee i sar., 2002), dok timol uzrokuje njenu propustljivost (Lambert i sar., 2001) i gubitak intracelularnih komponenti, uključujući ATP (Olaimat i sar., 2019). Poput timola, karvakrol deluje istim mehanizmom na bakterijske ćelije (Burt, 2004) o čemu svedoče ZI > 20 mm kod *L. monocytogenes* i *S. Typhimurium* (Mith i sar., 2014). Ovi dijometri su u skladu sa dijametrima ZI dobijenih primenom EO origana u ovom i ranije objavljenim istraživanjima (Rusenova i Parvanov, 2009; Puškárová i sar., 2017; Evangelopoulou i sar., 2019) protiv bakterija *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*.

Snažnu antibakterijsku aktivnost poseduju i EO cimeta i vreska. Aktivnost cimeta se zasniva na prisustvu cinamaldehida (74,93%), aromatičnog aldehida koji inhibiše sintezu esencijalnih enzima bakterija i/ili uzrokuje oštećenje ćelijskog zida bakterije (Sanla-Ead i sar., 2012; Mith i sar., 2014). Cinamaldehyd izaziva izuzetnu osetljivost (ZI $\geq$ 30 mm) kod *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* (Sanla-Ead i sar., 2012; Mith i sar., 2014), što može biti objašnjenje velikih ZI postignutih kod *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* u ovom i ranijim studijama (Goni i sar., 2009; Babu i sar., 2011; Olaimat i sar., 2019). Hranom prenosive patogene bakterije u ovom istraživanju se prema dejstvu EO vreska, bogatom karvakrolom, p-cimenom i gama-terpinenom, klasifikuju kao veoma i/ili izuzetno osetljive, što je u skladu sa ranijim istraživanjima (Djenane i sar., 2011; Miladi i sar., 2013; Valizadeh i sar., 2014).

Antibakterijska aktivnost EO u korelaciji je sa njihovim dominantnim jedinjenjima (Burt, 2004; Burt i sar., 2007; Di Pasqua i sar., 2007; Bakkali i sar., 2008; Di Pasqua i sar., 2010; Rao i sar., 2019).

Etarska ulja bosiljka, tajlandskog đumbira, karanfilića, mirte, ruzmarina i miloduha pokazuju različite varijacije prilikom delovanja na hranom prenosive patogene bakterije. U ovom istraživanju izolati *S. Typhimurium* su prema EO bosiljka neosetljivi (-) ili osetljivi (+) sa ZI do $13,00 \pm 1,00$ mm, što se razlikuje od rezultata dobijenih od strane autora Elgayyar i sar. (2001). U njihovom istraživanju *S. Typhimurium* je izuzetno osetljiva sa ZI = 79 mm, kao i *Y. enterocolitica*, sa ZI = 87 mm, koja je u ovom istraživanju osetljiva (+), odnosno veoma osetljiva (++) sa ZI između 10,33 mm i 19,33 mm. Objašnjenje za znatno veće ZI može biti hemijski sastav primenjenog EO. Navedeni autori u svom istraživanju koriste EO bosiljka koje pripada linalolskom hemotipu, dok je u ovom istraživanju primenjeno EO estragolskog tipa. Dodatno, duže vreme inkubacije (4 dana) takođe je moglo uticati na znatno veće ZI. Ipak, kada je reč o izolatima *L. monocytogenes*, rezultati pomenutih autora su u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja, kao i istraživanjima Teixeira i sar. (2013). Interesantno je da su izolati *L. monocytogenes* otporniji na EO bosiljka. Dijometri inhibicije izolata *S. Enteritidis* (7,00 – 11,00 mm) u saglasnosti su sa rezultatima Smith-Palmer i sar. (1998) (7,1 mm), ali znatno manji od rezultata autora Dobre i sar. (2011) ($18,7 \pm 0,95$ mm).

Spektar delovanja EO tajlandskog đumbira kreće se od toga da nije inhibitorno delovalo na izolat *L. monocytogenes* UB2-01-2 (1) u količini od 5 μ l/disk ($7,00 \pm 0,00$ mm), do toga da je izuzetno inhibitorno delovalo na izolat *S. Typhimurium* ST48 u količini od 10 μ l/disk ($25,67 \pm 0,58$ mm). Slično, u istraživanju Prakatthagomol i sar. (2012) ovo EO pokazuje snažno inhibitorno dejstvo na *S. Typhimurium* ATCC 14028 (35,7 mm).

Antibakterijsko dejstvo EO karanfilića pripisuje se dominantnom jedinjenju eugenolu, koji je zastupljen u oko 85% (Lopez i sar., 2005; Barakat, 2014). Subletalne koncentracije eugenola inhibišu proizvodnju amilaze i proteaze, oštećuju ćelijski zid i dovode do nastanka ćelijske lize

(Thoroski i sar., 1989). Izolati *S. Enteritidis* su se pokazali kao osetljivi, odnosno veoma osetljivi prema EO karanfilića, sa ZI koje su slične onima dobijenim u drugim istraživanjima (Hoque i sar., 2008; Thanissery i sar., 2014). Slični rezultati zabeleženi su kod *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* (Hoque i sar., 2008; Barakat, 2014) i *Y. enterocolitica* (Lopez i sar., 2005).

Delovanje EO mirte na hranom prenosive patogene bakterije je različito. Izolati *S. Enteritidis* uglavnom su rezistentni na ovo ulje, kao i izolati *S. Typhimurium* kada je upotrebljeno 5 µl/disk. Suprotno, Fadil i sar. (2018) su, primenom iste količine EO, izmerili $ZI = 21,00 \pm 0,88$ mm. Veće ZI uočavaju se i kod *L. monocytogenes* (Amensour i sar., 2010; Bouyahya i sar., 2016), u odnosu na rezultate ovog istraživanja. Ipak, ovo se može pripisati nešto drugačijoj metodologiji, odnosno primeni znatno veće količine EO (50 µl).

Procena antibakterijskog dejstva EO ruzmarina na *S. Enteritidis* slična je onom ukazanom u drugim istraživanjima (Smith-Palmer i sar., 1998; Thanissery i sar., 2014; Olaimat i sar., 2019). S druge strane, uočena rezistentnost *S. Typhimurium* u ovom istraživanju suprotna je nalazu Raeisi i sar. (2016), koji su izmerili $ZI = 21,4 \pm 0,2$ mm (10 µl/disk). Isti autori ističu snažno antilisterijsko delovanje EO ruzmarina, što se u istraživanju ove disertacije uočava samo kod izolata L18 (10 µl/disk), dok su uglavnom ostali izolati *L. monocytogenes* rezistentni. Najosetljiviji na EO ruzmarina bili su izolati *Y. enterocolitica*, što nije slučaj i u istraživanju Ozogul i sar. (2015).

Rezultati disk dufuzione metode pokazuju da EO miloduha ne poseduje antibakterijska dejstva protiv *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* (Jianu i sar., 2016), dok je slabo delovanje uočeno kod *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*. Generalno, slabo antimikrobno delovanje ovog ulja zabeleženo je i ranije (Kizil i sar., 2010). Ipak, povećanjem količine primenjenog EO povećava se efekat delovanja (Jianu i sar., 2016).

Jedino EO koje u ovom istraživanju nije pokazalo antibakterijsku aktivnost prema ispitanim izolatima *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* jeste EO fenela. Identične rezultate dobili su Cetin i sar. (2010). Suprotno, određena antibakterijska aktivost EO fenela zabeležena je prema hranom prenosivim patogenim bakterijama *S. Enteritidis* (8,1 mm), *S. Typhimurium* (8,6 mm) i *L. monocytogenes* (7,4 mm) primenom 10 µl (Soylu i sar., 2009). Prilikom upotrebe desetostruko veće količine EO fenela prema *S. Typhimurium* zapaža se ZI od 20,2 mm (Diao i sar., 2014). Određena antibakterijska aktivnost zabeležena je i prema *Y. enterocolitica* (Marotti i sar., 1994).

Uz EO fenela, EO smilja, hajdučke trave i anđelike nisu ispoljila antibakterijsku aktivnost prema Gram negativnim bakterijama (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*). Rezistentnost izolata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* zapažena je još i prema EO crnog bibera, limuna, lavande, žalfije i miloduha. Generalno, ispitani izolati Gram pozitivne bakterije *L. monocytogenes* su bili osetljiviji na ispitana EO nego izolati Gram negativnih bakterija (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*), što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Delaquis i sar., 2002; Burt, 2004; Lv i sar., 2011; Çetin i sar., 2011). Otpornost Gram negativnih bakterija se objašnjava kompleksnijom građom njihovog ćelijskog zida, uglavnom sačinjenog od lipoproteina i lipopolisaharida koji čine barijeru i otežavaju ulaz hidrofobnih jedinjenja, kao što su EO (Mith i sar., 2014).

Dodatno, različiti dijametri ZI među korišćenim EO dobijenim disk difuzionom metodom mogu se objasniti rastvorljivošću EO koje ograničava njihovu difuziju kroz agar. Uz to, određena količina EO ostaje na papirnom filter disku ili prosto ispari tokom inkubacije (Griffin i sar., 2000). Očekivano, dobijeni rezultati pokazuju i da inhibitorni efekat EO zavisi od primenjene količine (Kizil i sar., 2010; Jianu i sar., 2016; Evangelopoulou i sar., 2019).

Bujon mikrodiluciona metoda upotrebljena je kako bi se potvrdili prethodni nalazi, ali i odredila inhibitorna koncentracija EO. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije se u velikoj meri koristi za kvantifikovanje antimikrobne aktivnosti EO. Brojne varijacije ove metode su objavljene, ali se princip svodi na dodavanje testiranih mikroorganizama u niz razblaženja EO pripremljenih u

tečnom hranljivom medijumu. Prisustvo ili odsustvo rasta utvrđuje se nakon inkubacije. Najniža koncentracija koja inhibira rast mikroorganizama jeste MIC, dok najniža koncentracija bez vidljivog rasta mikroorganizama predstavlja minimalnu baktericidnu koncentraciju. Međutim, kroz literaturu uočava se razlika definicije termina MIC i MBC, kao i izražavanje vrednosti u nekoliko mernih jedinica, uključujući ppm, mg/ml, µg/ml, % (v/v), µl/l i µl/ml (Burt, 2004), što može dodatno otežati poređenje rezultata.

Utvrđeno je da MIC vrednosti nisu uvek u korelaciji sa vrednostima ZI zbog razlike u rastu mikroorganizama u tečnom i čvrstom medijumu, stepenu izloženosti mikroorganizama EO, rastvorljivosti EO i njihovom poreklu (Ballester-Costa i sar., 2013). Ovo najbolje pokazuje EO ružmarina koje nije inhibiralo rast većine izolata *S. Typhimurium* disk difuzionom metodom. Zabeležena je ZI (8,83 mm) samo kod jednog izolata. Ipak, MIC ovog ulja iznosio je 0,89 µl/ml, što klasifikuje ovo ulje kao EO izuzetnog antibakterijskog dejstva. Sposobnost boljeg delovanja pojedinih EO na bakterijske ćelije u tečnom medijumu zabeleženo je i ranije (Ghabraie i sar., 2016; Vieira i sar., 2017). Iste vrednosti zabeležene su i kod izolata *Y. enterocolitica*, dok su kod *S. Enteritidis* (MIC < 1,78 µl/ml) i *L. monocytogenes* (MIC < 7,11 µl/ml) nešto veće. Dodatno, najniža MIC vrednost zabeležena je kod EO origana, uprkos činjenici da je EO timijana ispoljavalo najveće ZI.

Etarska ulja sa najnižim MIC vrednostima, odnosno sa najjačim antibakterijskim delovanjem protiv hranom prenosivih patogenih bakterija u ovom istraživanju su EO origana (MIC ≤ 0,71 µl/ml), timijana (MIC ≤ 0,89 µl/ml), cimeta (MIC ≤ 0,89 µl/ml) i vreska (MIC ≤ 1,42 µl/ml), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Friedman i sar., 2002; Rota i sar., 2004; López i sar., 2007; Mith i sar., 2014; Ghabraie i sar., 2016). Kao što je ranije pomenuto, izvanredna antimikrobna aktivnost EO origana i timijana, pripisuje se fenolnim jedinjenjima, karvakrolu i timolu (Çetin i sar., 2011; Sakkas i Papadopoulou, 2017). Karvakrol je najistraživanija komponenta EO. Ulja koja poseduju karvakrol poseduju izvanrednu antimikrobnu aktivnost. Premda karvakrol najpre deluje na spoljašnju membranu, smatra se da je njegovo mesto delovanja zapravo citoplazmatska membrana, prouzrokujući pasivan transport jona kroz membranu. Kao mehanizam prilagođavanja, za održavanje optimalne membranske funkcije i strukture, smatra se da ćelije izložene karvakrolu menjaju kompoziciju masnih kiselina membrane (Chouhan i sar., 2017).

Izlaganjem *Salmonella enterica* sub-letalnim koncentracijama timola izaziva nakupljanje pogrešno obrazovanih membranskih proteina (Di Pasqua i sar., 2010). Ovim jedinjenjem pogođen je i metabolički put citrata, kao i mnogi enzimi uključeni u sintezu ATP-a. Unutarćelijsko delovanje timola utiče na važne procese stvaranja energije (Chouhan i sar., 2017).

Prema sabranim literaturnim podacima prikazanim od strane Bajpai i sar. (2012) MIC vrednosti EO origana kreću se u intervalu od 0,12 µl/ml do 3,12 µl/ml protiv *S. Typhimurium*, odnosno od 66,7 mg/ml do 160 mg/ml protiv *S. Enteritidis*. Podjednaka inhibitorna aktivnost (MIC ≥ 0,6 µl/ml) ovog ulja uočena je prema *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis* (Mazzarrino i sar., 2015; De Medeiros Barbosa i sar., 2016). Ranija istraživanja pokazuju da je *Y. enterocolitica* nešto osetljivija prema EO origana (MIC = 0,16 µl/ml) u odnosu na *L. monocytogenes* (MIC = 0,26 µl/ml) (Firouzi i sar., 2007), što je, kod pojedinih izolata ovih patogenih bakterija, potvrđeno i rezultatima ove doktorske disertacije.

Pregledom literature Burt (2004) ističe da je opseg MIC vrednosti EO timijana između 0,45 µl/ml i 20,00 µl/ml protiv *S. Typhimurium* i u opsegu od 0,156 µl/ml do 0,45 µl/ml protiv *L. monocytogenes*. Nešto veći opseg (od 2,5 µl/ml do 5,0 µl/ml) zapažen je kod *S. Enteritidis* i *L. monocytogenes* od strane Mazzarrino i sar. (2015). Inhibicija rasta *S. Enteritidis* zapaža se i pri koncentraciji od 0,06% ovog ulja (Thanissery i sar., 2014).

Prema literaturi EO cimeta inhibira rast izolata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* u opsegu MIC od 0,3% do 0,6%, odnosno pri koncentraciji od 0,63 mg/ml do 1,26 mg/ml (Ebani i sar., 2019), a *L.*

monocytogenes od 0,6 µl/ml do 2,5 µl/ml (Mazzarrino i sar., 2015). U ovom istraživanju najosetljiviji su bili izolati *Y. enterocolitica*, što je u skladu sa rezultatima Goni i sar. (2009) u čijem istraživanju je bilo nekoliko Gram negativnih (*E. coli*, *Salmonella choleraesuis* i *Pseudomonas aeruginosa*) i Gram pozitivnih bakterija (*Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*). Brnawi i sar. (2019) daju prednost EO cimeta poreklom iz kore, koje je inhibitorno delovalo na *L. monocytogenes* pri koncentraciji od 0,25%, u odnosu na ulje poreklom iz lišća koje je svoje inhibitorno dejstvo ispoljilo pri 0,5%. Odlično antibakterijsko dejstvo EO cimeta poreklom iz kore zapaža se i u istraživanju Al-Mariri i Safi (2014), gde se MIC vrednosti kreću između 1,5 µl/ml i 12,5 µl/ml protiv Gram negativnih bakterija, uključujući *Y. enterocolitica*.

Uočeno je da testirani izolati različito reaguju na dejstvo EO što ukazuje da prisutna jedinjenja EO poseduju različite mehanizme delovanja ili da je metabolizam nekih bakterija sposobniji da se izbori ili adaptira na EO. Mnogi autori (Smith-Palmer i sar., 1998; Soković i sar., 2010) ističu da su Gram negativne bakterije otpornije od Gram pozitivnih na delovanje EO, što se ispostavilo tačno prilikom delovanja pojedinih EO u ovom istraživanju. Relativna tolerancija Gram negativnih bakterija uslovljena je njihovom kompleksnijom građom. Međutim, posmatrajući delovanje određenih EO, između ostalog i EO origana, uočava se manja osetljivost izolata *L. monocytogenes* u odnosu na Gram negativne bakterije (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*). Hulánková i Bořilová (2011) su uočile sličnu rezistentnost *L. monocytogenes* u odnosu na *S. Enteritidis*, *E. coli* i *S. aureus* na EO origana. Do sličnih saznanja došli su i autori Elgayyar i sar. (2001) u čijim istraživanjima je *L. monocytogenes*, poređena sa Gram negativnim bakterijama *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, bila najrezistentniji mikroorganizam na nekoliko EO, uključujući bosiljak i fenel.

Podvrgnuti delovanju EO vreska dva izolata *L. monocytogenes* su bila najosetljivija, dok su dva izolata bila najotpornija. Razlika unutar iste vrste objašnjava se biodiverzitetom sojeva koji ima presudnu važnost u antibakterijskoj rezistenciji. Ova pojava zapažena je i među sojevima *Salmonella* (Mazzarrino i sar., 2015). Male razlike u aktivnim koncentracijama (MIC) među ispitanim izolatima mogu se pripisati karakteristikama ovih izolata. Izbor izolata može igrati važnu ulogu u poređenju antibakterijskog dejstva EO (Hulánková i Bořilová, 2011).

Uočeno je da EO vreska inhibitorno deluje pri istoj MIC vrednosti (1,72 µl/ml) na pojedine izolate *Y. enterocolitica* i *L. monocytogenes*. Isti efekat postignut je primenom EO cimeta na *Y. enterocolitica* i *L. monocytogenes* pri MIC 500 ppm (Simionato i sar., 2019). Podjednako delovanje na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije zabeleženo je i kod EO ruzmarina, limuna i karanfilića (Prabuseenivasan i sar., 2006). Odlično delovanje EO vreska na *L. monocytogenes* potvrđuje i studija Djenane i sar. (2011), gde je MIC vrednost iznosila $0,03 \pm 0,007\%$. Brojna istraživanja svedoče o antimikrobnom potencijalu EO vreska (De Oliveira i sar., 2011).

Etarsko ulje karanfilića utiče na sintezu nukleinskih kiselina i ekspresiju gena kod *L. monocytogenes*, što ometa sintezu određenih proteina i enzima, smanjujući tako sadržaj ukupnih proteina za 40,25%. Eugenol, glavna komponenta EO karanfilića, može da menja strukturu DNK. Generalno, delovanje EO karanfilića se pripisuje upravo ovoj komponenti, koja ima sposobnost ireverzibilnog oštećenja ćelijske membrane i ćelijske strukture, što dovodi do curenja biomakromolekula (ATP, DNK, jona i proteina) i intracelularnih enzima. Posledično se smanjuje fiziološka aktivnost ćelija i nastupa njihova smrt (Devi i sar., 2010; Cui i sar., 2018). Nezavisno od karakteristika mikroorganizama, EO karanfilića je delovalo u sličnim količinama, što je zapaženo i ranije kod bakterija *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* (MIC = 0,304 mg/ml) (Radünz i sar., 2019). Isti autori navode MBC koncentracije identične MIC koncentracijama, što nije slučaj sa MBC koncentracijama istraživanja ove doktorske disertacije. Razlika među MBC vrednostima može se pripisati varijacijama primenjene metode, bakterijama i sastavu EO.

Najširi opseg MIC vrednosti ovog istraživanja zapažen je kod EO mirte. Širok raspon delovanja zabeležen je takođe i kod autora [Alem i sar. \(2008\)](#), gde je MIC iznosila 0,5 mg/ml za *Staphylococcus aureus*, 2,5 mg/ml za *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris*, 15 mg/ml za *Klebsiella* i *Salmonella typhi*, i 20 mg/ml za *Pseudomonas aeruginosa*. Antibakterijska aktivnost ovog ulja zabeležena je u nekoliko radova ([Bouzouita i sar., 2003](#); [Gündüz i sar., 2009](#); [Pirbalouti i sar., 2014](#)).

Prema [Soković i sar. \(2010\)](#) MIC (5,0 µg/ml) EO bosiljka identična je kod *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*. Slično, u istraživanju [Gaio i sar. \(2015\)](#) kod Gram pozitivnih bakterija prosečna MIC iznosi 0,75 mg/ml, a kod Gram negativnih 0,73 mg/ml. MIC vrednosti u ovom istraživanju znatno su niže kod Gram negativnih bakterija, u odnosu na one dobijene kod Gram pozitivnih bakterija. Suprotno, u ranijim istraživanjima najniže MIC vrednosti utvrđene su kod Gram pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*) u odnosu na Gram negativne bakterije (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *S. Typhimurium*) ([Semeniuc i sar., 2017](#)).

Slično bosiljku, MIC vrednosti EO tajlandskog đumbira niže su kod Gram negativnih bakterija u odnosu na one dobijene kod *L. monocytogenes*. Ranija istraživanja pokazuju da ovo EO inhibitorno deluje na veliki broj Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, uključujući *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* i *Pasteurella multocida* ([Pithayanukul i sar., 2007](#); [Prakathagomol i sar., 2012](#)).

Formiranje biofilмова značajna je strategija preživljavanja bakterija usled nepovoljnih uslova spoljašnje sredine. Bakterije mogu formirati biofilmove na različitim vrstama površina, kao i na prelazima gasno-tečno, odnosno tečno-čvrsto ([Ma i sar., 2019](#)). Upotreba nerđajućeg čelika i plastičnih površina široko je rasprostranjena u industriji mesa. Ove površine na oko izgledaju kao glatke površine, ali su u stvari nepravilne i pružaju idealna mesta za adheziju i stvaranje biofilma bakterija. Smatra se da su plastične i gumene površine hidrofobne, za razliku od nerđajućeg čelika i stakla koji su hidrofilni, kao i da mikroorganizmi preferiraju vezivanje za hidrofobne materijale. Strukture ćelijske površine bakterija igraju važnu ulogu u procesu vezivanja. Fimbrije i razni proteini dominantno se vezuju za hidrofobne površine, dok se ekstracelularni polimerni supstrat i lipopolisaharidi više vezuju za hidrofilne materijale ([Donlan, 2002](#)).

Kako bi *in vitro* imitirali uslove u industriji mesa izabrane su dve površine (polistirenska i nerđajući čelik), različiti uslovi temperature i različiti hranljivi medijumi. Temperatura od 37 °C izabrana je kao optimalna temperatura rasta patogenih bakterija prenosivih hranom u laboratorijskim uslovima, dok su niže temperature imitirale uslove u pogonima za obradu mesa i proizvoda od mesa (15 °C) i temperaturu frižidera (5 °C). Zavisno od lokacije, bakterije u industriji mesa izložene su različitim stepenima hranljivih materija. Tako, populacije bakterija koje se nalaze u odvodima izložene su većem stepenu hranljivih materija, u odnosu na populacije koje se nalaze na zidovima, plafonima ili u ventilaciji, gde su izložene manjem stepenu hranljivih materija ([Djordjevic i sar., 2002](#)). U ovom istraživanju izabrana su tri različita hranljiva medijuma (TSB, MB i LB bujon) često korišćena u istraživanju sposobnosti formiranja biofilмова.

Monitoring sposobnosti formiranja biofilмова patogenih bakterija izvršen je primenom testa na polistirenskim mikrotitar pločama. Vizuelizacija formiranih biofilмова u polistirenskim mikrotitar pločama postiže se bojenjem biomase ([Kadam i sar., 2013](#)) najčešće kristal violetom ([Djordjevic i sar., 2002](#); [Stepanović i sar., 2004](#)). Vezivanjem boje i površine negativno naelektrisanih molekula i matriksa živih i neživih bakterija prebojava se biofilm ([Ommen i sar., 2017](#)), a očitavanjem optičke gustine omogućava njegova kvantifikacija. Test je pogodan za ispitivanje velikog broja bakterijskih izolata istovremeno. Takođe omogućava ispitivanje uticaja različitih faktora sredine, poput temperature, raspoloživosti hranljivih materija i vremena inkubacije. Ipak, nestandardizacija ovog testa otežava poređenje dobijenih rezultata sa ranijim istraživanjima.

Ovim testom utvrđeno je da su svi ispitani izolati *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* sposobni da formiraju biofilme na plastičnim površinama, dok su uslovi temperature i hranljivog medijuma uticali na njihov stepen.

Kao i u ranijim istraživanjima (Stepanović i sar., 2004) izolati *Salmonella* bili su veći biofilm produceri na plastičnoj površini. Višećelijsko ponašanje *Salmonella* regulisano je genima koji podstiču stvaranje polimera (tankih agregativnih fimbrija i celuloze) od kojih nastaje ekstracelularni matriks (Gerstel i Römling, 2001). Stvaranje agregativnih fimbrija regulisano je *agf* (*Aggregative Fimbriae Gene*) genima, koji su organizovani u dva operona, odnosno dve funkcionalne jedinice regulacije genetičke aktivnosti, *agfBAC* i *agfDEFG*, dok je stvaranje celuloze regulisano *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* i *bcsC* (*Bacterial Cellulose Synthesis*) genima (De Oliveira i sar., 2014).

Stvaranje tankih agregativnih fimbrija kod *S. Typhimurium* uslovljeno je temperaturom, na 28 °C se stvaraju, dok se na 37 °C ne stvaraju (Gerstel i Römling, 2001). Ovo bi moglo objasniti statistički najbolje ($p < 0,05$) stvaranje biofilma *S. Typhimurium* na 15 °C, bez obzira na hranljivi medijum, u odnosu na temperature inkubacije od 37 °C i 5 °C u istraživanju ove disertacije. De Oliveira i sar. (2014) su ispitali sposobnost formiranja biofilma 174 izolata *Salmonella* spp. na PVC (*Polyvinyl chloride*) površini pri različitim temperaturama, kada je najpovoljnije delovala temperatura od 35 °C (65,5%) u odnosu na 28 °C (44,8%), 20 °C (39,7%) i 16 °C (44,8%). Svi izolati koji su formirali biofilm klasifikovani su kao slabi biofilm produceri. Autori smatraju, iako nije rađena identifikacija *Salmonella*, da većina izolata pripada *S. Enteritidis*, s obzirom da su izolovani iz sirovog pilećeg mesa. S druge strane, u istraživanju Stepanović i sar. (2003), 30 °C je statistički više pogodovala formiranju biofilma 29 izolata *S. Enteritidis* od 37 °C i ~22 °C tokom 24 h inkubacije. Ipak, produženjem inkubacije na 48 h najveći kvantitet formiranih biofilma postignut je pri temperaturi od ~22 °C. Slično je zapaženo i kod 40 izolata *Salmonella enterica* poreklom iz svinjskih klanica, koji su statistički bolje stvarali biofilme pri temperaturi od 22 °C u odnosu na 35 °C (Piras i sar., 2015). U ovom istraživanju kod izolata *S. Enteritidis*, samo u slučaju inkubacije u LB bujonu, uočena je statistička značajnost ($p < 0,05$) između temperatura inkubacije (37 °C > 15 °C > 5 °C).

Smatra se da je adhezija *L. monocytogenes* za površine koje dolaze u kontakt sa hranom posledica hidrofobne interakcije između materijala površine i komponenti površine bakterije. Čini se da flagele igraju važnu ulogu u inicijalnoj adheziji, s obzirom da se pokretljive *L. monocytogenes* vežu u većem obimu od nepokretnih (Møretro i Langsrud, 2004). Veća adhezija, koja je posledica razlike u građi flagela, zapažena je kod serotipa 1/2c u odnosu na druge serotipove (Lundén i sar., 2000), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Naime, izolat L5, koji pripada serotipu 1/2c, umereno je formirao biofilme u najviše različitih uslova sredine. Dodatno, smatra se da gen *inlA* (*Internalin*) prouzrokuje ekspresiju receptora E-kadherina koji učestvuje u vezivanju za površinu, kao i da je gen *luxS* (*Luminescence*) prekursor procesa formiranja i regulacije biofilma (Bonsaglia i sar., 2014). Isto tako regulator virulencije *PrfA* (*Positive Regulatory Factor A*) promoviše stvaranje biofilma nakon prelaska bakterije *L. monocytogenes* iz flagelarnog ekstracelularnog oblika u oblik vezan za površinu (Lemon i sar., 2010).

Na 37 °C ekspresija flagelina je potisnuta kod većine izolata *L. monocytogenes* (Way i sar., 2004). Ipak, *L. monocytogenes* sposobna je da se pasivno veže za površinu (Lemon i sar., 2007), što je dosledno rezultatima ove doktorske disertacije i autora Kadam i sar. (2013) gde je temperatura od 37 °C najviše pogodovala stvaranju biofilma, u odnosu na 30 °C, 20 °C i 12 °C. Slično je zapaženo i u drugim istraživanjima (Di Bonaventura i sar., 2008; Barbosa i sar., 2013). Na 22 °C i 37 °C biofilm *L. monocytogenes* predstavlja kompleksnu organizaciju, u smislu broja ćelija i proizvedenih ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS), dok pri temperaturama od 4 °C i 12 °C *L. monocytogenes* proizvode rudimentirane biofilme koji se sastoje od retkih nakupina ćelija i minimalne količine EPS (Di Bonaventura i sar., 2008).

Izolati *Y. enterocolitica* biotipa 4 u ovom istraživanju uspešno su formirali biofilme pri temperaturama od 37 °C i 15 °C. Pregledom literature uočava se da je malo istraživanja o uticaju

temperature na formiranje biofilмова ove patogene bakterije. U literaturi se uglavnom spominje proizvodnja biofilмова na 25 °C (Wang i sar., 2016; Di Marco i sar., 2020) i 28 °C (Younis i sar., 2019).

Generalno, ne uzimajući u obzir hranljive medijume, temperatura od 37 °C je prosečno najpogodnije delovala na formiranje biofilмова izolata *S. Enteritidis* ($OD_{SE} = 0,282 \pm 0,137$) i *L. monocytogenes* ($OD_{LM} = 0,254 \pm 0,119$), dok je temperatura od 15 °C prosečno najpovoljnije delovala na formiranje biofilмова izolata *S. Typhimurium* ($OD_{ST} = 0,499 \pm 0,349$) i *Y. enterocolitica* ($OD_{YE} = 0,239 \pm 0,112$).

Bitno je istaći da su svi ispitani izolati hranom prenosivih patogenih bakterija, izuzev izolata *L. monocytogenes* L18, u ovom istraživanju bili sposobni da formiraju biofilmove pri temperaturi od 15 °C. Ovaj rezultat može poslužiti kao upozorenje pogonima industrije mesa, naročito prostorijama za rasecanje, gde je neophodno održavanje temperature okoline najviše do 12 °C (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnim uslovima, odnosno opštim i posebnim uslovima za higijenu hrane životinjskog porekla, kao i o uslovima higijene hrane životinjskog porekla („Službeni glasnik RS“, br. 25/2011 i 27/2014)). Važno je istaći i sposobnost formiranja biofilмова svih ispitanih izolata *S. Enteritidis* i dva izolata *S. Typhimurium* (ST28 i ST35) pri temperaturi od 5 °C, koja predstavlja prosek temperature frižidera u domaćinstvima (Biglia i sar., 2018), što posledično može dovesti do povećanja unakrsne kontaminacije na mestu skladištenja hrane.

Uzimajući u obzir sve četiri vrste patogenih bakterija prenosivih hranom i različite temperature inkubacije, rezultati ispitivanja pokazuju da je statistički najpogodniji ($p < 0,05$), za formiranje biofilмова, hranljivi medijum TSB ($n = 7$), praćen LB bujonom ($n = 5$). Najmanje pogodan hranljivi medijum bio je MB ($n = 1$). Ovaj hranljivi medijum nije pogodio stvaranju biofilмова *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*. Prosečno, izuzimajući uticaj temperature, za formiranje biofilмова oba serovarijeta *Salmonella* najpogodniji je LB bujon ($OD_{SE} = 0,278 \pm 0,148$; $OD_{ST} = 0,491 \pm 0,367$), dok je za formiranje biofilмова izolata *L. monocytogenes* ($OD_{LM} = 0,245 \pm 0,155$) i *Y. enterocolitica* ($OD_{YE} = 0,240 \pm 0,129$) najpogodniji TSB.

Opšte je prihvaćeno da hranljivo siromašniji medijumi povoljnije deluju na formiranje biofilмова *Salmonella* spp., dok hranljivo bogatiji medijumi povoljnije deluju na formiranje biofilмова *L. monocytogenes* (Stepanović i sar., 2004; Kadam i sar., 2013). Stepanović i sar. (2004) ističu da je kod većine (72,9%) ispitanih *Salmonella* spp. najefikasniji za formiranje biofilмова bio 20 puta razblaženi TSB (1/20 TSB). Preostali izolati (27,1%) formirali su kvantitativno veće biofilmove u BHI (Brain Heart Infusion) bujonu, TSB i MB. Preko 80% ispitanih izolata *L. monocytogenes*, u istom istraživanju, bolje je formiralo biofilmove u BHI, praćenog sa TSB i MB, dok su najslabiji rezultati bili u razblaženom 1/20 TSB. Slično, za formiranje biofilмова *Y. enterocolitica* pogodniji su nutritivno bogatiji medijumi, poput TSB (Wang i sar., 2016; Younis i sar., 2019; Di Marco i sar., 2020) i BHI (Zadernowska i Chajęcka-Wierzchowska, 2017), što je dokazano i ovim istraživanjem. U istraživanju imitacije uslova u pogonu industrije mesa Wang i sar. (2017) ističu da je *Y. enterocolitica*, koja pripada biotipu 4, sposobna da formira kvantitativno jače biofilmove tokom 24 h inkubacije u mesnom soku u odnosu na TSB. Suprotno, u ovom istraživanju MB nije pogodio stvaranju biofilмова *Y. enterocolitica*. Nesaglasnost rezultata može biti posledica razlike sastava MB i mesnog soka dobijenog usitnjavanjem, zamrzavanjem i otapanjem svinjskog mesa.

Analiza kapaciteta formiranja biofilмова testom na mikrotitar pločama upotrebom kristal violeta ne daje informacije o relativnom udelu ćelija biofilma i ekstracelularnog matriksa. Kombinacijom kristal violet testa i metode brojanja Castelijni i sar. (2012) otkrivaju da je najniža granica detekcije biofilma *S. Typhimurium* pri kristal violet testu 6,8 log CFU/bunarčiću, što ukazuje da ovaj test nije dovoljno osetljiv i da možda neće otkriti nizak nivo formiranja biofilмова.

Od pet ispitanih izolata koji su identifikovani kao jaki biofilm produceri na mikrotitar pločama izabrana su tri, po jedan predstavnik izolata *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*, i

jedan umereni biofilm producer iz vrste *Y. enterocolitica* za utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilмова na nerđajućem čeliku. Nerđajući čelik je jedan od najčešćih materijala korišćenih u industriji mesa, zbog svoje fizičko-hemijske stabilnosti i visoke otpornosti na koroziju (Moraes i sar., 2018). U ovom istraživanju korišćen je nerđajući čelik tipa 304, glatke površine i svetlo sive boje. Tokom proizvodnje nerđajućeg čelika vrši se presovanje metalnih zrna u ravne površine. Međutim, veze između metalnih zrna ne bivaju potpuno zapečaćene, čime nastaje mreža potpovršinskih pukotina, koje mogu biti mesta zadržavanja bakterija (Arnold i Bailey, 2000). Dodatno, ovaj materijal poseduje visoku slobodnu energiju, odnosno hidrofилnost, koja pogoduje vezivanju bakterija i formiranju biofilмова (Engel i sar., 2017).

Skening elektronska mikroskopija (SEM) omogućava posmatranje interakcije između bakterija i površine. S obzirom da nije moguće kvantifikovati broj mikroorganizama, zbog njihovog nepravilnog grupisanja, često višeslojnog, SEM predstavlja semi-kvantitativnu metodu (Marques i sar., 2007). SEM je zasnovana na površinskom rasipanju i apsorpciji elektrona, čime se dobija mikrograf visoke rezolucije i trodimenzionalni izgled površine uzorka (Azeredo i sar., 2017). Zbog upotrebe visokog vakuuma i nekonduktivne prirode bioloških materijala, iste je potrebno adekvatno pripremiti. Ova priprema podrazumeva dugotrajan proces fiksiranja, dehidracije i oblaganja uzorka provodnim materijalom, poput zlata, što može oštetiti strukturu uzorka i dovesti do pojave artefakata (Hannig i sar., 2010). Dehidracija uzrokuje skupljanje biofilma zbog kolapsa EPS, koja se primarno sastoji od vode, pri čemu bakterije ostaju izložene (Alhede i sar., 2012). Dodatno, evaluacija različitih bakterijskih vrsta nije moguća na mikrografu (Hannig i sar., 2010). Navedeni nedostaci SEM vidljivi su na preparatima iz ovog istraživanja. Naime, iako se uočava vezivanje bakterija za površinu, kao i nakupine istih, na preparatima se ne uočava ekstracelularni matriks. S obzirom da su svi ispitani izolati po strukturi štapičaste bakterije njihova diferencijacija nije bila moguća. Ipak, rezultati ukazuju na to da ovi bakterijski izolati mogu preživeti na površinama nerđajućeg čelika koje dolaze u kontakt sa hranom, što povećava verovatnoću pojave unakrsne kontaminacije.

Adhezija, odnosno primarna sedimentacija i vezivanje bakterija za površinu, u ovom istraživanju trajala je 3 h. Ovo vreme je bilo dovoljno svim bakterijskim izolatima da se vežu za kupone nerđajućeg čelika. Nekoliko autora (Hood i Zottola, 1997; Schlisselberg i Yaron, 2013) ističe da je kontaktno vreme u trajanju od 1 h dovoljno je da se bakterijske ćelije *S. Typhimurium* vežu za površinu nerđajućeg čelika. Isto tako, Casarin i sar. (2014) navode da se najveći broj bakterijskih ćelija izolata *S. Enteritidis* vezuje za površinu upravo nakon 1 h, dok je za isti nivo vezivanja *L. monocytogenes* potrebno 4 h. S druge strane, za vezivanje bakterija *Y. enterocolitica* bilo je potrebno 6 do 8 h u istraživanju Lenchenko i sar. (2019). Nakon vezivanja bakterija za površinu one proizvode supstance koje ispunjavaju intercelularni prostor. Vezivanjem ćelija za supstance i intercelularni matriks formira se monosloj. Monosloj se uočava kao difuzni sloj na površini, sa sporadično raspoređenim bakterijama i mestimičnim ćelijskim agregatima (Milanov i sar., 2010; Lenchenko i sar., 2019). Ovo se uočava nakon 18 do 24 h (Lenchenko i sar., 2019), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na mikrografima svih ispitanih izolata u ovom istraživanju. Uočene mikrokolonije, odnosno ćelijski agregati koje čine difuzni sloj biofilma, nastaju akumulacijom intercelularnog matriksa i koagregacijom bakterijskih ćelija. Dalje formiranje zrelog biofilma nastaje implementacijom intercelularnih komunikativnih procesa. Za ovaj proces je potrebno oko 48 do 72 h. Potom nastaje disperzija, odnosno odbacivanje bakterija. Pojedinačne ćelije se odvajaju od biofilma periodično, sposobne da se vežu za površinu i formiraju nove kolonije nakon 72 do 96 h (Lenchenko i sar., 2019).

Na svim mikrografima se zapažaju individualne ćelije i mikrokolonije koje ne pokrivaju celu površinu kupona. Ovakvi rezultati zapaženi su i u ranijim istraživanjima. Schlisselberg i Yaron (2013) su, nakon SEM, primenili konfokalnu mikroskopiju kojom su utvrdili da *S. Typhimurium* nakon 24 h inkubiranja pokriva 49% površine nerđajućeg čelika. Produžavanjem vremena

inkubiranja na 5 dana biofilm gotovo da pokriva celu površinu kupona (88%). Debljina biofilma se, takođe, znatno povećava sa $15 \pm 1 \mu\text{m}$ na $62 \pm 21 \mu\text{m}$. S obzirom da SEM zahteva dehidraciju i uništavanje EPS [Rodriguez i sar. \(2008\)](#) su primenili mikroskop atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscope* – AFM) u cilju dobijanja verodostojnije slike biofilma na nerđajućem čeliku. Kao i na mikrografu izolata UB2-01-2 (1) uočava se da *L. monocytogenes* ne kolonizuje celu površinu nerđajućeg čelika, nego raste u vidu pojedinačnih ćelija i malih mikrokolonija. Mikrokolonije su dijametra od 5 do $10 \mu\text{m}$ sa EPS, dok se visina mikrokolonija kreće između 0,2 i $0,45 \mu\text{m}$, što odgovara jednom do tri sloja bakterijskih ćelija ([Rodriguez i sar., 2008](#)).

Struktura biofilma zavisi i od načina inkubiranja u toku istraživanja. Pod statičkim uslovima tokom 24 h *L. monocytogenes* formira homogen sloj biofilma koji se sastoji od pojedinačnih štapićastih bakterija i mikrokolonija ([Rieu i sar., 2008](#)), što je zapaženo i na mikrografu izolata UB2-01-2 (1). Suprotno, biofilm *L. monocytogenes* nastao pod uticajem protoka se sastoji od mikrokolonija sferičnog oblika okruženih mrežom lanaca duguljastih ćelija ([Rieu i sar., 2008](#)). [Gram i sar. \(2007\)](#) tvrde da *L. monocytogenes* nije sposobna da formira debeo, višeslojni biofilm sa $10^9 - 10^{12}$ CFU/cm², kao što je slučaj kod biofilмова drugih bakterija. Nego, populacija ćelija iznosi $10^4 - 10^7$ CFU/cm². Gustina bakterijskih ćelija u biofilmu igra važnu ulogu prilikom kontaminacije hrane. Naime, broj uzoraka hrane koji mogu biti kontaminirani preko površina koje su kolonizovane biofilmom proporcionalan je gustini bakterijskih ćelija biofilma. Nož od nerđajućeg čelika inokulisan sa *L. monocytogenes* od 10^3 do 10^5 CFU može da kontaminira 5 do 20 narezaka. Povećanjem inokulacije na 10^8 CFU broj kontaminiranih narezaka povećava se na preko 30 ([Vorst i sar., 2006](#)).

Ovo istraživanje pokazuje da su patogene bakterije prenosive hranom sposobne da formiraju biofilmove na materijalima koji su prisutni u pogonima industrije mesa. Oprema i pribor, poput površina za sečenje i noževa, se vremenom habaju. Nastale ogrebotine i pukotine postaju potencionalna mesta za vezivanje bakterija, čak i nakon čišćenja i sanitacije. Za razliku od sveže formiranih biofilмова, zreli biofilmovi su tolerantniji na stesne uslove zbog jake trodimenzionalne strukture koja se sastoji od više slojeva bakterijskih ćelija. Ovakva struktura predstavlja fizičku barijeru koja limitira prodiranje hemijskih sredstava za sanitaciju ([Wang, 2019](#)).

Strategije za prevenciju i kontrolu formiranja biofilмова na površinama koje dolaze u dodir sa hranom jesu inhibicija inicijalne adhezije i kolonizacije površine, ometanje signalnih molekula koji stimulišu rast biofilma i uništavanje EPS ([Francolini i Donelli, 2010](#)). Redukcija i eliminacija mikroorganizama, odnosno kontrola biofilмова, u pogonima za proizvodnju i preradu mesa svodi se na svakodnevnoj primeni dobre higijenske prakse (DHP) i HACCP (eng. *Hazard Analysis Critical Control Point*) principa. Adekvatna procedura čišćenja u pogonima industrije mesa treba da se svodi na šest neophodnih koraka: predčišćenje (mehaničko čišćenje), pranje, ispiranje, sanitacija, završno ispiranje i sušenje ([SafeFood, 2012](#)).

Inhibicija inicijalne adhezije bakterijskih ćelija idealan je pristup prevencije nastanka biofilмова. Međutim, kontrolu već formiranih biofilмова treba izvesti na način da čišćenje razgradi EPS matriks kako bi dezinfekciono sredstvo moglo dospeti do bakterijskih ćelija. U upotrebi su najčešće kisela i bazna dezinfekciona sredstva. Nedostaci primene ovih sredstava jesu moguća toksičnost u vidu dezinfekcionih rezidua, kao i promocija rezistencije patogenih bakterija prenosivih hranom na pomenuta sredstva. Pored toga, negativna percepcija potrošača prema sintetskim hemijskim sredstvima pokrenula je trend potražnje alternativnih, odnosno prirodnih dezinficijenasa. Poslednjih godina antimikrobna dejstva EO i njihovih komponenti, kao ekološki prihvatljiva sredstva, su zaintrigirali istraživače širom sveta ([Giaouris i sar., 2014](#)). Pre dve decenije, [Knowles i Roller \(2001\)](#) bili su prvi autori koji su pokazali biocidno dejstvo karvakrola protiv biofilмова *L. monocytogenes*, *S. enterica* i *S. aureus* na nerđajućem čeliku.

Etarska ulja bogata karvakrolom, origano (81,00%) i vresak (50,45%), značajno su redukovala biofilmove patogenih bakterija prenosivih hranom u ovom istraživanju. Efikasnost ovih ulja i ranije

je povezivana sa visokim sadržajem karvakrola (Soni i sar., 2013; Trevisan i sar., 2018; Cariri i sar., 2019; Lira i sar., 2020). Tačan mehanizam kojim karvakrol inhibira formiranje biofilma nije potpuno rasvetljen. Subletalne koncentracije karvakrola redukuju pokretljivost bakterija ometanjem QS mehanizma među bakterijskim ćelijama i na taj način redukuju njihovu sposobnost za formiranje biofilma (Burt i sar., 2014). Biofilm *S. Typhimurium* redukovan je za od 58,12% do 89,66% delovanjem EO origana u koncentraciji od 0,18 µl/ml do 0,36 µl/ml, što je ekvivalentno 0,018% i 0,036%. U ranijim istraživanjima EO origana u koncentraciji od 0,025% redukovalo je broj bakterijskih ćelija biofilma za 3,6 log CFU tokom 24 h, što bi odgovaralo 48,65%. Povećanjem količine EO origana na 0,05% i 1% biofilm je potpuno redukovan (Soni i sar., 2013). Pri koncentraciji od 0,18 µl/ml do 1,42 µl/ml (od 0,018% do 0,142%) EO origana redukovalo je masu biofilma *L. monocytogenes* od 42,87% do 78,62%. U istraživanju Desai i sar. (2012) primena 0,025% EO origana tokom 24 h nije redukovala biofilm *L. monocytogenes*. Povećanjem EO origana na 0,05% zapažena je redukcija za 3,9 log CFU po udubljenju mikrotitar ploče, što bi odgovaralo 52,70%. Potpuna redukcija mase biofilma postignuta je pri koncentraciji EO origana od 0,5%. U istom istraživanju redukcija od 64,86% biofilma *L. monocytogenes* postignuta je primenom 0,05% EO timijana. S obzirom da se redukcija biomase biofilмова u istraživanju ove doktorske disertacije kretala između 32,61% i 69,25%, a da su se primenjene količine EO timijana kretale između 0,23 µl/ml i 0,89 µl/ml, odnosno 0,023% i 0,089%, može se zaključiti da su rezultati ova dva istraživanja u saglasnosti. Potpuna redukcija biofilma postignuta je primenom 0,25% EO timijana u trajanju od 24 h (Desai i sar., 2012). Etarska ulja origana, timijana i ružmarina efikasno su redukovala biomasu biofilмова izolata *S. Enteritidis* što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Čabarkapa i sar., 2019; Lira i sar., 2020).

Najznačajnija redukcija (90,28%) biomase biofilma postignuta je kod *S. Typhimurium* ST35 primenom 0,36 µl/ml EO vreska. Ranija istraživanja pokazuju da BIC50 (minimalna biofilm inhibitorna koncentracija EO koja pokazuje 50% inhibicije) iznosi 0,113 mg/ml i 0,22 mg/ml za *S. Typhimurium* ATCC 1408 i *S. Typhimurium* LT2 DT104, dok BIC90 (minimalna biofilm inhibitorna koncentracija EO koja pokazuje 90% inhibicije) iznosi 1,15 mg/ml, odnosno 0,85 mg/ml ovog EO (Miladi i sar., 2016).

Etarsko ulje karanfilića se takođe pokazalo efikasno protiv biofilмова ispitanih izolata. Dejstvo ovog ulja pripisuje se njegovoj glavnoj komponenti eugenolu (85,14%). Ranije je postignuta redukcija biomase *Echerichia coli* od 97,45%, odnosno 93,0% kod *Staphylococcus aureus* primenom eugenola (Millezi i sar., 2019).

Saglasno ranijim istraživanjima, EO cimeta uspešno je redukovalo biomasu formiranih biofilмова svih ispitanih izolata *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* (Somrani i sar., 2020). Minimalna koncentracija ovog ulja potrebna za 100% redukciju biomase biofilмова bakterija *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* i *E. coli* iznosi od 0,12 mg/ml do 0,50 mg/ml (Firmino i sar., 2018). Antibiofilmska aktivnost ovog ulja najverovatnije je posledica bogatog sadržaja cinamaldehida (74,93%), koje se pokazalo kao efikasno u borbi protiv biofilma *E. coli* (Kot i sar., 2015).

Rezultati ukazuju na mogućnost penetriranja EO u biofilmove i ubijanje zaštićenih bakterijskih ćelija. Ipak, primenjene MBC vrednosti EO slabije deluju na bakterije koje se nalaze u biofilmu. Veća otpornost bakterija biofilma od slobodnih bakterija zapažena je i ranije (Sandasi i sar., 2008; Jadhav i sar., 2013). Otpornost bakterija u biofilmovima pripisuje se mnogim faktorima. Negativno naelektrisan EPS, koji oblaže bakterijske ćelije, predstavlja fizičku barijeru koja se suprotstavlja penetraciji antimikrobnih agenasa. Pored toga, bakterije koje se nalaze zaštićene u biofilmovima aktiviraju drugačije gene od slobodnih bakterija. Zaštićene bakterije imaju sposobnost inaktivacije antimikrobnih peptida, kao i aktivaciju efluks pumpi koje izbacuju ove agense iz bakterijskih ćelija (Sandasi i sar., 2010; Jadhav i sar., 2013). Zreli biofilmovi su tolerantiji na stresne uslove zbog

jače trodimenzionalne strukture, koja predstavlja fizičku barijeru antimikrobnim agensima (Wang, 2019).

Kod svih ispitanih izolata zapažena je veća redukcija biomase biofilmova inkubiranih na 15 °C u odnosu na 37 °C. Ovo bi se moglo objasniti bržim oporavkom ćelija na optimalnoj temperaturi rasta. Bez sumnje, biofilmovi su dominantan način života bakterija u životnoj sredini i nemoguće je u potpunosti izbeći njihovo formiranje u pogonima industrije mesa. Nove strategije u borbi protiv biofilmova, poput etarskih ulja, treba integrisati u postojeće higijenske procedure, uz adekvatan odabir materijala za izradu opreme i pribora.

Mikrografi SEM pokazuju strukturne promene izazvane delovanjem EO origana i timijana na *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*. Etarska ulja izazvala su povećanje permeabilnosti ćelije i prekid membranskog integriteta svih bakterijskih izolata. U ovom istraživanju uočava se da su Gram negativne bakterije (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*) rezistentnije na delovanje EO origana i timijana od bakterija *L. monocytogenes*. Bakterijske ćelije *L. monocytogenes* su gotovo neprepoznatljive, što može biti posledica razlike u građi. Debeo sloj lipopolisaharida spoljašnje membrane prekriva ćelijski zid Gram negativnih bakterija i štiti ih od hidrofobnih supstanci (Burt, 2004; Kachur i Suntres, 2020), poput EO.

Citoplazmatska membrana bakterija je delikatna i metabolički izuzetno aktivna. S toga, svaka komponenta potencijalno može dovesti do promena u njenoj anatomskej strukturi. Aktivne komponente EO najpre se vezuju za površinu ćelije, a zatim penetrišu do ciljanog mesta, fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane i enzima vezanih za membranu (Shan i sar., 2007).

Fenolna jedinjenja, karvakrol i timol, najzastupljenije komponente EO origana i timijana, sposobna su da integrišu membranu bakterijske ćelije (Lambert i sar., 2001; Hyldgaard i sar., 2012). Nakupljanjem karvakrola ili timola unutar membranskih masnih kiselina nastaje konformaciona promena lipidnog dvosloja prouzrokujući poremećaj normalne membranske funkcije što dovodi do povećanja permeabilnosti membrane. Hidroksilna grupa ovih jedinjenja i prisustvo dvostrukih veza (Memar i sar., 2017) omogućava karvakrolu i timolu da se ponašaju kao razmenjivači protona, dovodeći do redukcije gradijenta kroz citoplazmatsku membranu što za posledicu ima kolaps protonske pumpe, inhibiciju respiratornog lanca i elektronskog prenosa, oksidaciju i promenu pH gradijenta (Zengin i Baysal, 2014; Kachur i Suntres, 2020). Ovo vodi do gubitka ATP-a i drugih ćelijskih komponenti, poput nukleinskih kiselina, ribozoma, lipida, proteina i amino kiselina (Walsh i sar., 2003; Chauhan i Kang, 2014). U istraživanju Chauhan i Kang (2014) zabeležena je povećana koncentracija kalijumovih jona u ekstracelularnoj tečnosti ćelija *S. Typhimurium* tretiranih timolom, čime se uočava jak toksičan efekat ovog jedinjenja.

Uticaj karvakrola i timola na bakterijske ćelije u ovom istraživanju saglasne su sa istraživanjima drugih autora (Lambert i sar., 2001; Al-Kandari i sar., 2019), koji mikrografima SEM beleže promene ćelijske morfologije u vidu gubitka oblika i integriteta, praćenih ćelijskom smrću. Smrt bakterijskih ćelija može biti posledica obimnog gubitka ćelijskog sadržaja ili pokretanja autolitičkih procesa (Zengin i Baysal, 2014).

Inicijalna mikrobiološka populacije usitnjenog mesa svinja namenjenog za ogled kretala se od 4,68 do 5,66 log CFU/g. Broj *Enterobacteriaceae* kretao se između 2,18 i 3,72 log CFU/g, dok je broj *E. coli* bio <1 log CFU/g. Razlike u inicijalnom broju mikroorganizama u usitnjenom mesu svinja mogu biti posledica različitog nivoa higijene procesa proizvodnje (Skandamis i Nychas, 2001), od klanja svinja, preko hlađenja trupova, obrade i usitnjavanja mesa. *Enterobacteriaceae*, koliformne bakterije, *E. coli* i *Staphylococcus* spp. smatraju se glavnim indikatorima higijene svežeg mesa i uslova pod kojima je usitnjeno meso proizvedeno. Broj *Enterobacteriaceae* ukazuje na nivo primenjene higijene, dok je *E. coli* indikator fekalne kontaminacije. *Staphylococcus* spp. je indikator kontaminacije nastale od radnika koji rukuju sa proizvodom. U aerobno skladištenom mesu, od kojeg se proizvodi usitnjeno meso, na temperaturi frižidera dobru sposobnost rasta

poseduje *Pseudomonas* spp. Pored navedenih bakterija u usitnjenom mesu se mogu naći i *Brochothrix thermosphacta*, bakterije mlečne kiseline, H₂S-produkujuće bakterije ([Andritsos i sar., 2012](#)), kao i patogene bakterije *Salmonella* spp., *Listeria* spp. i *Yersinia* spp.

Početna vrednost broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima veštački kontaminiranog usitnjenog mesa svinja u svim fazama ispitivanja bila je u proseku 5,47 log CFU/g čime je zadovoljen kriterijum $m = 5 \times 10^5$ CFU/g (5,70 log CFU/g) Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („[Službeni glasnik RS](#)“, br. 72/2010 i 62/2018). Tokom aerobnog skladištenja usitnjenog mesa svinja na temperaturi od 4 ± 1 °C ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, u svim grupama, rastao je tokom skladištenja, što se uočava i u ranijim istraživanjima ([Fratianni i sar., 2010](#)). Smatra se da je povećanje broja mikroorganizama u usitnjenom mesu preko 7 log CFU/g pokazatelj mikrobiološkog kvara ([Karabagias i sar., 2011](#); [Hussain i sar., 2021](#)). Tokom druge i četvrte faze ogleda, kada je usitnjeno meso svinja veštački kontaminirano izolatima *S. Typhimurium* ST35, odnosno *Y. enterocolitica* Y4/1, broj aerobnih mezofilnih bakterija limit od 7 log CFU/g dostiže već drugog dana ispitivanja, dok pojedini uzorci iz prve i treće faze, kada je usitnjeno meso svinja veštački kontaminirano izolatima *S. Enteritidis* SE53, odnosno *L. monocytogenes* UB2-01-2 (1), ovaj limit prelaze trećeg, odnosno četvrtog dana ispitivanja. Prosečno veća inicijalna populacija mikroorganizama u uzorcima iz druge (5,88 log CFU/g) i četvrte (5,67 log CFU/g) faze, u odnosu na prvu (5,48 log CFU/g) i treću (4,85 log CFU/g), može biti objašnjenje ove pojave.

Inicijalna vrednost *E. coli* u uzorcima usitnjenog mesa svinja u sve četiri faze ispitivanja kretala se između $0,00 \pm 0,00$ log CFU/g i $1,02 \pm 0,86$ log CFU/g. S obzirom da je *E. coli* indikator fekalne kontaminacije ([Andritsos i sar., 2012](#)), ovako nizak nivo *E. coli* može se objasniti poštovanjem dobre higijenske i dobre proizvođačke prakse u proizvodnom pogonu. Bitno je istaći da se broj *E. coli*, tokom skladištenja u trajanju od četiri dana na temperaturi do 4 ± 1 °C, nije značajno povećavao ni u jednoj fazi ispitivanja, kako u kontrolnim grupama, tako ni u grupama usitnjenog mesa svinja sa dodatkom EO origana i timijana. Broj *E. coli* četvrtog dana ispitivanja kretao se od $0,32 \pm 0,50$ do $1,03 \pm 0,86$ log CFU/g. Stabilan broj *E. coli* u usitnjenom mesu svinja zabeležen je i u ranijim istraživanjima ([Danilović i sar., 2021](#)).

Prisustvo bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* smatra se indikatorom higijene procesa proizvodnje svežeg usitnjenog mesa ([Andritsos i sar., 2012](#)). Broj *Enterobacteriaceae*, koji je u proseku inicijalno iznosio 4,89 log CFU/g, 4,56 log CFU/g i 4,95 log CFU/g u prvoj, drugoj i četvrtoj fazi ispitivanja posledica je kontaminacije uzoraka usitnjenog mesa svinja pripadnicima ove familije (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *Y. enterocolitica*). Prosečno znatno manji početni broj (2,18 log CFU/g) *Enterobacteriaceae* zabeležen je u trećoj fazi ispitivanja. Tokom skladištenja broj *Enterobacteriaceae* uglavnom je rastao do nivoa $\leq 3,64$ log CFU/g (u trećoj fazi ispitivanja), $\leq 5,26$ log CFU/g (u drugoj fazi ispitivanja) i $\leq 6,44$ log CFU/g (u četvrtoj fazi ispitivanja).

U prvoj fazi ispitivanja zabeleženo je održavanje broja *Enterobacteriaceae* u uzorcima gde je dodato EO origana. Dodatak EO timijana, u koncentracijama 0,23 µl/ml i 0,46 µl/ml, smanjio je broj *Enterobacteriaceae* za 0,46 log CFU/g, odnosno 0,48 log CFU/g. S obzirom da se u istim uzorcima uočava smanjenje broja *S. Enteritidis* za 0,44 log CFU/g, odnosno 0,55 log CFU/g, opadanje broja *Enterobacteriaceae* je najverovatnije posledica delovanja EO timijana na bakterijske ćelije *S. Enteritidis*.

Prilikom primene EO timijana redukcija broja *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* uočena je od drugog dana ispitivanja do kraja skladištenja. Primenom EO origana redukcija je zapažena kod *L. monocytogenes* od drugog dana ispitivanja i kod *S. Enteritidis* četvrtog dana ispitivanja u odnosu na kontrolnu grupu. Redukcija koja se uočava kod patogenih bakterija *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* odnosi se na razliku broja bakterija u kontrolnim grupama i grupama gde je primenjeno EO. Posmatrajući broj patogenih bakterija tokom skladištenja uočava se njihov rast. S druge strane, u grupama gde je primenjeno EO origana protiv *S. Enteritidis* broj

patogenih bakterija tokom skladištenja ostaje nepromenjen. Ova pojava može da se objasni bakteriostatskim delovanjem primenjenih EO. Baktericidno delovanje EO timijana uočeno je protiv *S. Enteridis* kada je zapažena redukcija inicijalnog broja bakterija $> 0,2 \log \text{CFU/g}$. Ranija istraživanja također beleže antibakterijsko dejstvo EO origana i timijana u usitnjenom mesu (Skandamis i Nychas, 2001; Skandamis i sar., 2002; Solomakos i sar., 2008; Govaris i sar., 2010; Abdollahzadeh i sar., 2014; Zengin i Baysal, 2015; Boskovic i sar., 2017; Hulankova i Borilova, 2020).

Delovanje EO origana i timijana protiv *S. Typhimurium* na modelu usitnjenog mesa nije zapaženo u ovom istraživanju. Izostanak dejstva EO u MIC koncentraciji uočen je i u ranijim istraživanjima (Firouzi i sar., 2007; Barbosa i sar., 2009). Iako *in vitro* istraživanja pokazuju odlična antibakterijska dejstva EO origana i timijana, količine potrebne na modelima hrane obično su veće od organoleptički prihvatljivih (Karabagias i sar., 2011). Mnogi istraživači (Smith-Palmer i sar., 2001; Burt, 2004; Hayouni i sar., 2008; Hulankova i Borilova, 2020; Pateiro i sar., 2021) smatraju da masti, proteini i ugljeni hidrati apsorbiraju EO i ometaju njihove mehanizme delovanja na bakterijske ćelije. Veća dostupnost hranljivih materija u matriksu hrane, u poređenju sa laboratorijskim medijumima, omogućava brži oporavak bakterijskih ćelija (Gill i sar., 2002; Bajpai i sar., 2012), dok niži sadržaj vode u hrani smanjuje antibakterijski efekat EO na bakterijske ćelije (Smith-Palmer i sar., 2001). Dodatno, EO koja se rastvore u lipidnoj fazi matriksa hrane slabije su dostupna za delovanje na bakterije koje se nalaze u vodenoj fazi hrane (Mejlholm i Dalgaard, 2002). Pol i sar. (2001) ističu da prisustvo proteina limitira antibakterijsku aktivnost karvakrola. Pored toga, fizička struktura hrane koja utiče na difuziju EO, takođe smanjuje njihovu antibakterijsku aktivnost (Skandamis i sar., 2000).

Odluku o kupovini mesa potrošači često donose na osnovu boje koja služi kao indikator za svežinu. Boja mesa zavisi od različitih faktora, uključujući vrstu životinja, pol, starost, način ishrane i dr. Optimalna površinska boja svežeg mesa je prilično nestabilna. Sveže meso koje je zaštićeno od uticaja vazduha (npr. u vakuum pakovanju), je jarke crvene boje. Za crvenu boju mesa odgovoran je protein mioglobin. Prilikom vezivanja kiseonika za mioglobin nastaje oksimioglobin i svetlocrvena boja, odnosno metmioglobin koji daje smeđe crvenu boju mesu. Formiranje metmioglobina zavisi od brojnih faktora, između ostalog količine kiseonika, temperature, pH, mikrobiološke populacije prisutne u mesu i dr. Diskoloracija, odnosno promena boje mesa je normalna pojava za sveže meso i posledica je oksidacije (Mancini i Hunt, 2005). Sadržaj metmioglobina je u korelaciji sa oksidacijom lipida tokom skladištenja mesa (Zhang i sar., 2016). Tokom skladištenja mesa normalno je da dođe do oksidacije lipida, proteina i pigmenata. Prilikom oksidacije lipida dolazi do formiranja nepoželjnih isparljivih jedinjenja, poput aldehida, ketona, kiselina i alkohola. Fizičko hemijske promene proteina i amino kiselina tokom oksidacije smanjuju njihovu biološku raspoloživost i svarljivost. Sve navedeno dovodi do smanjenja senzorskih parametara kvaliteta mesa, uključujući diskoloraciju i pojavu mirisa koji ukazuje na kvar (Al-Hijazeen i sar., 2016; Pateiro i sar., 2018). Sveže svinjsko meso gotovo da je bez mirisa. Međutim, duže skladištenje, naročito pod nepovoljnim uslovima, stvara miris koji ukazuje na kvar, prvo kiseo, a potom proteolitički, odnosno miris truleži. Pod određenim uslovima stvara se i užegli miris.

Etarska ulja prepoznata su kao odlična alternativa sintetskim antioksidantima u mesu i proizvodima od mesa. Antioksidativna aktivnost EO posledica je reagovanja fenolnih jedinjenja (karvakrola, eugenola, timola), odnosno njihovih hidroksilnih grupa (-OH) inaktivirajući slobodne radikale nastalih oksidacijom nezasićenih masnih kiselina (Hyltdgaard i sar., 2012). Etarska ulja origana, ruzmarina, timijana, žalfije i karanfilića najčešće se koriste u svrhu produženja roka trajanja mesa i proizvoda od mesa (Pateiro i sar., 2018; Šojić i sar., 2018).

U ovom istraživanju, primenom EO origana i timijana, uočava se duža prihvatljivost boje u odnosu na miris koji ukazuje na kvar, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Skandamis i Nychas, 2001; Boskovic i sar., 2017). Miris koji ukazuje na kvar statistički je manje uočljiv ($p < 0,05$) u

grupama gde su primenjene veće koncentracije EO. Najbolji rezultati postignuti su primenom EO origana u koncentraciji od 0,36 $\mu\text{l/g}$, odnosno EO timijana od 0,36 $\mu\text{l/g}$ do 0,71 $\mu\text{l/g}$. Ovo istraživanje je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima, gde su organoleptičke karakteristike mesa poboljšane tokom skladištenja primenom EO. Govaris i sar. (2010) su dodatkom 0,6% i 0,9% EO origana poboljšali organoleptičke parametre usitnjenog ovčijeg mesa. U istraživanju Al-Hijazeen i sar. (2016) primena > 100 ppm EO origana je poboljšala stabilnost boje sirovog pilećeg mesa i smanjila pojavu mirisa koji ukazuje na kvar. Pregledom literature uočava se da su primenjene koncentracije EO u istraživanjima različite. Primena EO origana u koncentraciji većoj od 0,2% u mesu smatra se prejakom za paneliste u istraživanju Hulankova i sar. (2013), dok je u istraživanju Chouliara i sar. (2007) neprihvatljiva koncentracija EO origana bila 1%. Razlika senzorske prihvatljivosti može biti objašnjena razlikom sastava primenjenog EO, čime se postiže i drugačiji intenzitet arome (Burt, 2004).

Matematički modeli predviđaju rast, preživljavanje ili inaktivaciju mikroorganizama, odnosno odgovor mikrobiološke populacije na faktore sredine u kojoj se nalaze (McMeekin i sar., 2006). Primarni matematički modeli se koriste za izražavanje promene koncentracije mikroorganizama u vremenu upotrebom kinetičkih parametara, poput generacionog vremena i stope rasta ili inaktivacije, koje zajedno opisuju promenu u veličini populacije. Sekundarni modeli izražavaju uticaj parametara sredine, kao što su temperatura, pH i drugi, na kinetičke parametre, dok tercijalni modeli predstavljaju kombinaciju primarnih i sekundarnih modela (Grijnspeerdt i Vanrolleghem, 1999; McMeekin i sar., 2006). Ovakvi matematički modeli čine prediktivnu mikrobiologiju, koja zapravo predstavlja primenu sredstava, odnosno teorije u cilju poboljšanja bezbednosti i kvaliteta hrane (Bevilacqua i sar., 2015).

Napretkom informacionih tehnologija razvijeni su različiti programi za predviđanje promena populacije mikroorganizama, bazirani na prethodnim istraživanjima u mikrobiologiji. Primenom DMFit programa u ovoj doktorskoj disertaciji prikazani su Baranyi i Robertovi modeli uticaja EO origana i timijana na patogene bakterije prenosive hranom *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* u usitnjenom mesu svinja na temperaturi od $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Baranyi i Robertov model predstavlja mehanistički model rasta bakterija. U ovom modelu lag faza, odnosno generaciono vreme, je povezana sa potrebom prilagođavanja bakterijskih ćelija na uslove nove sredine, kada nastaje njihov eksponencijalni rast sve do trenutka restrikcije hranljivih materija. Ovaj model je predstavljen 1990-ih godina. Ipak, njegova intenzivna upotreba usledila je nakon lansiranja programa DMFit od strane Instituta za ispitivanje hrane u Velikoj Britaniji (Institute of Food Research, Norič, Ujedinjeno Kraljevstvo) (McKellar i Lu, 2003) u okviru baze podataka ComBase (www.combase.cc), sa preko 60 000 zapisa. Svaki zapis pokazuje uticaj delovanja određenih kombinacija parametara sredine na bakterijsku populaciju. DMFit program radi na principu unosa podataka broja bakterija i vremena, nakon čega program, prema Baranyi i Robertovom modelu, formira odgovarajuću krivu i daje parametre za određivanje značajnosti primenjenog modela. Parametri zakrivljenosti, $n\text{Curv}$ i $m\text{Curv}$, koji opisuju zakrivljenost sigmoidne krive na početku i na kraju faze rasta bakterija, u programu DMFit iznose 1, odnosno 10. Iako se Baranyi i Robertov model smatra primarnim, DMFit predstavlja sekundarni model (Bevilacqua i sar., 2015).

Bitno je napomenuti da Baranyi i Robertov model formira sopstvene inicijalne vrednosti mikrobiološke populacije, koje su uglavnom nešto niže ili jednake sa inicijalnim vrednostima oglada (Sabike i sar., 2014), što je zabeleženo i u ovom istraživanju.

U uslovima ovog istraživanja, primenom DMFit verzije 3.5, najveća stopa rasta ispitanih izolata zabeležena je u grupi LMMICT ($\mu_{\text{max}} = 0,033851 \log \text{CFU/g/h}$), dok je najniža zabeležena u grupi SE2MICT ($\mu_{\text{max}} = -0,00308 \log \text{CFU/g/h}$). Primena MIC (0,23 $\mu\text{l/g}$) i 2MIC (0,46 $\mu\text{l/g}$) koncentracije EO timijana u modelu usitnjenog mesa svinja izazvalo je smanjenje populacije *S. Enteritidis*, što je prikazano i krivom Baranyi i Robertovog modela, kao i negativnim vrednostima

$\mu_{\max}$. U većini slučajeva Baranyi i Robertovim modelom nisu dobijene lag vrednosti, odnosno vremena prilagođavanja bakterija uslovima sredine, sem kod *L. monocytogenes*, što je zapaženo i u ranijim istraživanjima (Koutsoumanis i sar., 1998; Plaza-Rodríguez i sar., 2015; Ranucci i sar., 2019). Niže vrednosti $\mu_{\max}$ i lag faze su poželjne kod produžetka roka trajanja hrane (Tarlak, 2020).

Tačnost prediktivnog mikrobiološkog modela zavisi od nekoliko parametara. Što su manje vrednosti standardne greške, pouzdanost predviđanja je veća (Grijspeerdt i Vanrolleghem, 1999). U ovom istraživanju vrednosti standardne greške kretale su se između 0,006325 (SEMICO) i 0,234435 (LMMICT), što ukazuje da su primenjeni Baranyi i Robertovi modeli pouzdani u predviđanju ponašanja patogenih bakterija u usitnjenom mesu svinja na 4 ± 1 °C prilikom primene EO origana i timijana. Isto se može zaključiti i posmatranjem koeficijenta determinacije R^2 (Baranyi i Roberts, 1995) koji se kretao između 0,696268 (STMICT) i 0,992184 (LM2MICT).

Ipak, prediktivna mikrobiologija nije tako jednostavna. U *in situ* uslovima, kada postoji interakcija matriksa hrane sa EO i bakterijskim ćelijama, moguća je redukcija uticaja primenjenih EO i sprečavanje oštećenja bakterijskih ćelija (Mazzarrino i sar., 2015), što je uočeno i u ovom istraživanju. S druge strane, dodatni faktori, poput uticaja pH i temperature takođe doprinose navedenom ishodu. S toga, dinamiku populacije mikroorganizama teško je predvideti bez prethodnih istraživanja.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji zaključuje se sledeće:

1. Formirana je kolekcija mikroorganizama od 16 izolata. Izolati *Salmonella* Enteritidis su poreklom iz mesa živine (četiri izolata), *Salmonella* Typhimurium iz usitnjenog oblikovanog mesa (četiri izolata), *Listeria monocytogenes* sa površina u industriji mesa (četiri izolata) i uzorka fermentisane kobasice (jedan izolat) i *Yersinia enterocolitica* iz tonzila svinja (tri izolata).
2. Hemijskim ispitivanjem 18 etarskih ulja utvrđeno je da broj jedinjenja varira, i to najmanje kod etarskog ulja karanfilića (9 jedinjenja), a najviše kod etarskog ulja miloduha (47 jedinjenja). Dominantna jedinjenja su bila zastupljena u više od polovine udela kod sledećih etarskih ulja: vreska (50,45% karvakrol), žalfije (56,41% linalil acetat), bosiljka (69,52% estragol), cimeta (74,93% cinamaldehyd), limuna (79,72% limonen), origana (81,00% karvakrol), karanfilića (85,14% eugenol) i fenela (88,42% anetol).
3. Primenom disk difuzione metode utvrđeno je da su najosetljiviji izolati *Listeria monocytogenes*, dok su najotporniji izolati *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium. Od 18 primenjenih etarskih ulja 17 je inhibitorno delovalo na izolate *Listeria monocytogenes*, 14 na izolate *Yersinia enterocolitica* i po 9 na izolate *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium. Etarska ulja origana i timijana su imala najbolji antimikrobni efekat (najveće zone inhibicije) na ispitane izolate mikroorganizama.
4. Primenom mikrodilucione metode utvrđene su najniže minimalne inhibitorne koncentracije etarskih ulja origana (MIC od 0,04 do 0,71 µl/ml), cimeta (MIC od 0,09 do 0,89 µl/ml), timijana (MIC od 0,12 do 0,89 µl/ml) i vreska (MIC od 0,17 do 1,42 µl/ml) za ispitivane izolate mikroorganizama.
5. Svi ispitivani izolati *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* su pokazali sposobnost formiranja biofilмова na polistirenskoj površini i površini nerđajućeg čelika. Najjači biofilm produceri bili su izolati *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis.
6. Primenom etarskih ulja origana, vreska, cimeta, ruzmarina, karanfilića i timijana, postignuta je redukcija biofilмова ispitanih izolata bakterija u rasponu od 30,93% do 90,28%. Redukcija biomase biofilмова izolata *Salmonella* Enteritidis kretala se u rasponu od 35,65% do 75,97%, *Salmonella* Typhimurium od 30,93% do 90,28%, *Listeria monocytogenes* od 32,61% do 78,62% i *Yersinia enterocolitica* od 45,34% do 78,89%.
7. Skening elektronskom mikroskopijom utvrđene su morfološke promene kod ispitanih izolata bakterija tretiranih etarskim uljima origana i timijana u vidu narušenog ćelijskog integriteta, povećanja permeabilnosti ćelijske membrane, rupture ćelijske membrane, nedovršenog i deformisanog oblika ćelija, kao i liza bakterijskih ćelija.
8. Na modelu usitnjenog mesa svinja:

- a) etarsko ulje origana, u koncentracijama 0,04 µl/g, odnosno 0,08 µl/g, uticalo je na značajno smanjenje broja *Salmonella* Enteritidis za 0,15 log CFU/g, odnosno 0,18 log CFU/g, kao i etarsko ulje timijana, u koncentracijama 0,23 µl/g, odnosno 0,46 µl/g, gde je utvrđeno značajno smanjenje broja za 0,44 log CFU/g, odnosno 0,55 log CFU/g u odnosu na broj *Salmonella* Enteritidis u kontrolnom uzorku;
- b) etarsko ulje origana, u koncentracijama 0,09 µl/g, odnosno 0,18 µl/g, nije uticalo na značajno smanjenje broja *Salmonella* Typhimurium, kao ni etarsko ulje timijana, u koncentracijama 0,23 µl/g odnosno 0,46 µl/g, u odnosu na broj *Salmonella* Typhimurium u kontrolnom uzorku;
- c) etarsko ulje origana, u koncentracijama 0,18 µl/g, odnosno 0,36 µl/g, uticalo je na značajno smanjenje broja *Listeria monocytogenes* za 0,25 log CFU/g, odnosno 0,51 log CFU/g, kao i etarsko ulje timijana, u koncentracijama 0,36 µl/g, odnosno 0,72 µl/g, gde je utvrđeno značajno smanjenje broja za 0,22 log CFU/g, odnosno 0,29 log CFU/g u odnosu na broj *Listeria monocytogenes* u kontrolnom uzorku;
- d) etarsko ulje origana, u koncentracijama 0,09 µl/g, odnosno 0,18 µl/g, nije uticalo na značajno smanjenje broja *Yersinia enterocolitica*, dok je etarsko ulje timijana, u koncentracijama 0,23 µl/g, odnosno 0,46 µl/g, uticalo na značajno smanjenje broja za 0,38 log CFU/g, odnosno 0,64 log CFU/g, u odnosu na broj *Yersinia enterocolitica* u kontrolnom uzorku.

8. LITERATURA

1. Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35 (1), 177 – 183.
2. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
3. Ahmad, M. M., Ur-Rehman, S., Iqbal, Z., Anjum, F. M., & Sultan, J. I. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (2), 319 – 324.
4. Akthar, M. S., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2 (1), 001 – 007.
5. Alatoom, A. A., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., Mandrekar, J., & Patel, R. (2011). Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (8), 2868 – 2873.
6. Alem, G., Mekonnen, Y., Tiruneh, M., & Mulu, A. (2008). *In vitro* antibacterial activity of crude preparation of myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. *Ethiopian Medical Journal*, 46 (1), 63 – 69.
7. Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M., & Bjarnsholt, T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65 (2), 335 – 342.
8. Al-Hijazeen, M., Lee, E. J., Mendonca, A., & Ahn, D. U. (2016). Effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) on the storage stability and quality parameters of ground chicken breast meat. *Antioxidants*, 5 (2), 18, DOI:10.3390/antiox5020018.
9. Al-Kandari, F., Al-Temaimi, R., van Vliet, A. H. M., & Woodward, M. J. (2019). Thymol tolerance in *Escherichia coli* induces morphological, metabolic and genetic changes. *BMC microbiology*, 19, Article number: 294.
10. Al-Mariri, A., & Safi, M. (2014). *In vitro* antibacterial activity of several plant extracts and oils against some Gram-negative bacteria. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 39 (1), 36 – 43.
11. Aljabeili, H. S., Barakat, H., & Abdel-Rahman, H. A. (2018). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*, 9 (5), 433 – 446.
12. Amensour, M., Bouhdid, S., Fernández-López, J., Idaomar, M., Senhaji, N. S., & Abrini, J. (2010). Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Properties*, 13 (6), 1215 – 1224.
13. Anderson, N. W., Buchan, B. W., Riebe, K. M., Parsons, L. N., Gnacinski, S., & Ledebøer, N. A. (2012). Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (3), 1008 – 1013.

14. Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., & Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, 91 (4), 486 – 489.
15. Arnold, J. W., & Bailey, G. W. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*, 79 (12), 1839 – 1845.
16. Asllani, U. (2000). Chemical composition of Albanian myrtle oil (*Myrtus communis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 12 (2), 140 – 142.
17. Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43 (3), 313 – 351.
18. Babu, A. J., Rupa Sundari, A., Indumathi, J., Srujan, R. V. N., & Sravanthi, M. (2011). Study on the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of essential oils of spices. *Veterinary World*, 4 (7), 311 – 316.
19. Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, 45 (2), 722 – 734.
20. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446 – 475.
21. Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304 – 311.
22. Barakat, H. (2014). Composition, antioxidant, antibacterial activities and mode of action of clove (*Syzygium aromaticum* L.) buds essential oil. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 4 (13), 1934 – 1951.
23. Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26 (2), 199 – 218.
24. Barbieri, C., & Borsotto, P. (2018). Essential oils: market and legislation. In: El-Shemy, H. A. *Potential of Essential Oils*, IntechOpen, 107 – 127.
25. Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., & Teixeira, P. (2013). Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*, 2013, Article ID 524975.
26. Barbosa, L. N., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Ushimaru, P. I., da Silva Probst, I., & Fernandes Jr. A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (6), 725 – 728.
27. Barra, A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural Product Communications*, 4 (8), 1147 – 1154.
28. Battistini, R., Rossini, I., Ercolini, C., Gorla, M., Callipo, M. R., Maurella, C., Pavoni, E., Serracca, L. (2019). Antiviral activity of essential oils against hepatitis A virus in soft fruits. *Food and Environmental Virology*, 11, 90 – 95.
29. Bekhechi, C., Watheq Malti, C. E., Boussaïd, M., Achouri, I., Belilet, K., Gibernau, M., Casanova, J., & Tomi, F. (2019). Composition and chemical variability of *Myrtus communis* leaf oil from Northwestern Algeria. *Natural Product Communications*, 14 (5), DOI: 10.1177/1934578X19850030.
30. Bernhardt, B., Sipos, L., Kókai, Z., Gere, A., Szabó, K., Bernáth, J., & Sárosi, S. Z. (2015). Comparison of different *Ocimum basilicum* L. gene bank accessions analyzed by GC-MS and sensory profile. *Industrial Crops and Products*, 67, 498 – 508.
31. Bertuzzi, G., Tirillini, B., Angelini, P., & Venanzoni, R. (2013). Antioxidative action of *Citrus limonum* essential oil on skin. *European Journal of Medicinal Plants*, 3 (1), 1 – 9.

32. Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). A focus on the death kinetics in predictive microbiology: benefits and limits of the most important models and some tools dealing with their application in foods. *Foods*, 4 (4), 565 – 580.
33. Biglia, A., Gemmell, A. J., Foster, H. J., & Evans, J. A. (2018). Temperature and energy performance of domestic cold appliances in households in England. *International Journal of Refrigeration*, 87, 172 – 184.
34. Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, Article ID 3149362.
35. Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., McFall, M. E., King, R. K., & Renter, D. G. (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *Journal of Food Protection*, 70 (5), 1080 – 1087.
36. Böhme, K., Antelo, S. C., Fernández-No, I. C., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2016). Detection of foodborne pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry. In: Barros-Velázquez, J. *Antimicrobial Food Packaging*, Academic Press, 203 – 214.
37. Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., & Aubourg, S. P. (2014). Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications. In: Villa T., Veiga-Crespo P. *Antimicrobial Compounds*, Springer, 51 – 81.
38. Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2010). Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2, 1941 – 1947.
39. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35 (1), 386 – 391.
40. Boskovic, M., Djordjevic, J., Ivanovic, J., Janjic, J., Zdravkovic, N., Glisic, M., Glamoclija, N., Baltic, B., Djordjevic, V., & Baltic, M. (2017). Inhibition of *Salmonella* by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 258, 58 – 67.
41. Bouyahya, A., Abrini, J., Khay, E. O., Charfi, S., Boujida, N., Harsal, A. E., Talbaoui, A., ET-Touys, A., Bakri, Y., & Dakka, N. (2016). *In vitro* antibacterial activity of organic extracts from North-West Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.). *Biotechnology Journal International*, 16 (4), 1 – 9.
42. Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., & Chaabouni, M. M. (2003). Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 380 – 383.
43. Bridier, A., Sanchez-Vizute, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naitali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167 – 178.
44. Brnawi, W. I., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., Kumar-Phillips, G., & Ricke, S. (2019). Antimicrobial activity of leaf and bark cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in broth system and on celery. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, e13888.
45. Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1 – 13.
46. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223 – 253.
47. Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits *quorum sensing* in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE*, 9 (4), e93414.

48. Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gastra, W., Haagsman, H. P., Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4484 – 4490.
49. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 87 (2 – 3), 215 – 220.
50. Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6, 29 – 42.
51. Cariri, M. L., de Melo, A. N. F., Mizzi, L., Ritter, A. C., Tondo, E., de Souza, E. L., Valdramidis, V. & Magnani, M. (2019). Quantitative assessment of tolerance response to stress after exposure to oregano and rosemary essential oils, carvacrol and 1,8-cineole in *Salmonella* Enteritidis 86 and its isogenic deletion mutants Δdps , $\Delta rpoS$ and $\Delta ompR$. *Food Research International*, 122, 679 – 687.
52. Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (1), 1 – 8.
53. Casarin, L. S., Brandelli, A., de Oliveira Casarin, F., Soave, P. A., Wanke, C. H., & Tondo, E. C. (2014). Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 103 – 108.
54. Castelijns, G. A. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28 (1), 51 – 63.
55. Çetin, B., Çakmakçi, S., & Cakmakci, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35, 145 – 154.
56. Cetin, B., Özer, H., Cakir, A., Polat, T., Dursun, A., Mete, E., Öztürk, E., & Ekinci, M. (2010). Antimicrobial activities of essential oil and hexane extract of Florence fennel [*Foeniculum vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell.] against foodborne microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 13 (1), 196 – 204.
57. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. *Phytotherapy Research*, 21, 501 – 506.
58. Chaiyana, W., Anuchapreeda, S., Leelapornpisid, P., Phongpradist, R., Viernstein, H., & Mueller, M. (2017). Development of microemulsion delivery system of essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb. rhizome for improvement of stability and anti-inflammatory activity. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 18 (4), 1332 – 1342.
59. Chalchat, J. C., & Garry, R. P. (1997). Essential oil of angelica roots (*Angelica archangelica* L.): optimization of distillation, location in plant and chemical composition. *Journal of Essential Oil Research*, 9 (3), 311 – 319.
60. Chalchat, J. C., & Özcan, M. M. (2008). Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*, 110 (2), 501 – 503.
61. Chalchat, J. C., Garry, R. P., Michet, A., Benjilali, B., & Chabart, J. L. (1993). Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain, France). *Journal of Essential Oil Research*, 5 (6), 613 – 618.
62. Chauhan, A. K., & Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. *typhimurium* *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an *ex vivo* model. *Research in Microbiology*, 165 (7), 559 – 565.

63. Cheng, R. A., Eade, C. R., & Wiedmann, M. (2019). Embracing diversity: differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article: 1368.
64. Chivandi, E., Dangarembizi, R., Nyakudya, T. T., & Erlwanger, K. H. (2016). Use of essential oils as a preservative of meat. In: Preedy, V. R. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Academic Press, 85 – 91.
65. Chooluck, K., Singh, R. P., Sathirakul, K., & Derendorf, H. (2012). Dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol following topical administration of *Zingiber cassumunar* (plai) oil. *Planta Medica*, 78 (16), 1761 – 1766.
66. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils – present status and future perspectives. *Medicines*, 4 (3), 58, DOI: 10.3390/medicines4030058.
67. Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 24 (6), 607 – 617.
68. CLSI. (2012a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard – Eleventh edition. Document M02-A11, 32 (1), Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
69. CLSI. (2012b). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Ninth edition. Document M07-A9, 32 (2), Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
70. Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2018). Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 94, 140 – 146.
71. Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2017). *Salvia officinalis* L. essential oils from Spain: determination of composition, antioxidant capacity, antienzymatic, and antimicrobial bioactivities. *Chemistry & Biodiversity*, 14, e1700102.
72. Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., & Pezo, L. (2019). Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 35 (3), 361 – 375.
73. Čabarkapa, I., Lević, J., & Đuragić, O. (2013). Biofilm. In Méndez-Vilas, A., *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex Research Center, 42 – 51.
74. Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112 (4), 1072 – 1078.
75. Danilović, B., Đorđević, N., Milićević, B., Šojić, B., Pavlić, B., Tomović, V., & Savić, D. (2021). Application of sage herbal dust essential oils and supercritical fluid extract for the growth control of *Escherichia coli* in minced pork during storage. *LWT – Food Science and Technology*, 141, 110935.
76. D'auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43 (5), 391 – 396.
77. Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*, 503, 1 – 24.
78. De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016). Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, 27 (4), 161 – 169.
79. De Mastro, G., Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G., & Ruta, C. (2017). Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chemistry*, 235, 1 – 6.
80. De Medeiros Barbosa, I., da Costa Medeiros, J. A., de Oliveira, K. A. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2016). Efficacy of the combined application of

- oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food Control*, 59, 468 – 477.
81. De Oliveira, D. C. V., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araújo Júnior, J. P., Silva, N. C. C., & Rall, V. L. M. (2014). Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (6), 478 – 483.
 82. De Oliveira, T. L. C., de Araújo Soares, R., Ramos, E. M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (3), 546 – 555.
 83. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1 – 2), 101 – 109.
 84. Desai, M. A., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., & Silva, J. L. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. *Journal of Food Protection*, 75 (7), 1332 – 1337.
 85. Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (1), 107 – 115.
 86. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3 (4), 25, DOI:10.3390/medicines3040025.
 87. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (6), 1552 – 1561.
 88. Di Marco, N. I., Pungitore, C. R., & Lucero-Estrada, C. S. (2020). Aporphinoid alkaloids inhibit biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* isolated from sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 1029 – 1042.
 89. Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863 – 4870.
 90. Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10 (5), 1040 – 1049.
 91. Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., & Xu, J. G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35 (1), 109 – 116.
 92. Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (12), 4136 – 4146.
 93. Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., & Malorny, B. (2008). Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24), 7767 – 7778.
 94. Dimić, G. R., Kocić-Tanackov, S. D., Pejin, D. J., Pejin, J. D., Tanackov, I. J., & Tuco, D. (2009). Antimicrobial activity of caraway, garlic and oregano extracts against filamentous moulds. *Acta Periodica Technologica*, 40, 9 – 16.

95. Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22 (7), 1046 – 1053.
96. Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6), 2950 – 2958.
97. Dmitrić, M. P. (2018). Detekcija salmonela vrsta i karakterizacija *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium poreklom iz lanca hrane. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
98. Dmitrić, M., Vidanović, D., Matović, K., Šekler, M., Šarić, L., Arsić, M., & Karabasil, N. (2018). In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV A and TTR genes of *Salmonella* spp. in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (2), e13455.
99. Dobre, A. A., Gagi, V., & Petru, N. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (6), 119 – 125.
100. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881 – 890.
101. Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT – Food Science and Technology*, 44 (9), 1908 – 1914.
102. Dosoky, N. S., Satyal, P., Barata, L. M., da Silva, J. K. R., & Setzer, W. N. (2019). Volatiles of Black Pepper Fruits (*Piper nigrum* L.). *Molecules*, 24 (23), 4244, DOI: 10.3390/molecules24234244.
103. Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Tosi, G., Massi, P., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2019). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils against *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium strains isolated from poultry. *Molecules*, 24 (5), 900, DOI: 10.3390/molecules24050900.
104. EFSA & ECDC. (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17 (12), 5926.
105. EFSA & ECDC. (2021). The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal*, 19 (2), 6406.
106. EFSA. (2014). Update of the technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC. *EFSA Journal*, 12 (3), 3598.
107. El Euch, S. K., Hassine, D. B., Cazaux, S., Bouzouita, N., & Bouajila, J. (2019). *Salvia officinalis* essential oil: chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *South African Journal of Botany*, 120, 253 – 260.
108. Elbehiry, A., Marzouk, E., Hamada, M., Al-Dubaib, M., Alyamani, E., Moussa, I. M., AlRowaidhan, A., & Hemeg, H. A. (2017). Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products. *New Microbiologica*, 40 (4), 269 – 278.
109. Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64 (7), 1019 – 1024.
110. Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J., & da Silva Malheiros, P. (2017). Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 252, 18 – 23.

111. Evangelopoulou, G., Solomakos, N., Ioannidis, A., Pexara, A., & Burriel, A. R. (2019). A comparative study of the antimicrobial activity of oregano, rosemary and thyme essential oils against *Salmonella* spp. *Biomedical Research and Clinical Practice*, 4, 1 – 7.
112. Fadil, M., Fikri-Benbrahim, K., Rachiq, S., Ihssane, B., Lebrazi, S., Chraibi, M., Haloui, T., & Farah, A. (2018). Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 126, 211 – 220.
113. Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In: Mendez-Vilas, A. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex Research Center, 2, 1143 – 1156.
114. FDA. (2021). Substances generally recognized as safe. Essential oils, oleoresins (solvent free), and natural extractives (including distillates). Code of Federal Regulations, 3, 21CFR182.20.
115. Firmino, D. F., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Firmino, N. C. S., Rosa, L. D., de Carvalho, M. G., & Catunda Jr, F. E. A. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of *Cinnamomum* Sp. essential oil and cinnamaldehyde: antimicrobial activities. *The Scientific World Journal*, 2018, ID 7405736.
116. Firouzi, R., Shekarforoush, S. S., Nazer, A. H. K., Borumand, Z., & Jooyandeh, A. R. (2007). Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *Journal of Food Protection*, 70 (11), 2626 – 2630.
117. Flechas, M. C., Ocazonez, R. E., & Stashenko, E. E. (2018). Evaluation of *in vitro* antiviral activity of essential oil compounds against dengue virus. *Pharmacognosy Journal*, 10 (1), 55 – 59.
118. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9), 563 – 575.
119. Folkesson, A., Advani, A., Sukupolvi, S., Pfeifer, J. D., Normark, S., & Löfdahl, S. (1999). Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Molecular Microbiology*, 33 (3), 612 – 622.
120. Forshell, L. P., & Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientifique et Technique*. 25 (2), 541 – 554.
121. Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59 (3), 227 – 238.
122. Fraternali, D., Flamini, G., & Ricci, D. (2014). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Angelica archangelica* L. (*Apiaceae*) roots. *Journal of Medicinal Food*, 17 (9), 1043 – 1047.
123. Fratianni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75 (8), 528 – 535.
124. Fredriksson-Ahomaa, M. (2017). *Yersinia enterocolitica*. In: Dodd, C. E. R. *Foodborne Diseases*. Academic Press, 223 – 233.
125. Fredriksson-Ahomaa, M., Joutsen, S., & Laukkanen-Ninios, R. (2018). Identification of *Yersinia* at the species and subspecies levels is challenging. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 135 – 142.
126. Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65 (10), 1545 – 1560.

127. Gaio, I., Saggiorato, A. G., Treichel, H., Cichoski, A. J., Astolfi, V., Cardoso, R. I., Toniazzo, G., Valduga, E., Paroul, N., & Cansian, R. L. (2015). Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10, 323 – 329.
128. Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J., & Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 898.
129. Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5, Article 391.
130. Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (1), 1 – 15.
131. Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120 – 1130.
132. Garg, S. N., Naqvi, A. A., Singh, A., Ram, G., & Kumar, S. (1999). Composition of essential oil from an annual crop of *Hyssopus officinalis* grown in Indian plains. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 170 – 172.
133. Gast, R. K., & Porter Jr, R. E. (2020). *Salmonella* infections. In: Swayne, D. E. *Diseases of poultry*, John Wiley & Sons, 719 – 753.
134. Gende, L. B., Floris, I., Fritz, R., & Eguaras, M. J. (2008). Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bulletin of Insectology*, 61 (1), 1 – 4.
135. Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Microbiology*, 3 (10), 638 – 648.
136. Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT – Food Science and Technology*, 66, 332 – 339.
137. Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F.J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: a review. *Food Research International*, 113, 245 – 262.
138. Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., & Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97 (3), 298 – 309.
139. Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73 (1), 83 – 92.
140. Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116 (4), 982 – 989.
141. Gould, L. H., Walsh, K. A., Vieira, A. R., Herman, K., Williams, I. T., Hall, A. J., & Cole, D. (2013). Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1998 – 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries*, 62 (2), 1 – 34.
142. Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., & Chatzopoulou, P. S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (2 – 3), 175 – 180.

143. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18 (10), 1165 – 1171.
144. Griffin, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (2), 249 – 255.
145. Grigore, A., Paraschiv, I. N. A., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., & Ichim, M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (4), 5436 – 5443.
146. Grijspeerdt, K., & Vanrolleghem, P. (1999). Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, 16 (6), 593 – 605.
147. Gündüz, G. T., Gönül, Ş. A., & Karapinar, M. (2009). Efficacy of myrtle oil against *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (2), 147 – 150.
148. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (1), 91 – 97.
149. Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (1), 1 – 7.
150. Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., & Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (3), 242 – 251.
151. Henna, A., Nemmiche, S., Dandlen, S., & Miguel, M. G. (2019). *Myrtus communis* essential oils: insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 31 (6), 487 – 545.
152. Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (2 – 3), 145 – 153.
153. Hoque, M. M., Bari, M. L., Juneja, V. K., & Kawamoto, S. (2008). Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Report of National Food Research Institute*, 72, 9 – 21.
154. Hsouna, A. B., Dhibi, S., Dhifi, W., Mnif, W., Nasr, H., B., & Hfaiedh, N. (2019). Chemical composition and hepatoprotective effect of essential oil from *Myrtus communis* L. flowers against CCL₄-induced acute hepatotoxicity in rats. *RSC Advances*, 9, 3777 – 3787.
155. Hulánková, R., & Bořilová, G. (2011). *In vitro* combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Acta Veterinaria Brno*, 80, 343 – 348.
156. Hulankova, R., & Borilova, G. (2020). Modeling dependence of growth inhibition of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* by oregano or thyme essential oils on the chemical composition of minced pork. *Journal of Food Safety*, 40, e12818.
157. Hulankova, R., Borilova, G., & Steinhauserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Science*, 95 (2), 190 – 194.
158. Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108 (3), 986 – 995.
159. Hussain, Z., Li, X., Zhang, D., Hou, C., Ijaz, M., Bai, Y., Xiao, X. & Zheng, X. (2021). Influence of adding cinnamon bark oil on meat quality of ground lamb during storage at 4 °C. *Meat Science*, 171, 108269.

160. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 12.
161. Ikebe, T., Iyoda, S., & Kutsukake, K. (1999). Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 145, 1389 – 1396.
162. Inouye, S., Uchida, K., & Abe, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12 (4), 210 – 216.
163. IZJZS. (2018). Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2017. godinu. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”.
164. IZJZS. (2019). Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2018. godinu. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”.
165. IZJZS. (2020). Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2019. godinu. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”.
166. Jadhav, S. R., Shah, R. M., Karpe, A. V., Morrison, P. D., Kouremenos, K., Beale, D. J., & Palombo, E. A. (2018). Detection of foodborne pathogens using proteomics and metabolomics-based approaches. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 3132.
167. Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, 29 (1), 125 – 130.
168. Jamshidi, R., Afzali, Z., & Afzali, D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5 (1), 78 – 81.
169. Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2000). Chemical composition of the flower oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 4294 – 4295.
170. Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J., & Sakariah, K. K. (2002). Chemical composition of volatile oil from *Cinnamomum zeylanicum* buds. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57 (11 – 12), 990 – 993.
171. Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 34 (2), 96 – 108.
172. Jelačić, S. Ć., Beatović, D. V., Prodanović, S. A., Tasić, S. R., Moravčević, Đ. Ž., Vujošević, A. M., & Vučković, S. M. (2011). Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum* L. *Lamiaceae*). *Hemijska Industrija*, 65 (4), 465 – 471.
173. Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et Technique*, 25 (2), 571 – 580.
174. Jianu, C., Golet, I., Misca, C., Jianu, A. M., Pop, G., & Gruia, A. T. (2016). Antimicrobial properties and chemical composition of essential oils isolated from six medicinal plants grown in Romania against foodborne pathogens. *Revista de Chimie*, 67 (6), 1056 – 1061.
175. Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (18), 3042 – 3053.
176. Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165 (3), 259 – 264.
177. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10), 813 – 829.
178. Kang, L., Li, N., Li, P., Zhou, Y., Gao, S., Gao, H., Yin, W., & Wang, J. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry provides high accuracy in identification of *Salmonella* at species level but is limited to type or subtype *Salmonella* serovars. *European Journal of Mass Spectrometry*, 23 (2), 70 – 82.
179. Kapoor, I. P. S., Singh, B., Singh, G., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2009). Chemistry and *in vitro* antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of

- black pepper (*Piper nigrum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (12), 5358 – 5364.
180. Karabagias, I., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. Meat Science, 88 (1), 109 – 116.
181. Karatzas, A. K., Kets, E. P. W., Smid, E. J., & Bennik, M. H. J. (2001). The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Applied Microbiology, 90, 463 – 469.
182. Kaszoni-Rückerl, I., Mustedanagic, A., Muri-Klinger, S., Brugger, K., Wagner, K. H., Wagner, M., & Stessl, B. (2020). Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. Microorganisms, 8 (2), 234, DOI:10.3390/microorganisms8020234.
183. Kizil, S., Haşimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., & Karataş, H. (2010). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38 (3), 99 – 103.
184. Knowles, J., & Roller, S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. Journal of Food Protection, 64 (10), 1542 – 1548.
185. Kocić-Tanackov, S. D., Dimić, G. R., Mojović, Lj. V., Pejin, J. D., & Tanackov, I. J. (2014). Effect of caraway, basil, and oregano extracts and their binary mixtures on fungi in growth medium and on shredded cabbage. LWT – Food Science and Technology, 59 (1), 426 – 432.
186. Kocić-Tanackov, S. D., Dimić, G. R., Tanackov, I. J., Pejin, D. J., Mojović, Lj. V., & Pejin, J. D. (2012). Antifungal activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. Hemijska Industrija, 66 (1), 33 – 41.
187. Kocić-Tanackov, S., Blagojev, N., Suturović, I., Dimić, G., Pejin, J., Tomović, V., Šojić, B., Savanović, J., Kravić, S., Karabasil, N. (2017). Antibacterial activity essential oils against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Safety and Food Quality (Archiv für Lebensmittelhygiene), 68 (4), 88 – 95.
188. Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Đerić, N., Mojović, Lj., Tomović, V., Šojić, B., Đukić-Vuković, A., Pejin, J. (2020). Growth control of molds isolated from smoked fermented sausages using basil and caraway essential oils, *in vitro* and *in vivo*. LWT – Food Science and Technology, 123, 109095.
189. Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Lević, J., Tanackov, I., & Tuco, D. (2011). Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. African Journal of Biotechnology, 10 (50), 10188 – 10195.
190. Kokkalou, E., Kokkini, S., & Handidou, E. (1992). Volatile constituents of *Achillea millefolium* in relation to their infraspecific variation. Biochemical Systematics and Ecology, 20 (7), 664 – 670.
191. Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., & Gruzewska, A. (2015). Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, *p*-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. Turkish Journal of Medical Sciences, 45, 919 – 924.
192. Kothary, M. H., & Babu, U. S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. Journal of Food Safety, 21, 49 – 73.
193. Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., Taoukis, P. S., & Nychas, G. J. (1998). Modelling the effect of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil on the death/survival of *Salmonella* Enteritidis in homemade taramasalad. Acta Horticulturae, 476, 171 – 178.
194. Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. Frontiers in Microbiology, 8, Article 108.
195. Kureljušić, J. M. (2017). Fenotipizacija, genotipizacija i osetljivost na antimikrobne lekove *Salmonella* spp. izolovanih sa trupova zaklanih svinja. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.

196. Kustrak, D., Kuftinec, J., Blazevic, N., & Maffei, M. (1996). Comparison of the essential oil composition of two subspecies of *Satureja montana*. *Journal of Essential Oil Research*, 8 (1), 7 – 13.
197. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453 – 462.
198. Laukkanen-Ninios, R., Fredriksson-Ahomaa, M., & Korkeala, H. (2014). Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: challenges for control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 1165 – 1191.
199. Lee, S., Najiah, M., Wendy, W., & Nadirah, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*, 3, 332 – 336.
200. Lemon, K. P., Freitag, N. E., & Kolter, R. (2010). The virulence regulator *PrfA* promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 192 (15), 3969 – 3976.
201. Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189 (12), 4418 – 4424.
202. Lenchenko, E., Lozovoy, D., Strizhakov, A., Vatnikov, Y., Byakhova, V., Kulikov, E., Sturov, N., Kuznetsov, V., Avdotin, V., & Grishin, V. (2019). Features of formation of *Yersinia enterocolitica* biofilms. *Veterinary World*, 12 (1), 136 – 140.
203. Leonardi, M., Ambryszewska, K. E., Melai, B., Flamini, G., Cioni, P. L., Parri, F., & Pistelli, L. (2013). Essential oil composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba island (Tuscany, Italy). *Chemistry & Biodiversity*, 10, 343 – 355.
204. Li, Y. X., Zhang, C., Pan, S., Chen, L., Liu, M., Yang, K., Zeng, X., & Tian, J. (2020). Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black and white pepper (*Piper nigrum* L.) in five provinces of southern China. *LWT – Food Science and Technology*, 117, 108644.
205. Lira, M. C., Rodrigues, J. B., Almeida, E. T. C., Ritter, A. C., Tondo, E., Torres, S. M., Schaffner, D., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2020). Efficacy of oregano and rosemary essential oils to affect morphology and membrane functions of noncultivable sessile cells of *Salmonella* Enteritidis 86 in biofilms formed on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 376 – 386.
206. Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645 – 659.
207. Liu, Y., Qin, R., Zaat, S. A. J., Breukink, E., & Heger, M. (2015). Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*, 1 (3), 140 – 167.
208. Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6939 – 6946.
209. López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11), 4348 – 4356.
210. LPSN. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/> (pristupljeno 13.05.2020.)
211. Lundén, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63 (9), 1204 – 1207.

212. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44 (9), 3057 – 3064.
213. Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm formation by shiga toxin-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, 7 (4), 95, DOI: 10.3390/microorganisms7040095.
214. Maggio, A., Loizzo, M. R., Riccobono, L., Bruno, M., Tenuta, M. C., Leporini, M., Falco, T., Leto, C., Tuttolomondo, T., Cammalleri, I., & La Bella, S., Tundis, R. (2019). Comparative chemical composition and bioactivity of leaves essential oils from nine Sicilian accessions of *Myrtus communis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 31 (6), 546 – 555.
215. Mahmoud, B. S. M. (2012). *Salmonella* – a dangerous foodborne pathogen. Intech, Croatia.
216. Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (6), 882 – 889.
217. Maksimov, O. (2017). Thyme *Thymus vulgaris* L. thymol CT essential oil as natural preservative. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5 (2), 19 – 22.
218. Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71 (1), 100 – 121.
219. Mangmee, S., Reamtong, O., Kalambaheti, T., Roytrakul, S., & Sonthayanon, P. (2020). MALDI-TOF mass spectrometry typing for predominant serovars of non-typhoidal *Salmonella* in a Thai broiler industry. *Food Control*, 113, 107188.
220. Mani-Lopez, E., Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2018). Principles of sensory evaluation in foods containing essential oil. In: Hashemi, S. M. B., Khaneghah, A. M., de Souza Sant'Ana, A. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*, John Wiley & Sons Ltd., 293 – 325.
221. Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1994). Effects of variety and ontogenic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Essential Oil Research*, 6 (1), 57 – 62.
222. Marques, S. C., Rezende, J. D. G. O. S., Alves, L. A. D. F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R. D., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (3), 538 – 543.
223. Maurischat, S., Baumann, B., Martin, A., & Malorny, B. (2015). Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4, [5], 12: i: – by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 8 – 14.
224. Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D., & Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794 – 803.
225. Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A., & Siciliano, R. A. (2006). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 1180 – 1189.
226. McKellar, R. C., & Lu, X. (2003). Modeling microbial responses in food. CRC press.
227. McMeekin, T. A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S. & Zwietering, M. H. (2006). Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, 112 (3), 181 – 194.
228. Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27 – 31.

229. Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Akbari, A. M., & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28 (2), 63 – 68.
230. Mendoza-Yepes, M. J., Sanchez-Hidalgo, L. E., Maertens, G., & Marin-Iniesta, F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, 47 – 55.
231. Menon, A. N., & Padmakumari, K. P. (2005). Studies on essential oil composition of cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) – V. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (2), 153 – 155.
232. Menon, A. N., Padmakumari, K. P., & Jayalekshmy, A. (2003). Essential oil composition of four major cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) III. *Journal of Essential Oil Research*, 15 (3), 155 – 157.
233. Menon, A. N., Padmakumari, K. P., Jayalekshmy, A., Gopalakrishnan, M., & Narayanan, C. S. (2000). Essential oil composition of four popular Indian cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 12 (4), 431 – 434.
234. Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella* spp. strains. *Journal of Chemistry*, 2013, ID 275698.
235. Miladi, H., Mili, D., Slama, R. B., Zouari, S., Ammar, E., & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22 – 31.
236. Milanov, D. S., Velhner, M. J., Karabasil, N. R., Čabarkapa, I. S., & Suvajdžić, Lj. Đ. (2015). Epidemiological significance of *Salmonella enterica* serovar Montevideo and the potential role of feed for their entry into the food chain. *Food and Feed Research*, 42 (2), 155 – 162.
237. Milanov, D., Bugarski, D., Petrović, J., & Rackov, O. (2010). Primena testa na mikrotitracionim pločama i mikroskopskih tehnika u ispitivanju sposobnosti nekih bakterijskih vrsta izolovanih od životinja da formiraju biofilm. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 3 (1), 23 – 37.
238. Millezi, A. F., Costa, K. A. D., Oliveira, J. M., Lopes, S. P., Pereira, M. O., & Piccoli, R. H. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. *Ciência Rural*, 49 (1), e20180314.
239. Mimica-Dukić, N., Kujundžić, S., Soković, M., & Couladis, M. (2003). Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytotherapy Research*, 17 (4), 368 – 371.
240. Mirjalili, M. H., Salehi, P., Vala, M. M., & Ghorbanpour, M. (2019). The effect of drying methods on yield and chemical constituents of the essential oil in *Lavandula angustifolia* Mill. (*Lamiaceae*). *Plant Physiology Reports*, 24, 96 – 103.
241. Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2 (4), 403 – 416.
242. Mitić, V., & Đorđević, S. (2000). Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia. *Facta Universitatis*, 2 (2), 105 – 108.
243. Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: Grumezescu, A. M., Holban, A. M. *Soft chemistry and food fermentation*. Academic Press, 379 – 419.
244. Moraes, J. O., Cruz, E. A., Souza, E. G. F., Oliveira, T. C. M., Alvarenga, V. O., Peña, W. E. L., Sant'Ana, A. S., & Magnani, M. (2018). Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 90 – 100.

245. Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1 (2), 107 – 121.
246. Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26 (1), 34 – 40.
247. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6 (12), 1451 – 1474.
248. Nivinskienė, O., Butkienė, R., & Mockutė, D. (2005). Chemical composition of seed (fruit) essential oils of *Angelica archangelica* L. growing wild in Lithuania. *Chemija*, 16 (3 – 4), 51 – 54.
249. Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., & Iino, T. (1990). Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics MGG*, 221, 139 – 147.
250. Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Abu Ghoush, M. H., Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., & Holley, R. A. (2019). Inhibitory effects of cinnamon and thyme essential oils against *Salmonella* spp. in hummus (chickpea dip). *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, e13925.
251. Ommen, P., Zobek, N., & Meyer, R. L. (2017). Quantification of biofilm biomass by staining: non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *Journal of Microbiological Methods*, 141, 87 – 89.
252. Orhan-Yanikan, E., da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A. I., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. *Food Control*, 101, 29 – 38.
253. Orth, M., Czygan, F. C., & Dedkov, V. P. (1999). Variation in essential oil composition and chiral monoterpenes of *Achillea millefolium* s.l. from Kaliningrad. *Journal of Essential Oil Research*, 11 (6), 681 – 687.
254. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73 (2), 236 – 244.
255. Özek, T., Demirci, B., & Baser, K. H. C. (2000). Chemical composition of Turkish myrtle oil. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (5), 541 – 544.
256. Ozogul, Y., Kuley, E., Uçar, Y., & Ozogul, F. (2015). Antimicrobial impacts of essential oils on food borne-pathogens. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 7 (1), 53 – 61.
257. Pan, K., Chen, H., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2014). Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (7), 1649 – 1657.
258. Pandit, V. A., & Shelef, L. A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology*, 11 (1), 57 – 63.
259. Paranagama, P. A., Wimalasena, S., Jayatilake, G. S., Jayawardena, A. L., Senanayake, U. M., & Mubarak, A. M. (2001). A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blum) grown in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 29 (3 – 4), 147 – 153.
260. Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant'Ana, A. S., Khaneghah, A. M., Gavahian, M., Gómez, B., & Lorenzo, J. M. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: a review. *Food Research International*, 113, 156 – 166.
261. Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Sant'Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., & Lorenzo, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108966.
262. Pavlović, M., Huber, I., Konrad, R., & Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7, 135 – 141.

263. Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 2 (1), 47 – 50.
264. Pino, J. A., Rosado, A., & Fuentes, V. (1998). Chemical composition of the leaf oil of *Achillea millefolium* L. grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 10 (4), 427 – 428.
265. Piras, F., Fois, F., Consolati, S. G., Mazza, R., & Mazzette, R. (2015). Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 78 (10), 1875 – 1878.
266. Pirbalouti, A. G., Mirbagheri, H., Hamed, B., & Rahimi, E. (2014). Antibacterial activity of the essential oils of myrtle leaves against *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 505 – 509.
267. Pithayanukul, P., Tubprasert, J., & Wuthi-Udomlert, M. (2007). *In vitro* antimicrobial activity of *Zingiber cassumunar* (Plai) oil and a 5% Plai oil gel. *Phytotherapy Research*, 21 (2), 164 – 169.
268. Plaza-Rodríguez, C., Thoens, C., Falenski, A., Weiser, A. A., Appel, B., Kaesbohrer, A., & Filter, M. (2015). A strategy to establish food safety model repositories. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 81 – 90.
269. Plitnick, J., Chevance, F. F., Stringer, A., Hughes, K. T., & Wade, J. T. (2021). Regulatory cross talk between motility and interbacterial communication in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 203 (4), e00510-20.
270. Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., & Smid, E. J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64 (7), 1012 – 1018.
271. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT – Food Science and Technology*, 36 (7), 679 – 684.
272. Pongprayoon, U., Soontornsaratune, P., Jarikasem, S., Sematong, T., Wasuwat, S., & Claeson, P. (1997). Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: The essential oil. *Phytomedicine*, 3 (4), 319 – 322.
273. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, Article 39.
274. Prakathagomol, W., Sirithunyalug, J., & Okonogi, S. (2012). Comparison of antibacterial activity against food-borne bacteria of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Zingiber cassumunar*. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 11 (2), 177 – 186.
275. Prashar, A., Locke, I. C., & Evans, C. S. (2006). Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 39 (4), 241 – 248.
276. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Službeni glasnik RS“, br. 72/2010 i 62/2018).
277. Pravilnik o veterinarsko-sanitarnim uslovima, odnosno opštim i posebnim uslovima za higijenu hrane životinjskog porekla, kao i o uslovima higijene hrane životinjskog porekla („Službeni glasnik RS“, br. 25/2011 i 27/2014).
278. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa („Službeni glasnik RS“, br. 50/2019).
279. Prunić, B. Z. (2017). Ispitivanje mogućnosti formiranja biofilmova u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeteta *Salmonella* vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
280. Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., Son, R. (2011). *Salmonella*: a foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18 (2), 465 – 473.

281. Puškárová, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D., & Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7, Article 8211.
282. Radünz, M., da Trindade, M. L. M., Camargo, T. M., Radünz, A. L., Borges, C. D., Gandra, E. A., & Helbig, E. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food chemistry*, 276, 180 – 186.
283. Raeisi, M., Tajik, H., Aminzare, M., Sangin Abadi, S., Yarahmadi, A., Yarahmadi, E., & Tepe, B. (2016). The role of nisin, monolaurin, and EDTA in antibacterial effect of *Rosmarinus officinalis* L. and *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oils on foodborne pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19 (7), 1709 – 1720.
284. Ranucci, D., Roila, R., Andoni, E., Braconi, P., & Branciari, R. (2019). *Punica granatum* and *Citrus* spp. extract mix affects spoilage microorganisms growth rate in vacuum-packaged cooked sausages made from pork meat, emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schübler), almond (*Prunus dulcis* Mill.) and hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Foods*, 8 (12), 664, DOI:10.3390/foods8120664.
285. Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 365 – 387.
286. Reis, R. O. D., Souza, M. N., Cecconi, M. C. P., Timm, L., Ikuta, N., Simon, D., Wolf, J. M., & Lunge, V. R. (2018). Increasing prevalence and dissemination of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22 (5), 424 – 432.
287. Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36 (5), 347 – 355.
288. Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Ochoa-Velasco, C. E., Palou, E., López-Malo, A., & Ávila-Sosa, R. (2020). Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (10), 1641 – 1650.
289. Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 132 – 140.
290. Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2207 – 2217.
291. Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (14), 4491 – 4497.
292. Riley, L. W. (2020). Extraintestinal foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 275 – 294.
293. Rios, J. L. (2016). Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: Preedy, V. R. *Essential oils in food preservation, flavor and Safety*. Academic Press, 3 – 10.
294. Rodriguez, A., Autio, W. R., & McLandsborough, L. A. (2008). Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. *Journal of Food Protection*, 71 (1), 170 – 175.
295. Rohloff, J., Skagen, E. B., Steen, A. H., & Iversen, T. H. (2000). Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 6205 – 6209.
296. Rota, C., Carraminana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67 (6), 1252 – 1256.

297. Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19 (7), 681 – 687.
298. Rusenova, N., & Parvanov, P. (2009). Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, 7 (1), 37 – 43.
299. Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfino, S., Cardile, V., Rosselli, S., & Bruno, M. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42 – 47.
300. Ryzhov, V., & Fenselau, C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical Chemistry*, 73 (4), 746 – 750.
301. Sabike, I. I., Fujikawa, H., Edris, A. M., Ibrahim, H. M., & Hasanin, F. S. (2014) Evaluation of predicting performances of extended logistic model and Baranyi model for the growth of *Salmonella* Enteritidis in minced beef. *Benha Veterinary Medical Journal*, 27 (2), 91 – 103.
302. Safefood. (2012). Whitepaper. Cleaning and disinfection in food processing operations. Safefood 360, Inc.
303. Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (3), 429 – 438.
304. Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19 (11), 1070 – 1075.
305. Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2010). The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50 (1), 30 – 35.
306. Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V., & Suppakul, P. (2012). Antimicrobial Activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. *Packaging Technology and Science*, 25 (1), 7 – 17.
307. Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 56 – 66.
308. Schillaci, D., Arizza, V., Dayton, T., Camarda, L., & Stefano, V. D. (2008). *In vitro* anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (5), 433 – 438.
309. Schlisselberg, D. B., & Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35 (1), 65 – 72.
310. Semeniuc, C. A., Pop, C. R., & Rotar, A. M. (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2), 403 – 408.
311. Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14), 5484 – 5490.
312. Shmeit, Y. H., Fernandez, E., Novy, P., Kloucek, P., Orosz, M., & Kokoska, L. (2020). Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. *Scientia Horticulturae*, 263, 109095.
313. Simionato, I., Domingues, F. C., Nerín, C., & Silva, F. (2019). Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanospheres and their potential use for antimicrobial food packaging. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110647.
314. Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011 – 1022.

315. Skandamis, P., Tsigarida, E., & Nychas, G. J. E. (2000). Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 31 – 35.
316. Skandamis, P., Tsigarida, E., & Nychas, G. J. E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19 (1), 97 – 103.
317. Skočibuašić, M., Bezić, N. (2004). Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. essential oils produced during ontogenesis. *Journal of Essential Oil Research*, 16 (4), 387 – 391.
318. Smith, R. L., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Goodman, J. I., Marnett, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M., Hall, R. L., Higley, N. A., Lucas-Gavin, C., Adams, T. B. (2005). A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (3), 345 – 363.
319. Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (2), 118 – 122.
320. Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18 (4), 463 – 470.
321. Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15 (11), 7532 – 7546.
322. Soković, M., Marin, P., Vukojević, J., Ristic, M., Glamočlija, J., & Ćirić, A. (2008). Chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. essential oil and its antifungal activity. *Zbornik radova*, 26 (27), 41 – 50.
323. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25 (1), 120 – 127.
324. Somrani, M., Inglés, M. C., Debbabi, H., Abidi, F., & Palop, A. (2020). Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against *Listeria monocytogenes*. *Foods*, 9 (5), 567, DOI: 10.3390/foods9050567.
325. Soni, K. A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Silva, J. L., Mikel, B., & Bailey, R. H. (2013). Inhibition and inactivation of *Salmonella Typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *Journal of Food Protection*, 76 (2), 205 – 212.
326. Soyly, S., Soyly, E. M., & Evrendilek, G. A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) and dill (*Anethum graveolens* L.) against the growth of food-borne and seed-borne pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 21 (3), 345 – 355.
327. Sparbier, K., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M. (2012). Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 767 – 773.
328. Srivastava, A. K., Srivastava, S. K., & Syamsundar, K. V. (2005). Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 20 (1), 51 – 53.
329. SRPS EN ISO 10273. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje patogene *Yersinia enterocolitica*.
330. SRPS EN ISO 11290-1. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp. – Deo 1: Metoda otkrivanja.

331. SRPS EN ISO 11290-2. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp. – Deo 2: Metoda određivanja broja.
332. SRPS EN ISO 21528-2. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* – Deo 2: Tehnika brojanja kolonija.
333. SRPS EN ISO 4833-1. (2014). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – Deo 1: Brojanje kolonija na 30 °C tehnikom nalivanja ploče.
334. SRPS EN ISO 6579-1. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* – Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp.
335. SRPS EN ISO 6887-1. (2017). Mikrobiologija lanca hrane – Pripremanje uzoraka za ispitivanje, početne suspenzije i decimalnih razblaženja za mikrobiološko ispitivanje – Deo 1: Opšta pravila za pripremanje početne suspenzije i decimalnih razblaženja.
336. SRPS EN ISO 7218. (2008). Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Opšti zahtevi i uputstvo za mikrobiološka ispitivanja.
337. SRPS EN ISO 8589. (2015). Senzorske analize – Opšte uputstvo za projektovanje prostorija za ispitivanje.
338. SRPS EN ISO 9235. (2021). Aromatične sirovine prirodnog porekla – Rečnik.
339. SRPS ISO 16649-2. (2008). Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja β -glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* – Deo 2: Tehnika brojanja kolonija na 44 °C pomoću 5-bromo-4-hloro-3-indolil β -D-glukuronida.
340. Stefanini, M. B., Ming, L. C., Marques, M. O. M., Facanali, R., Meireles, M. A. A., Moura, L. S., Marchese, J. A., & Sousa, L. A. (2006). Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). Revista Brasileira de Plantas Medicinai, 8, 193 – 198.
341. Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., & Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. Food Microbiology, 20 (3), 339 – 343.
342. Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 38 (5), 428 – 432.
343. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS – Journal of Pathology, Microbiology and Immunology, 115 (8), 891 – 899.
344. Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., Pflüger, V., Tonolla, M., Ravasi, D., Fredriksson-Ahomaa, M., & Hächler, H. (2011). Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods, 87 (2), 150 – 153.
345. Stevanović, Z. D., Pljevljakušić, D., Ristić, M., Šoštarić, I., Krešović, M., Simić, I., & Vrbničanin, S. (2015). Essential oil composition of *Achillea millefolium* agg. populations collected from saline habitats in Serbia. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18 (6), 1343 – 1352.
346. Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. Industrial Crops and Products, 55, 116 – 122.
347. Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Joković, N., Jokanović, M., Ivić, M., Šojić, B., Škaljac, S., Stojanović, P., Mihajilov-Krstev, T. (2018). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. Food Control, 90, 332 – 343.

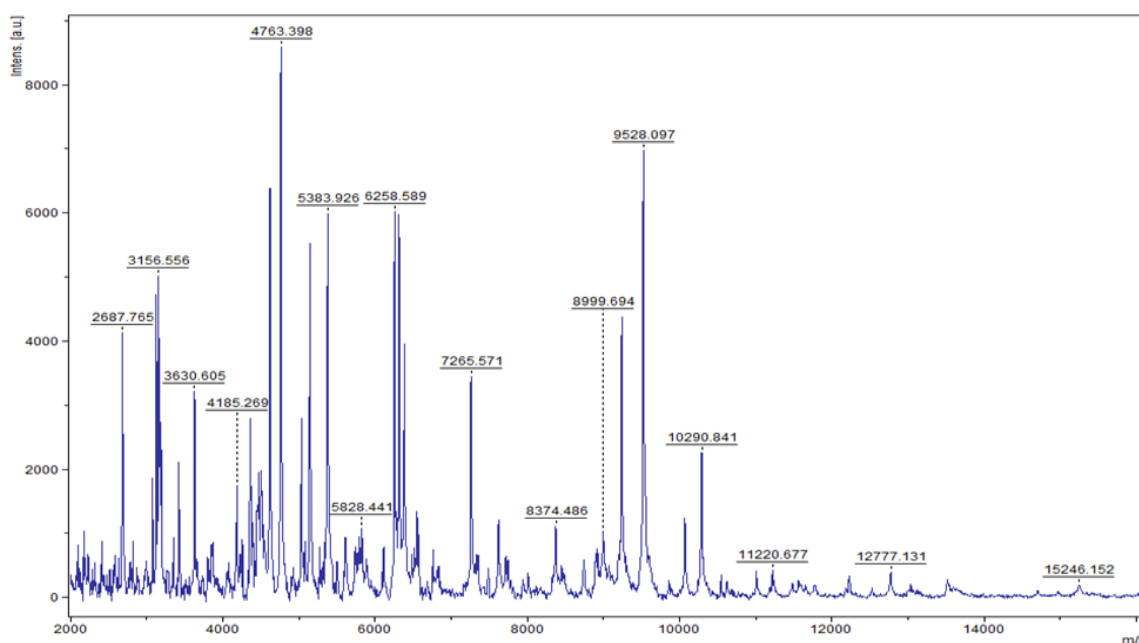
348. Sukatta, U., Rugthaworn, P., Punjee, P., Chidchenchey, S., & Keeratinijakal, V. (2009). Chemical composition and physical properties of oil from Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) obtained by hydro distillation and hexane extraction. *Agriculture and Natural Resources*, 43 (5), 212 – 217.
349. Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, ID 3012462.
350. Šojić, B., Pavlić, B., Zeković, Z., Tomović, V., Ikonić, P., Kocić-Tanackov, S., & Džinić, N. (2018). The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 749 – 755.
351. Šojić, B., Tomović, V., Jokanović, M., Ikonić, P., Džinić, N., Kocić-Tanackov, S., Popović, Lj., Tasić, T., Savanović, J., Živković Šojić, N. (2017). Antioxidant activity of *Juniperus communis* L. essential oil in cooked pork sausages. *Czech Journal of Food Sciences*, 35 (3), 189 – 193.
352. Tarlak, F. (2020). Development of a Novel Growth Model Based on the Central Limit Theorem for the Determination of Beef Spoilage. *Applied Food Biotechnology*, 7 (3), 143 – 150.
353. Taroeno, Brophy, J. J., & Zwaving, J. H. (1991). Analysis of the essential oil of *Zingiber cassumunar* Roxb. from Indonesia. *Flavour and Fragrance Journal*, 6, 161 – 163.
354. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587 – 595.
355. Tekin, K., Akalın, M. K., & Şeker, M. G. (2015). Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Industrial Crops and Products*, 77, 954 – 960.
356. Telci, I., Bayram, E., Yılmaz, G., & Avcı, B. (2006). Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34 (6), 489 – 497.
357. Thanissery, R., Kathariou, S., & Smith, D. P. (2014). Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* *in vitro*. *Journal of Applied Poultry Research*, 23 (2), 221 – 227.
358. Thévenot, D., Dernburg, A., & Vernozzy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (1), 7 – 17.
359. Thoroski, J., Blank, G., & Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Protection*, 52 (6), 399 – 403.
360. Tian, Y., Dong, F., Zhou, X. & Yang, X. (2020). Repellent, insecticidal and antimicrobial activities of leaf essential oils from three *Eucalyptus* species. *Chemistry & Biodiversity*, 17 (2), e1900580.
361. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80 (1), 7 – 12.
362. Trevisan, D. A. C., Silva, A. F. D., Negri, M., Abreu Filho, B. A. D., Machinski Junior, M., Patussi, E. V., Campanerut-Sá, P. A. Z., & Mikcha, J. M. G. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54 (1), e17229.
363. Turgis, M., Han, J., Caillet, S., & Lacroix, M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20 (12), 1073 – 1079.

364. Turgis, M., Vu, K. D., Dupont, C., & Lacroix, M. (2012). Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*, 48 (2), 696 – 702.
365. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4), 1561 – 1568.
366. Valizadeh, S., Fakheri, T., Mahmoudi, R., Katiraei, F., & Gajarbeygi, P. (2014). Evaluation of antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of *Satureja hortensis* essential oil. *Biotechnology and Health Sciences*, 1 (3), e24733.
367. Veličković, D. T., Randelović, N. V., Ristić, M. S., Veličković, A. S., & Šmelcerović, A. A. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 68 (1), 17 – 24.
368. Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P., Mendes, A., Martins da Costa, P., & Belo, A. D. (2017). Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chemistry & Biodiversity*, 14, e1700006.
369. Vinturelle, R., Mattos, C., Meloni, J., Nogueira, J., Nunes, M. J., Vaz, I. S., Rocha, L., Lione, V., Castro, H. C., & Chagas, E. F. D. (2017). *In vitro* evaluation of essential oils derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Biochemistry Research International*, 2017, Article ID 5342947.
370. Vokou, D., Kokkini, S., & Bessiere, J. M. (1993). Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21 (2), 287 – 295.
371. Vorst, K. L., Todd, E. C., & Ryser, E. T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. *Journal of Food Protection*, 69 (12), 2939 – 2946.
372. Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., & Bartolo, R. G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (2), 240 – 247.
373. Wang, H., Palmer, J., & Flint, S. (2016). A rapid method for the nonselective enumeration of *Yersinia enterocolitica*, a foodborne pathogen associated with pork. *Meat Science*, 113, 59 – 61.
374. Wang, H., Tay, M., Palmer, J., & Flint, S. (2017). Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. *Food Control*, 73, 433 – 437.
375. Wang, R. (2019). Biofilms and meat safety: a mini-review. *Journal of Food Protection*, 82 (1), 120 – 127.
376. Wang, R., Wang, R., & Yang, B. (2009). Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10 (2), 289 – 292.
377. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). *Quorum sensing*: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319 – 346.
378. Way, S. S., Thompson, L. J., Lopes, J. E., Hajjar, A. M., Kollmann, T. R., Freitag, N. E., & Wilson, C. B. (2004). Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cellular Microbiology*, 6 (3), 235 – 242.
379. Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., & Scherer, S. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: a comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 44 – 52.

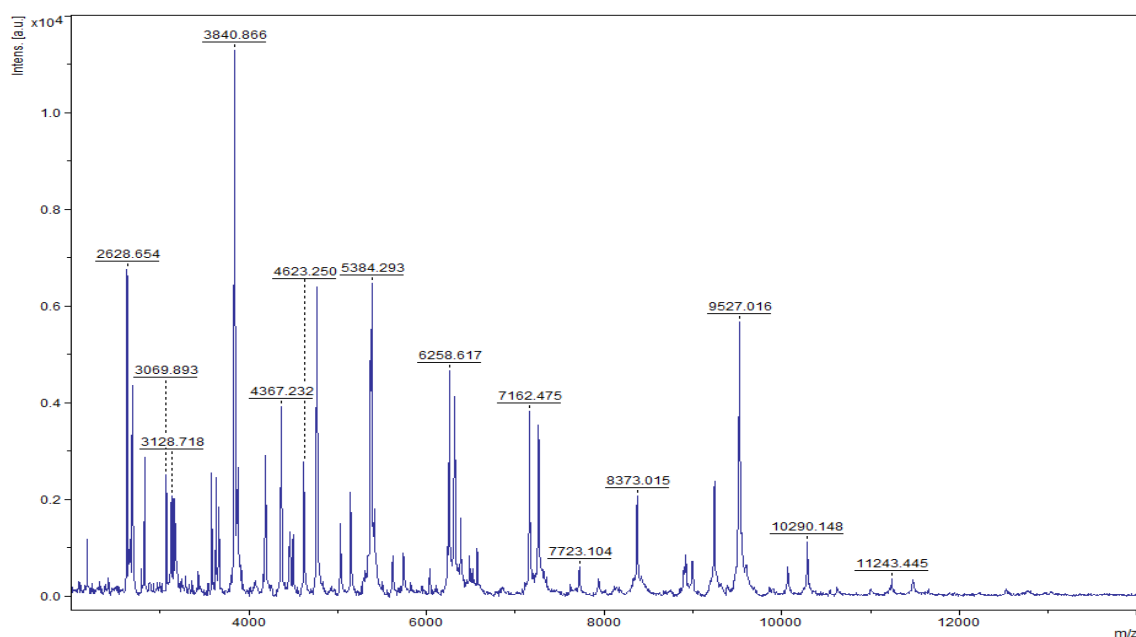
380. WHO & FAO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series 4. World Health Organization and the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
381. WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007 – 2015. World Health Organization.
382. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 965 – 974.
383. www.combase.cc (pristup 02.02.2021.)
384. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67 (12), 1249 – 1255.
385. Yan, W., Qian, J., Ge, Y., Ye, K., Zhou, C., & Zhang, H. (2020). Principal component analysis of MALDI-TOF MS of whole-cell foodborne pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, 592, 113582.
386. Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., & Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24 (2), 140 – 151.
387. Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (14), 3423.
388. Younis, G., Mady, M., & Awad, A. (2019). *Yersinia enterocolitica*: prevalence, virulence, and antimicrobial resistance from retail and processed meat in Egypt. *Veterinary World*, 12 (7), 1078 – 1084.
389. Zadernowska, A., & Chajęcka-Wierzchowska, W. (2017). Prevalence, biofilm formation and virulence markers of *Salmonella* sp. and *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin in Poland. *LWT – Food Science and Technology*, 75, 552 – 556.
390. Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2014). *Yersinia enterocolitica*: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. *Food Reviews International*, 30 (1), 53 – 70.
391. Zengin, H., & Baysal, A. H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19 (11), 17773 – 17798.
392. Zengin, H., & Baysal, A. H. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (6), 1261 – 1271.
393. Zhang, J., Wang, Y., Pan, D. D., Cao, J. X., Shao, X. F., Chen, Y. J., Sun, Y. Y., & Ou, C. R. (2016). Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. *Meat Science*, 117, 130 – 136.
394. Zheljaskov, V. D., Astatkie, T., & Schlegel, V. (2012). Distillation time changes oregano essential oil yields and composition but not the antioxidant or antimicrobial activities. *American Society for Horticultural Science*, 47 (6), 777 – 784.

9. PRILOZI

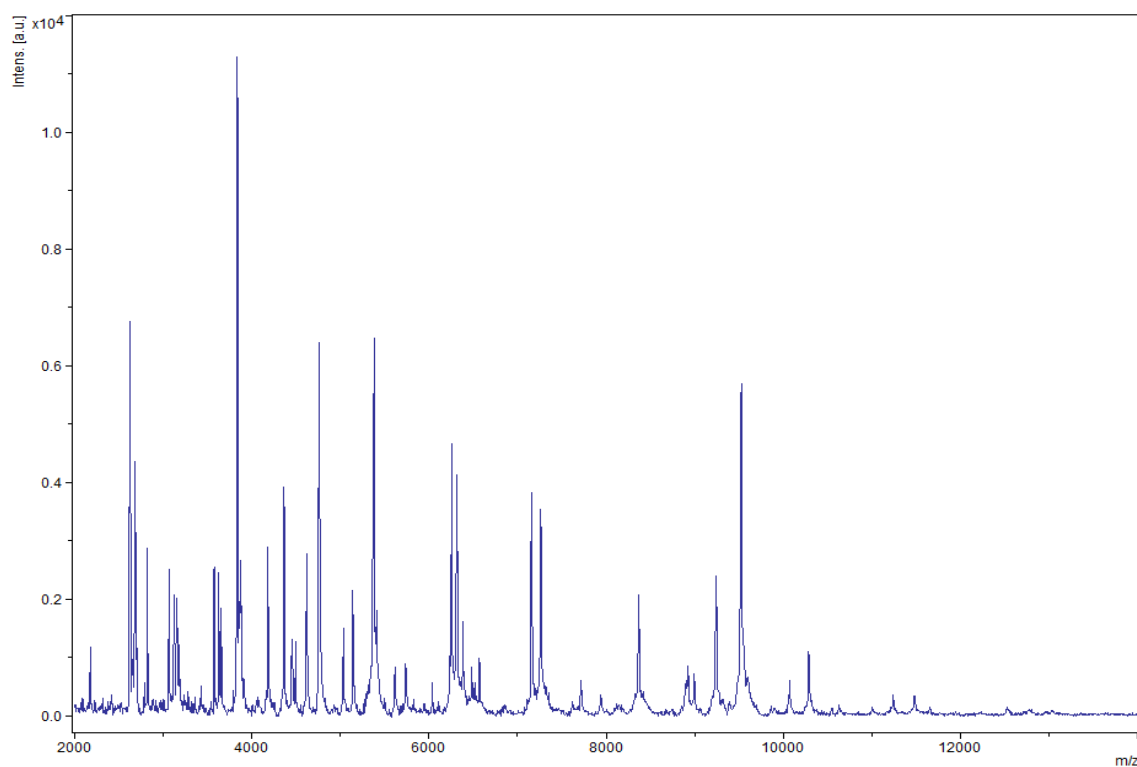
PRILOG A. SPEKTRI MALDI-TOF MASENE SPEKTROMETRIJE ISPITANIH IZOLATA



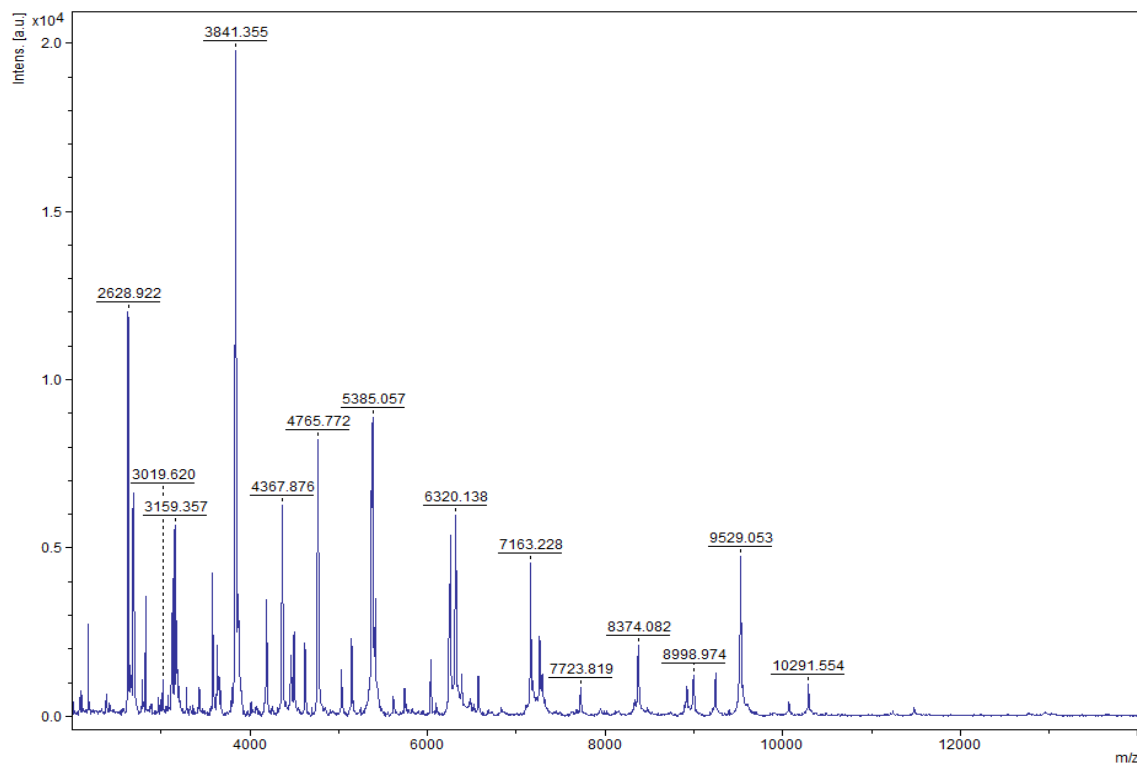
Slika 9.1. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella Enteritidis* SE53.



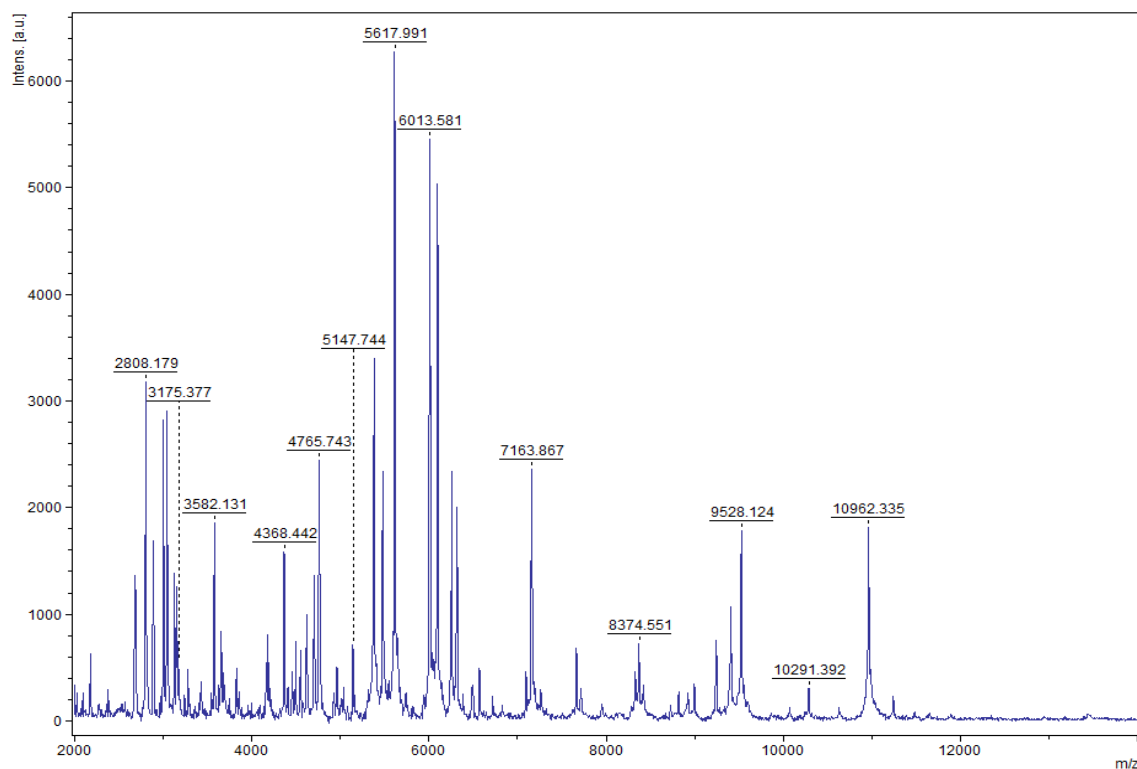
Slika 9.2. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella Enteritidis* SE56.



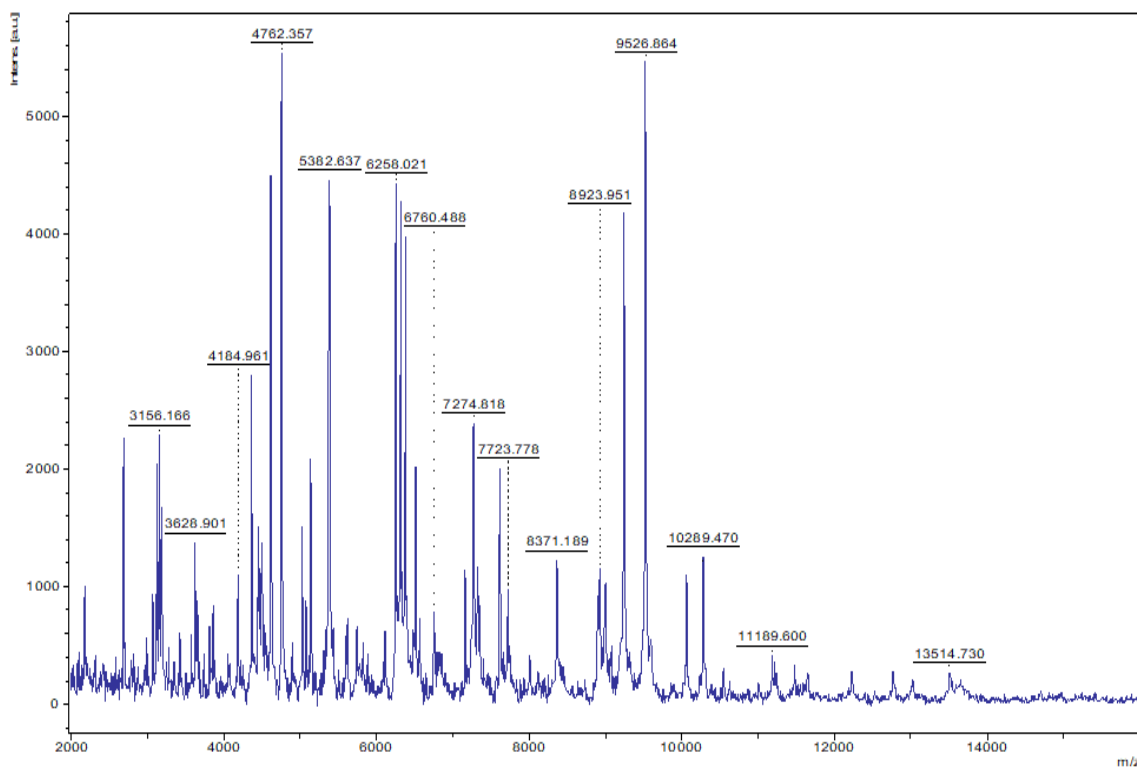
Slika 9.3. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE132.



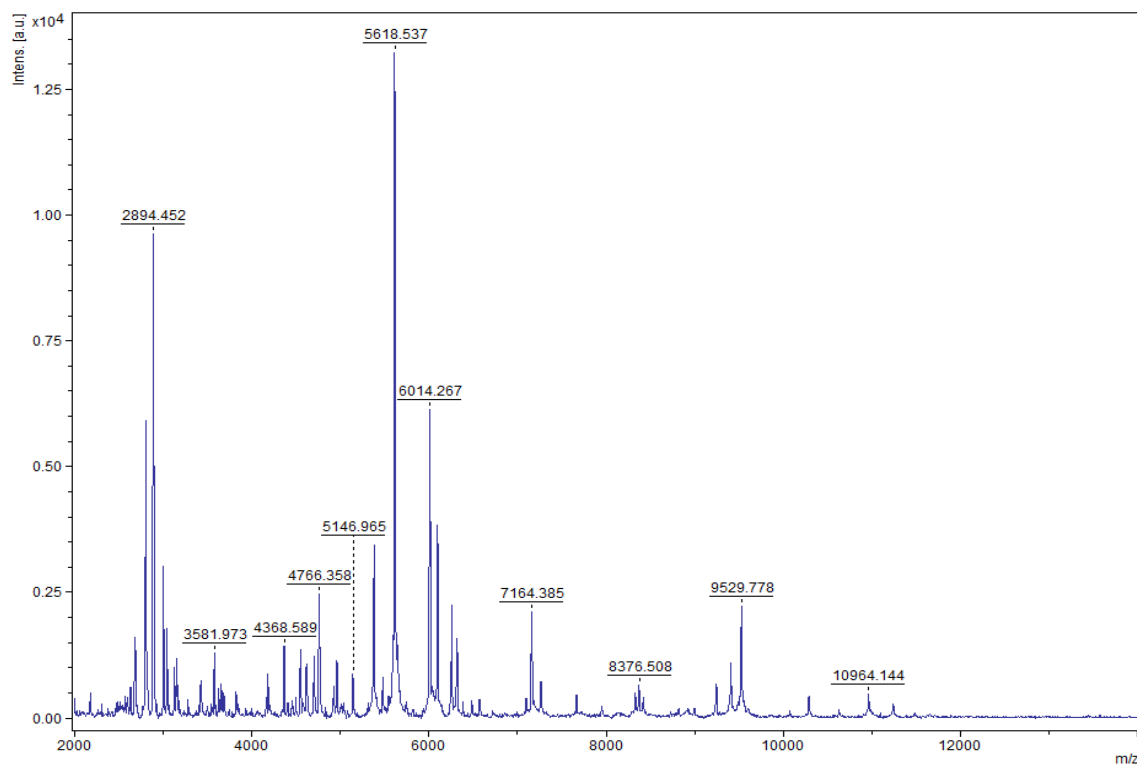
Slika 9.4. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Enteritidis SE144.



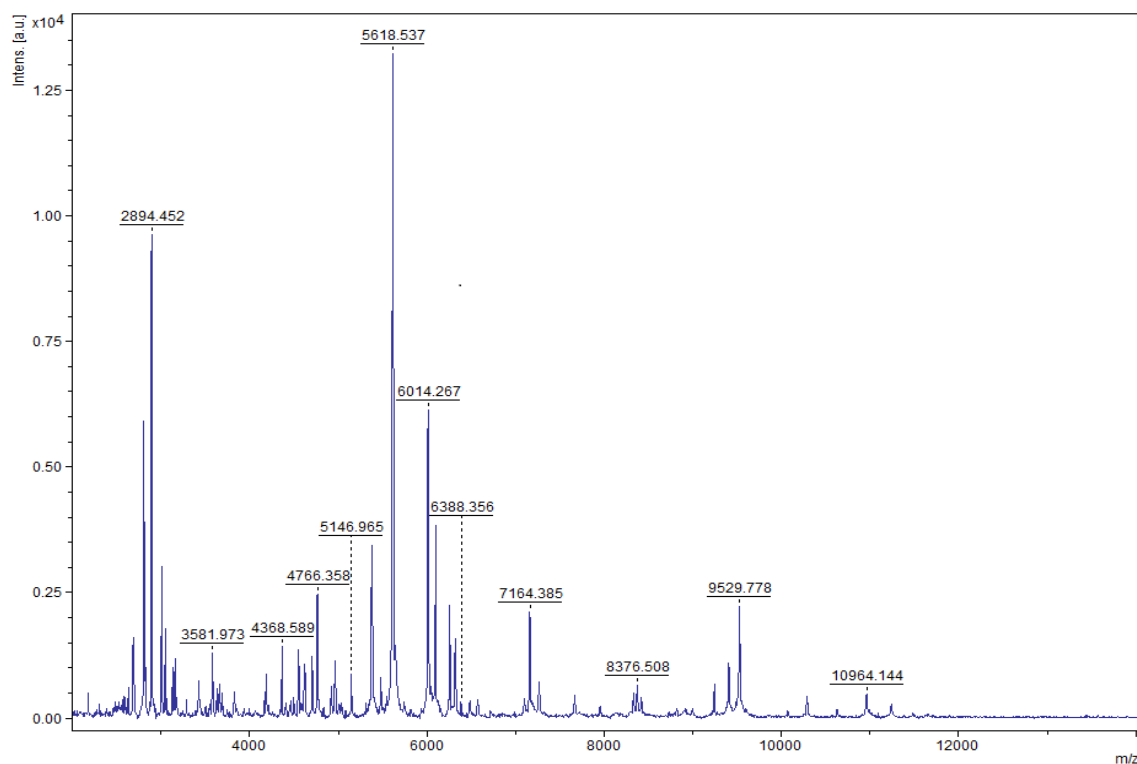
Slika 9.5. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST28.



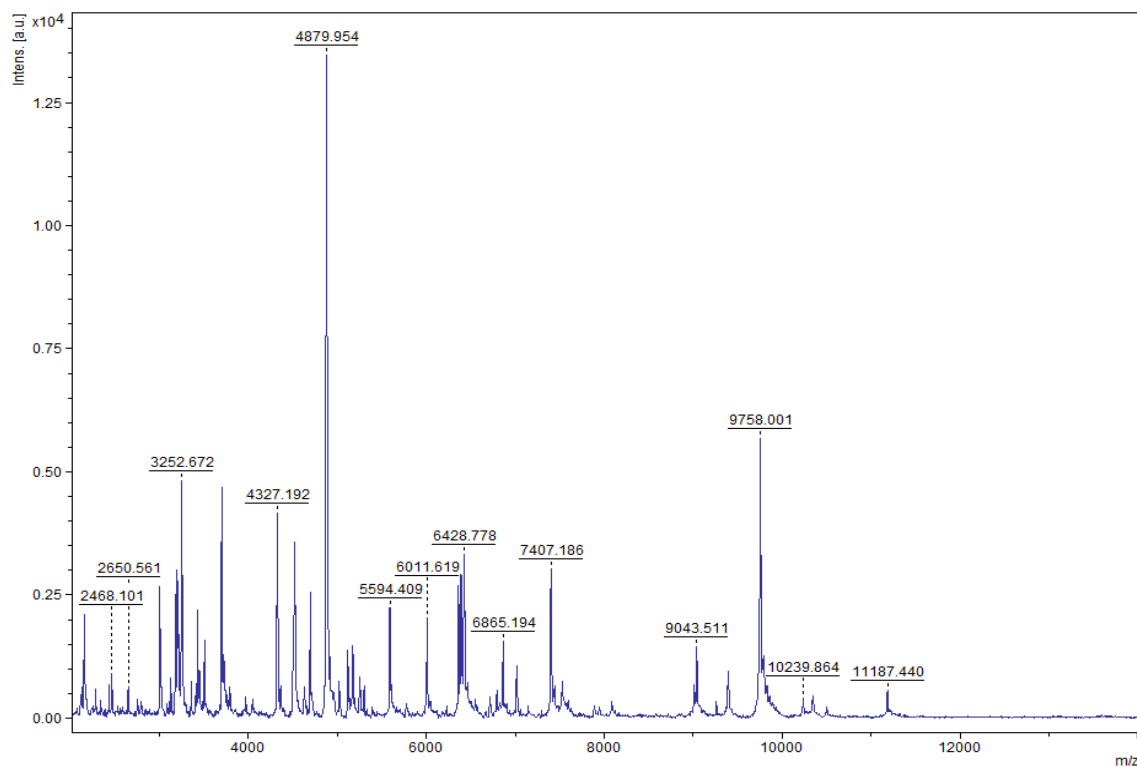
Slika 9.6. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST35.



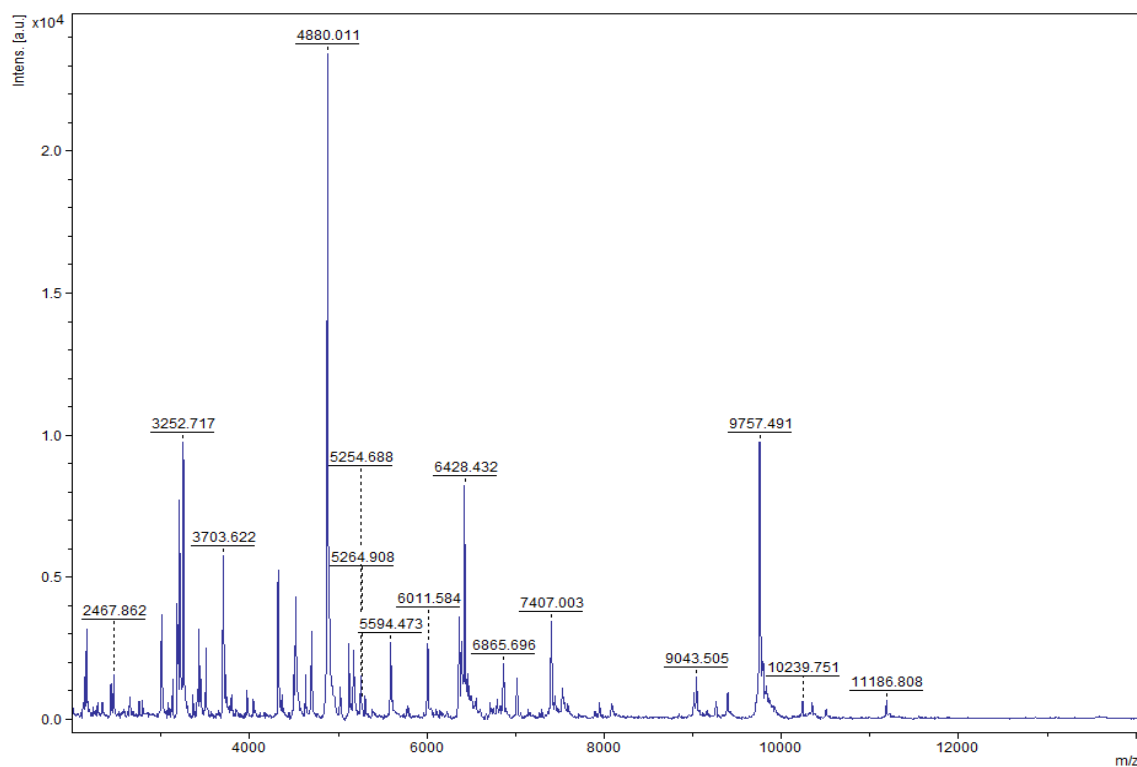
Slika 9.7. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST48.



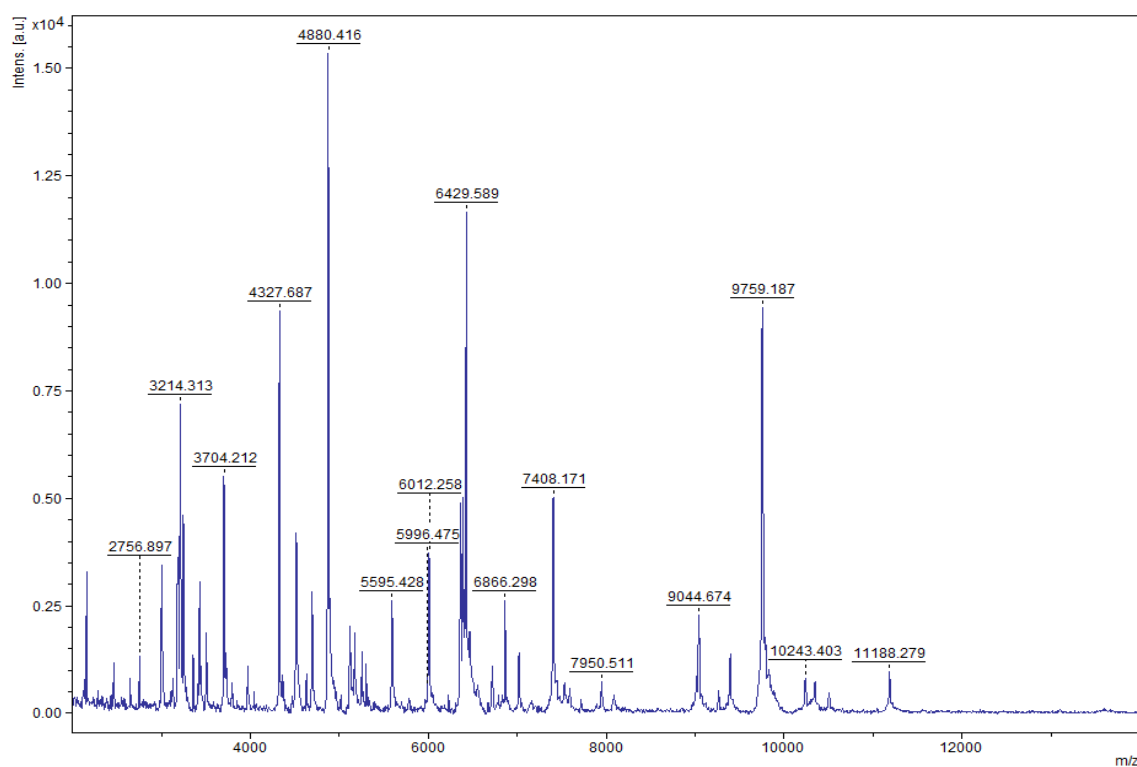
Slika 9.8. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Salmonella* Typhimurium ST49.



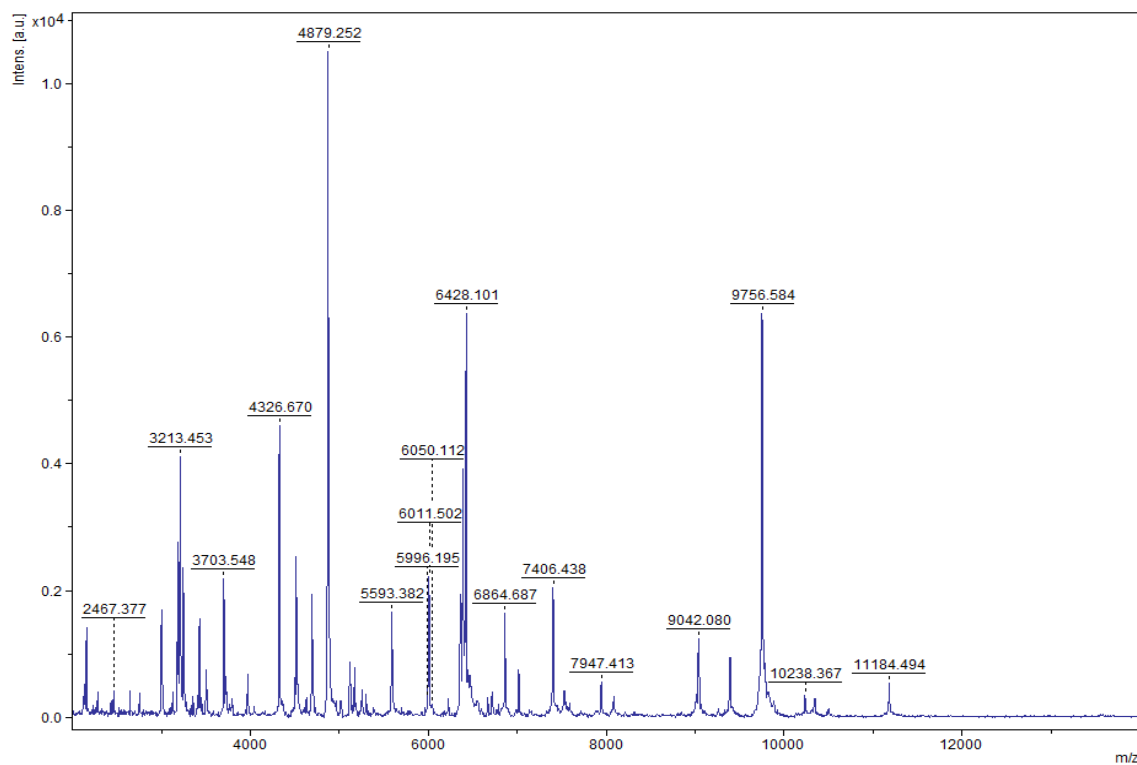
Slika 9.9. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L1.



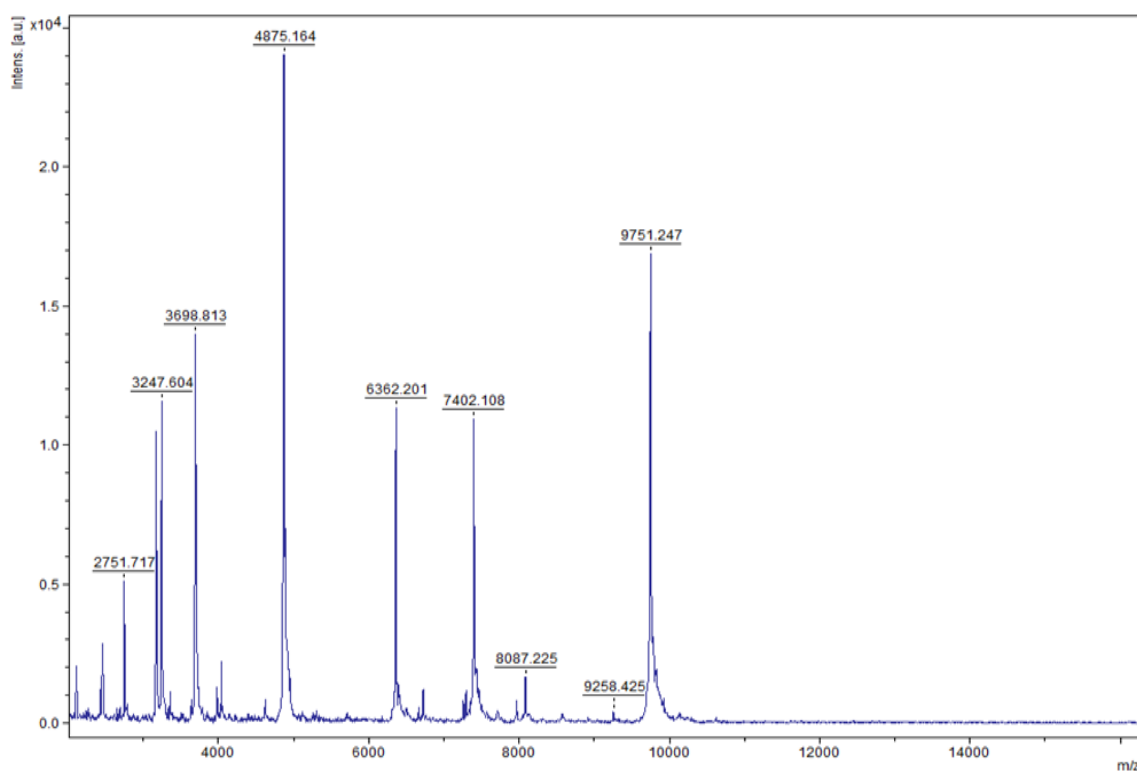
Slika 9.10. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* UB2-02-4 (L5).



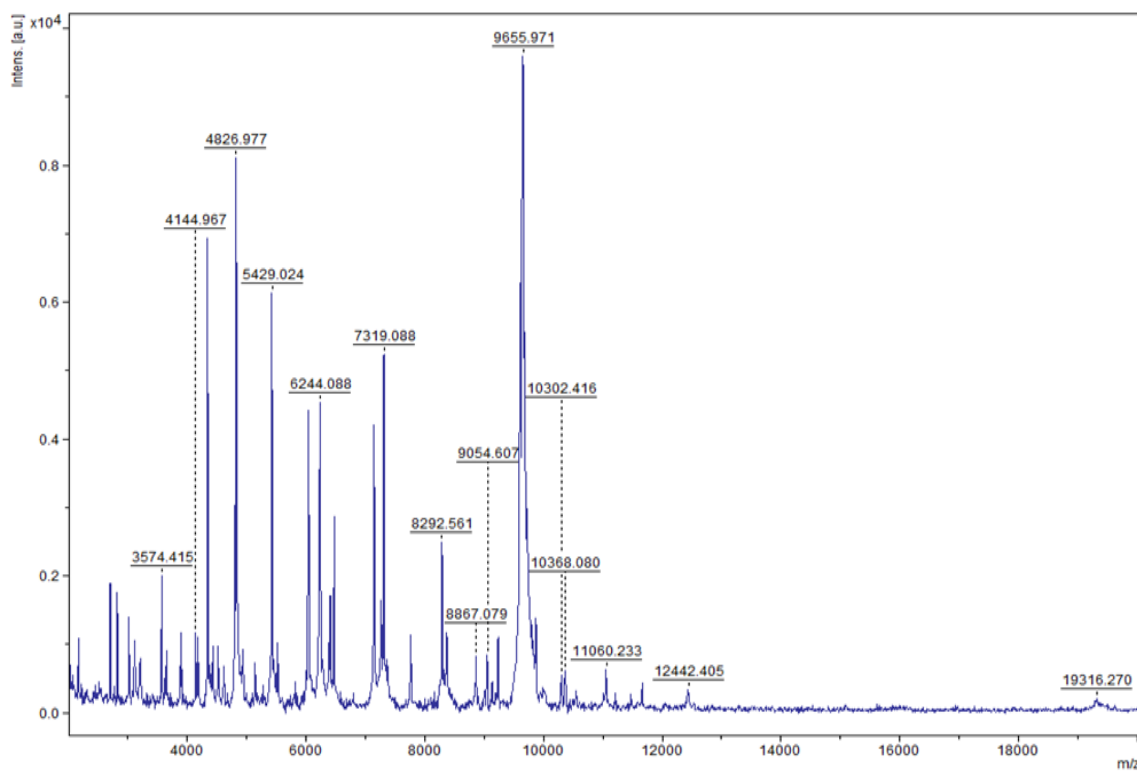
Slika 9.11. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L17.



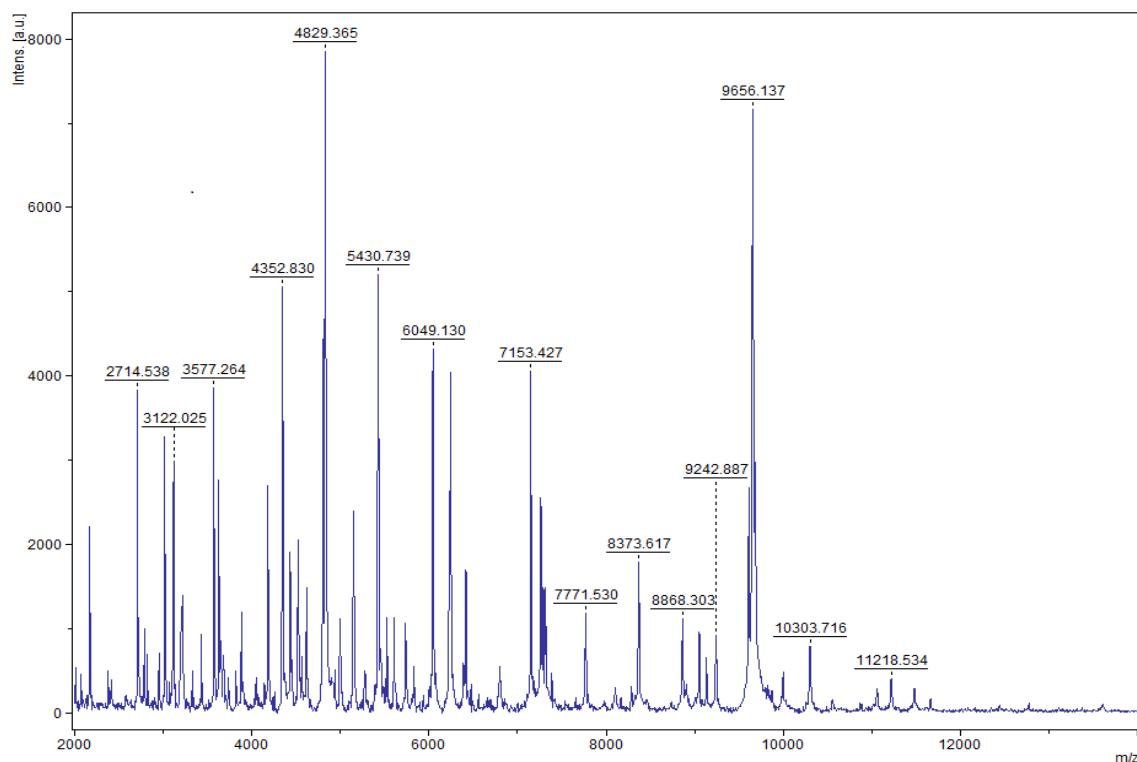
Slika 9.12. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* L18.



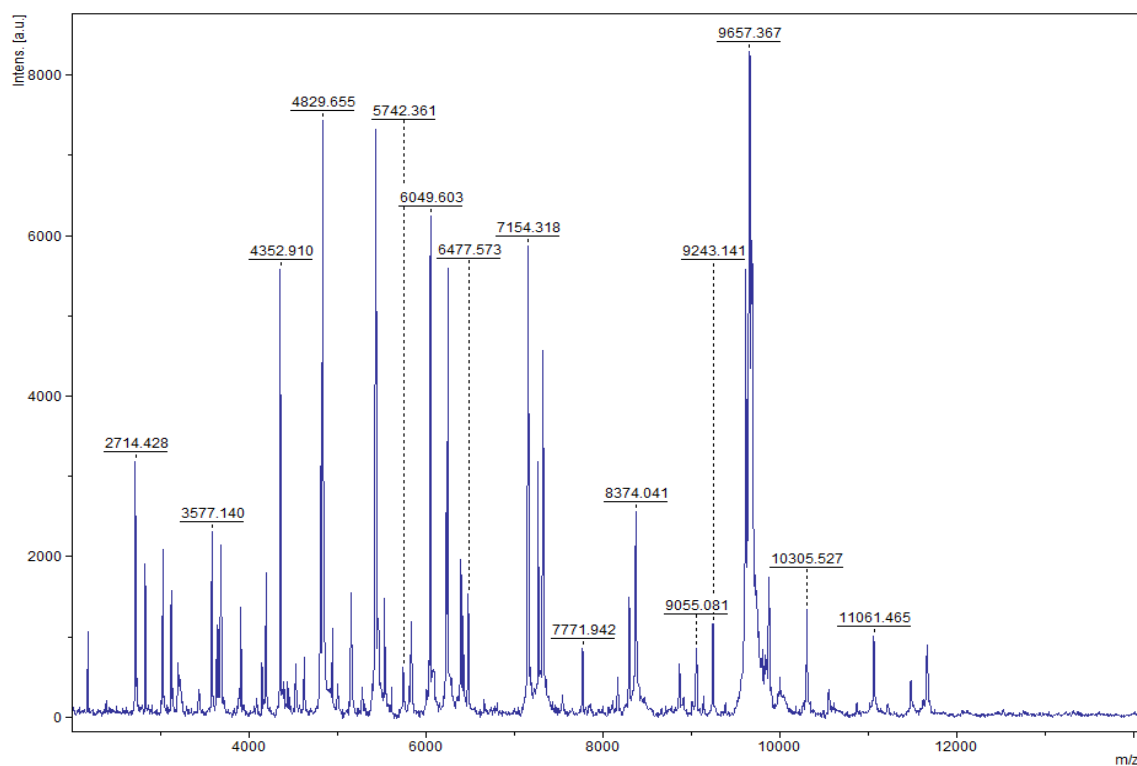
Slika 9.13. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Listeria monocytogenes* UB2-01-2 (1).



Slika 9.14. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y4/1.

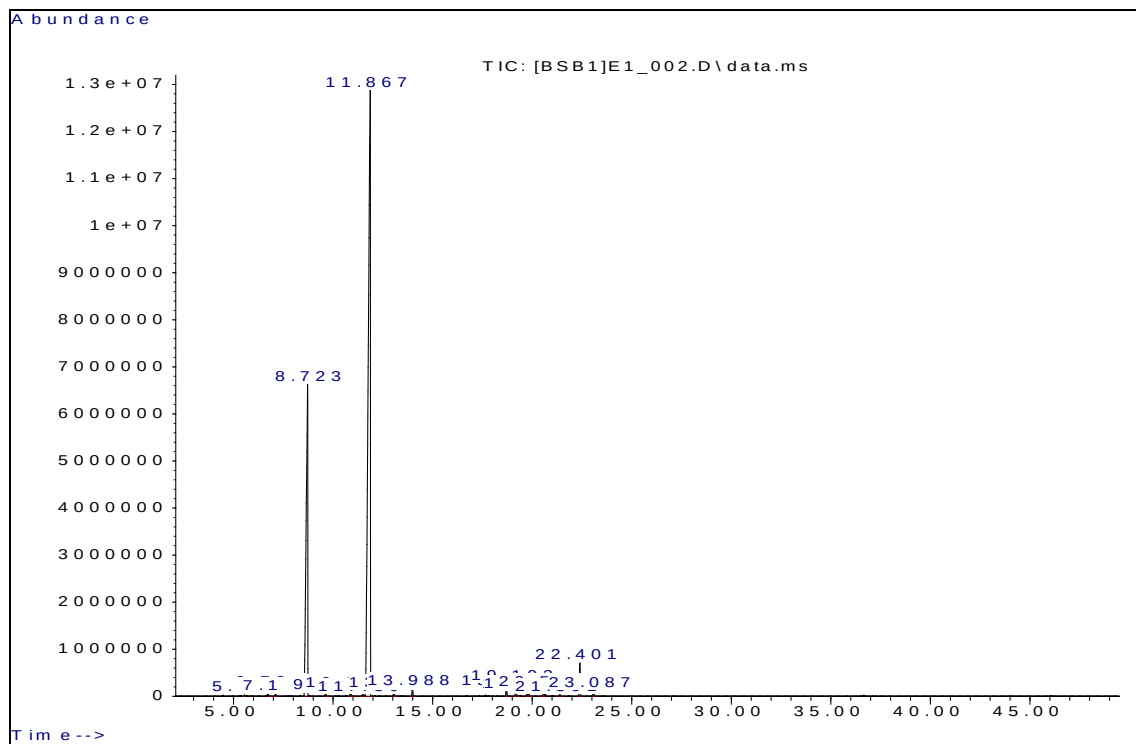


Slika 9.15. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y9.

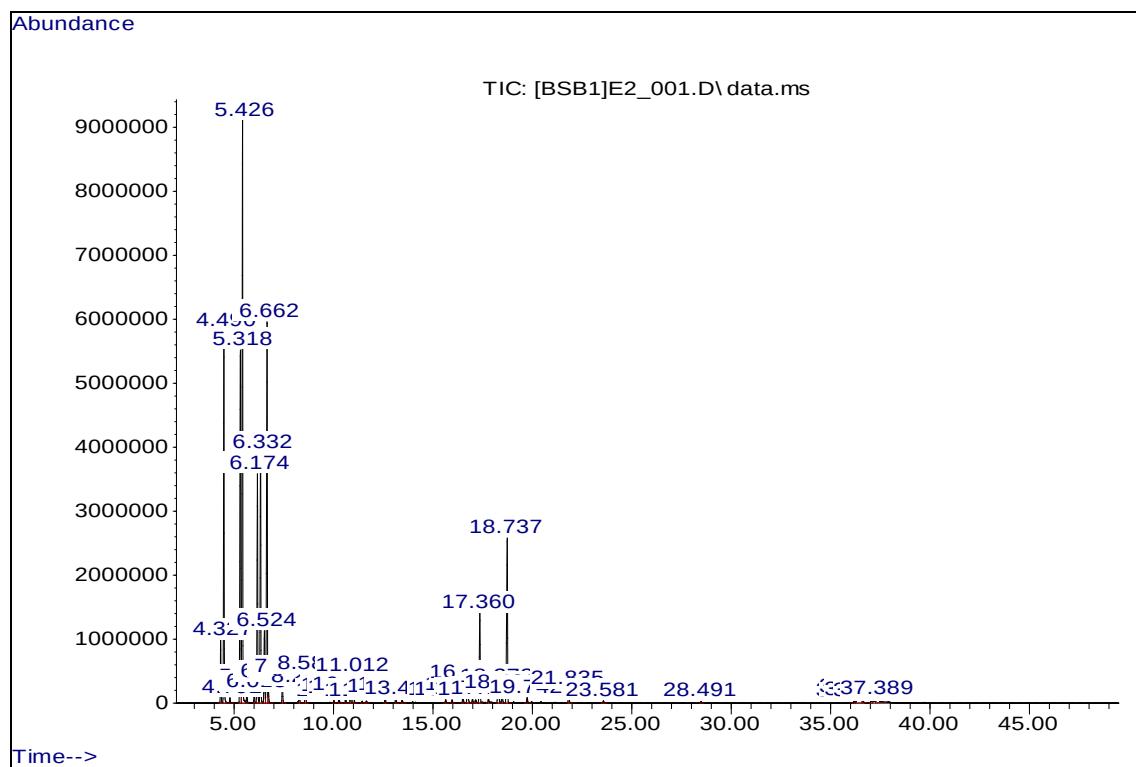


Slika 9.16. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije izolata *Yersinia enterocolitica* Y14.

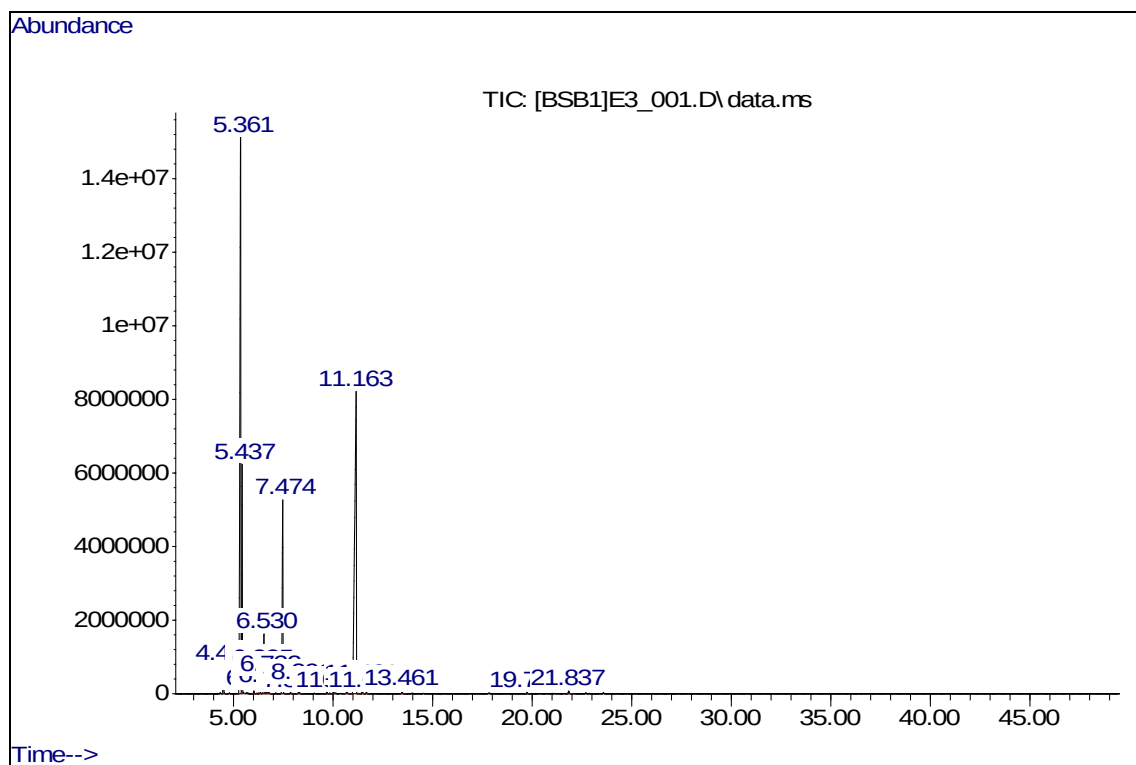
PRILOG B. HROMATOGRAMI ETARSKIH ULJA



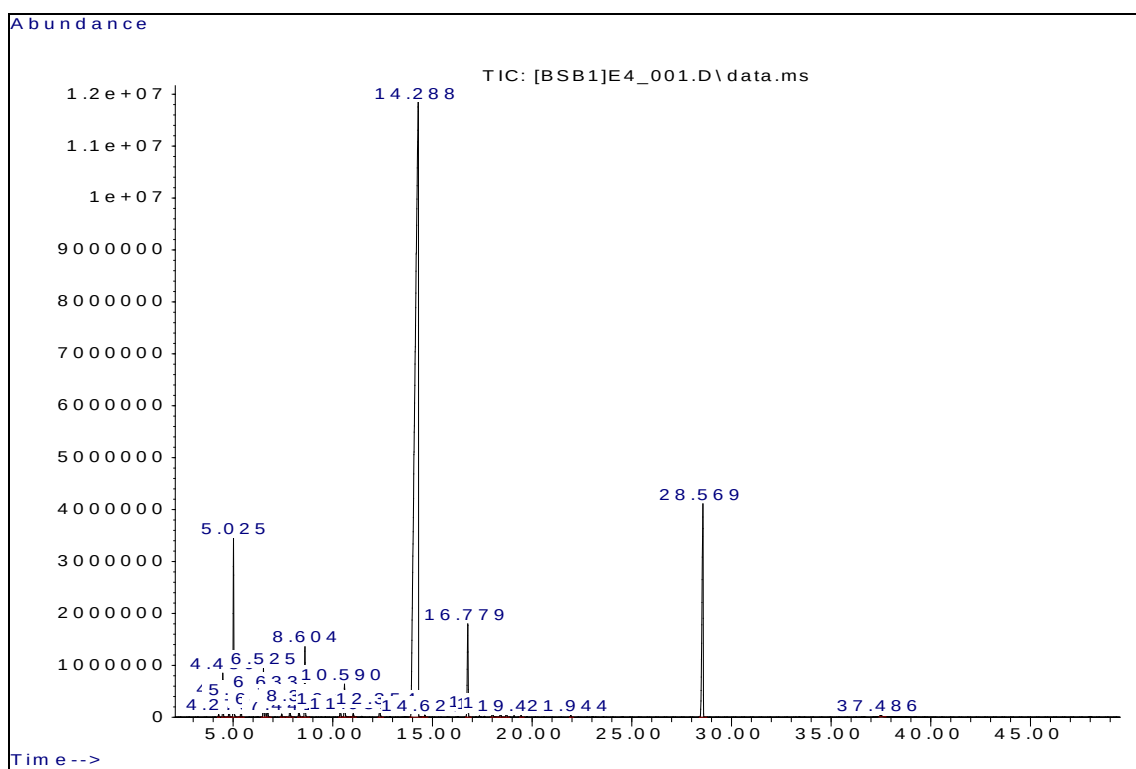
Slika 9.17. Hromatogram etarskog ulja bosiljka.



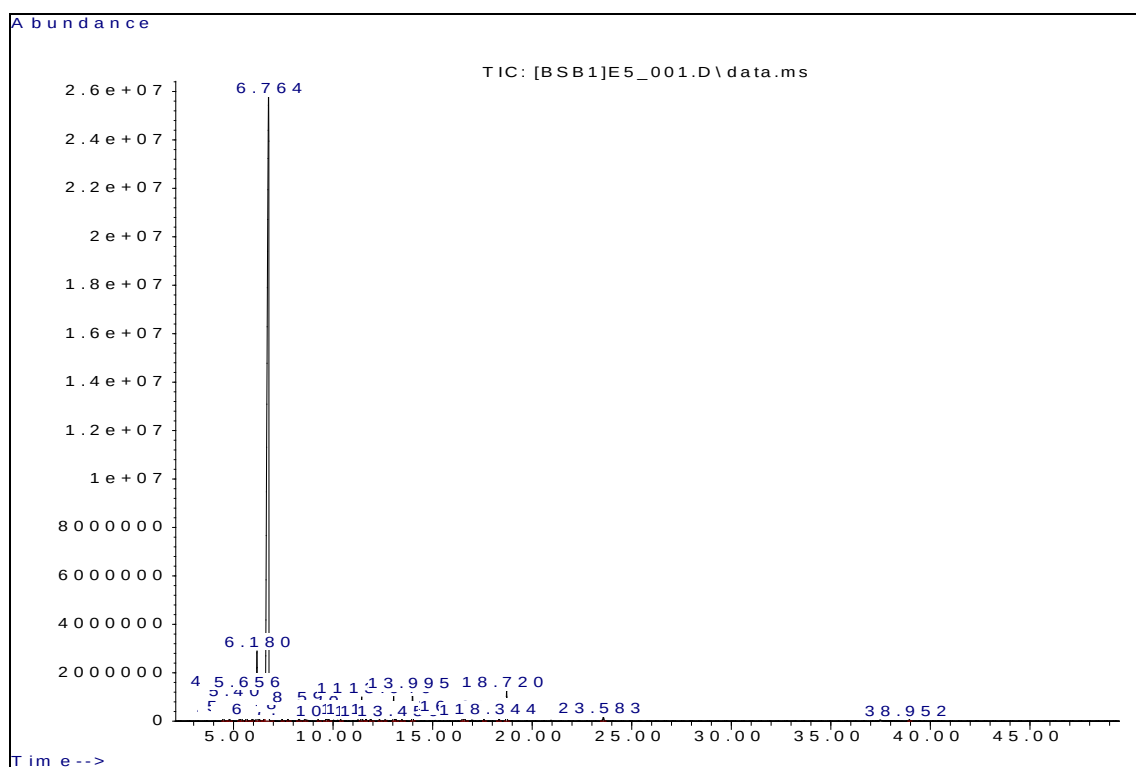
Slika 9.18. Hromatogram etarskog ulja crnog bibera.



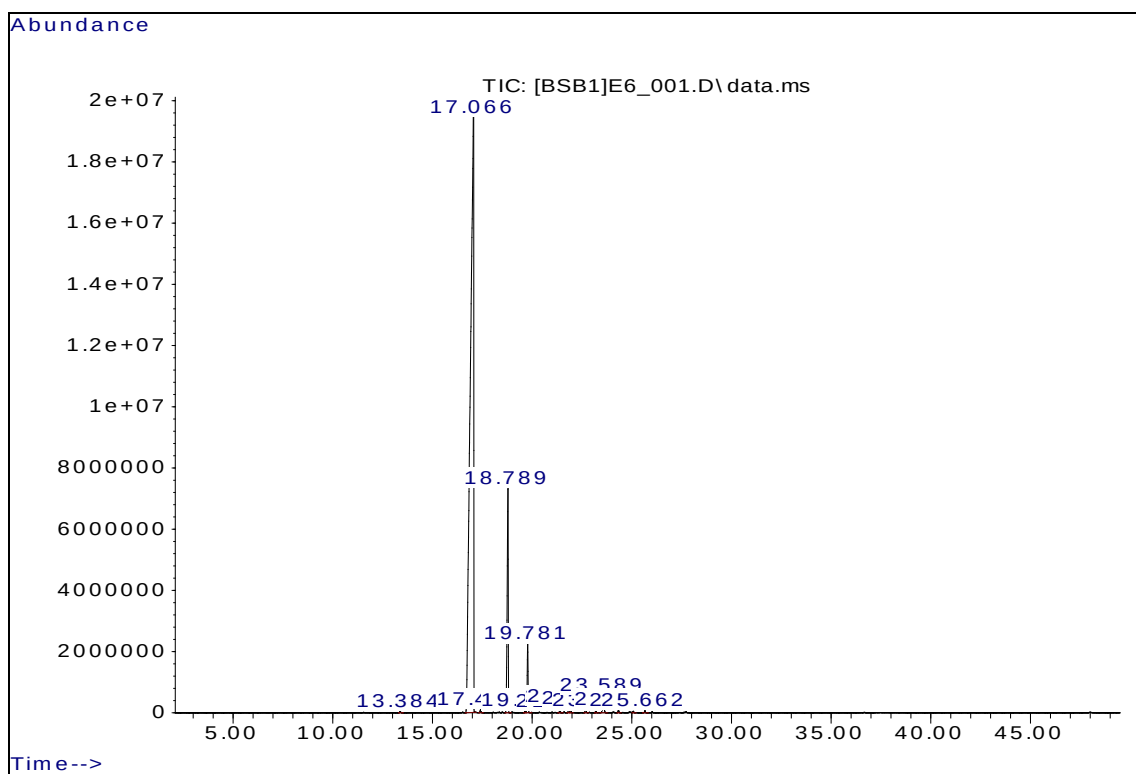
Slika 9.19. Hromatogram etarskog ulja tajlandskog đumbira.



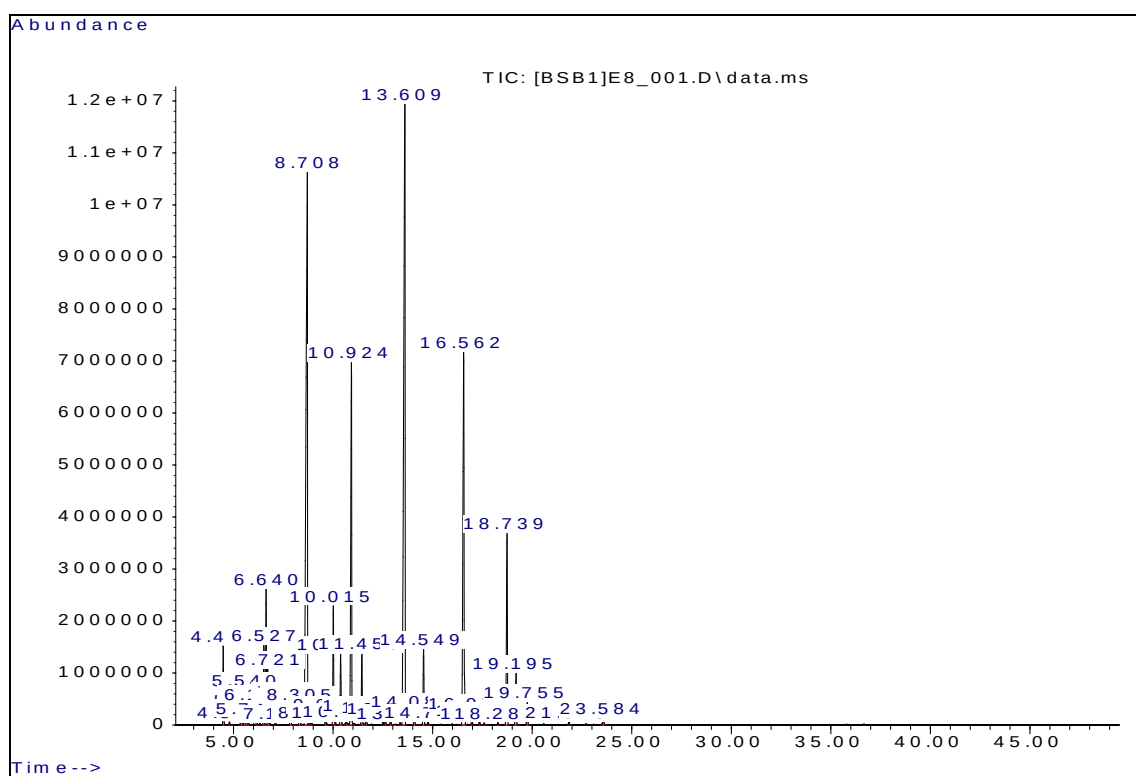
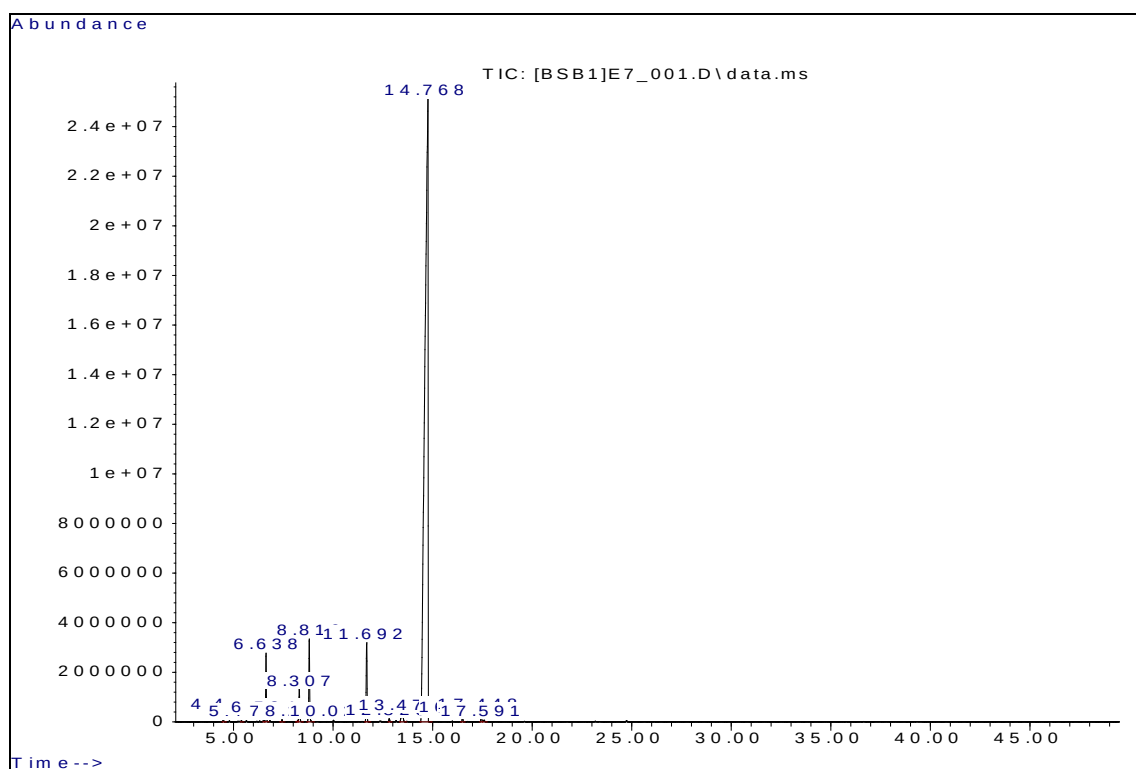
Slika 9.20. Hromatogram etarskog ulja cimeta.

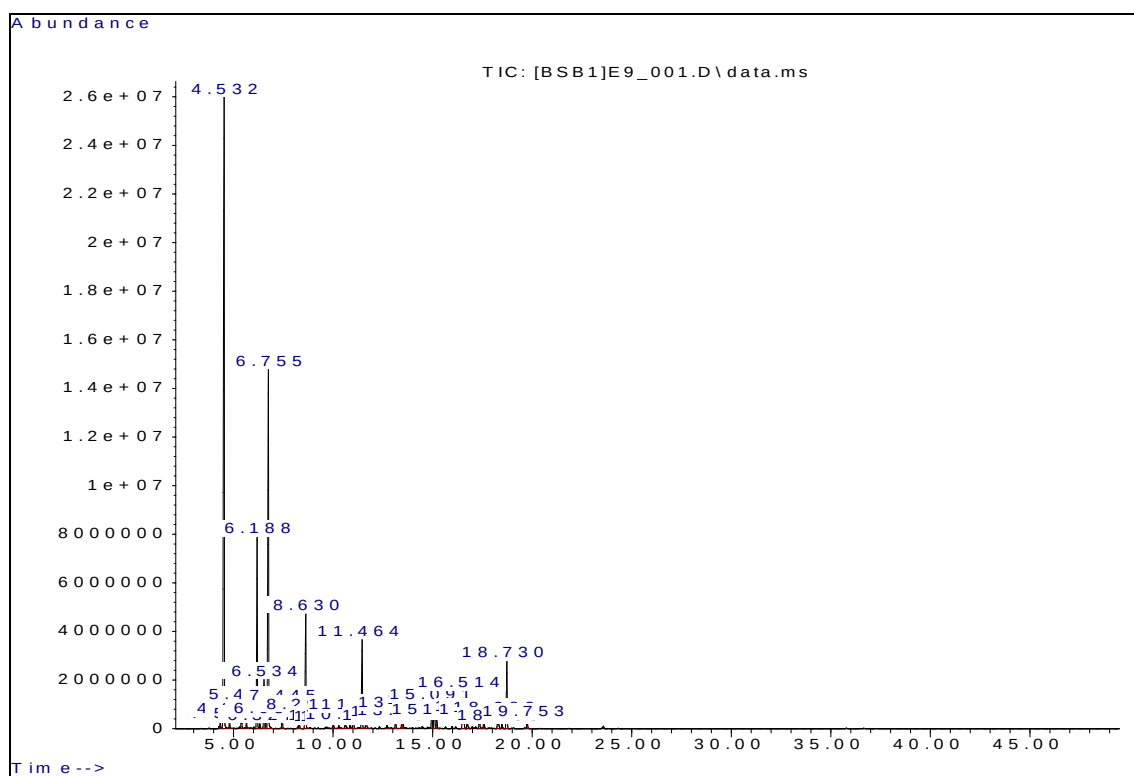


Slika 9.21. Hromatogram etarskog ulja limuna.

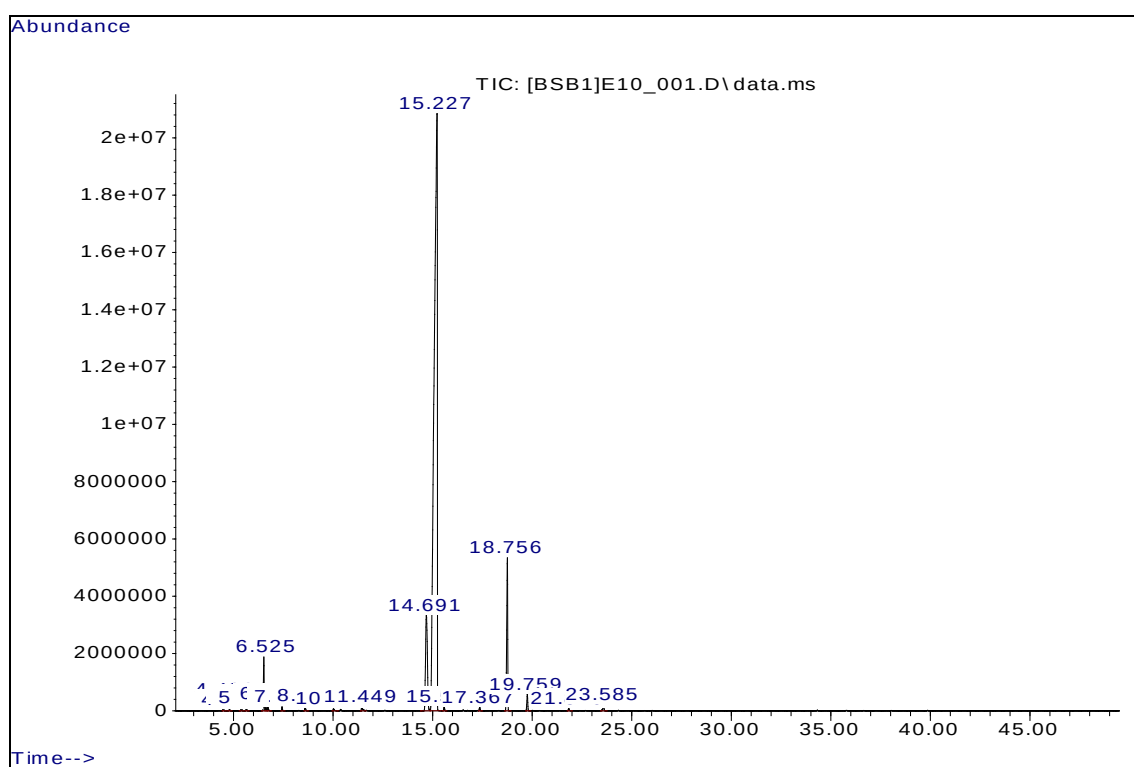


Slika 9.22. Hromatogram etarskog ulja karanfilića.

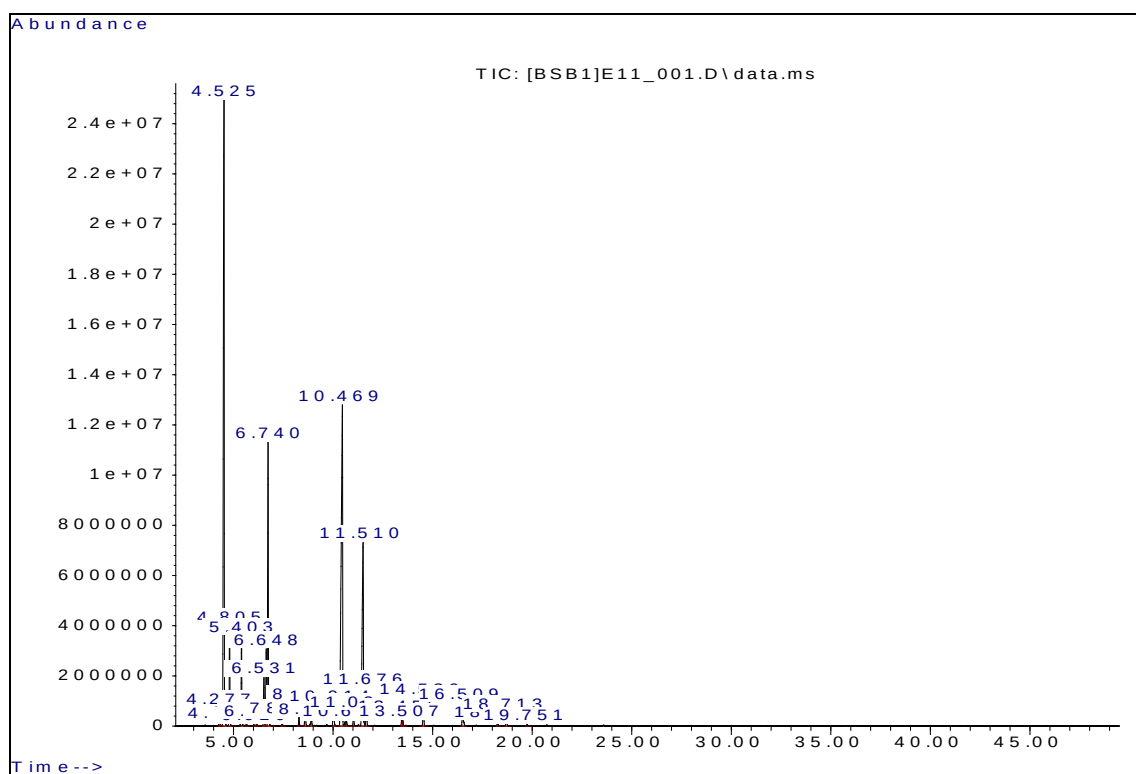




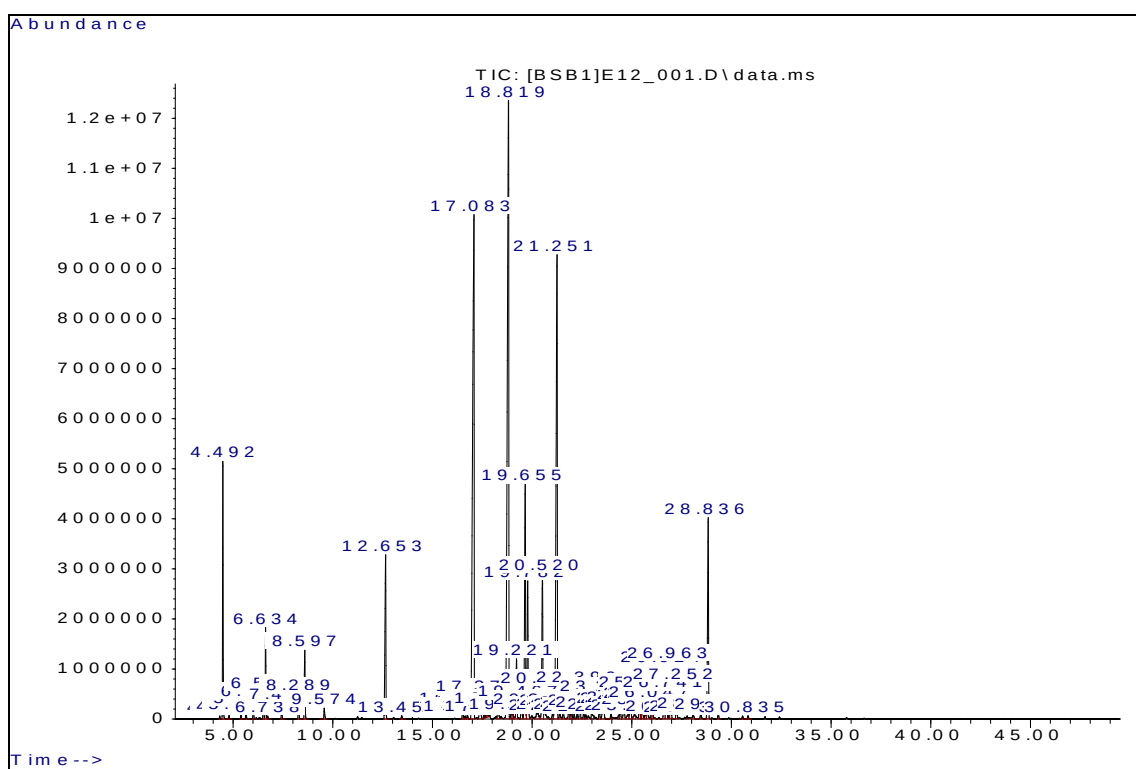
Slika 9.25. Hromatogram etarskog ulja mirte.



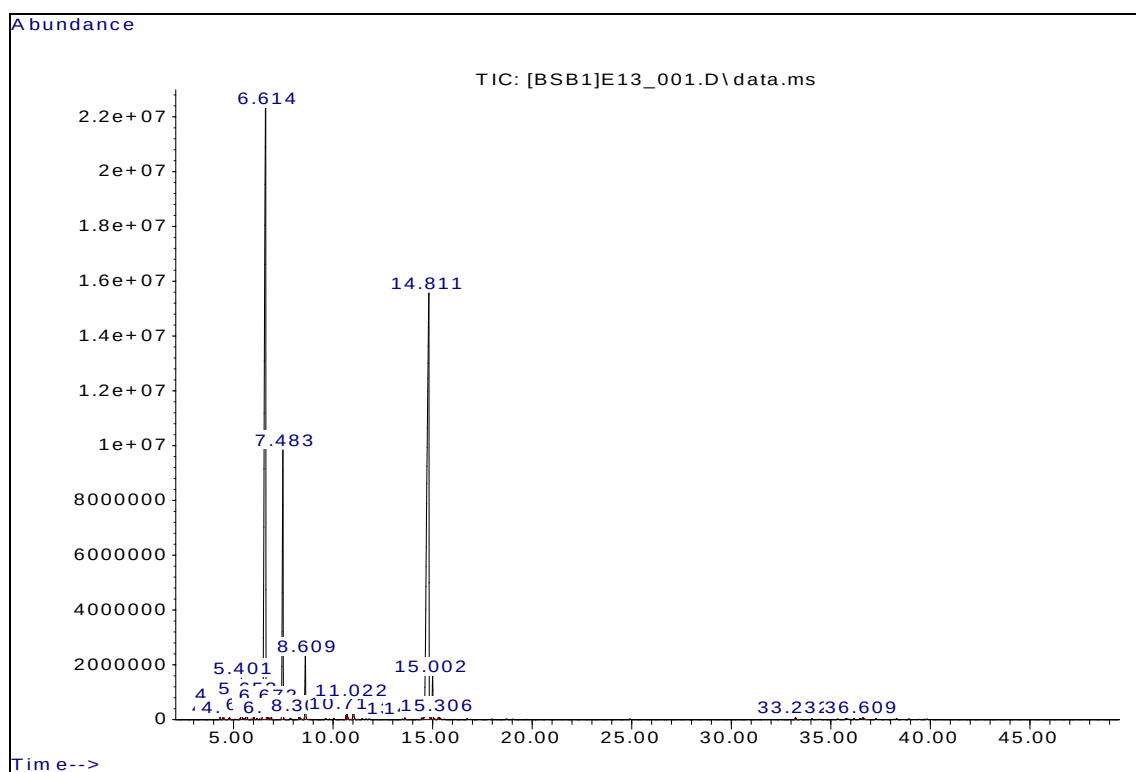
Slika 9.26. Hromatogram etarskog ulja origana.



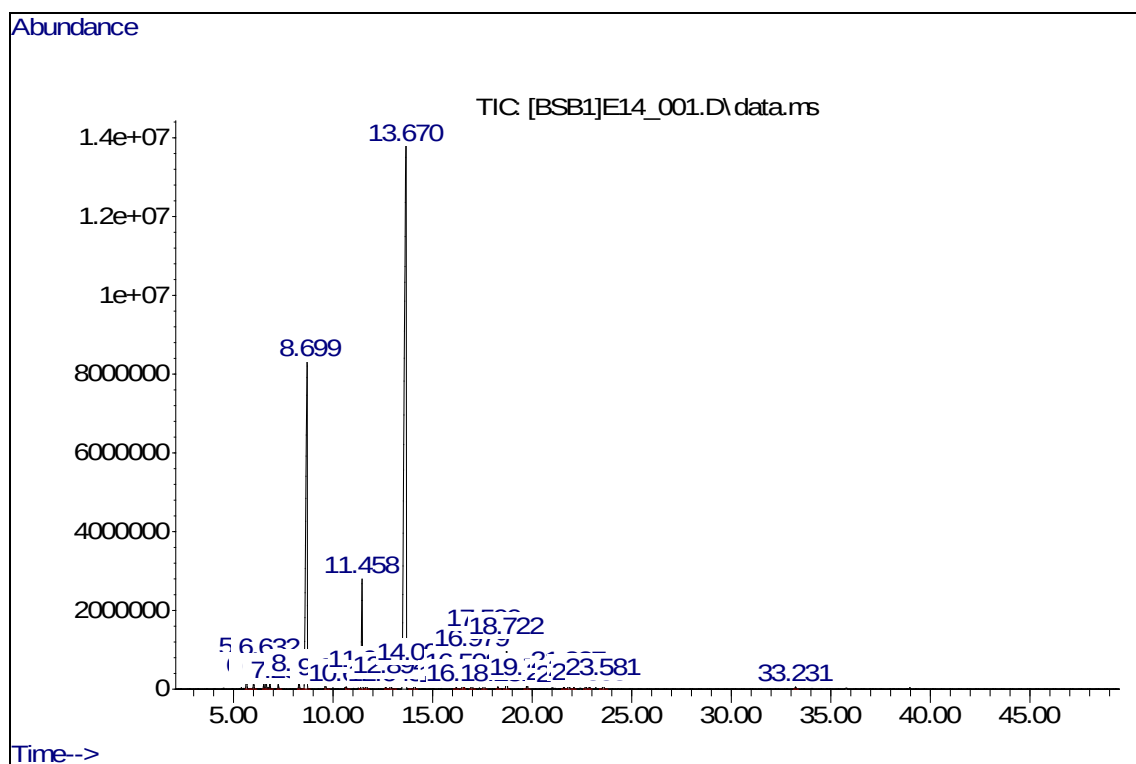
Slika 9.27. Hromatogram etarskog ulja ruzmarina.



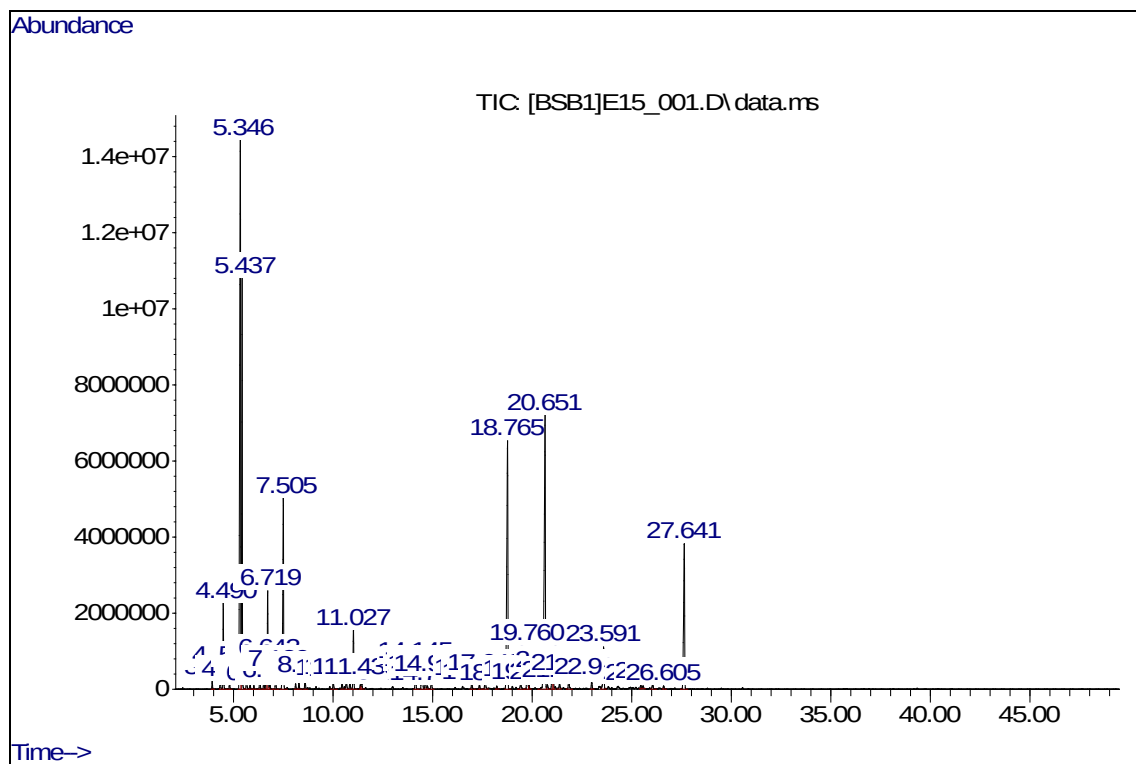
Slika 2.28. Hromatogram etarskog ulja smilja.



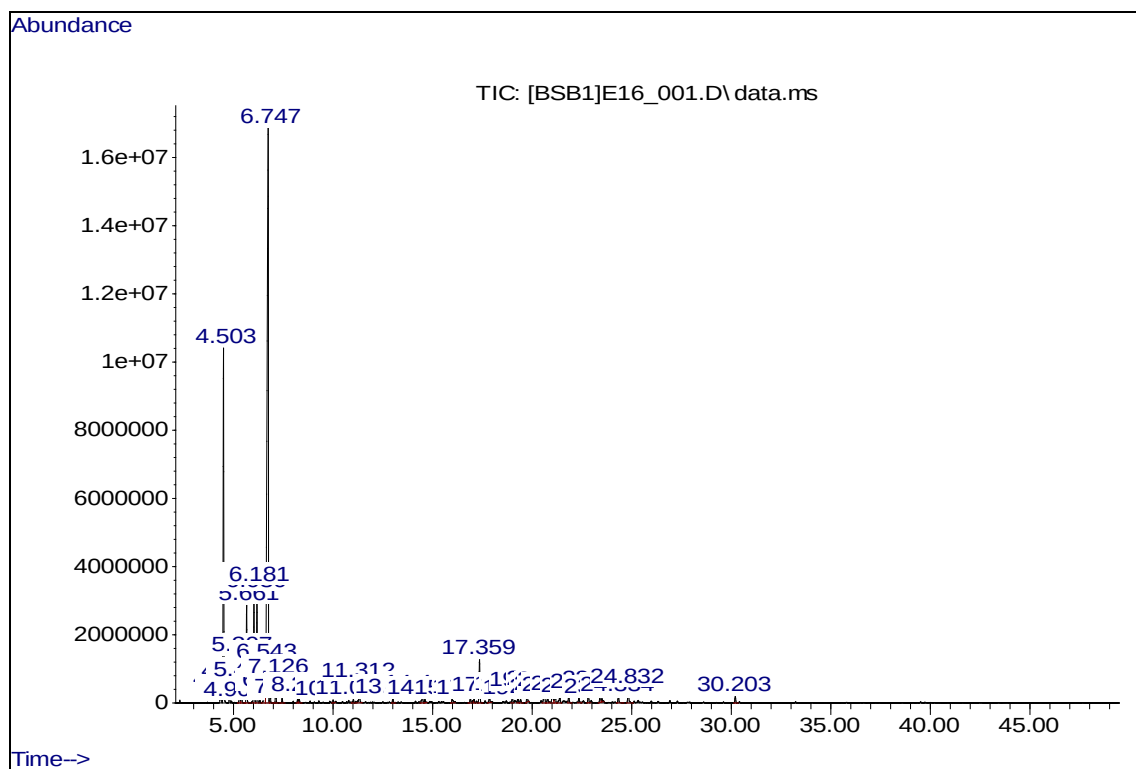
Slika 2.29. Hromatogram etarskog ulja timijana.



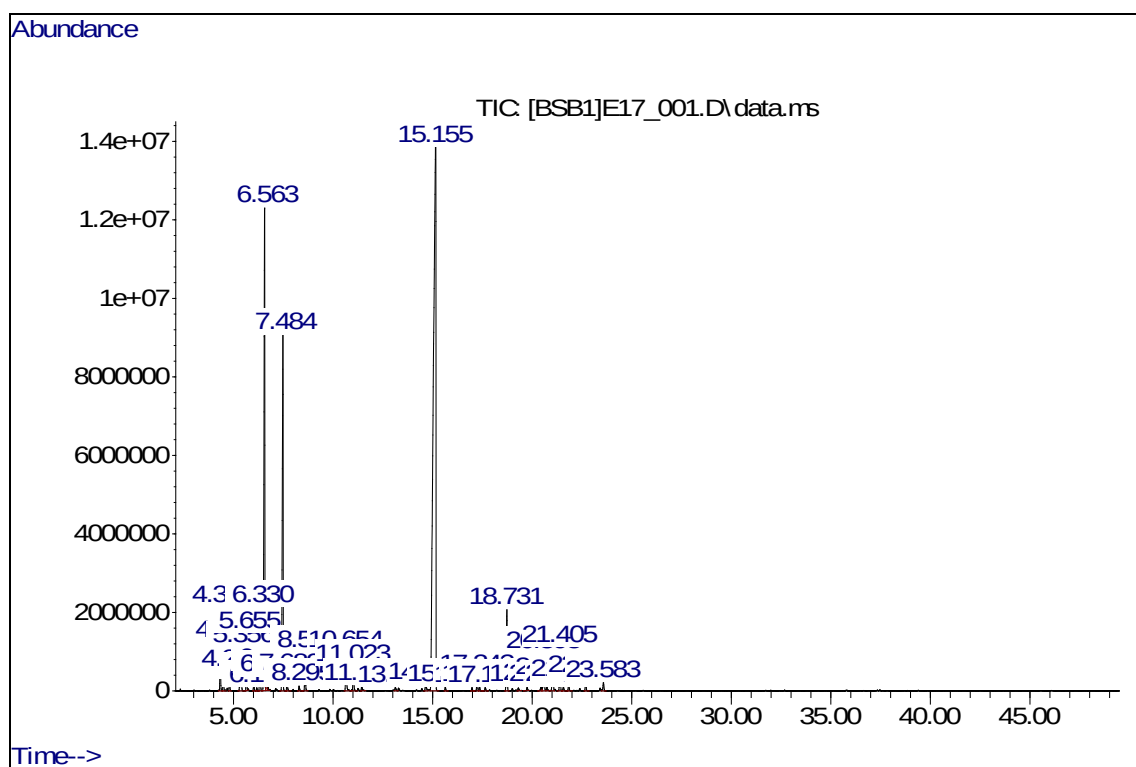
Slika 9.30. Hromatogram etarskog ulja žalfije.



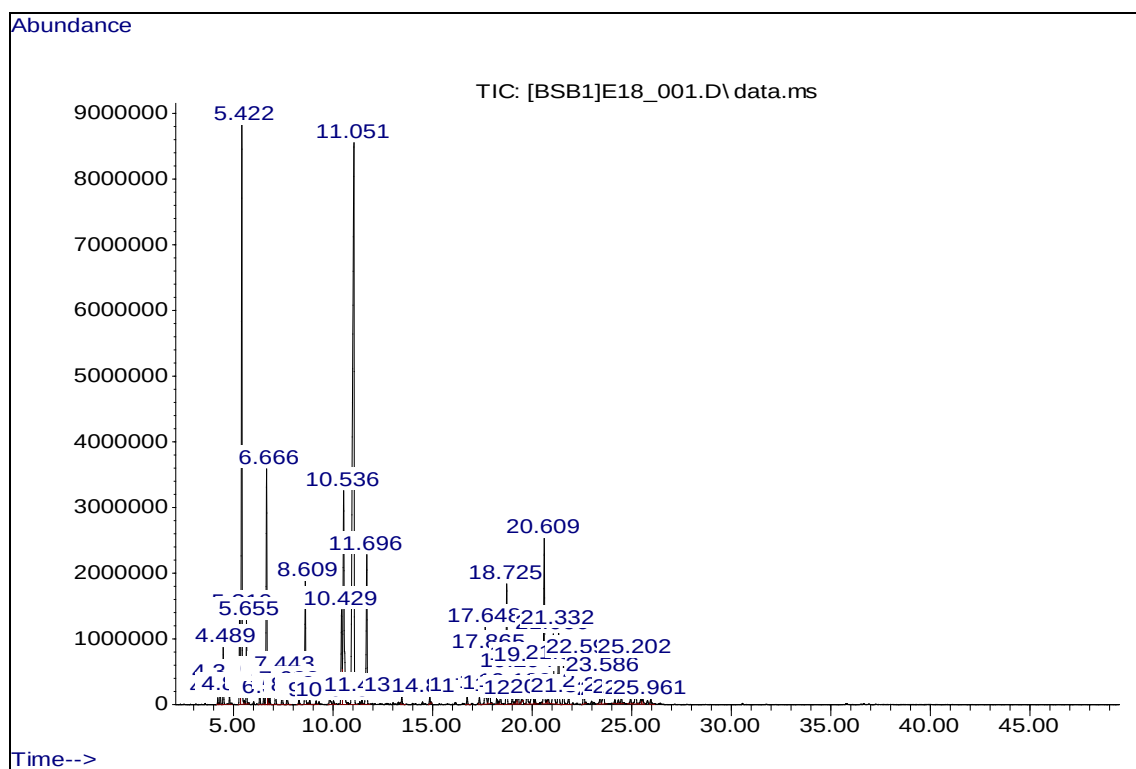
Slika 9.31. Hromatogram etarskog ulja hajdučke trave.



Slika 9.32. Hromatogram etarskog ulja anđelike.



Slika 9.33. Hromatogram etarskog ulja vreska.



Slika 9.34. Hromatogram etarskog ulja miloduha.

BIOGRAFIJA

Suzana Vidaković Knežević je rođena 23.01.1988. godine u Vukovaru, Republika Hrvatska. Osnovnu školu započinje u Boboti (Republika Hrvatska), nastavlja u Usu (Norveška), a završava u Srpskom Miletiću (Srbija). Srednju poljoprivredno prehrambenu školu, smer veterinarski tehničar – ogled, završava u Somboru. Integrisane osnovne i master akademske studije prvog i drugog stepena na studijskom programu „veterinarska medicina“ završava 2014. godine odbranom diplomskog rada pod nazivom „Nova saznanja o infekcijama životinja i ljudi izazvanim uzročnikom *Clostridium difficile*“ na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. U aprilu mesecu 2015. godine se zapošljava u Industriji mesa „Đurđević“, Subotište, gde završava pripravnički staž. Doktorske akademske studije na Fakultetu Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisuje školske 2015/2016. godine. Od oktobra 2016. godine zaposlena je na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu. Trenutno radi na Odeljenju za mikrobiološka i senzorska ispitivanja namirnica na funkciji zamenika šefa.

Posедуje licencu i član je Veterinarske komore Srbije, Udruženja mikrobiologa Srbije i Udruženja jednog zdravlja Srbije.

Bila je angažovana na dva nacionalna projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i 15 inovacionih vaučera Fonda za inovacionu delatnost, od kojih je na četiri bila rukovodilac.

Kao koautor do sada je objavila 11 radova u časopisima od međunarodnog značaja. Kao prvi autor ili koautor objavila je više od 70 radova u časopisima, na skupovima od nacionalnog i međunarodnog značaja. Učestvovala je u izradi 5 tehničkih rešenja.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Suzana Vidaković Knežević

broj upisa 14/12

Izjavljujem

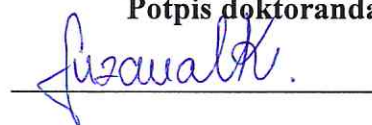
da je doktorska disertacija pod naslovom

UTICAJ ETARSKIH ULJA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE IZOLOVANE U PROCESU PROIZVODNJE MESA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 25.02.2022.

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Suzana Vidaković Knežević

Broj upisa 14/12

Studijski program Doktorske akademske studije

Naslov rada UTICAJ ETARSKIH ULJA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE IZOLOVANE U PROCESU PROIZVODNJE MESA

Mentori Prof. dr Neđeljko Karabasil i doc. dr Sunčica Kocić-Tanackov

Potpisani Suzana Vidaković Knežević

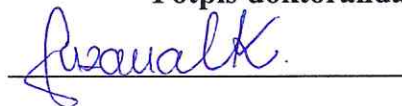
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 25.02.2022.

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetožar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ ETARSKIH ULJA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE IZOLOVANE U PROCESU PROIZVODNJE MESA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

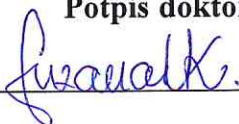
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 25.02.2022.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.