



UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTICAJ ETARSKIH ULJA NA BIOFILMOVE ODABRANIH
SOJEVA ENTEROBAKTERIJA FORMIRANIH NA LISNOJ
POVRŠINI POVRĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Dr Sunčica Kocić-Tanackov

Kandidat:

Ana Varga, dipl. inž.

Novi Sad, 2022. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Ana Varga, dipl. inž.
AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): Dr Sunčica Kocić-Tanackov, docent,
Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u
Novom Sadu

MN

Naslov rada: Uticaj etarskih ulja na biofilmove odabranih
sojeva enterobakterija formiranih na lisnoj
površini povrća

NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2022.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: 7 poglavlja / 161 stranica / 25 tabela / 49
slika / 398 literaturna navoda

FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Prehrambeno inženjerstvo

ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Biofilmovi, enteropatogene bakterije *E. coli* i *S. Typhimurium*, etarska ulja, antimikrobna i antibiofilm aktivnost etarskih ulja, lisnato povrće

PO**UDK****Čuva se:**

Biblioteka Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

ČU**Važna napomena:**

Nema

VN**Izvod:****IZ**

Pojava i učestalost epidemija izazvanih konzumiranjem hrane beleži stalni rast. Tome su doprinele promene u ishrani i težnja savremenih potrošača za konzumiranjem minimalno obrađene hrane koja u najvećoj meri obuhvata sveže voće i lisnato povrće. Kao jedan od čestih izvora kontaminacije navodi se zelena salata koja se pre konzumiranja podvrgava samo pranju. S obzirom na način gajenja, putevi kontaminacije ovog povrća patogenim bakterijama kao što su *Escherichia coli* - *E. coli* i *Salmonella Typhimurium* - *S. Typhimurium* su mnogobrojni. Dodatni problem predstavlja sposobnost ovih patogena da formiraju biofilmove u kojima su zaštićeni od nepovoljnih uslova spoljašnje sredine, a koje je nemoguće potpuno ukloniti pranjem vodom. Činjenica da mikroorganizmi u biofilm formaciji pokazuju znatno veću otpornost prema dejstvu antibiotika i raznih dezinficijensa u odnosu na planktonski oblik, doprinela je izboru etarskih ulja (EU) kao prirodnih jedinjenja velikog i do sada nepotpuno iztraženog antimikrobnog i antibiofilm potencijala. Kulinarske i začinske biljke, bogate EU se od davnina koriste u kulinarstvu i farmaciji, te svako novo saznanje vezano za njihov antimikrobni potencijal može doprineti iznalaženju novog biološkog rešenja za eliminisanje patogena i njihovih biofilмова u hrani, posebno onoj koja se konzumira sveža, kao što je lisnato povrće.

Imajući u vidu navedene činjenice, cilj rada je bio da se ispita antibiofilm potencijal EU prema biofilmovima *E. coli* i *S. Typhimurium* ATCC 14028 formiranim u *in vitro* uslovima i na površini lista zelene salate. S tim u vezi prvo je ispitivana sposobnost izolata *E. coli* različitog porekla da formiraju biofilmove *in vitro* uz prethodno određivanje morfotipa kolonija na Kongo crvenom agaru (KCA) na dve različite temperature, 25 °C i 37 °C. Zatim je izvršeno ispitivanje sposobnosti preživljavanja odabranog izolata *E. coli* (koji je prethodnim testiranjem svrstan u jake biofilm producere) i laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium* u zemljištu pri konstantnim i promenljivim uslovima vlage i temperature tokom 120 dana inkubiranja. Ispitana je sposobnost adherencije i formiranje biofilma ova dva mikroorganizma na površini lista zelene salate na temperaturi od 25 °C i 37 °C. Na kraju je određen uticaj odabranih EU na adherenciju i

formirane biofilmove *E. coli* i *S. Typhimurium* u *in vitro* uslovima i na listu zelene salate. Vizuelizacija biofilma formiranog na površini lista zelene salate izvedena je primenom skening elektronske mikroskopije (SEM).

Određivanjem morfotipa kolonija na KCA na temperaturi inkubiranja od 25 °C utvrđeno je da su testirani izolati *E. coli* formirali kolonije morfotipa RDAR (eng. red, dry and rough), BDAR (eng. brown, dry and rough), RAS (eng. red and smooth) i SAW (eng. smooth and white), dok su na temperaturi inkubiranja od 37 °C formirali kolonije morfotipa, RDAR, BDAR i SAW. Laboratorijski tipski soj *S. Typhimurium* formirao je kolonije morfotipa RDAR na temperaturi inkubiranja od 25 °C, odnosno SAW na temperaturi inkubiranja od 37 °C. Ispitivanjem sposobnosti formiranja biofilma *in vitro* uz kvantifikaciju ukupne mase biofilma primenom kristal violet testa na obe temperature uočen je jak uticaj temperature u smislu većeg broja izolata koji su svrstani u jake biofilm producere na nižoj temperaturi inkubiranja. Uporednom analizom rezultata dobijenih za određivanje morfotipa i sposobnosti formiranja biofilma na obe temperature uočena je pozitivna korelacija između broja izolata *E. coli* koji su formirali RDAR morfotip i broja izolata koji su svrstani u jake biofilm producere. Ispitivanjem sposobnosti preživljavanja odabranog izolata *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu, nakon 120 dana inkubiranja, ustanovljeno je prisustvo vijabilnih ćelija oba mikroorganizma pri konstantnim i pri promenljivim uslovima vlažnosti i temperature. Stopa preživljavanja *S. Typhimurium* bila je veća i pri konstantnim i pri promenljivim uslovima temperature i vlažnosti i iznosila je 0,60% odnosno 0,27%. Stepem adherencije na površinu lista zelene salate tokom 3 h na temperaturi od 25 °C iznosio je 6,75 log cfu/cm² lista za *S. Typhimurium*, odnosno 6,64 log cfu/cm² lista za *E. coli*. Viša temperatura inkubiranja (37 °C) različito je uticala na stepen adherencije ispitivanih mikroorganizama na list zelene salate, generalno ga redukujući na nižu vrednost, pri čemu je kod *S. Typhimurium* redukcija iznosila 50%, a kod *E. coli* 10%. Primenom SEM, na mikrografijama manjeg uvećanja uočeno je formiranje ćelijskih agregata *E. coli* i *S. Typhimurium* na površini lista zelene salate, koji su sastavni deo biofilma dok je na mikrografijama većeg uvećanja uočena interkonekcija između ćelija i formirani biofilm.

Drugi deo ispitivanja sproveden je u cilju određivanja uticaja EU začinskih biljaka bosiljka, mirođije, nane i vreska na inicijalnu ćelijsku adheziju i prethodno formirani biofilm. Pre ispitivanja antimikrobnog i antibiofilm potencijala, analiziran je hemijski sastav EU, koji je pokazao da sva četiri EU sadrže visok % monoterpena. Najzastupljenije identifikovano jedinjenje EU bosiljka bilo je linalool (69,2%), EU mirođije karvon (66,6%) i limonen (25,3%), EU nane mentol (30,8%) i menton (28,8%) i EU vreska p-cimen (33,8%) i karvakrol (32,9%). Najbolji antimikrobni potencijal prema bujonskim kulturama *E. coli* i *S. Typhimurium* pokazalo je EU mirođije, sledi EU bosiljka i vreska, dok je EU nane pokazalo najmanji antimikrobni potencijal, koji je vrednovan dobijenim vrednostima za minimalnu inhibitornu koncentraciju (eng. minimal inhibitory concentration, MIC) i minimalnu baktericidnu koncentraciju (eng. minimal bactericidal concentration, MBC). Etarska ulja pokazala su dozno-zavistan uticaj na inicijalnu ćelijsku adheziju i posledično na formiranje biofilma u *in vitro* uslovima, prema

sledećem redosledu: EU mirođije > EU bosiljka > EU vreska > EU nane (odnosi se na koncentracije EU od 2 MIC). Ispitivanjem uticaja EU na ukupnu masu biofilma *in vitro* dokazano je da EU u primenjenim koncentracijama od 0,5 MIC, MIC i 2 MIC ispoljavaju uticaj na redukciju ukupne mase formiranog biofilma na dozno-zavistan način u funkciji vremena, tako da je najveći % eradikacije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* postignut nakon 60 minuta ekspozicije primenom EU koncentracije 2 MIC prema sledećem redosledu: EU mirođije > EU bosiljka > EU vreska > EU nane. Uticaj EU na prethodno formirani biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* na površini lista zelene salate takođe je zavisio od koncentracije. Posmatrajući njihov uticaj sa aspekta broja vijabilnih ćelija biofilma, najefikasnije je bilo EU mirođije koncentracije 2 MIC, a najmanje efikasno EU nane koncentracije MIC. Najveći % redukcije ukupne mase biofilma i *E. coli* i *S. Typhimurium* postignut je primenom EU koncentracije 2 MIC prema sledećem redosledu: EU mirođije > EU bosiljka > EU vreska > EU nane. Poređenjem rezultata redukcije ukupne mase biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium*, formiranog u *in vitro* uslovima i na površini lista zelene salate, veći procenat redukcije zabeležen je kod biofilmova formiranih u *in vitro* uslovima, što se može objasniti hrapavom strukturom površine lista zelene salate koja je ograničila kontakt EU i biofilma ispitivanih mikroorganizama.

Na osnovu izvedenih ispitivanja, u skladu sa ciljevima ove doktorske disertacije i postignutih rezultata, može se zaključiti da je EU mirođije pokazalo najbolji antimikrobni i antibiofilm potencijal u *in vitro* uslovima i na kuponima lista zelene salate prema oba ispitivana mikroorganizma. Sledi EU bosiljka, vreska i nane. Dobijeni rezultati upućuju da EU ovih biljaka na osnovu dokazanog antimikrobnog i antibiofilm potencijala koji poseduju mogu naći primenu kao sastojci salatnih preliva, mogu da se inkorporiraju u materijale za pakovanje ili u atmosferu pakovanja doprinoseći time zdravstvenoj bezbednosti zelene salate.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 26.10.2018.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

Dr Aleksandra Tepić Horecki, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik
Dr Sunčica Kocić-Tanackov, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor
Dr Ivana Čabarkapa, viši naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu, član

KO

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD thesis
CC

Author: Ana Varga, BSc
AU

Menthor: PhD Sunčica Kocić-Tanackov, Assistant professor,
Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi
Sad

MN

Title: Influence of essential oils on selected enterobacteria
strains biofilms formed on the vegetable leaf surfaces

TI

Language of text: Serbian (Latin)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2022
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: 7 chapters / 161 pages / 25 tables / 49 figures / 398
references

PD

Scientific field: Technological Engineering
SF

Scientific discipline: Food Engineering
SD

Subject, Key words

bacterial biofilms, enteropathogenic bacteria *E. coli* and *S. Typhimurium*, essential oils, antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils, leafy vegetables

SKW**UC****Holding data:**

Library of Faculty of Technology, University of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

HD**Note:**

None

N**Abstract****AB**

The frequency of foodborne outbreaks is constantly increasing. This trend has been contributed to by changes in diet and the desire of modern consumers to consume minimally processed foods, which primarily include fresh fruits and leafy vegetables. Lettuce is one of the frequent sources of contamination, consumed after washing only. Due to the growing techniques, the contamination pathways of this vegetable with pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* - *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium - *S. Typhimurium*, are numerous. An additional problem is the ability of these pathogens to form a biofilm. In biofilms, pathogens are protected from adverse environmental conditions and cannot be entirely removed by water washing. The fact that microorganisms in biofilm formation show significantly higher resistance to antibiotics and various disinfectants compared to planktonic form, contributed to the choice of essential oils (EOs). EOs as natural compounds of great and until now incompletely investigated antimicrobial and antibiofilm potential. Culinary and spice plants rich in EOs have long been used in cooking and pharmacy, and any new knowledge about their antimicrobial potential can contribute to finding a new biological solution to eliminate pathogens and their biofilms in food, especially those consumed fresh as leafy vegetables.

Having in mind this fact, this study aimed to examine the effect EOs on the removal of biofilms of *E. coli* and *S. Typhimurium* ATCC 14028 formed *in vitro* and on lettuce leaves. In this regard, the ability of *E. coli* isolates of different origins to form biofilms *in vitro* was examined. Previous, the morphotype of the colonies on the Congo Red Agar (CRA) at two different temperatures, 25 °C and 37 °C, was determined, as well as the viability of the selected *E. coli* isolates, previously classified as a strong biofilm producer. Furthermore, the viability of the laboratory-type strain *S. Typhimurium* in soil under constant and variable humidity and temperature during 120 days of incubation was investigated, along with these two microorganisms' ability to adhere and form a biofilm on the lettuce leaves surface at temperatures of 25 °C and 37 °C. Finally, the influence of selected EO on adherence and formed biofilms of *E. coli* and *S. Typhimurium* *in vitro* and on lettuce leaf was examined. Obtained biofilm visualization was performed using scanning electron microscopy (SEM).

By determining the colony morphotypes on CRA at an incubation temperature of 25 °C, the tested isolates of *E. coli* formed colony morphotypes RDAR (red, dry and rough), BDAR (brown, dry and rough), RAS (red and smooth) and SAW (smooth and white), while at an incubation temperature of 37 °C they formed colony morphotypes, RDAR, BDAR and SAW. The laboratory-type strain *S. Typhimurium* formed the RDAR and SAW morphotype at incubation temperatures of 25 °C and 37 °C, respectively. Examination of the ability to form biofilms *in vitro* with quantification of total biofilm mass using crystal violet test at both temperatures showed a strong influence of temperature in terms of a higher number of isolates classified as strong biofilm producers at lower incubation temperature. A comparative analysis of the results obtained to determine morphotype and biofilm formation ability at both temperatures showed a positive correlation between the number of *E. coli* isolates that formed the RDAR morphotype and the number of isolates classified as strong biofilm producers. By examining the viability of the selected isolate of *E. coli* and *S. Typhimurium* in soil, after 120 days of incubation, the presence of viable cells of both microorganisms was detected under both constant and variable conditions of humidity and temperature. The survival rate of *S. Typhimurium* was higher under both constant and variable temperature and humidity conditions and was 0.60% and 0.27%, respectively. The adhesion degree to the surface of lettuce leaves for 3 h at a temperature of 25 °C was 6.75 log cfu/cm² leaves for *S. Typhimurium* and 6.64 log cfu/cm² leaves for *E. coli*. Higher incubation temperature (37 °C) differently affected the degree of adhesion of the tested microorganisms to a lettuce leaf, generally reducing it to a lower value, with a reduction of 50% in *S. Typhimurium* and 10% in *E. coli*. Using SEM, low magnification micrographs showed the formation of *E. coli* and *S. Typhimurium* cell aggregates on the surface of lettuce leaves, which are an integral part of the biofilm, while high magnification micrographs showed interconnection between cells and the formed biofilm.

Therefore, the second part of the research within this doctoral dissertation aimed to examine the influence of EOs of spice plants of basil, dill, mint, and heather on the initial cell adhesion and preformed biofilm. Before testing the antimicrobial and antibiofilm potentials, the chemical composition of the EOs was analyzed, this showed that all four EOs contain a high share of monoterpenes. The major compounds of basil EO were linalool (69.2%), dill EO carvone (66.6%) and limonene (25.3%), mint EO menthol (30.8%) and menthone (28.8 %) and heather EO p- cymene (33.8%) and carvacrol (32.9%). The best antimicrobial potential against the broth cultures of *E. coli* and *S. Typhimurium* showed dill EO, followed by EOs of basil and heather, while mint EO showed the lowest antimicrobial potential. The antimicrobial potential was evaluated based on the obtained values for minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

Tested EOs showed a dose-dependent effect on initial cell adhesion and consequently on biofilm formation *in vitro* according to the following order: dill EO > basil EO > heather EO > mint EO (refers to EO concentrations of 2 MIC). By examining the influence of the EO on the total mass of biofilm *in vitro*, it was proved that EOs in applied concentrations of 0.5 MIC, MIC, and 2

MIC have an effect on reducing the total mass of preformed biofilm in a dose-dependent manner as a function of time. Eradication of preformed biofilms of *E. coli* and *S. Typhimurium* were achieved after 60 minutes of exposure to EOs in concentration of 2 MIC in the following order: EO dill > EO basil > EO heather > EO mint. The influence of the EO on the preformed biofilm of *E. coli* and *S. Typhimurium* on the surface of lettuce leaves showed also a dose-dependent manner as a function of time. Observing their influence regarding to the number of viable biofilm cells, the most effective was EO dill in a concentration of 2 MIC, and the least efficient was EO dill in a concentration of MIC. The highest % reduction of the total biofilm mass of both *E. coli* and *S. Typhimurium* was determined by applying the EO concentration of 2 MIC in the following order: EO dill > EO basil > EO heather > EO mint. By comparing the results of reducing the total mass of *E.coli* and *S. Typhimurium* biofilms formed *in vitro* and on the surface of lettuce leaves, a higher percent reduction was observed in biofilms formed *in vitro*. This result can be explained by the rough surface structure of lettuce leaves, which limited the contact between the EO and the biofilm of the tested microorganisms.

Based on the performed tests following the goals of this doctoral dissertation and the achieved results, it can be concluded that dill EO showed the best antimicrobial and antibiofilm potential *in vitro* and on lettuce coupons against both tested microorganisms. It is followed by basil, heather and mint EOs. Obtained results indicated that investigated EOs next to be used as ingredients in salad dressings also can be incorporated into packaging materials as well as packaging atmosphere. Based on their proven antimicrobial and antibiofilm potential their application can contribute to food safety and lead to improving health safety in general.

Accepted on Senate on: 26.10.2018.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board: PhD Aleksandra Tepić Horecki, Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, president
PhD Sunčica Kocić-Tanackov, Assistant Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, mentor
PhD Ivana Čabarkapa, Senior Research Associate, Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad, member

DB

Zahvalnica

Spisak oznaka, skraćenica i simbola

ANN	eng. „Artificial Neural Network“
ATCC	eng. „American Type Culture Collection“
a_w	Aktivnost vode
BDAR	eng. „brown, dry and rough“
cfu	eng. „colony forming unit“
CLSI	eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
ECM	Ekstracelularni matriks
EFSA	eng. „European Food Safety Authority“
EPS	Ekstracelularna polimerna supstanca
ESBL	eng. „extended spectrum β -lactamases“
EU	Etarsko ulje
FR	Fiziološki rastvor
GC/MS	Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom
HAL	eng. Harlequin - Salmonella ABC agar
KCA	Kongo crveni agar
LBA	Luria-Bertani agar
MALDI - MS	eng. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry“
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija
MBEC	Minimalna biofilm eradikaciona koncentracija
MBIC	Minimalna biofilm inhibitorna koncentracija
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
OD	eng. „Optical density“
PCA	eng. Plate count agar
PCA*	eng. „Principal Components Analysis“
PCR	eng. „Polymerase Chain Reaction“
PDAR	eng. „pink, dry and rough“
QS	eng. „quorum sensing“
RAS	eng. „red and smooth“
RDAR	eng. „red, dry and rough“
RV	Relativna vlažnost
SAW	eng. „smooth and white“
SBAM	eng. „smooth brown and mucoid“
SD	Standardna devijacija
SEM	Skening elektronska mikroskopija
spp.	vrste - lat. „species“
SPR	Slani peptonski rastvor
SS	eng. Salmonella - Shigella agar
T	Temperatura
TBX	eng. Tryptone Bile Glucuronic Agar
TOF	eng. „Time of Flight“
TSA	eng. Tryptone Soya Agar

TSB
XLD

eng. Tryptone Soya Broth
eng. Xylose Lysine Deoxycholate Agar

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Enteropatogene bakterije - kontaminanti hrane	3
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1.1. Alimentarna oboljenja uzrokovana <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.2. <i>Salmonella</i> spp.	7
2.1.2.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium	8
2.1.2.2. Alimentarna oboljenja uzrokovana <i>Salmonella</i> spp.	9
2.2. Mikrobiološka kontaminacija lisnatog povrća	11
2.2.1. Značaj povrća u ishrani	11
2.2.2. Epidemije izazvane konzumiranjem lisnatog povrća	12
2.2.3. Salata (<i>Lactuca sativa</i>)	14
2.2.4. Zemljište kao izvor patogenih bakterija	16
2.2.5. Kolonizacija i mehanizam vezivanja patogenih bakterija za biljku	18
2.2.5.1. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama	18
2.2.5.2. Faktori adherencije patogenih bakterija	20
2.2.6. Odgovor biljaka na napad patogenih bakterija	23
2.3. Biofilm	24
2.3.1. Definicija biofilma	24
2.3.2. Faze formiranja biofilma	24
2.3.2.1. Vezivanje bakterija za površinu	25
2.3.2.2. Formiranje mikrokolonija	26
2.3.2.3. „Quorum sensing“	26
2.3.2.4. Maturacija (sazrevanje biofilma)	28
2.3.2.5. Ekstracelularni matriks	28
2.3.2.6. Disperzija biofilma	29
2.3.3. Ekstracelularni matriks <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella</i> Typhimurium	30
2.3.3.1. Biofilm fenotip i genetska regulacija komponenti matriksa biofilma <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella</i> Typhimurium	32
2.3.4. Otpornost biofilmova na dejstvo antimikrobnih sredstava	36
2.3.5. Antibiofilm metode	38
2.3.5.1. Biofilmovi na opremi i njihovo uklanjanje	39
2.3.5.2. Biofilmovi na površini hrane i njihovo uklanjanje	39
2.4. Etarska ulja u prehrambenoj industriji	41
2.4.1. Porodica <i>Apiaceae</i>	42
2.4.1.1. Mirođija (<i>Anethum graveolens</i>)	43
2.4.2. Porodica <i>Lamiaceae</i>	43

2.4.2.1. Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i>)	44
2.4.2.2. Nana (<i>Mentha piperita</i>)	45
2.4.2.3. Vresak (<i>Satureja montana</i>)	45
2.4.3. Hemijski sastav etarskih ulja	46
2.4.4. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja	48
2.4.5. Etarska ulja i biofilm	49
3. CILJ RADA	50
4. MATERIJAL I METODE	52
4.1. Kulture mikroorganizama	52
4.1.1. Kulturne i biohemijske karakteristike <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella</i> Typhimurium	52
4.1.2. Potvrđivanje ispitivanih mikroorganizama MALDI - TOF MS metodom	56
4.1.3. Potvrđivanje <i>Salmonella</i> Typhimurium real - time PCR metodom	57
4.2. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma	58
4.2.1. Određivanje morfotipa kolonija <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella</i> Typhimurium na Kongo crvenom agaru	58
4.2.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija za kristal violet test	59
4.2.3. Određivanje sposobnosti formiranja biofilma kristal violet testom	60
4.3. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella</i> Typhimurium u zemljištu	62
4.3.1. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija	62
4.3.2. Inokulacija zemljišta	63
4.3.3. Određivanje a_w vrednosti zemljišta	63
4.4. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma na lisnoj površini povrća	64
4.4.1. Priprema kupona lista zelene salate	64
4.4.2. Određivanje sposobnosti adherencije na lisnu površinu povrća	65
4.4.3. Formiranje biofilma na lisnoj površini povrća	66
4.4.4. Skening elektronska mikroskopija (SEM)	66
4.5. Etarska ulja	67
4.5.1. Biljni materijal	67
4.5.2. Ekstrakcija etarskih ulja	67
4.5.3. Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja	68
4.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja	68
4.6.1. Priprema rastvora resazurina	68
4.6.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija za ispitivanje antimikrobne aktivnosti	69
4.6.3. Bujon mikrodiluciona metoda	69
4.7. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju i formirani biofilm	71
4.7.1. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju	71

4.7.2. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm <i>in vitro</i>	72
4.7.3. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm na lisnoj površini povrća	73
4.7.4. Vizuelizacija uticaja etarskih ulja na formirani biofilm na lisnoj površini povrća primenom SEM	73
4.8. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata	74
4.8.1. Veštačke neuronske mreže - ANN modeli (Artificial Neural Network)	75
5. REZULTATI I DISKUSIJA	77
5.1. Kulturelne i biohemijske karakteristike <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i>	77
5.2. Identifikacija <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> MALDI - TOF masenom spektrometrijom	77
5.3. Identifikacija <i>Salmonella Typhimurium</i> real - time PCR metodom	80
5.4. Morfotipovi kolonija <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> na Kongo crvenom agaru	80
5.5. Sposobnost formiranja biofilma <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> primenom kristal violet testa	83
5.6. Preživljavanje <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> u zemljištu	86
5.7. Određivanje sposobnosti adherencije <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> na lisnu površinu povrća	91
5.8. SEM biofilmova <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> formiranih na površini lista zelene salate	93
5.9. Hemijski sastav etarskih ulja	96
5.9.1. Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka (<i>Ocimum basilicum</i>)	96
5.9.2. Hemijski sastav etarskog ulja nane (<i>Mentha piperita</i>)	98
5.9.3. Hemijski sastav etarskog ulja vreska (<i>Satureja montana</i>)	100
5.9.4. Hemijski sastav etarskog ulja mirođije (<i>Anethum graveolens</i>)	102
5.10. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja	103
5.11. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium in vitro</i>	106
5.12. Uticaj etarskih ulja na prethodno formirani biofilm <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium in vitro</i>	109
5.13. Uticaj etarskih ulja na prethodno formirani biofilm <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> na lisnoj površini povrća	114
5.14. SEM biofilmova <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella Typhimurium</i> formiranih na površini lista zelene salate nakon delovanja etarskih ulja	118
5.15. Analiza glavnih komponenata (PCA analiza)	120
5.16. Veštačke neuronske mreže	121
6. ZAKLJUČAK	125

**7. LITERATURA
PRILOZI**

**128
155**

1. UVOD

Procenjuje se da više od 90% mikroorganizama koje naseljavaju živu i neživu prirodu živi u strukturnoj zajednici ćelija, jer ona predstavlja efikasniji način preživljavanja u za njih „negostoljubivim“ sredinama (Simões i sar., 2010). Ove „negostoljubive“ uslove mikroorganizmi preživljavaju ulaskom u tzv. vijabilno ali nekultivabilno stanje (eng. viable but nonculturable state, VBNC) (Xu i sar., 2010). Sposobnost mikroorganizama da pređu u VBNC stanje usko je povezana sa njihovom sposobnošću formiranja biofilma (Donlan i sar., 2002; Hall-Stoodley i Stoodley, 2005). Zreo biofilm sastoji se od bakterijskih ćelija uklopljenih u ekstracelularnu polimernu supstancu (EPS) ispresecanu intersticijalnim kanalima, koji omogućavaju dotok hranljivih materija i eliminaciju otpadnih produkata metabolizma ćelija (Fux i sar., 2004). Zahvaljujući EPS koja deluje kao difuziona barijera, molekularno sito ili adsorbent, mikroorganizmi u biofilmu pokazuju veću rezistentnost na antimikrobne tretmane i sredstva u poređenju sa sestrinskim planktonskim ćelijama, eksprimujući nove gene za otpornost (Milanov i sar., 2008).

Adhezijom za čestice zemlje i sedimenta, uz formiranje biofilma, ćelije mikroorganizama mogu perzistirati više od godinu dana. Kontaminirajući zemljište, i biljke mogu biti kontaminirane. Suprotno do nedavno opšte prihvaćenom mišljenju da do kontaminacije biljaka dolazi površinski, prilikom zalivanja kontaminiranom vodom ili neadekvatnim postupcima transporta i prerade, skorija istraživanja su pokazala da patogene bakterije mogu kontaminirati biljke i intracelularno, u svim stadijumima njihovog rasta (Oliveira i sar., 2012). Pri tome, bakterijske ćelije koje dospeju do različitih jestivih delova biljke ne prijanjaju, već čvrsto adheriraju za biljnu površinu, formirajući biofilm (Yaron i Römling, 2014). Poseban problem predstavljaju bakterijski biofilmovi formirani na svežem ili minimalno prerađenom povrću (eng. ready to eat). Sa tog aspekta je posebno značajno lisnato povrće koje se najvećim delom koristi sveže, bez prethodne termičke obrade i koje predstavlja pogodan supstrat za vezivanje i formiranje biofilmova patogenih bakterija.

Prema preporuci Svetske zdravstvene organizacije (eng. The World Health Organization, WHO 2008) povrće treba da bude neizostavni i svakodnevni sastojak uključen u ishranu. Prema podacima FAOSTAT (2016), proizvodnja povrća je u periodu od 1990. do 2011. godine porasla za oko 150% u odnosu na period od 1970. do 1990. godine. Na globalnu potrebu za povrćem nije uticao samo porast broja stanovništva, već i promene u načinu života i ishrane, naročito u razvijenim zemljama. Bogatstvo u hranljivim i zaštitnim materijama čini povrće značajnom namirnicom u savremenoj, zdravstveno bezbednoj ishrani. Posebnu vrednost povrću, kao hrani koja se konzumira u svežem stanju daju vitamini i mineralne materije i niz drugih specifičnih sastojaka, kao što su organske kiseline, etarska ulja (EU), fitoncidi i dr., koji daju bolji ukus, nadražuju i aktiviraju organe za varenje i neophodni su u zdravoj ishrani čoveka (Vračar, 2012; Oguntibeju i sar., 2013).

Uprkos zdravstvenim blagodetima koje nam pruža, rizik od mikrobiološke kontaminacije povrća nije zanemarljiv. Kao najznačajniji mikrobni kontaminanti svežeg povrća, odgovorni za pojavu alimentarnih toksikoinfekcija, navode se *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*, i to ne zbog incidencije oboljenja, koja je mnogo niža nego kod ostalih alimentarnih patogena (kao što je *Campylobacter*), već zbog težine simptoma i niskih infektivnih doza (European Food Safety Authority, EFSA 2017).

Mikrobni kontaminanti svežeg povrća dospevaju u spoljašnju sredinu iz digestivnog trakta ljudi i životinja putem izmeta i mokraće, čime se otvara put ka njihovom nesmetanom ulasku u vodotokove i zemljište. Time i voda i zemljište mogu postati ne samo izvor kontaminacije, već i prenosnik između domaćina (Pavlović i sar., 2014; López-Martín i sar., 2016).

Iako je poslednjih decenija ubrzan tehnološki razvoj doveo do uvođenja novih tehnologija u proizvodnji hrane u cilju dobijanja zdravstveno, nutritivno i tehnološki bezbednog proizvoda, učestalost kontaminacije lisnatog povrća sa *Salmonella* spp. i *E. coli* nije zanemarljiva. Dodatni problem predstavlja činjenica da je u slučaju pojave mikrobiološke kontaminacije svežeg povrća veoma teško izvršiti njegovu dekontaminaciju, s obzirom da se pranjem vodom može ukloniti samo oko 10% enteropatogena (Ključev, 2012).

U cilju uklanjanja mikrobih kontaminata svežeg povrća koriste se različite fizičke i hemijske metode, pojedinačno ili u kombinaciji. Fizičke metode, pored tradicionalne primene pranja (ručno ili mašinski), uključuju korišćenje inovativnih metoda zasnovanih na primeni ultrazvuka, magnetnog i električnog polja, hladne atmosferske plazme, kao i različitih vrsta zračenja. Od hemijskih metoda u cilju mikrobiološke dekontaminacije svežeg povrća najčešće se primenjuje: tretman hlorom, vodonik peroksidom, ozonom, organskim kiselinama i dr. (Akbas i Ölmez, 2007; Gil i sar., 2009). Iako pomenute metode pokazuju dobre rezultate, ni jedna od njih ne dovodi do potpunog uklanjanja mikrobih kontaminata svežeg povrća, a često su neprimenljive i iz ekonomskih razloga, jer zahtevaju određenu tehničku i prostornu opremljenost. S druge strane, upotreba hemijskih jedinjenja usled neadekvatne primene može biti uzrok zaostajanja nepoželjnih hemijskih rezidua, potencijalno štetnih po ljudsko zdravlje. Navedeni nedostaci pomenutih metoda i visoki zahtevi potrošača za hranom koja je minimalno tehnološki obrađena, bez sintetičkih konzervanasa i aditiva, nalažu iznalaženje alternativnih metoda za uklanjanje i inaktivaciju prisutne mikroflore lisnatog povrća (Kocić-Tanackov i sar., 2014; Laranjo i sar., 2017). Širok dijapazon zdravstveno i ekološki prihvatljivih prirodnih antimikrobih jedinjenja kao što su EU i ekstrakti aromatičnih biljaka, kao i aktuelna pažnja naučne javnosti o njihovom uticaju na mikrobne kontaminante s jedne, a manjak podataka o njihovom mogućem uticaju na bakterijske biofilme s druge strane, doprinela je odabiru teme ove doktorske disertacije, čiji je cilj bio da se ispita antibiofilm potencijal EU začinskih biljaka bosiljka, mirođije, nane i vreska na biofilme formirane od strane *E. coli* i *S. Typhimurium* u *in vitro* uslovima i na površini lista zelene salate.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Enteropatogene bakterije - kontaminanti hrane

Među najučestalije mikrobiološke kontaminante hrane ubrajaju se vrste roda *Escherichia* i *Salmonella* spp., pripadnici porodice *Enterobacteriaceae*. Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvata veliki broj bakterija, čak preko 170 vrsta, koje su svrstane u 53 roda. Naziv potiče od grčke reči „enteron“, što u prevodu znači crevo, iako su samo neke vrste pripadnici stalne mikroflore gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja. Sem pomenuta dva roda, porodici *Enterobacteriaceae* pripadaju i vrste rodova *Proteus*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia* i dr. Sa zdravstvenog aspekta pojedini pripadnici ovih rodova se ubrajaju u izrazite patogene, jer mogu da izazovu veliki broj različitih oboljenja kod ljudi, koja se uglavnom manifestuju teškom kliničkom slikom obolelog. Najčešća oboljenja izazvana pojedinim vrstama iz porodice *Enterobacteriaceae* su: septikemija, pneumonija, meningitis, infekcije urinarnog trakta, bolesti organa za varenje, kao i mnoge druge bolesti (Rock i Donnenberg, 2014). Hrana u kojoj se ustanovi prisustvo enterobakterija smatra se zdravstveno nebezbednom (Škrinjar i Tešanović, 2007).

2.1.1. *Escherichia coli*

Rod *Escherichia*, zajedno sa rodovima *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, pripada grupi tzv. koliformnih bakterija, koje se od ostalih rodova iz porodice *Enterobacteriaceae* razlikuju po tome što fermentuju laktozu. Čitava grupa je dobila naziv po najkarakterističnijem predstavniku - vrsti *Escherichia coli*. Koliformne bakterije čine sastavni deo crevne mikroflore ljudi i životinja. U spoljašnju sredinu dospevaju preko izmeta životinja i ljudi, kontaminirajući živu i neživu prirodu. Prisustvo koliformnih bakterija u hrani i vodi se smatra indikatorom fekalne kontaminacije. Krug prenosa je fekalno-oralni. Značaj *E. coli* kao uzročnika velikog broja bolesti kod ljudi leži pre svega u činjenici da može biti povezana sa infekcijom gotovo svakog organa i tkiva (Karakašević i sar., 1969).

Escherichia coli je otkrio nemački pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich 1885. godine iz stolice novorođenčadi, i nazvao ju je *Bacterium coli commune*. Tek 1920. godine vrsta je dobila sadašnji naziv. Naime, te godine Castellani i Chalmers izolovali su i druge bakterije tipa *Escherichia* i u taj rod uvrstili i *Bacterium coli* pod nazivom *Escherichia coli*, u čast njenog pronalazača. Kompletni genom *E. coli* sekvencioniran je tek 1997. godine (Kocić-Tanackov i sar., 2022).

Escherichia coli je gram-negativna štapićasta asporogena bakterija. Štapići *E. coli* su veličine 2-6 µm i mogu biti raspoređeni pojedinačno, u parovima ili nepravilnim grupama. Većina sojeva *E. coli* je pokretna pomoću peritrihijalnih flagela. Ne obrazuje spore, a neki sojevi *E. coli* imaju kapsulu. Razmnožava se u aerobnim ili fakultativno anaerobnim uslovima u temperaturnom intervalu od 10 do 46 °C. S druge strane, prema nekim autorima može se razmnožavati i na temperaturi od 4 °C, pa i nižoj (ispod 0 °C). Minimalna a_w vrednost (sadržaj slobodne vode, a_w) za rast i razmnožavanje *E. coli* je 0,93, a minimalna pH vrednost 4,3. *Escherichia coli* spada u prilično otporne bakterije. U zemljištu i vodi može živeti mesecima. U pojedinim životnim namirnicama, kao što su sveže povrće, voće i žitarice veoma se lako razmnožava. Temperatura od 60 °C tokom 15 minuta delovanja ima letalni efekat za *E. coli*, što znači da hrana koja tokom procesa proizvodnje podleže procesu pasterizacije ($T = 70-80$ °C), ne bi smela da sadrži *E. coli*, pod uslovom da je taj postupak adekvatno sproveden (Kocić-Tanackov i sar., 2022).

Escherichia coli je osetljiva na hlor i hlorna jedinjenja, dok prema različitim antibioticima i hemoterapeuticima vrlo brzo postaje rezistentna (Kocić-Tanackov i sar., 2022).

2.1.1.1. Alimentarna oboljenja uzrokovana *Escherichia coli*

Oboljenja izazvana *E. coli* dele se na:

- Intestinalna (crevna);
- Ekstraintestinalna: infekcije urinarnog trakta, sepsa, zapaljenje pluća, upala trbušne maramice, upala slepog creva, meningitis kod novorođenčadi itd.

Postoje različiti biotipovi, serotipovi i varijeteti *E. coli*, koji se međusobno razlikuju prema biohemijskim, fiziološkim i serološkim osobinama. Svi tipovi *E. coli* sadrže endotoksin koji je po svom sastavu polisaharidno-lipido-polipeptidski kompleks i sastavni je deo ćelijskog zida (Lalošević i sar., 2011). Serološki se razlikuju tipovi na osnovu O, H i K antigena. Somatski ili O - antigen je termostabilan lipopolisaharid na površini ćelije, flagelarni ili H - antigen je termolabilan protein prisutan na flagelama (Rock i Donnenberg, 2014). Kapsularni ili K - antigen poseduju serotipovi *E. coli* koji imaju kapsulu i ovaj antigen je po svom sastavu polisaharid ili protein. Prisustvo K - antigena povećava patogeni potencijal soja. Do sada je identifikovano preko 170 O - antigena, preko 50 H - antigena i više od 100 K - antigena. Na osnovu O - antigena izvedena je podela sojeva *E. coli* na serogrupe, a na osnovu H - antigena na serotipove (Lalošević i sar., 2011).

Poznato je pet seroloških tipova *E. coli*, koji su izazivači intestinalnih infekcija:

- Enterotoksigeni sojevi *E. coli* (ETEC);
- Enteropatogeni sojevi *E. coli* (EPEC);

- Enteroinvazioni sojevi *E. coli* (EIEC);
- Enteroagregativni sojevi *E. coli* (EAggEC);
- Enterohemoragični sojevi *E. coli* (EHEC) (Miri i sar., 2017).

Enterotoksigeni sojevi *E. coli* (ETEC), kao što i sam naziv govori, sintetišu različite toksine, od kojih je za ljude najznačajniji enterotoksin. Enterotoksin je po sastavu lipopolisaharid i sastoji se od dve komponente koje se međusobno razlikuju prema osetljivosti na dejstvo povišenih temperatura. Termostabilna komponenta je otporna na visoke temperature i njena struktura se narušava tek na 100 °C nakon 30 minuta delovanja. Termolabilna komponenta je osetljiva prema dejstvu povišenih temperatura, i do narušavanja njene strukture dolazi već na temperaturi od 65 °C za isto vreme delovanja (30 minuta). Za kompletno dejstvo toksina ETEC sojeva odgovorna je termolabilna komponenta (Kocić-Tanackov i sar., 2022).

Dejstvo termolabilnog enterotoksina *E. coli* slično je dejstvu enterotoksina *Vibrio cholerae* - uzročnika kolere, i dovodi do stimulacije adenilciklaze koja je vezana za membranu creva, pri čemu dolazi do konverzije adeniltrifosfata u adenilmonofosfat koji izaziva ekskreciju jona hlora (Cl⁻) i inhibira apsorpciju jona natrijuma (Na⁺). Time se narušava elektrolitička ravnoteža na crevnoj mukozi i dolazi do gubitka velikih količina tečnosti uz pojavu vodenaste dijareje, dehidracije i demineralizacije organizma, koja je praćena mučninom sa ili bez povraćanja i opštom malaksalošću. Enterotoksigeni sojevi *E. coli* su najčešći uzročnici dijareje kod dece i smrtnost od infekcije ovom bakterijom je naročito izražena kod dece u zemaljama u razvoju. Pored navedenog, enterotoksigeni sojevi *E. coli* su uzročnici dijareje i kod životinja, i to svinja, ovaca, koza, pasa i konja (Kabir i sar., 2012).

Enteropatogeni sojevi *E. coli* (EPEC) ne stvaraju toksine, već se uz pomoć specifičnih fimbrija i adhezina intimina vezuju za enterocite, pri čemu dolazi do oštećenja ćelija domaćina u vidu gubitka mikrovila koje je praćeno ravnanjem citoskeleta epitelnih ćelija. Faktor virulencije koji je odgovoran za ravnanje citoskeleta epitelnih ćelija je LEE (eng. locus of enterocyte effacement) (Mc Daniel i sar., 1995). Enteropatogeni sojevi *E. coli* kod ljudi dovode do akutnog gastroenteritisa, pri čemu su simptomi oboljenja slični onima nastalim usled dizenterije. Kod obolelog dolazi do pojave abdominalnih grčeva praćenih dijarejom, a u izmetu se može konstatovati prisustvo gnoja, sluzi i leukocita. Kao i enterotoksigeni, tako i enteropatogeni sojevi *E. coli*, vrlo često izazivaju dijareje kod novorođenčadi i kod domaćih životinja kao što su zečevi, psi, mačke, konji (Kaper i sar., 2004).

Enteroinvazioni sojevi *E. coli* (EIEC) su uzročnici infekcija samo kod ljudi. Invazijom ćelija zida creva od strane EIEC sojeva *E. coli*, dolazi do njegovog mehaničkog oštećenja u vidu mikroapscesa i ulceracija i razvoja upalnog procesa. Početni stadijum infekcije praćen je vodenastom dijarejom koja u kasnijim fazama bolesti prelazi u krvavo sluzavu, praćenu visokom temperaturom. Simptomi su identični kao kod bolesti izazvanih *Shigella* spp., tako da je radi postavljanja tačne dijagnoze neophodno izolovanje uzročnika iz izmeta obolelog. Enteroinvazivni sojevi *E. coli* ne sintetišu toksine i od ostalih sojeva *E. coli* se razlikuju po tome

što poseduju *ipaH*-gen koji je prisutan isključivo kod EIEC sojeva i kod *Shigella* spp. (Beld i Reubsæet, 2012).

Enteroagregativni sojevi *E. coli* (EAggEC) su, kao i EIEC sojevi, izazivači humanih infekcija. Dovode do pojave vodenaste dijareje prvenstveno kod novorođenčadi. Sintetišu hemolizine i termostabilni enterotoksin, koji je sličan toksinu koji sintetišu ETEC sojevi (Weintraub, 2007).

Enterohemoragični sojevi *E. coli* (EHEC) najčešći su uzročnik dijareja u razvijenim zemljama. Enterohemoragična *E. coli* sintetiše toksin koji je sličan toksinu *Shigella* pa je i dobio naziv *Shiga-like* toksin, a koji je ujedno i glavni faktor virulencije ovog soja (Evans i sar., 1996, Lalošević i sar., 2011). Inkubacioni period kod infekcija izazvanih EHEC sojevima traje tri dana, nakon čega dolazi do pojave, kao i kod većine infekcija izazvanih *E. coli*, vodenaste dijareje koja u kasnijim fazama bolesti prelazi u krvavu. Najpoznatiji EHEC serotip *E. coli* je O157:H7, koji dovodi do krvavih dijareja bez povišene temperature, do pojave hemoragičnog kolitisa (zapaljenja creva), kao i do pojave hemolitičkog uremičkog sindroma (HUS) (Karch, 2001; Tarr i sar., 2005). Hemolitički uremički sindrom je, prema kliničkoj slici obolelog, najteži oblik infekcije EHEC sojevima *E. coli*. Kod 3-5% obolelih završava se smrtnim ishodom. To je teško bubrežno oboljenje koje nastaje nakon što *Shiga* toksin EHEC premosti crevnu barijeru i ošteti endotelne i tubularne ćelije domaćina, što može izazvati prestanak rada bubrega. Izrazito niska infektivna doza za razvoj infekcije, koja iznosi svega 10-100 cfu, svrstava EHEC sojeve *E. coli* u sam vrh patogena opasnih po ljudsko zdravlje (Karch i sar., 2005). Oko jedne trećine domaćih preživara, od kojih najviše svinje, konji i jeleni, su asimptomatski nosioci i ujedno glavni rezervoar serotipa O157:H7 (Lalošević i sar., 2011).

Ekstraintestinalne infekcije najčešće nastaju kao posledica migracije *E. coli* iz fecesa kroz uretru do organa za izlučivanje. U ekstraintestinalne infekcije *E. coli* spadaju infekcije mokraćnih puteva kao što je infekcija uretre (uretritis), mokraćne bešike (cistitis), bubrežne karlice i bubrega (pijelonefritis), infekcije žučnih puteva itd. Nastanku ekstraintestinalnih infekcija *E. coli* pogoduju razne urođene ili novonastale anomalije mokraćnog sistema kao što su tumori, kamenci, uvećana prostata, prisustvo stranih tela (urinarni kateteri), kao i druge bolesti organizma (dijabetes, bolesti imunog sistema i dr.). Međutim, posebni sojevi *E. coli*, tzv. uropatogeni sojevi, mogu izazvati infekcije mokraćnih kanala i bez pomenutih anomalija (Kaper i sar., 2004).

Humane infekcije izazvane *E. coli* najčešće se leče antibiotskom terapijom, uz primenu antibiotika kao što su amoksisilin, cefalosporin, ciprofloksacin i dr. Do problema kod ovakvog načina lečenja dolazi zbog pojave rezistencije *E. coli* na ove antibiotike, čime sam postupak lečenja postaje duži i kompleksniji (Johnson i sar., 2007). Sposobnost produkcije enzima β -laktamaze proširenog spektra delovanja (eng. extended spectrum β -lactamases, ESBL) je glavni uzročnik rezistencije *E. coli* na cefalosporine treće i četvrte generacije, kao i monobaktame (Poirel i sar., 2012). Rezistencija *E. coli* na karbapeneme prvenstveno je uzrokovana karbapenemazama kodiranim plazmidima, dok je rezistencije prema fluoro hinolonima povezana

sa produkcijom enzima ESBL (Ruiz i sar., 2012). Ovi enzimi se često nalaze u bolničkim izolatima *E. coli* (Canton i sar., 2012).

Krug prenosa *E. coli* u hrani može se zaustaviti povećanjem higijenskih mera u pogonima prehrambene industrije, primenom adekvatnog termičkog tretmana namirnica, praćenjem zdravstvenog stanja radnika i praćenjem održavanja higijene radnika, kao i opreme za rad, uređaja, aparata i prostorija (Todor, 2007).

2.1.2. *Salmonella* spp.

Rod *Salmonella* pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Prvi put je izolovana 1880. godine od strane Ebertha iz slezine i mezenterijalnih žlezda bolesnika koji je umro od crevnog tifusa. Četiri godine kasnije (1884) Gaffky je ovu bakteriju uspeo da kultiviše i detaljnije opiše. Daniel Elmer Salmon i Theobald Smith su 1885. godine izolovali drugu bakteriju iz svinja obolelih od svinjske kolere, koja je po mnogim osobinama bila slična ranije izolovanoj bakteriji uzročniku crevnog tifusa. Na predlog francuskog bakteriologa Liginerésa, a u čast Salmonu, ova bakterija je nazvana salmonela (Gunel, 2010). Salmonele su gram-negativni, fakultativno anaerobni nesporigeni štapići širine 0,7-1,5 μm i dužine 2-5 μm (Ozkalp, 2012). Ne stvaraju kapsulu i većina je pokretna (osim serovarijeteta Gallinarum - biotip Gallinarum i biotip Pullorum) pomoću peritrihijalno raspoređenih flagela. Pojedini sojevi poseduju fimbrije ili pile (Hald, 2013). Mogu da rastu u širokom temperaturnom intervalu (5-47 °C) i pH vrednosti (3,6-9,5), ali je za njihov rast i razmnožavanje optimalna temperatura 37 °C, dok se optimalne vrednosti pH kreću u intervalu 6,5-7,5 (Marriott i Gravani, 2006). Do potpune inhibicije rasta i razmnožavanja salmonela dolazi pri temperaturi < 7 °C, pH < 3,8 i a_w < 0,94 (Pui i sar., 2011). Salmonele razlažu glukozu i druge ugljene hidrate (kao što su manitol i maltoza) do kiseline i gasa, a ne fermentuju laktozu i saharozu. Koriste citrat kao jedini izvor ugljenika, oksidaza su negativne, a katalaza pozitivne (SRPS EN ISO, 2017).

Prema sadašnjoj, važećoj klasifikaciji, rod *Salmonella* obuhvata dve vrste, *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Vrsta *Salmonella bongori* obuhvata 22 serovarijeteta, dok je u okviru vrste *Salmonella enterica* identifikovano više od 2637 serovarijeteta (što čini više od 99% do danas poznatih serovarijeteta) svrstanih u šest podvrsta (Issenhuth-Jeanjean i sar., 2014):

- *enterica* (podvrsta I),
- *salamae* (podvrsta II),
- *arizonae* (podvrsta IIIa),
- *diarizonae* (podvrsta IIIb),
- *houtenae* (podvrsta IV),
- *indica* (podvrsta VI).

Salmonele su široko rasprostranjeni mikroorganizmi u prirodi. Rasprostranjenost pojedinih serovarijeteta je različita u pojedinim geografskim područjima, te u svakom području dominira njih nekoliko, mada ova pojava nije stalna, već je uočeno da se vremenski menja (Miljković-Selimović i sar., 2010). Glavni rezervoar skoro svih serovarijeteta salmonela je digestivni trakt toplokrvnih (domaćih i divljih), kao i hladnokrvnih životinja (gmizavci, ribe) (Back i sar., 2016). Ovo ne važi za serotipove *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi, koji su patogeni samo za ljude i čiji je jedini rezervoar digestivni trakt ljudi. Iz digestivnog trakta salmonele se putem izmeta i mokraće izlučuju u spoljašnju sredinu, čime se otvara put ka njihovom nesmetanom ulasku u vodotokove i zemljište. Time i voda i zemljište mogu postati ne samo izvor zaraze salmonelom, već i transmitter (prenosnik) između domaćina (Wong i sar., 2002). Salmonele se kod zaraženih životinja mogu naći u mleku, mesu i u jajima kod živine. Bez da pokazuju ikakve simptome bolesti, zaražene životinje su često samo kliconoše (López-Martín i sar., 2016). Put prenosa salmonela je fekalno-oralni. Minimalna infektivna doza je niska i kreće se u intervalu od < 10 do 10^9 cfu/g, što zavisi od virulentnosti soja, starosti i zdravstvenog stanja organizma, kao i vrste namirnice koja je izvor salmonela. Ako se salmonele nalaze u namirnicama bogatim mastima i proteinima, koje štite bakterijsku ćeliju od uticaja niskog pH želudačnog soka, infektivna doza je niža. Prema Bem i Adamič (1991), infekcija salmonelama najčešće ima sledeći tok:

Hrana za životinje → Životinje → Hrana → Čovek

Salmonella vrste se odlikuju velikom sposobnošću adaptacije na raznovrsne uslove spoljašnje sredine, te uspešno opstaju i na biljnom materijalu internalizacijom stoma, pukotina, zasečenih površina, kao i u biofilmovima koje formiraju na površini biljaka. Time i biljke, a pre svega povrće i voće koje je tokom gajenja u kontaktu sa zemljom, može postati izvor ovih mikroorganizama (Srey i sar., 2013).

2.1.2.1. *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium se nalazi na drugom mestu kao uzročnik humanih salmoneloza u našoj i u zemljama Evropske unije. Glavni rezervoar ovog serotipa je izmet svinja, goveda i živine koji, dospevši u spoljašnju sredinu, može da kontaminira zemljište i vodotokove, a time i useve koji se tu gaje i za čije se navodnjavanje koristi kontaminirana voda. Ovaj serotip je najčešće navođen serotip od kliničkog značaja koji dominira nad drugim serotipovima u studijama ispitivanja životne sredine, zbog visoke stope preživljavanja van domaćina (Martinez-Urtaza i sar., 2004). *Salmonella* Typhimurium pripada grupi serotipova koji nisu adaptirani na jednu vrstu domaćina, međutim sojevi *S. Typhimurium* DT 2 i *S. Typhimurium* DT 99 dovode do specifičnog oboljenja golubova (*avian paratyphoid disease*) te se smatra da su prilagođeni jednoj vrsti domaćina (Rabsch i sar., 2002). Optimalna temperatura za rast i razmnožavanje *S.*

Typhimurium se, kao i kod većine salmonela, kreće u intervalu 35-37 °C, optimalni pH je ~7, a a_w od 0,96 do 0,99 (Pui i sar., 2011). Oboljenje izazvano ovim serotipom kod životinja se javlja kao perakutna septikemija i kao akutni, subakutni i hronični enteritis. Za akutni oblik bolesti koji se manifestuje u vidu groznice i dijareje, je karakterističan visok stepen morbiditeta i nizak stepen mortaliteta. Dolazi do dehidracije i teškog poremećaja ravnoteže elektrolita, što je posebno izraženo kada postoji i septikemija (Lalošević i sar., 2011). Epidemije izazvane ovim serotipom praćene su teškom kliničkom slikom i kod ljudi i kod životinja što iziskuje primenu visokih doza antibiotika. Učestala primena antibiotika dovodi do pojave bakterijske rezistencije, što je čest slučaj i kod *S. Typhimurium*. Jedan od najčešćih razloga rezistencije *S. Typhimurium* na antibiotike je sposobnost produkcije enzima β -laktamaze proširenog spektra delovanja (ESBL). Sposobnost produkcije ESBL predstavlja tzv. skriveni mehanizam rezistencije (Filipović i sar., 2007). Isti mehanizam dovodi, kako je kasnije dokazano i drugih vrsta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, uključujući *Klebsiella pneumoniae* i prethodno pomenutu *E. coli*.

Oboljenje ljudi koje izaziva *S. Typhimurium* poznato je kao gastroenteritis, što se manifestuje kao upala creva i želuca. Gastroenteritis je infekcija kratke inkubacije (vreme koje protekne od unosa infektivnog agensa do pojave prvih simptoma infekcije), koja traje 6-24 h. Simptomi gastroenteritisa su groznica, grčevi u stomaku, mučnina, povraćanje i dijareja. Stolice su retke, neprijatnog mirisa i zelenkaste boje. Uz navedene simptome dolazi i do glavobolje, malaksalosti, pospanosti, povišene temperature (38-39 °C). Usled povraćanja i dijareje dolazi do dehidracije organizma koja ima za uzrok opštu slabost, suvoću sluznice, promuklost, oslabljeni turgor kože, muskularne grčeve, pad pritiska. Bolest kod imunološki nekompromitovanih osoba traje nekoliko dana (3-5 dana), uz simptomatsko lečenje koje uključuje dijetalnu ishranu praćenu unosom dovoljne količine tečnosti i odmor, bez davanja antibiotika. Do težih komplikacija dolazi kada se infekcija proširi izvan creva. Tada salmonela ulazi u krvotok, pri čemu može dospeti do tkiva i organa u celom organizmu, uključujući mozak, kičmenu moždinu, koštanu srž. Dolazi do bakterijemije i pojave sekundarnih žarišta (Fàbrega i Vila, 2013).

2.1.2.2. Alimentarna oboljenja uzrokovana *Salmonella* spp.

Salmonele se odlikuju velikom invazivnošću koja se ogleda u tome da, ubrzo nakon dospeća u probavni trakt domaćina, iz probavnog trakta prodiru u površinske (epitelne) ćelije tankog i debelog creva, i dalje preko krvi u druge organe, dovodeći do raznih upala. Nakon prodora kroz epitelne ćelije, neke tipove salmonela, ćelije obrambenog sistema domaćina (leukociti), mogu da eliminišu sprečavajući na taj način infekciju. Većina tipova salmonela međutim, zbog svoje specifične građe, koja ih štiti od delovanja leukocita, može živeti u ćelijama domaćina godinama, bez simptoma. Patogenost pojedinih serotipova salmonela određena je sposobnošću da preko

određenih molekularnih mehanizama uđu u ćeliju domaćina, kao i sposobnošću da se prilagode širokom krugu domaćina (Stevens i sar., 2009).

Prema sposobnosti adaptacije na vrstu domaćina salmonela se mogu podeliti u tri grupe (Stevens i sar., 2009):

- Ubikvitarni serotipovi koji se mogu adaptirati na različite domaćine (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*). Rezervoar ovih serotipova salmonela najčešće su domaće životinje preko čijeg izmeta dospevaju u spoljašnju sredinu iz koje lako mogu dospeti u lanac ishrane ljudi, dovodeći do teških infekcija;
- Drugu grupu čine serotipovi koji su primarno adaptirani na jednu vrstu domaćina, ali mogu izazvati infekcije i kod drugih vrsta. Ovoj grupi pripada *S. Dublin* koja je primarno adaptirana za goveda, izazivajući kod njih bolesti, ali takođe može da izazove oboljenja i kod ljudi;
- U treću grupu spadaju serotipovi koji su adaptirani samo na jednu vrstu domaćina i mogu izazvati salmoneloze kod ograničenog broja srodnih vrsta. Na primer, *S. Typhi* i *S. Paratyphi* izaziva oboljenja samo kod ljudi, *S. Gallinarum* kod živine a *S. Abortus-ovis* kod ovaca (Uzzau i sar., 2000).

Bolesti koje izazivaju salmonela nazivaju se zajedničkim imenom salmoneloze. Prema kliničkoj slici, salmoneloze ljudi se mogu podeliti u sledeće grupe (Kocić-Tanackov i sar., 2022):

- Opšta ciklična zarazna oboljenja, od kojih su najznačajniji tifus i paratifusi;
- Alimentarne toksikoinfekcije, izazvane oslobađanjem endotoksina nakon razaranja bakterijske ćelije u digestivnom traktu;
- Enteritise, koji se razvijaju sporo sa prolivima.

Salmoneloze spadaju u grupu najučestalijih zoonoza u svetu, koje pogađaju ljude različite starosti i pola čime predstavljaju veliki javno-zdravstveni i ekonomski problem. U zemljama Evropske unije posle kampilobakterioze, salmoneloze se nalaze na drugom mestu kao uzrok epidemija izazvanih kontaminiranom hranom. Kao najčešći uzročnik humanih salmoneloza u 2019. godini navodi se *S. Enteritidis* (50,3%), *S. Typhimurium* (11,9%), monofazna *S. Typhimurium* (8,2%), *S. Infantis* (2,4%), *S. Newport* (1,1%) (European Food Safety Authority, EFSA, 2021).

Iako se kao glavni izvor infekcije salmonelama smatra hrana životinjskog porekla, sve više je zabeleženih slučajeva salmoneloza uzrokovanih konzumiranjem povrća i voća (Iwu i Okoh, 2019). Do površinske kontaminacije biljaka najčešće dolazi prilikom zalivanja fekalnom vodom, ali je dokazano da salmonela mogu kontaminirati biljke i intracelularno kroz korenov sistem. Nakon kolonizacije unutrašnjosti biljke salmonela se aktivno razmnožavaju u njima izazivajući patogene promene u svim stadijumima razvoja biljke. Prema Schikora i sar. (2008), salmonela mogu intracelularno inficirati radič, salatu, paradajz i razne klice, a mogu formirati i stabilne biofilmove na korenu i listovima ovih biljaka. Kod *S. Typhimurium* identifikovan je poseban set

gena koji se diferencijalno reguliše tokom kolonizacije unutrašnjih tkiva paradajza, a koji se razlikuje od gena uključenih u infekciju i kolonizaciju životinjskih tkiva, kao i od gena odgovornih za kolonizaciju biljnih tkiva nađenih kod fitopatogenih bakterija (Noel i sar., 2010).

2.2. Mikrobiološka kontaminacija lisnatog povrća

2.2.1. Značaj povrća u ishrani

Ishrana ljudi od davnina se jednim delom zasnivala na korišćenju povrtarskih biljaka. Prema istorijskim podacima, stari narodi su veoma cenili prijatan ukus povrća i zapazili njegovu hranljivu vrednost i korisna svojstva za organizam. Veći deo povrtarskih kultura bio je poznat i korišćen u ishrani još pre 4000-5000 godina pre naše ere, a neke od njih (crni i beli luk, ren i dr.) tretirane su kao lekovi. Otkrićem Amerike (1492. godine) asortiman povrtarskih kultura se znatno proširio vrstama kao što su krompir, paradajz, tikvice, boranija, kikiriki i dr., a koje su do tada bile nepoznate u Evropi (Popović, 1991; Lazić i sar., 2017).

Visok sadržaj i raznolikost nutritivnih jedinjenja čini povrće značajnom namirnicom u savremenoj i zdravoj ishrani. Prosečan hemijski sastav povrća čini voda (79-96 g/100 g), ugljeni hidrati (0,5-18 g/100 g), proteini (0,5-5,0 g/100 g) i masti (0,1-1 g/100 g) (Lintas, 1992). Ugljeni hidrati se u povrću nalaze kao mono-, di- i polisaharidi. Od ugljenih hidrata povrće sadrži materije kao što su celuloza, hemiceluloza, pektin i hitin, koje su značajne u ishrani, jer podstiču rad creva i ubrzavaju eliminaciju štetnih materija iz organizma. Posebnu vrednost povrću kao hrani daju vitamini i mineralne materije i niz drugih specifičnih sastojaka, kao što su organske kiseline, etarska ulja, fitonocidi i dr., koje kao prirodni antioksidanti u zaštiti od slobodnih radikala smanjuju rizik od malignih oboljenja i oboljenja srca i krvnih sudova. Pored blagotvornog uticaja na zdravlje ljudi, originalni oblik i forma, kao i širok spektar aromatskih i bojnih supstanci, doprinosi visokom stepenu senzorske dopadljivosti povrća (Jašić, 2007; Oguntibeju i sar., 2013).

Sistematskim proučavanjem hemijskog sastava povrća potvrđeno je da ova namirnica na više načina deluje u zaštiti i održavanju zdravlja ljudi, štiteći od raznih bolesti. Dijetoterapeutska vrednost povrća ogleda se u tome da upotrebljeno na adekvatan način (i sa kvalitativnog i sa kvantitativnog aspekta), u sastavu ishrane koja je prilagođena patološkim stanjima organizma, može da doprinese ozdravljenju organizma (Vračar, 2012).

Mnoge vrste povrća ne samo što jačaju otpornost organizma, već neutrališu i odstranjuju toksična jedinjenja iz njega, nastala u procesu normalnog metabolizma (Vračar, 2012;

Oguntibeju i sar., 2013). Savremena nauka o ishrani smatra da je svaki dan neophodno konzumirati 400-500 g raznog povrća (WHO, 2008).

Pošto se neki sastojci povrća razgrađuju prilikom termičke obrade, čime se smanjuje njegova biološka i hranljiva vrednost, preporučuje se da se povrće konzumira u svežem obliku. Pri tome je pranje hlorisanom vodom (sadržaj hlora 20-200 mg/l) najčešći i jedini tretman pre konzumiranja. Međutim, pranjem hlorisanom vodom ne dolazi do potpunog uklanjanja prisutne mikroflore (maksimalna redukcija broja mikroorganizama iznosi 3 log redukcije), čime sveže povrće postaje potencijalni izvor mikroorganizama (Han i sar., 2000). S druge strane, sam postupak gajenja povrća na zemlji doprinosi njenoj kontaminaciji zemljišnim mikroorganizmima. Lisnato povrće, pre svega salata, koja se uglavnom konzumira sveža, može biti izvor nekih patogenih mikroorganizama, izazivača oboljenja ljudi.

2.2.2. Epidemije izazvane konzumiranjem lisnatog povrća

Učestalost epidemija izazvanih konzumiranjem svežeg voća i povrća poslednjih godina beleži stalni rast (Olaimat i Holley, 2012). Tome su doprinele promenjene navike u ishrani stanovništva sa tendencijom rasta potrošnje svežeg ili minimalno prerađenog voća i povrća, povećani uvoz hrane, promene u primeni agrotehničkih mera, kao i povećanje broja imuno - kompromitovanih potrošača. Među mikroorganizmima koji se najčešće mogu preneti konzumiranjem svežeg povrća su *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* spp. (Beuchat, 2002). U lancu prenosa patogenih bakterija konzumiranjem svežeg povrća, značajno mesto zauzima lisnato povrće čiji se jestivi deo - lišće pre konzumiranja najčešće samo opere.

Prema podacima koje je objavila EFSA (2015) u periodu od 2007. do 2011. godine samo na području evropskih država (EFSA članica), konzumiranje hrane biljnog porekla je evidentirano kao uzročnik kod 10% epidemija i 18% pojedinačnih slučajeva od kojih je 8% hospitalizovano, a 8% se završilo smrtnim ishodom. Kao najčešći uzročnik ovih epidemija navode se *Salmonella* spp., čiji je glavni izvor bilo sveže lisnato povrće, i *E. coli* čiji su glavni izvor bile mahunarke, lisnato povrće i žitarice. Tokom januara 2010. godine, prema navodima Ethelberg i sar. (2010), u Danskoj je zabeležena epidemija izazvana enterotoksigenim sojevima *E. coli* (ETEC), čiji je izvor bila „Lollo bionda“ zelena salata gajena na otvorenom polju u Francuskoj. U Australiji tokom 2016. godine dolazi do izbijanja dve epidemije izazvane salmonelama. U prvom slučaju kao izvor epidemije navodi se zelena salata kontaminirana *Salmonella* Anatum sa zabeleženih 144 slučaja, a u drugom slučaju izvor zaraze su bile dinje kontaminirane *Salmonella* Hvitvingfoss sa zabeleženih 97 slučaja. Herman i sar. (2015), ukazuju da je u periodu od 1973. do 2012. godine u Sjedinjenim američkim državama došlo do izbijanja 12714 epidemija, pri čemu je kod 606 (5%) epidemija izvor bilo povrće, od toga kod 162 epidemije kao uzročnik se navodi lisnato

povrće, a kod 444 epidemije salate od svežeg povrća. Kao jedan od razloga učestalosti epidemija izazvanih konzumiranjem salate i ostalog lisnatog povrća, može biti činjenica da se ovo povrće gaji u toplim i vlažnim uslovima koji pogoduju razvoju patogenih bakterija.

U tabeli 2.1. prikazan je pregled broja obolelih/umrlih usled konzumiranja svežeg povrća sa akcentom na lisnato povrće, u periodu od 2006. do 2019. godine. Prema prikazanim podacima kao najčešći kontaminant identifikovana je *E. coli* i *Salmonella* spp.

Tabela 2.1. Pregled broja obolelih usled konzumiranja kontaminiranog svežeg povrća u periodu 2006-2019 (preuzeto od Iwu i Okoh, 2019)

Vrsta povrća	Bakterijski kontaminant	Broj obolelih/ broj umrlih	Država	Godina	Referenca
Zelena salata	STEC <i>E. coli</i> O157:H7	62	SAD	2018	CDC, 2018
Lisnato povrće	<i>E. coli</i> O157:H7	25/1	SAD	2017	CDCa, 2017
Spanać	<i>E. coli</i>	199/3	SAD	2017	CDCb, 2017
Zelena salata	<i>E. coli</i>	34	Kanada	2017	CDCb, 2017
Zelena salata, krastavci	<i>E. coli</i> O96	50	UK	2016	Wadamori i sar., 2017
Zelena salata, krastavci	<i>E. coli</i> O96	50	UK	2014	PHE
Zelena salata	<i>E. coli</i> O157:H7	58	SAD	2011	CDC, 2011
Zelena salata	<i>E. coli</i> O145	26	SAD	2010	CDC, 2010
Zelena salata	<i>E. coli</i> O157:H7	134	SAD, Kanada	2008	Warriner i sar., 2010
Bosiljak	<i>Salmonella</i> spp.	32	UK	2008	Elviss i sar., 2009
Spanać	<i>Salmonella</i> spp.	354	Evropa	2007	Denny i sar., 2007
Bosiljak	<i>Salmonella</i> spp,	51	Severna Amerika	2007	Pezzoli i sar., 2007

Nastavak tabele 2.1.

Spanać	<i>E. coli</i> O157:H7	199/3	SAD	2006	CDC, 2006
--------	---------------------------	-------	-----	------	-----------

SAD - Sjedinjene Američke Države; UK - Ujedinjeno Kraljevstvo (Velika Britanija)

2.2.3. Salata (*Lactuca sativa*)

Prema istorijskim zapisima blagodeti ukusnih, a kako se kasnije ustanovilo i hranljivih listova zelene salate, prvi su otkrili stari Egipćani, oko 3000 godina pre naše ere. U početku su je smatrali svetom biljkom koju su koristili u verskim obredima, verujući da pospešuje plodnost. Vremenom je uvrštena u jelovnik faraona, da bi kasnije bila prihvaćena i u ishrani „običnog“ sveta, koji ju je uzgajao u svojim okućnicama. Preko starog Egipta salata je dospela u Grčku, odakle je prenetu u Rim. Stari Latini dali su joj ime *lactuca* („mlečna“), zbog beličaste tečnosti koja curi iz presečenih listova i, kao i stari Egipćani, verovali su da utiče na potenciju i plodnost (Odu i Okomuda, 2013). U zapisima Kolumele („oca agronomije“), pominje se nekoliko sorti zelene salate uz savete za njihovo uzgajanje, dok je jedan deo posvećen lekovitosti ove biljke (Hedges i Lister, 2005). Povezanost salate sa religijom prisutna je i danas među pripadnicima naroda Yazidi na severu Iraka, kojima religija zabranjuje konzumiranje salate (Odu i Okomuda, 2013).

Salata je jednogodišnja lisnata povrtarska vrsta iz familije *Asteraceae* - Glavočika i poreklo vodi od divlje vrste *Lactuca scariola*. Koren ove biljke je mesnat i razgranat. Stabiljka je u vegetativnoj fazi skraćena, dok se u generativnoj fazi naglo izdužuje, te doseže visinu do 1,2 m. Lišće formira rozetu, pri čemu oblik, struktura i boja lišća variraju između varijeteta. Kod kultivisanih formi salate razlikuje se 5 varijeteta:

1. Lisnata salata - *Lactuca sativa* sub. sp. *sekalina*;
2. Salata za rezanje - *Lactuca sativa* var. *acephala*;
3. Glavičasta salata - *Lactuca sativa* var. *capitata*;
4. Rimska salata - *Lactuca sativa* var. *romana* sub. var. *longifolia*;
5. Šparglasta salata - *Lactuca sativa* var. *angustana* sub. var. *asparagina* (Mou, 2009).

Među najveće proizvođače salate ubrajaju se Kina, SAD i Evropske zemlje, sa udelom od 57%, 14% i 11% od celokupne svetske proizvodnje (Vella i sar., 2020).

U Republici Srbiji se najviše gaje glavičaste forme salate, unutar kojih se razlikuju dva tipa kultivara:

- Kristalka - glavičasta salata koja ima nazubljene i naborane listove sa izraženom nervaturom;
- Maslenka (puterica) - glavičasta salata sa više ili manje glatkim listovima, ravnih ivica (Đurovka, 2008).

U savremenoj ishrani salata zauzima značajno mesto zbog niske energetske vrednosti i visokog sadržaja biološki vrednih i zaštitnih materija kao što su vitamini, minerali i organske kiseline (jabučna, limunska, oksalna) (Gueye i Diouf, 2007). Prosečan hemijski sastav zelene salate prikazan je u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Osnovni hemijski sastav zelene salate (preuzeto od Tepić Horecki, 2019)

Sadržaj u g na 100 g jestivog dela u svežem stanju					
Voda	Proteini	Masti	Ukupni ugljeni hidrati	Šećer	Vlakna
92-97	0,8-1,6	Tr-0,5	2,2	1,1-2,2	0,3-1,4

Tr-u tragovima

Salata je bogata mineralima - kalijumom - K (jača imunitet i blagotvorno deluje na nerve, bubrege i srce), kalcijumom - Ca (deluje protivupalno i od izuzetne je važnosti za kosti, mišiće, nerve) i natrijumom - Na zaduženim za regulaciju vode u organizmu, a sadrži veliku količinu vitamina A, B i C (tabela 2.3) (Titchenal i Dobbs, 2004).

Tabela 2.3. Prosečan sadržaj vitamina i minerala zelene salate (preuzeto od Titchenal i Dobbs, 2004)

C	A	B ₁ (Tiamin)	B ₂ (Riboflavin)	B ₃ (Niacin)	B ₉ (Folna kiselina)	Ca	Fe
mg	IU	mg	mg	mg	µg	mg	mg
3-33	40-2200	0,04-0,14	0,03-0,1	0,2-0,5	20-73	17-107	0,05-4,0

IU - Internacionalna jedinica

Organske kiseline u salati, kao što su limunska i jabučna kiselina, igraju važnu ulogu u percepciji ukusa, modifikujući ukus šećera (limunska kiselina maskira, dok jabučna kiselina pojačava ukus šećera) (Schifferstein i Fritjers, 1990). Laktukarijum, mlečni sok iz „srca” salate deluje kao blagi analgetik, smiruje nerve i otklanja nesanicu, zahvaljujući prisustvu dva seskviterpenska laktona. Naziva se još i „opijum zelene salate“ (Wesołowska i sar., 2006). Ulje, koje se specijalnim postupkom dobija iz semena ima široku primenu u arapskoj kuhinji, ali i u alternativnoj medicini za lečenje rinitisa, astme, kašlja i drugih oboljenja (Katz i Weaver, 2003; Tepić Horecki, 2019).

Studije su pokazale da je salata bogat izvor jedinjenja sa antioksidativnim efektom, kao što su fenoli, vitamin C, folati, karotenoidi i hlorofili, koji imaju idealna strukturalna svojstva za

uklanjanje slobodnih radikala koji nastaju kao produkt ćelijskog metabolizma (Sulaiman i sar., 2011).

Pored mnogobrojnih blagotvornih jedinjenja po ljudski organizam, salata sadrži i potencijalno štetna jedinjenja - nitrata. Nitrati su sami po sebi netoksični po ljudski organizam, za razliku od njihovih metabolita nitrita, azot oksida (NO) i N-nitrozo jedinjenja, koji uz pomoć crevnih bakterija mogu obrazovati nitrozoamine, potencijalne uzročnike karcinoma gastrointestinalnog trakta. Nitriti takođe mogu oksidovati gvožđe u hemoglobinu, pri čemu nastaje methemoglobin, koji nema sposobnost vezivanja i prenosa kiseonika, te može doći do hipoksije, odnosno smanjenog dotoka kiseonika u ćelije i tkiva, što ima za uzrok poremećaj u funkcionisanju organizma (Miloš i sar., 2016).

Uobičajenom praksom pripreme povrća, koja obuhvata pranje i eventualno ljuštenje i termičku obradu, količina nitrata se smanjuje, pa je stvarni unos manji od količine određene u sirovom povrću. Hrvatske agencija za hranu je tokom 2012. i 2013. godine sprovela istraživanje na području četiri grada u Republici Hrvatskoj o prisustvu nitrata u vrstama povrća u kome je najviša dopuštena količina propisana zakonom (spanać, salata i rukola), ali i u onim vrstama za koje ove vrednosti nisu propisane (kelj, blitva, kupus, brokoli i dr.). Rezultati njihovog istraživanja ukazali su da konzumiranje ovog povrća ima veći značaj za ljudski organizam u smislu zadovoljavanja potreba za gradivnim, energetskim i zaštitnim materijama, nego što je štetni uticaj nitrata (Miloš i sar., 2016).

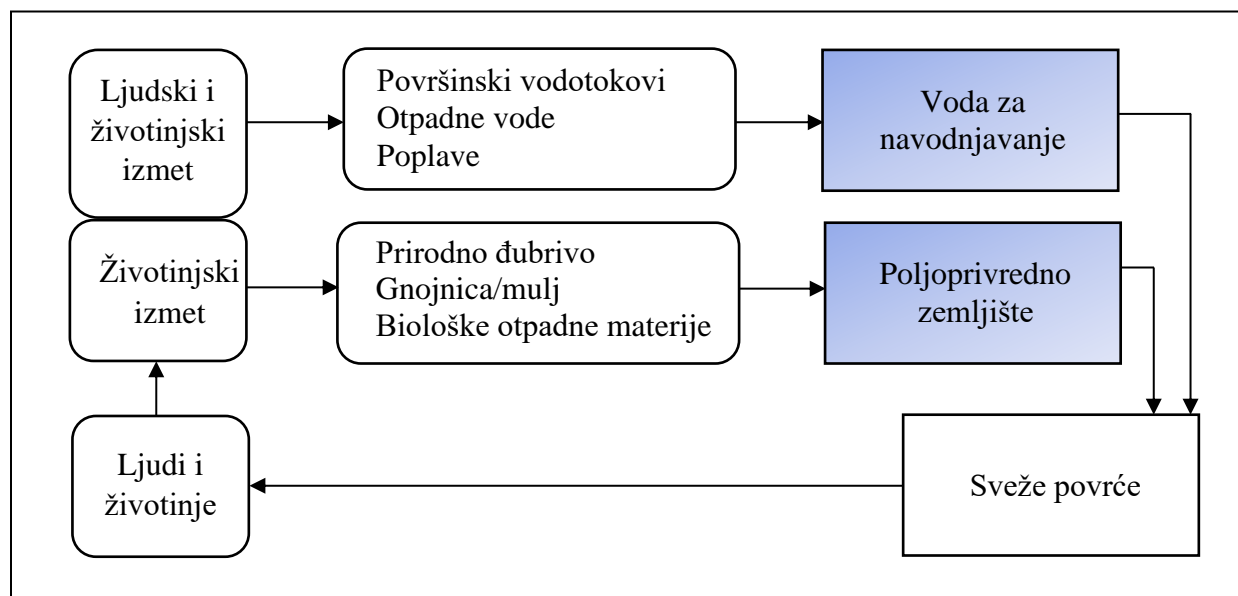
2.2.4. Zemljište kao izvor patogenih bakterija

Zemljište je osnovni rezervoar mikroorganizama u prirodi. Svojom aktivnošću, mikroorganizmi omogućavaju kruženje svih biogenih elemenata, učestvuju u pedogenezi i održavaju plodnost zemljišta. U ukupnoj organskoj materiji zemljišta mikroorganizmi su zastupljeni od 0,1 do 3%, pri čemu njihova biomasa u proseku iznosi od 1 do 5 t po hektaru. U plodnom zemljištu ne radi se samo o velikom broju vrsta, već i o visokom ukupnom broju. U mikrobnjoj populaciji zemljišta najbrojnije su bakterije (10^8 - 10^9 /g zemljišta), aktinomicete (10^7 - 10^8 /g zemljišta) i gljive (10^5 - 10^6 /g zemljišta) (Đukić i sar., 2011). Poseban problem među populacijom zemljišnih mikroorganizama predstavlja prisustvo patogenih bakterija, izazivača alimentarnih toksikoinfekcija. U najznačajnije patogene bakterije izazivače alimentarnih toksikoinfekcija spadaju bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, koje se putem izmeta životinja i ljudi izlučuju u spoljašnju sredinu, kontaminirajući zemljište, vodu i hranu (Winn i sar., 2006).

Do kontaminacije površinskih i dubljih slojeva zemljišta patogenim bakterijama uglavnom dolazi đubrenjem nekompostiranim stajskim đubrivom, upotrebom mikrobiološki neispravne vode

(kako za navodnjavanje, tako i za pripremu različitih preparata za prskanje useva), izmetom divljih životinja, kao i neadekvatnim zbrinjavanjem leševa životinja (Sánchez i sar., 2012).

Dospevši u zemljište, patogene bakterije se suočavaju sa potpuno drugačijim uslovima životne sredine u odnosu na uslove unutar domaćina, gde su im obezbeđeni optimalni uslovi za rast i razmnožavanje. U ovakvim uslovima najčešće opstaju formirajući biofilme. Adhezijom za čestice zemlje i sedimenta, uz formiranje biofilma, patogene bakterije mogu perzistirati više od godinu dana. Pored sposobnosti formiranja biofilma, preživljavanje ovih patogena zavisi od različitih biotičkih (autohtona mikroflora zemljišta) i abiotičkih (vlaga, odnosno sadržaj slobodne vode, temperatura, pH, dostupnost hranljivih materija) faktora zemljišta (Oliver i sar., 2006). Sem navedenog, na sposobnost preživljavanja utiču i genetske karakteristike soja, pokretljivost, prisustvo somatskog O - antigena. Prema istraživanjima Cools i sar. (2001), *E. coli* može da preživi u zemljištu duže od 80 dana pri nižim temperaturama (25 °C) i većoj vlažnosti (100%). Za razliku od *E. coli*, *S. Typhimurium* može preživeti u zemljištu oko 203 dana (Islam i sar., 2004). Vrsta zemljišta i njegove fizičke i hemijske karakteristike kao što su tekstura, raspodela i veličina čestica u velikoj meri utiču na inkorporaciju i opstanak patogenih bakterija. Opstanak *E. coli* ispitivan je u tri različita tipa zemljišta: u peskovitom, ilovastom i peskovito - ilovastom, pri čemu su rezultati preživljavanja išli u prilog peskovitog zemljišta (Cools i sar., 2001). Ispitivanja Fongaro i sar. (2017) pokazala su da i *S. Typhimurium* duže opstaje u peskovitom zemljištu u odnosu na ilovasto, što može biti povezano sa višom pH vrednošću i većim sadržajem organske materije.



Slika 2.1. Putevi kontaminacije svežeg povrća patogenim bakterijama (preuzeto od Iwu i Okoh, 2019)

Primena organskih i neorganskih đubriva radi poboljšanja plodnosti zemljišta deluje pozitivno na opstanak patogenih bakterija u zemljištu, jer predstavlja izvor mikronutrijenata kao što su azot, fosfor, sumpor, kalijum, magnezijum i kalcijum, koji su neophodni za njihov rast (Diacono i sar.,

2010). Međutim, primena organskog đubriva može imati negativan uticaj na opstanak patogena u zemljištu, što se objašnjava time da autohtoni mikroorganizmi uneti organskim đubrivom predstavljaju konkurenciju u korišćenju ograničenih resursa hranljivih materija. Preživljavanja salmonela u uzorcima zemljišta pokazala su da su najkraće opstale salmonele u zemlji obogaćenog stajskim đubrivom, nešto duže one u netretiranom uzorku, dok su najduže opstale u sterilisanom zemljištu (García i sar., 2010).

Kontaminirano zemljište može biti izvor kontaminacije biljaka (slika 2.1). Sem zemljištem, do kontaminacije biljaka patogenim bakterijama može doći i upotrebom nekompostiranog ili nepravilno kompostiranog đubriva, mikrobiološki neispravne vode za navodnjavanje i pripremu preparata za prskanje, izmetom ptica, glodara i raznih drugih domaćih i divljih životinja. Vazdušne struje i vetrovi, kapljice vode za navodnjavanje, jake kišne padavine ili poplave mogu biti prenosnici čestica kontaminiranog zemljišta do nadzemnih delova biljaka (Allende i sar., 2017).

Ruke radnika koje dolaze u kontakt sa plodovima povrća predstavljaju potencijalne tačke unakrsne kontaminacije tokom berbe, pakovanja, prerade i distribucije do potrošača. Time biljke postaju vektori prenosa patogena na ljude. Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (EFSA, 2015), konzumiranje hrane biljnog porekla bilo je uzrok izbijanja više od 10% epidemija, pri čemu se čak kod 4,4% kao uzročnik navodi povrće, sokovi i slični proizvodi. Salate od svežeg povrća, lisnato povrće kao što je spanać i kupus kao i sveže začinsko bilje Svetska zdravstvena organizacija (WHO, 2008) svrstala je u namirnice visokog rizika po ljudsko zdravlje. Uprkos tome što se radi o visoko rizičnim namirnicama, potrošnja svežeg povrća poslednjih 20 godina beleži stalni rast (Olaimat i Holley, 2012).

2.2.5. Kolonizacija i mehanizam vezivanja patogenih bakterija za biljku

2.2.5.1. Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama

U zavisnosti od puta prenosa (voda, stajsko đubivo, nepravilno rukovanje), patogene bakterije mogu dospeti u rizosferu (zona korena) i filosferu (nadzemni deo) biljke. Rizosfera sadrži eskudate korena, gde spadaju jedinjenja koja se oslobađaju kao produkt ćelijskog metabolizma ili nastaju posle lize biljnih ćelija. Glavna supstanca eskudata korena je sluz sastavljena od hidriranih polisaharida, organskih kiselina, vitamina i aminokiselina, što predstavlja odličnu podlogu za rast mikroorganizama. Sluz vezuje vodu i na taj način omogućava formiranje dobro hidriranog okruženja rizosfere koje omogućava opstanak 10^6 do 10^9 mikrobne populacije na 1 g korena (Hallmann i sar., 2001). Neke bakterije koje kolonizuju površinu korena mogu da migriraju u vaskularni parenhim kroz ksilemske provodne sudove u gornje delove biljke (Klerks

i sar., 2007). Za razliku od rizosfere, hranljivih sastojaka na površini biljke koji uglavnom potiču od eskudata epidermalnih ćelija nema dovoljno i njihova raspodela je vrlo heterogena. Pored toga filofsfera biljaka je izložena promenljivim i za mikroorganizme stresnim faktorima spoljašnje sredine, koji su direktno zavisni od atmosferskih prilika, kao i sunčevom UV zračenju, pa je prosečan broj mikroorganizama koje je naseljavaju niži u odnosu na rizosferu i iznosi 10^3 do 10^7 na 1 g lista (Hallmann i sar., 2001).

Dospevši na površinu biljke, patogene bakterije razvijaju mehanizam odbrane od nepovoljnih uslova ili kolonizuju mesta koja su zaštićena od nepovoljnih uticaja spoljašnje sredine kao što su stome (Beattie i Lindov, 1999).

Kolonizacija biljnog tkiva bakterijama može biti epifitna i endofitna. Epifitna kolonizacija predstavlja naseljavanje nadzemnog dela biljke. Razlikuju se slučajna i stalna epifitna mikroflora (Jarak i Čolo, 2007). U sastav stalne epifitne mikroflore najčešće ulaze vrste rodova *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, koliformne i bakterije mlečne kiseline (Allende i sar., 2017). Slučajna epifitna mikroflora može biti sastavljena od humano patogenih bakterija, kao što je *E. coli* i vrste roda *Salmonella*, koje dospevaju do biljke i kolonizuju je kao svog sekundarnog domaćina. Sposobnost kolonizacije, razmnožavanje i prodiranje bakterija na i unutar biljnog tkiva zavisi kako od osobina bakterija, tako i od biljne vrste, starosti biljke i vrste biljnog tkiva, kao i od faktora spoljašnje sredine (temperatura i vlažnost) (Merget i sar., 2019).

Različite sorte iste biljne vrste odlikuje varijabilnost površine lišća u pogledu sadržaja površinskih fenola, proteina, šećera, voska, gustine stoma, što sve može da olakša ili ometa vezivanje patogenih bakterija za biljku (Hunter i sar., 2015). Ispitivanja Hunter i sar. (2015), su pokazala znatno veći stepen vezivanja *Salmonella* Senftenberg za starije listove tri različite sorte salate kod kojih je uočena manja gustina stoma u odnosu na mlade listove. Rezultati Brandl i Amundsona (2008), ukazuju da su lisni nervi i predeo između nerava lista, kao i okolina stoma deo koji bakterije kolonizuju u najvećem procentu, bez obzira na starost lista. Ovi delovi lisne površine predstavljaju svojevrsne zaštitne niše, u kojima su bakterijske ćelije delimično zaštićene od nepovoljnih uslova spoljašnje sredine. U skladu sa ovim, što je hrapavost lisne površine veća, u većoj meri je podložna za kolonizaciju patogenim bakterijama, što su pokazali rezultati ispitivanja adhezije *E. coli* O157:H7 na listove različitih sorti spanaća izvedeni od strane Macarisin i sar. (2014). S druge strane, prisustvo vanćelijskih struktura na površini bakterijske ćelije kao što su fimbrije, pile i flagele, sem što utiče na hidrofobnost i naelektrisanje bakterijske ćelije, u velikoj meri utiče i na sposobnost i jačinu vezivanja bakterija za biljne površine (Ryu i sar., 2004). Bakterije sa većim hidrofobnim karakteristikama jače se vezuju za kutikulu, hidrofobni sloj na biljnim površinama koji se sastoji od masnih kiselina, polisaharida i voska (Patel i Sharma, 2010). Kolonizacija biljaka patogenim bakterijama zavisi i od serotipa. Rezultati ispitivanja Patel i Sharma (2010), pokazuju da je kolonizacija listova kupusa i zelene salate od strane *Salmonella* Tennessee sa aspekta broja vezanih ćelija, veća u odnosu na ostale serotipove salmonela. Uticaj epifitne mikroflore na kolonizaciju biljke patogenim bakterijama ispitivali su Lopez-Velasco i sar. (2012), koji su poredili stopu rasta *E. coli* O157:H7 na listu spanaća u

zajednici sa epifitnim bakterijama koje inhibiraju rast ove patogene bakterije. Zaključili su da je najznačajnije inhibitorno delovanje pokazala *Paenibacillus polymyxa*. Ova filozofska bakterija inhibirala je rast *E. coli* čija je brojnost u zajednici iznosila 7,27 log cfu/ml nakon 48 časova, u odnosu na 10,04 log cfu/ml kontrole.

Endofitna kolonizacija biljaka predstavlja prodiranje patogenih bakterija u biljna tkiva kao što su epidermalne i endodermalne (kortikalne) ćelije, ekstracelularni i intracelularni prostor. Smatra se da bakterije dospevaju u biljku kroz pukotine u epidermisu ili napukline koje su rezultat izbijanja lateralnih korenova (Cooley i sar., 2006).

Epifitna i endofitna kolonizacija biljaka patogenim bakterijama može da protekne bez vidljivih spoljašnjih promena, kao što su pokazali rezultati ispitivanja ciljane kontaminacije salate sa *E. coli* O157:H7 koje su sprovedi Thilmoni i sar. (2006). Nasuprot navedenom, prema rezultatima ispitivanja Schikora i sar. (2008), kontaminacija salate salmonelama dovela je do vidljivih promena u vidu zakržljalog rasta i žutih mrlja na listovima, uz slabije razvijen korenov sistem. Ovo se može objasniti jačom indukcijom biljnog imunog odgovora od strane *E. coli* O157:H7, odnosno suzbijanjem biljnog imunog odgovora od strane salmonele (Lim i sar., 2014).

2.2.5.2. Faktori adhezije patogenih bakterija

Rezultati različitih studija pokazali su da površinske strukture bakterija kao što su flagele, fimbrije i pili predstavljaju strukturne adhezivne komponente, tzv. faktore adhezije, i imaju važnu ulogu u njihovom vezivanju za biotičke i abiotičke površine, a doprinose i njihovoj patogenosti (Kroupitski i sar., 2009; Lapidot i Yaron, 2009). Flagele su dugačke (20 µm), tanke površinske strukture proteinske prirode koje obezbeđuju pokretljivost bakterijama (Wiedemann i sar., 2015). Pri vezivanju/adheziji salmonela i *E. coli* za površinu biljaka njihova je uloga kontradiktorna. Brisanjem gena *fliC* odgovornog za kodiranje podjedinice flagela kod *E. coli* O157:H7 i *S. Senftenberg* dovelo je do smanjenog vezivanja na površinu listova spanaća i salate (Xicohtencatl - Cortes i sar., 2009) i na površinu listova bosiljka (Berger i sar., 2009), ali brisanje istog gena kod *S. Typhimurium* nije uticalo na njeno vezivanje za listove salate (Berger i sar., 2009). Tanke agregativne fimbrije - tafi ili kovrdžave fimbrije - kurli (eng. curli) su amiloidne strukture proteinske prirode na čijem se vrhu nalaze adhezini koji pokazuju afinitet prema različitim molekulima ugljenih hidrata (Yaron i Römling, 2014). Sastavljene su od jedne subjedinice proteina fimbrina (eng. curlin) koja formira filamente širine 2-7 nm. Tanke agregativne fimbrije omogućavaju adheziju bakterijskih ćelija za različite površine, stvaranje agregata i formiranje biofilma. Temperatura je jedan od ključnih faktora za sintezu fimbrija. Kod većine laboratorijskih sojeva *E. coli* i sojeva salmonela sinteza fimbrija se odvija na temperaturi nižoj od 30 °C (Arnqvist i sar., 1992; Bokranz i sar., 2005). Međutim, kod većine kliničkih izolata *E. coli*, uključujući uzročnike sepse, kao i kod *S. Typhimurium*, do sinteze fimbrija može

doći i na temperaturi od 37 °C (Bian i sar., 2000). Ekspresija gena odgovornih za njihovu sintezu kodirana je aktivacijom glavnog transkripcionog regulatora *csgD* (eng. curli subunit genes) (Robinson i sar., 2006). Mutacije glavnog transkripcionog regulatora *csgD* mogu rezultirati sojevima kod kojih dolazi do sinteze fimbrija nezavisno od temperature (Römling i sar.; 1998; Uhlich i sar., 2001). Pored temperature, i ostali uslovi sredine utiču na sintezu fimbrija. Mikroaerofilni uslovi, odsustvo soli, nedostatak hranljivih materija stimulišu sintezu fimbrija (Barnhart i sar., 2006). Pored tankih agregativnih fimbrija, mnogi pripadnici porodice *Enterobacteriaceae* poseduju fimbrije tipa 1, koje takođe imaju važnu ulogu u adherenciji za različite površine. Utvrđena je njihova uloga u vezivanju azot fiksirajućih sojeva *Klebsiella* spp. za koren biljke *Poa pratensis* (Haahtela i sar., 1985).

U tabeli 2.4. prikazano je koji su geni određene patogene bakterije odgovorni za ekspresiju strukturnih adhezivnih komponenti koji igraju ključnu ulogu za vezivanje datog patogena za navedenu vrstu povrća.

Tabela 2.4. Geni odgovorni za vezivanje *Salmonella* spp. i *E. coli* za različite vrste povrća (preuzeto od Yaron i Römling, 2014)

Geni	Uloga	Patogena bakterija	Vrsta povrća	Referenca
<i>adrA</i>	Sinteza celuloze	<i>S. Newport</i> , <i>S. Enteritidis</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2007
<i>bcsA</i>	Sinteza celuloze	<i>S. Enteritidis</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2007
<i>bcsC</i>	Sinteza celuloze	<i>S. Typhimurium</i>	plod paradajza	Shaw i sar., 2011
<i>csgB/csgD</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>S. Newport</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2005
<i>csgA (agfA)</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Torres i sar., 2005
<i>csg (agfA)</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>E. coli</i> K - 12, <i>E. coli</i> O157:H7	lišće salate	Fink i sar., 2012
<i>csgA/bcsA</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>S. Typhimurium</i>	lišće peršuna	Lapidot i sar., 2006
<i>csgB/bcsA</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>S. Enteritidis</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2007
<i>csgD (agfD)</i>	Sinteza fimbrija i celuloze	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Torres i sar., 2005
<i>fliC</i>	Flagele	<i>E. coli</i> O157:H7	lišće spanaća i salate	Xicohtencatl - Cortes i sar., 2009
<i>fliC</i>	Flagele	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Senftenberg</i>	lišće bosiljka	Berger i sar., 2009

Nastavak tabele 2.4.

<i>fliC</i>	Flagele	<i>S. Senftenberg</i>	plod paradajza	Shaw i sar., 2011
<i>fliC/fliB</i>	Flagele	<i>S. Typhimurium</i>	plod paradajza	Shaw i sar., 2011
<i>escN</i>	T3SS	<i>E. coli</i> O157:H7	lišće rukole	Shaw i sar., 2011
<i>espB</i>	T3SS	<i>E. coli</i> O157:H7	lišće rukole	Shaw i sar., 2011
<i>ompA</i>	membranski protein	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Torres i sar., 2005
<i>rpoS</i>	sigma faktor	<i>S. Newport</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2005
<i>pgaC</i>	sinteza poli- β -1,6-N-acetilglukozaamin	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Matthysse i sar., 2008
<i>waal</i>	sinteza LPS	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Matthysse i sar., 2008
<i>wcaD</i>	sinteza kolanske kiseline	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Matthysse i sar., 2008
<i>wcaJ</i>	sinteza kolanske kiseline	<i>S. Enteritidis</i>	klice lucerke	Barak i sar., 2007
<i>ycfR</i>	membranski protein	<i>E. coli</i> K - 12, <i>E. coli</i> O157:H7	lišće salate	Fink i sar., 2012
<i>ycfR</i>	membranski protein	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Saintpaul</i>	lišće spanaća	Salazar i sar., 2013
<i>yhjN</i>	sinteza celuloze	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Matthysse i sar., 2008
<i>yidE</i>	faktor adherencije	<i>E. coli</i> O157:H7	klice lucerke	Torres i sar., 2005
<i>yigG</i>	protein unutrašnje membrane	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Saintpaul</i>	lišće spanaća	Salazar i sar., 2013
<i>yihO</i>	kapsularni O - antigen	<i>S. Enteritidis</i>	klice lucerke	Xicohtencatl - Cortes i sar., 2009

LPS - lipopolisaharid; T3SS - sekretorni sistem tipa III

Nakon vezivanja za površinu biljke, bakterije počinju da se razmnožavaju formirajući mikrokolonije koje se mogu razviti u biofilmove. Formiranje mikrokolonija praćeno je sintezom ekstracelularnih polimera, od kojih je najzastupljenija celuloza, koja ima važnu ulogu u formiranju biofilмова. Ispitivanja Lapidot i Yaron (2009), pokazala su da je vezivanje salmonela za sveže povrće omogućeno sintezom fimbrija i celuloze.

Strukturne adhezione komponente bakterija u kombinaciji sa ekstracelularnim polimerima određuju hidrofobnost površine bakterijske ćelije (Zita i Hermansson, 1997). Hidrofobnost površine u velikoj meri utiče na vezivanje salmonela i *E. coli* za biotičke i abiotičke površine (Palmer i sar., 2007). Istraživanja Ukuku i Fett (2006) koji su ispitivali efekat hidrofobnosti na vezivanje *E. coli* O157:H7, ne-hemoragičnih sojeva *E. coli*, *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* za koru dinje pokazali su da postoji linearna korelacija između jačine vezivanja i hidrofobnosti površine ćelija.

2.2.6. Odgovor biljaka na napad patogenih bakterija

Imuni odgovor na napad patogena kod biljaka bitno se razlikuje u odnosu na životinje, zato što biljke ne poseduju stečeni imunitet, već svaka biljna ćelija poseduje urođeni imunitet, odnosno samostalno reaguje, a i samo mesto infekcije šalje sistemske signale na koje reaguju biljne ćelije (Jones i Dangl, 2006). Odgovor biljaka na napad patogenih bakterija može se odvijati preko receptora na površini biljne ćelije (eng. pattern recognition receptors, PRRs), koji prepoznaju molekule karakteristične za različite patogene (eng. microbial or pathogen-associated molecular patterns, MAMPs ili PAMPs), što dovodi do imuniteta podstaknutog PAMP molekulima (eng. PAMP-triggered immunity, PTI), ili preko receptora tipa NB-LRR (eng. nucleotide binding leucine rich repeat, NB-LRR) koji se nalaze u citoplazmi biljne ćelije i koji prepoznaju efektorske molekule patogena, što aktivira drugi tip imunog odgovora biljaka, koji je podstaknut efektorima (eng. effector-triggered immunity, ETI) (Nürnberg i Brunner 2002; Tsuda i Katagiri 2010).

PAMP molekuli kao što je flagelin, peptidoglikan i lipopolisaharidi, prisutni su kod patogenih bakterija. Prepoznavanje molekularnih obrazaca patogenih bakterija od strane biljnih ćelija (MAMP) može inicirati odbrambeni odgovor biljke (PTI) u vidu sužavanja otvora stoma, sinteze odbrambenih enzima ili antimikrobnih supstanci kao što su etarska ulja i lučenje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Holt i sar., 1999).

NB-LRR proteini mogu prepoznati molekule patogena nazvane faktori avirulencije, koji se nazivaju efektorski molekuli, odnosno efektori (Boller i Felix 2009) i aktivirati biljne odbrambene mehanizme. S druge strane, patogene bakterije mogu suzbiti imuni odgovor biljke aktiviranjem gena odgovornih za toleranciju na oksidativni stres i antimikrobnu rezistenciju.

Kao što je napred navedeno, u odbrambeni odgovor biljaka na napad patogenih bakterija uključene su dve grupe receptora (PRR i NB-LRR receptori), koji su proteinski produkti određenih biljnih gena čiji mehanizam regulacije ekspresije još nije potpuno istražen. Ukoliko je regulacija ekspresije tih gena pravilna, dolazi do sinteze odgovarajućih biljnih receptora za prepoznavanja patogenih bakterija i zaustavljanja napada patogena, dok nepravilna regulacija

ekspresije istih gena može pokrenuti autoimuni odgovor biljaka u odsustvu patogena i zaustaviti rast biljke (Li i sar., 2012). PTI i ETI daju slične odgovore, no ipak je imuni odgovor biljke zasnovan na prepoznavanju efektorskih molekula patogena (ETI) jači i brži i može dovesti do ćelijske smrti. Ovaj tip imunog odgovora biljke poznat je kao hipersenzitivni odgovor (eng. hypersensitive response, HR) (Dodds i Rathjen, 2010).

2.3. Biofilm

2.3.1. Definicija biofilma

Iako se uobičajeno kultivisanje bakterija u tečnoj podlozi najčešće koristi za proučavanje patogenosti i fizioloških osobina bakterija, u prirodi je planktonski rast čiste kulture retka pojava. Proučavanjem opstanka mikroorganizama u raznovrsnim prirodnim staništima ustanovljeno je da većina mikroorganizama opstaje pričvršćena za podloge u vidu biofilmova, a ne kao slobodni organizmi (Ivanović i Vučetić, 2006).

Biofilm se definiše kao sesilna zajednica mikroorganizama ireverzibilno povezanih sa supstratom i međusobno, i uklopljenih u vanćelijski matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a ispoljavaju izmenjen fenotip usled promenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje se ne uočavaju kod planktonskih ćelija (Costerton i sar., 1995).

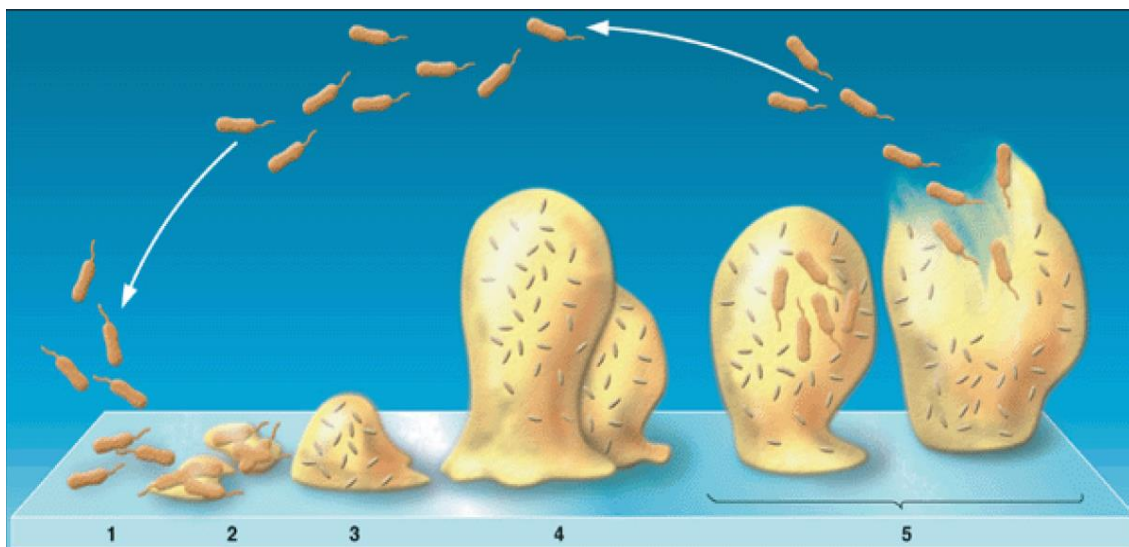
Iako prilikom formiranja biofilma dolazi do ireverzibilnog vezivanja za supstrat, biofilm nije nepokretna zajednica ćelija, već je to jedna funkcionalna životna zajednica u kojoj postoji visok stepen organizovanosti i aktivnosti, kao i međusobne zaštite. Biofilm može biti formiran od jedne vrste bakterija, što je redak slučaj u prirodnom okruženju, ili ga mogu formirati više bakterijskih vrsta, što je mnogo češći slučaj. Bez obzira da li su sastavljeni od jedne ili više vrsta bakterija, biofilmovi se razvijaju po obrascima višećelijskog, odnosno kolektivnog ponašanja (Watnick i Kolter, 2000).

2.3.2. Faze formiranja biofilma

Proces formiranja biofilma od momenta kontakta bakterijske ćelije sa površinom do formiranja zrelog biofilma sastoji se od nekoliko faza (slika 2.2):

- Vezivanje bakterija za površinu (reverzibilno i ireverzibilno vezivanje) (1,2);

- Formiranje mikrokolonija (3);
- Sazrevanje (maturacija) biofilma (4);
- Disperzija (osipanje) biofilma (5) (Milanov, 2008).



Slika 2.2. Faze formiranja biofilma i disperzija zrelog biofilma (preuzeto od Stoodley i sar., 2002)

Razumevanje mehanizama formiranja biofilma od ključne je važnosti za iznalaženje metoda za prevenciju njihovog nastanka i uklanjanje već formiranih biofilmova.

2.3.2.1. Vezivanje bakterija za površinu

Prvi korak kojim se omogućava vezivanje bakterija za neku površinu, a time i posledično formiranje biofilma je kondicioniranje površine organskim i neorganskim materijama iz okoline, čime se formira tzv. kondicioni sloj, koji menja prvobitne fizičko-hemijske osobine površine i omogućava adheziju bakterija. Ovaj sloj ujedno predstavlja izvor hranljivih materija za bakterije (Donlan, 2002).

Vezivanje bakterija za površinu zavisi od ćelijske pokretljivosti i može biti aktivno ili pasivno. Pasivno vezivanje nastaje delovanjem sile gravitacije, difuzijom i dinamikom tečnosti, dok je aktivno vezivanje posredovano prisustvom struktura na površini ćelije bakterija, kao što su flagele, pili, adhezini, proteini, lipopolisaharidi i kapsule (Milanov i sar., 2008).

Sam proces vezivanja sastoji se iz dve faze. U prvih nekoliko sekundi (5-30 s) dolazi do slabog reverzibilnog vezivanja - adhezije planktonskih ćelija bakterija, a koje je posredovano hidrofobnim interakcijama, van der Waals-ovim i elektrostatičkim silama (Boland i sar., 2000;

Tarver, 2009). Adhezija zapravo predstavlja fazu spajanja (eng. docking stage), na koju u velikoj mjeri utiču privlačne i odbojne sile koje istovremeno deluju između bakterijske ćelije i površine (Dunne, 2002). U ovoj fazi bakterije se mogu lako ukloniti sa površine ispiranjem.

U drugoj fazi, tzv. fazi zaključavanja (eng. locking phase), kada sile privlačenja postanu jače od sile odbijanja, može doći do jakog ireverzibilnog vezivanja bakterija za supstrat, koje je praćeno gubitkom sposobnosti kretanja bakterija. Vanćelijske površinske strukture (flagele, fimbrije i pile) imaju glavnu ulogu u savladavanju sila odbijanja. Ireverzibilno vezivanje je praćeno sintezom ekstracelularne polimerne supstance (EPS), nazvane još i glikokaliks, odnosno matriks biofilma (Laus i sar., 2005). Preko EPS bakterijsko vezivanje za supstrat uključuje sile kratkog dometa kao što su dipol-dipol interakcije, kovalentne, vodonične i jonske veze (Milanov i sar., 2008; Bazaka i sar., 2011).

2.3.2.2. Formiranje mikrokolonija

Nakon ireverzibilnog vezivanja za površinu dolazi do umnožavanja bakterijskih ćelija uz stalnu produkciju EPS, čime su stvoreni uslovi za formiranje mikrokolonija. Mikrokolonije su osnovne organizacione jedinice biofilma. U njima su ćelije međusobno povezane intercelularnim vezama, okružene EPS koja ih povezuje međusobno i za površinu. Formiranjem mikrokolonija povećava se gustina bakterijske populacije i da bi ova višćelijska zajednica opstala, dolazi do međućelijske komunikacije produkcijom signalnih molekula nazvanih autoinduceri (AI), a sama pojava je nazvana „Quorum sensing“ (Waters i Bassler, 2005).

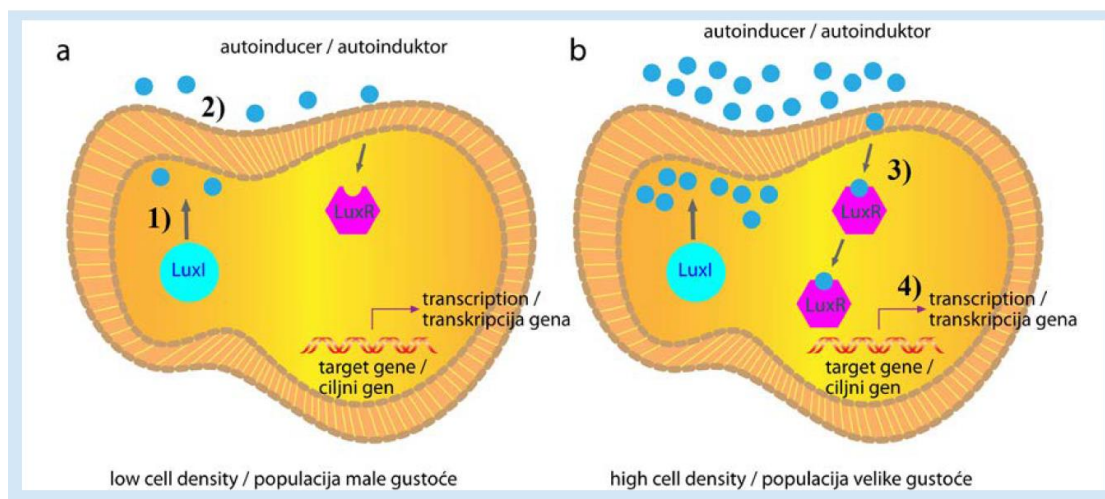
2.3.2.3. „Quorum sensing“

„Quorum sensing“ se može definisati kao minimalna koncentracija ćelija u biofilm populaciji koja je neophodna da bi došlo do zajedničke ekspresije gena pod čijim uticajem nastaje koordinisani odgovor na promene uslova spoljašnje sredine. Fenomen međućelijske komunikacije u biofilmu - „quorum sensing“ odvija se u nekoliko faza:

- Sinteza malih biohemijskih signalnih molekula unutar ćelije (1);
- Otpuštanje signalnih molekula iz bakterijske ćelije, bilo aktivnim transportom ili pasivno (2);
- Prepoznavanje signalnih molekula specifičnim receptorima (3);
- Promene u genskoj regulaciji i transkripcija gena (4) (slika 2.3) (Sifri, 2008).

Bakterije proizvode i oslobađaju hemijske signalne molekule, tzv. „autoinducere“ (AI) koji slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu. Vanćelijska koncentracija signalnih molekula raste sa povećanjem gustine bakterijskih ćelija (Miller i Bassler, 2001).

Signalni molekuli mogu biti različita hemijska jedinjenja koja se razlikuju kod gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. N-acetil-homoserin lakton (AHL) ili autoinducer-1 (AI-1) je identifikovan kod gram-negativnih bakterija, autoinducerski polipeptidi (AI-P) kod gram-pozitivnih bakterija, a autoinducer-3/epinefrin/norepinefrin (AI-3/epi/norepi) kod nekih vrsta enterobakterija (Waters i Bassler, 2005).



Slika 2.3. Mehanizam „quorum sensing“ sistema: sinteza signalnih molekula unutar ćelije (slika a - 1); otpuštanje signalnih molekula van ćelije (slika a - 2); transkripcija gena (slika b - 4); *LuxI* - autoinduktor sintaza (slika a - 1); *LuxR* - autoinduktorski receptor (slika b - 3) (preuzeto od Plančak i sar., 2015)

Tip „quorum sensing“ sistema, koji je regulisan *Lux I/R* homologima i AHL autoinduktorskim molekulom, javlja se kod različitih bakterijskih vrsta kao vid komunikacije unutar iste vrste (Plančak i sar., 2015).

S obzirom da su u prirodnim uslovima biofilmovi najčešće formirani od više bakterijskih vrsta, od suštinske važnosti je bilo rasvetliti način međućelijske komunikacije u takvim zajednicama. S tim u vezi, i kod gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija identifikovan je univerzalni autoinducer (S)-4,5-dihidroksi-2,3-pentandion ili autoinducer-2 (AI-2), koji omogućava komunikaciju između različitih bakterijskih vrsta. Prvi put je otkriven kod bakterije *Vibrio harveyi*. Za produkciju autoinducera-2 odgovoran je gen *luxS* *Vibrio harveyi*, koji kodira enzim sintazu. Geni sličnih sekvenci identifikovani su i kod drugih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (DeKeersmaecker i Vanderleyden., 2003).

2.3.2.4. Maturacija (sazrevanje biofilma)

Nakon što se bakterijske ćelije ireverzibilno vežu za supstrat, dolazi do sazrevanja (maturacije biofilma). Maturacija je rezultat stalne adherencije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija, što na kraju rezultira trodimenzionalnom strukturom zrelog biofilma. Dostizanje stadijuma zrelog biofilma podložno je uticaju raznih spoljašnjih i unutrašnjih faktora. Pri uslovima kontinuiranog dotoka hranljivih materija, biofilm se formira brzo, pa se nakon 24 h može razmatrati kao zreo (Deibel i Schoeni, 2003). Zreli biofilm se sastoji od ćelija mikroorganizama sa udelom 15-20%, a ostatak čini ekstracelularni matriks (ECM), koji predstavlja svojevrsno utočište za bakterije, štiteći ih od iznenadnih promena uslova spoljašnje sredine. Iz ovih razloga je lako razumeti zašto bakterije preferiraju život u biofilmu u odnosu na planktonski oblik (Watnick i Kolter 2000; Flemming i Wingender 2010). Unutrašnjost biofilma je ispresecana vodenim kanalima koji se mestimično otvaraju na površini. Od vitalnog su značaja, jer omogućavaju difuziju hranljivih materija i kiseonika, kao i uklanjanje otpadnih produkata metabolizma ćelija uklopljenih u biofilm. Međutim, rast bakterijskog biofilma nije beskonačan proces, već je ograničen dostupnošću hranljivih materija, njihovom perfuzijom do bakterijskih ćelija, kao i uklanjanjem produkata metabolizma ćelija (Milanov i sar., 2008).

Sazrevanjem biofilma uz formiranje ćelijskih aglomerata menjaju se uslovi okoline za ćelije koje se nalaze na površini u odnosu na ćelije koje se nalaze u dubljim slojevima biofilma, što dovodi do razlika u njihovoj metaboličkoj i reproduktivnoj aktivnosti. Fiziološki status ćelija koje se nalaze u gornjim delovima biofilma sličan je kao kod planktonskih ćelija, jer lakše dolaze do hranljivih materija i kiseonika i lako se oslobađaju produkata metabolizma. S druge strane, dotok hranljivih materija i kiseonika do ćelija koje se nalaze u dubljim slojevima biofilma je otežan, a zbog manjka kiseonika ovde vladaju anaerobni uslovi (Stewart i Franklin, 2008). Smatra se da kada biofilm dostigne debljinu od 10-25 μm uslovi u njegovoj osnovi (sloju najbližem supstratu) postaju anaerobni (Hamilton, 1987).

2.3.2.5. Ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks predstavlja osnovnu komponentu biofilmova u koju su uklopljene mikrokolonije bakterija, međusobno odvojene vodenim kanalima. Kod većine bakterijskih biofilmova, ECM je glavna komponenta koja čini 90% mase biofilma, dok mikroorganizmi predstavljaju manje od 10%. Ekstracelularni matriks je visoko hidrirana supstanca koja se pored vode sastoji od egzopolimera i ostalih produkata ćelijske aktivnosti, kao što su enzimi, lizirane ćelije, adsorbovani molekuli iz okoline. Od egzopolimera najviše su zastupljeni polisaharidi, proteini, nukleinske kiseline, lipidi (Donlan i Costerton, 2002). Prisustvo enzima koji su sastavni

deo matrikasa biofilma dovodi do razgradnje pojedinih komponenti matriksa, što za pojedine ćelije može biti izvor hranljivih materija, dok je za druge put izlaska iz biofilm zajednice (Allison, 2003). Sastav ECM je promenljiv i s obzirom da je produkt ćelijske aktivnosti, zavisi od unutrašnjih (genotip bakterija) i spoljašnjih faktora, koji uključuju fizičko-hemijske uslove okoline (Flemming i Wingender, 2010). Kod gram-negativnih bakterija ECM se prvenstveno sastoji od neutralnih i polianjonskih polisaharida, dok je kod gram-pozitivnih bakterija sastavljen uglavnom od katjonskih polisaharida (Flemming i sar., 2000; Sutherland, 2001).

Uloga matriksa biofilma je višestruka. Matriks je taj koji daje stabilnost i strukturu biofilmu, omogućava adheziju i agregaciju bakterijskih ćelija za biotičke i abiotičke površine, omogućava koheziju biofilma, učvršćujući ga za površinu i čineći ga mehanički stabilnim, služi kao izvor hranljivih materija omogućavajući akumulaciju hranljivih materija iz spoljašnje sredine, omogućava eliminaciju štetnih produkata ćelijskog metabolizma, a omogućava i brojne međućelijske interakcije, uključujući i horizontalni transfer gena. Ipak, jedna od važnih uloga matriksa biofilma, ako ne i najvažnija za opstanak bakterija u različitim ekosistemima, je zaštitna uloga kojom štiti bakterije od isušivanja, dejstva biocida, antibiotika, teških metala, UV zračenja, i ćelija imunog sistema (Flemming i Wingender, 2010; Yaron i Römmling, 2014). Stoga je sasvim razumljivo organizovanje života bakterija u zajednicama koje nazivamo biofilmovima.

2.3.2.6. Disperzija biofilma

Nakon sazrevanja, završna faza razvoja biofilma je odvajanje ćelija biofilma i njihova disperzija u okolnu sredinu. Ovo je suštinska faza životnog ciklusa biofilma koja omogućava preživljavanje i širenje bakterija. Disperzija bakterijskog biofilma se odvija u tri faze:

- Odvajanje ćelija od kolonija biofilma;
- Premeštanje ćelija na novu lokaciju;
- Vezivanje ćelija za podlogu na novoj lokaciji (Karatan i Watnick, 2009).

Pri disperziji biofilma, osnovni uslov da bi ćelije napustile biofilm je narušavanje strukture ECM, što može da bude složen proces koji uključuje brojne faktore koji se mogu podeliti na:

- Biohemijske (produkcija enzima koji razgrađuju ECM, litička aktivacija bakteriofaga, „quorum sensing“ signali);
- Ekološke (dostupnost hranljivih materija, nagomilavanje produkata metabolizma, promena osmolarnosti);
- Fizičke (trenje, abrazija, ljudska aktivnost) (Thormann i sar., 2006).

Na primer, za disperziju biofilma *E. coli* i *P. aeruginosa* ključnu ulogu ima signalni molekul ciklični diguanilat (c-di-GMP). Pored cikličnog diguanilata, važnu ulogu u ovom procesu ima c-

di-GMP vezujući protein *BdcA*, koji smanjuje količinu dostupnog c-di-GMP-a, čime se smanjuje proizvodnja ECM-a i povećava pokretljivost ćelija, što za posledicu ima disperziju biofilma (Kostakioti i sar., 2013).

U zavisnosti od uzroka, narušavanje strukture biofilma može biti pasivno (gde uzrok mogu biti spoljašnje mehaničke sile kao što su trenje, abrazija, ljudski faktor, dejstvo bakterijskih predatora) ili aktivno (koje je inicirano od samih bakterijskih ćelija koje pod uticajem različitih spoljašnjih faktora kao što su dostupnost hranljivih materija i kiseonika i povećanje otpadnih produkata metabolizma) napuštaju biofilm u potrazi za novim pogodnijim mestom gde ga mogu ponovo formirati (Kaplan, 2010; Solano i sar., 2014).

Aktivan proces disperzije bakterija iz biofilma je rasejavaje, koje nastaje kada dolazi do odvajanja velikog broja pojedinačnih ćelija ili manjih ćelijskih agregata iz unutrašnjosti biofilma (Sheffield i Crippen, 2012).

Erozija je proces koji prati sve faze formiranja biofilma i predstavlja odvajanje pojedinačnih ćelija ili manjih ćelijskih agregata iz biofilma. U prvim fazama formiranja biofilma erozija je slabo izražena, ali vremenom, povećanjem debljine biofilma i povećanjem delovanja sila trenja, erozija se povećava (Telgmann i sar., 2004). Otkidanje predstavlja odvajanje velikih delova biofilma. Karakteristično je za zrele „stare“ biofilmove i nastaje kao posledica nedostatka hranljivih materija i kiseonika (Donlan, 2002). Iako se uglavnom erozija i otkidanje smatraju pasivnim procesima disperzije biofilma, ovi procesi mogu biti i aktivni, tj. inicirani od samih bakterijskih ćelija (Kaplan, 2010).

Abrazija kao jedan od načina disperzije biofilma predstavlja narušavanje strukture biofilma usled sudaranja čestica okolne tečnosti o površinu biofilma (Sheffield i Crippen, 2012).

Disperzija i rast biofilma su procesi koji se nalaze u pozitivnoj korelaciji: povećanjem rasta biofilma povećava se i proces disperzije.

2.3.3. Ekstracelularni matriks *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*

Ekstracelularni matriks *E. coli* i *S. Typhimurium* sastoji se iz proteinskog i polisaharidnog dela. Proteinski deo *E. coli* čine fimbrije, DNK, antigen 43, fimbrije tip 1. Polisaharidni deo ECM *E. coli* i *S. Typhimurium* čine celuloza, kolanska kiselina i ostali manje zastupljeni kapsularni polisaharidi (Zogaj i sar., 2001; Whitchurch i sar., 2002; Beloin i sar., 2008).

Tanke agregativne fimbrije - tafi kod salmonela (eng. thin aggregative fimbriae) koje čine većinski proteinski deo ECM *E. coli* i *S. Typhimurium* su površinske nitaste strukture, koje poseduju mnoge gram-negativne bakterije. One su kraće (0,2-0,3 μm) i tanje od flagela, a izgrađene su od strukturnog proteina kurlina. Obično se nalaze u velikom broju na površini

bakterija. Njihova glavna funkcija je adhezija. Pomoću njih bakterije mogu da adheriraju i kolonizuju razne biotičke i abiotičke površine, formirajući biofilm. To su tzv. „faktori kolonizacije“, koji su značajni i za virulenciju patogenih bakterija. Kao što je pomenuto, ekspresija fimbrija je kod *Enterobacteriaceae* temperaturno zavistan fenomen i odvija se na temperaturi nižoj od 30 °C (Bokranz i sar., 2005). Izuzetak su pojedini sojevi salmonela, uključujući *S. Typhimurium*, koja može da sintetiše fimbrije u *in vitro* uslovima i na 37 °C (Olsen i sar., 1998). Kod *E. coli* sinteza fimbrija na temperaturi od 37 °C je retko viđen fenomen i zabeležen je samo kod pojedinih kliničkih izolata ovog patogena, uzročnika sepse. Enterotoksigeni, enteropatogeni i uropatogeni sojevi (EPEC, ETEC i UPEC) *E. coli* sintetišu fimbrije samo na temperaturi ispod 30 °C (Barnhard i sar., 2006).

Fimbrije tipa 1 izgrađene su od agregata strukturnog proteina fimbrina u vidu spiralne strukture, dijametra 7 nm. Fimbrije tipa 1, prisutne kod *E. coli* i *Salmonella* vrsta, specifično se vezuju za rezidue d-manoze (Steenackers i sar., 2012). Kao i tanke agregativne fimbrije, omogućavaju adheziju bakterija za biotičke i abiotičke površine.

Antigen 43 je protein spoljašnje membrane *E. coli* koji pokreće ćelijsku agregaciju, inicirajući međućelijske interakcije, kao i interakcije između ćelija i površine (Danese i sar., 2000; Kjaergaard i sar., 2000).

Proteinski deo ECM *S. Typhimurium* čini, pored fimbrija, i veliki površinski protein *BapA* (eng. biofilm-associated protein). Poput fimbrija, ovaj protein posreduje u međućelijskim interakcijama, dovodeći do ćelijske agregacije (Latasa i sar., 2006).

Od polisaharida koji ulaze u sastav ECM *E. coli* i *S. Typhimurium* najzastupljenija je celuloza. Celuloza je polimer koji se sastoji od monomera glukoze međusobno povezanih β -1,4-glikozidnim vezama u vidu makromolekula fibrilarne strukture (Zogaj i sar., 2001). Ovaj polimer je široko rasprostranjen u prirodi, jer je sastavni deo ćelijskog zida biljaka, međutim kod bakterija celuloza je vanćelijski produkt koji u biofilm zajednici pruža mehaničku i hemijsku zaštitu bakterijama i podržava međućelijsku agregaciju (Vestby i sar., 2009). Sinteza celuloze je, kao i sinteza fimbrija, temperaturno zavisna i odvija se na temperaturama nižim od 30 °C. Prema navodima Bokranz i sar. (2005), koekspresija fimbrija i celuloze na temperaturi od 28 °C i 37 °C karakteristična je za fekalne izolate *E. coli*, dok je za izolate *E. coli* uzročnike urinarnih infekcija koekspresija ove dve glavne komponente matriksa biofilma moguća samo na temperaturi od 28 °C.

Kolanska kiselina je ekstracelularni, kapsularni, negativno naelektrisani polisaharid koji se sastoji od ponavljajućih podjedinica D-glukoze, D-fruktoze, D-galaktoze i D-glukuronske kiseline sa bočnim lancima piruvata i O-acetila (Hanna i sar., 2003). Njena sinteza je limitirana temperaturom i ne sintetiše se na temperaturama višim od 30 °C. Ispitivanja Danese i sar. (2000) pokazala su da sinteza kolanske kiseline nema značaja u početnoj fazi vezivanja bakterija za površinu. Njena uloga dolazi do izražaja u kasnijim fazama razvoja biofilma i povezuje se sa formiranjem trodimenzionalne strukture biofilma.

Sojevi *E. coli* i *Salmonella* spp. sintetišu više od 80 različitih kapsularnih polisaharida koji mogu biti sastavni deo matriksa biofilma i koji su klasifikovani u nekoliko grupa. Kapsularni polisaharidi grupe 4 sastoje se od O - polisaharida strukturno sličnih O - polisaharidima LPS i nazvani su kapsularni O - antigen. Kapsularni O - antigen štiti ćeliju od isušivanja (Gibson i sar., 2006).

Generalno, ekspresija komponenti matriksa biofilma nastaje kao odgovor bakterijskih ćelija na nepovoljne uslove spoljašnje sredine i regulisana je ekspresijom specifičnih setova gena kao odgovor na stres.

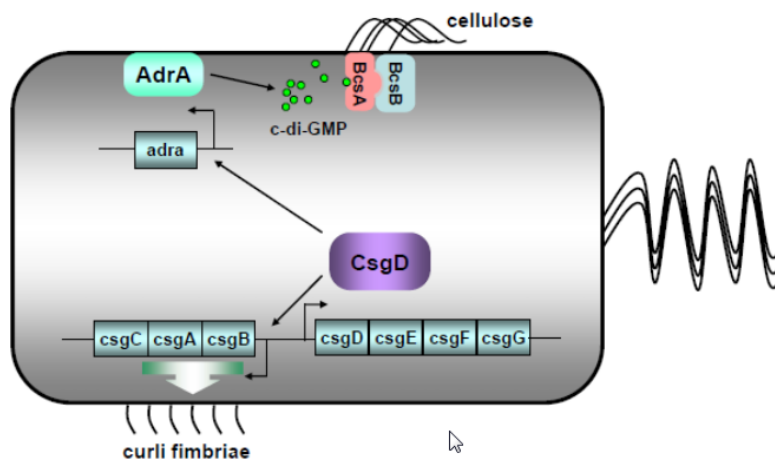
2.3.3.1. Biofilm fenotip i genetska regulacija komponenti matriksa biofilma *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*

Fenotip ćelija unutar biofilma se razlikuje od fenotipa planktonskih ćelija, jer su i uslovi sredine unutar biofilma potpuno različiti u odnosu na uslove sredine u kojoj se razmnožavaju planktonske ćelije. Fenotipske osobine mogu biti posledica genetskih mutacija ili ekspresije novih gena (Milanov i sar., 2008).

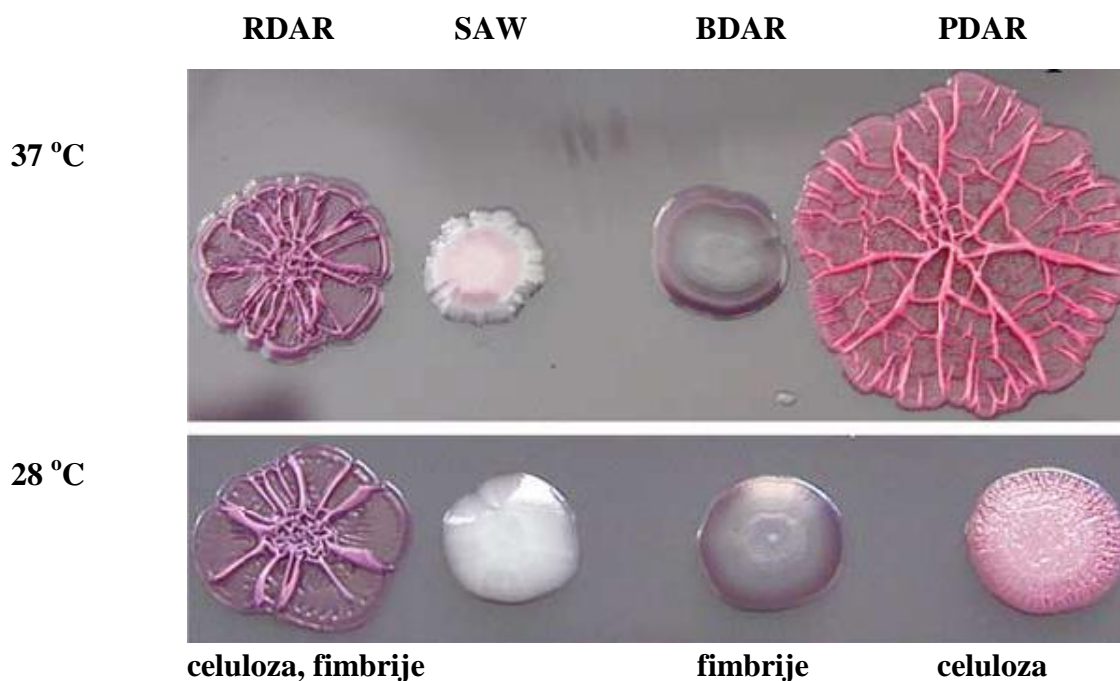
Biofilm kao zajednica ćelija, radi njenog opstanka nameće obrasce višećelijskog ponašanja, što se ogleda u ekspresiji različitih gena kojima se stiču nove osobine neophodne za preživljavanje, uz sintezu produkata koje ovi geni kodiraju. S obzirom na to da je formiranje biofilma praćeno sintezom ECM, određivanje biofilm fenotipa zasniva se na detekciji dve glavne komponente ECM - celuloze i fimbrija na osnovu morfotipa kolonija izraslih na Kongo crvenom agaru (KCA) u koji su inkorporirane dve indikatorske boje, kongo crveno i brilijant plavo (Olsen i sar., 1998; Bokranz i sar., 2005). Kongo crveno je nespecifična diazo boja, čiji se spektar apsorbanci razlikuje u zavisnosti od toga da li je vezana za fimbrije ili celulozu. Njenom inkorporacijom u podlogu omogućena je detekcija obe komponente matriksa biofilma bilo da su prisutne obe ili samo jedna od njih. Brilijant plavu boju mogu da apsorbuju samo proteinske komponente matriksa biofilma (fimbrije) (Uhlich i sar., 2006).

Sinteza celuloze i fimbrija koje su glavne komponente ECM *E. coli* i *S. Typhimurium* regulisana je ekspresijom glavnog transkripcionog regulatora *csgD*, što je prikazano na slici 2.4. Promene spoljašnjih uslova sredine kao što su temperatura, pH, osmolarnost, dostupnost hranljivih materija i kiseonika, UV zračenje, gustina ćelija utiču na ekspresiju *csgD* (Gerstel i Römling, 2003). Pored navedenog, kontrola ekspresije *csgD* posredovana je i sigma faktorom *RpoS* (eng. stress response regulator, RNA polymerase, sigma S), stacionarne faze, zbog čega je njegova transkripcija maksimalna na kraju eksponencijalne faze ili tokom rane stacionarne faze (Römling i sar., 1998, Steenackers i sar., 2012). Dva odvojena transkripciona operona kodiraju gene za sintezu celuloze *bcs* (eng. bacterial cellulose synthesis) označena kao *bcsABZC* i *bcsEFG* (Zogaj

i sar., 2001). Aktivnost *bcsABZC* i *bcsEFG* operona je regulisana takođe preko *csgD*, ali indirektno preko ekspresije *adrA* (eng. *agfD*-dependent regulator-*csgD*) proteina, koji je član *GGDEF* familije proteina koja je takođe regulisana preko *csgD* proteina (Römling i sar., 2000). *AdrA* kodira gen za diguanilat ciklazu koja je uključena u sintezu c-di-GMP, koji je efektorni molekul za aktivaciju sinteze celuloze vezivanjem za *bcsB* (Römling, 2005; Jonas i sar., 2007).



Slika 2.4. Ekspresija kurli fimbrija (eng. curli fimbriae) i celuloze (eng. cellulose) kod *E. coli* i *S. Typhimurium* pomoću glavnog transkripcionog regulatora *csgD* (preuzeto od Wang, 2008)



Slika 2.5. Morfotip kolonija *E. coli* na KCA nakon kultivisanja na 28 °C tokom 48 h i na 37 °C tokom 24 h (preuzeto od Bokranz i sar., 2005)

Regulacija ekspresije *csgD* proteina inicirana od strane regulatora *LuxR* stimuliše sintezu fimbrija putem transkripcione aktivacije *csg* gena uključenih u biosintezu fimbrija i

organizovanih u dva suprotna operona *csgBAC* i *csgAFG* (Gerstel i Römling, 2003; Zogaj i sar., 2003; Giaouris i sar., 2012). Pored fimbrija i celuloze, *csgD* reguliše ekspresiju i *BapA* i kapsularnog O - antigena (Latasa i sar., 2006).

Uloga glavnog transkripcionog regulatora *csgD* odgovornog za sintezu fimbrija i celuloze značajnija je u interakciji patogenih bakterija i biljaka u odnosu na interakcije sa životinjskim domaćinom (Barak i sar., 2012).

Ekspresija gena odgovornih za sintezu fimbrija *csg* i celuloze *bcs* uzrokuje na KCA pojavu ljubičasto-crvenih, suvih kolonija R-forme koje se u literaturi označavaju kao RDAR (eng. red, dry and rough) morfotip.

Odsustvo ekspresije gena odgovornih za sintezu celuloze-*bcs* s jedne i ekspresija gena odgovornih za sintezu fimbrija-*csg* s druge strane dovodi do pojave braon, suvih kolonija R-forme označenih u literaturi kao BDAR (eng. brown, dry and rough) morfotip kolonija.

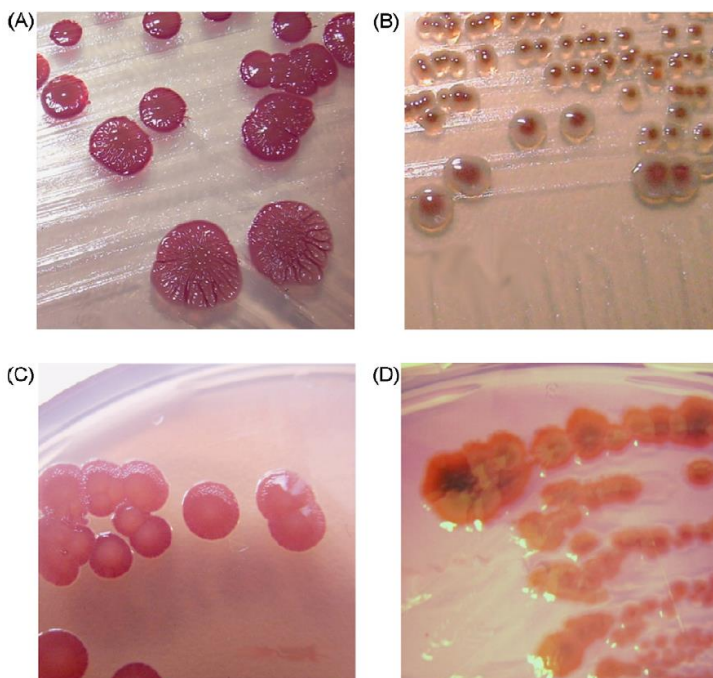
U slučaju nefunkcionalnosti gena odgovornih za sintezu fimbrija-*csg* na KCA, dolazi do pojave roze, suvih kolonija R-forme koje se u literaturi označavaju kao PDAR morfotip (eng. pink, dry and rough). PDAR morfotip nastaje kao posledica ekspresije gena odgovornih za sintezu celuloze - *bcs*.

Potpuna inhibicija gena odgovornih za sintezu fimbrija-*csg* i gena odgovornih za sintezu celuloze-*bcs* dovodi do pojave braon, mukoidnih kolonija S-forme koje se u literaturi označavaju kao SBAM (eng. smooth, brown and mucoid) morfotip. Za ovaj morfotip je karakteristična prekomerna sinteza kapsularnog polisaharida.

Potpuno odsustvo ekspresije glavnog transkripcionog regulatora *csgD* uzrokuje pojavu kolonija na KCA beličaste boje S-forme koje se u literaturi označavaju kao SAW (eng. smooth and white) morfotip (Römling i sar., 2000; Zogaj i sar., 2001; Solano i sar., 2002).

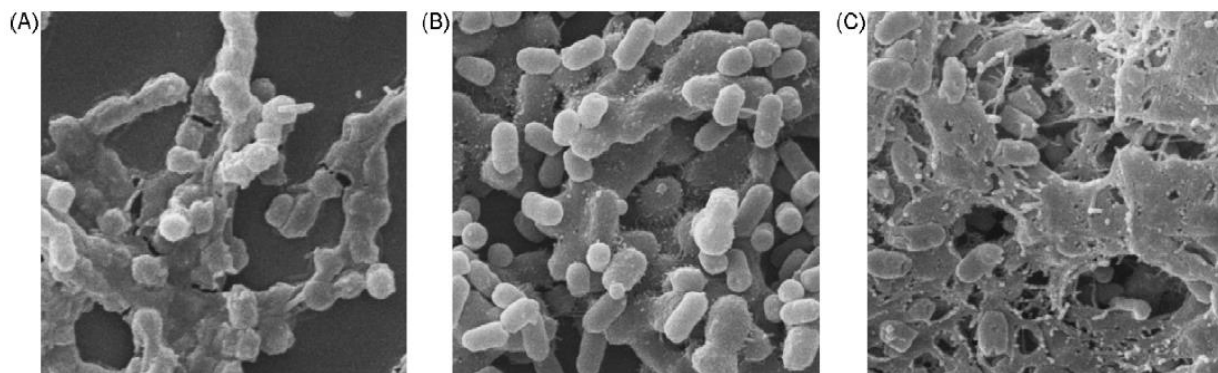
Uticaj temperature na ekspresiju glavnog transkripcionog regulatora *csgD* odgovornog za sintezu komponenti matriksa biofilma, celuloze i fimbrija od čega zavisi morfotip kolonija na KCA u slučaju *E. coli* prikazan je na slici 2.5.

Više autora je opisalo korelaciju između morfologije kolonije i sposobnosti formiranja biofilma (Gerstel i Römling, 2003; Römling, 2005; Kim i Wei, 2007). Rezultati ispitivanja Malcove i sar. (2008) su to potvrdila. Pomenuti autori su ispitali devedeset četiri izolata *S. Typhimurium* različitog porekla koja su nakon kultivisanja na Luria Bertrani agaru (LBA) suplementiranog sa kongo crvenom i brilijant plavom bojom tokom 96 h na 28 °C formirala kolonije morfotipa RDAR (62 izolata), BDAR (10 izolata), SBAM (5 izolata) i SAW (17 izolata) (slika 2.6).



Slika 2.6. Morfotip kolonija *S. Typhimurium* na KCA nakon kultivisanja na 28 °C tokom 96 h: (A) RDAR, (B) SAW, (C) BDAR i (D) SBAM (preuzeto od Malcova i sar., 2008)

Sposobnost formiranja biofilma izvedena je testom u polistirenskim mikrotitar pločama sa 96 bunarića na 28 °C tokom 96 h. Vizuelizacija formiranog biofilma pri istim uslovima kultivisanja (96 h, 28 °C) formiranog na staklenim kuponima izvedena je primenom skening elektronske mikroskopije (SEM).



Slika 2.7. SEM mikrografije biofilma različitih morfitipova *S. Typhimurium*, formiranog na staklenim kuponima tokom 96 h na 28 °C: (A) BDAR, (B) RDAR i (C) SBAM (preuzeto od Malcova i sar., 2008)

Rezultati SEM koji su prikazani na slici 2.7. prikazuju biofilmove izolata *S. Typhimurium* koji su formirali RDAR, BDAR i SBAM morfitip koji karakteriše sinteza jedne ili obe komponente

matriksa biofilma. Izolati *S. Typhimurium* koji su formirali SAW morfotip kolonija nisu formirali biofilm, jer je za njih karakteristično odsustvo sinteze bilo koje komponente matriksa biofilma.

Izolati *S. Typhimurium* koji pripadaju SBAM morfotipu formirali su biofilm uprkos činjenici da ne sintetišu ni celulozu, ni fimbrije. Njihova sposobnost formiranja biofilma je posledica prekomernog lučenja kapsularnog polisaharida koji se na SEM mikrografiji uočava u vidu granula i filamenata karakterističnih za visoko hidrirane strukture poput kolanske kiseline (Prigent-Combaret i sar., 2000).

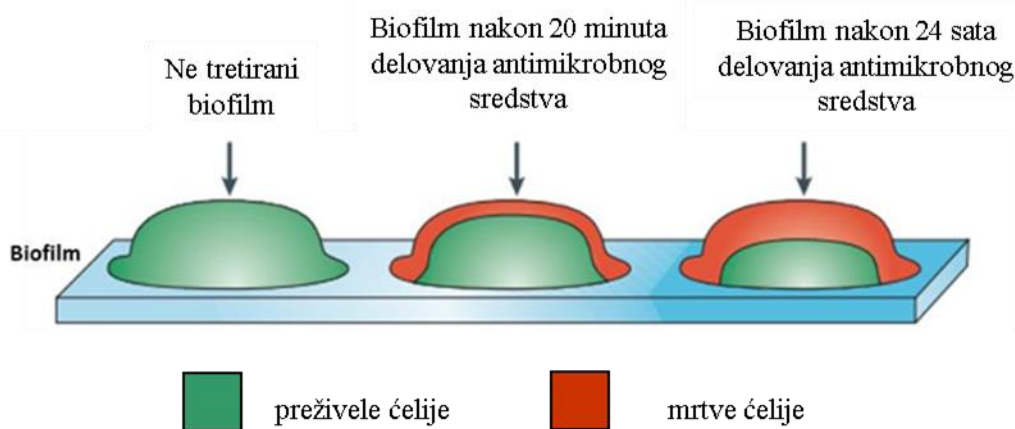
2.3.4. Otpornost biofilmova na dejstvo antimikrobnih sredstava

Poznato je da je biofilm veoma pogodna sredina za opstanak bakterija u spoljašnjem okruženju, štiteći ih od nepovoljnih uslova kao što je visoka/niska temperatura, UV zračenje, isušivanje (Cos i sar., 2010). Važna prednost biofilmova je što su bakterije uklopljene u biofilm formaciju daleko otpornije prema dejstvu antibakterijskih sredstava nego kada se nalaze u planktonskom (slobodno plivajućem) obliku (Dunne i sar., 2002). Prema navodima Patel (2005), minimalna inhibitorna i minimalna baktericidna koncentracija antibiotika za bakterije biofilma je 100-1000 puta veća u odnosu na planktonski oblik istih, a moguće je i da su 150-3000 puta otpornije prema dejstvu različitih dezinficijenasa. Nepotpun biocidni efekat nakon tretmana biofilm populacije različitim antimikrobnim sredstvima (slika 2.8) dovodi do toga da preživele bakterije nakon prestanka dejstva antimikrobnog sredstva mogu ponovo da izazovu infekciju, čime i dalje predstavljaju opasnost kao izazivači alimentarnih toksikoinfekcija (Davies, 2003). Prema navodima Davies i sar. (2003), faktori koji utiču na povećanu rezistenciju bakterija biofilma na dejstvo antimikrobnih sredstava su:

- Ograničena difuzija antimikrobnog sredstva kroz matriks biofilma - Difuzija antibakterijskih sredstava kroz ECM je relativno mala (Kaali i sar., 2011). Matriks biofilma deluje kao difuziona barijera i molekulska sito i izuzetno je efikasan u sprečavanju difuzije antimikrobnih sredstava veće molekulske mase. Difuzija antimikrobnog sredstva ka dubljim slojevima biofilma dovodi do smanjenja njegove koncentracije, čime su samo ćelije površinskog sloja biofilma izložene letalnim koncentracijama. Matriks biofilma svojom kompleksnom strukturom takođe usporava difuziju antimikrobnog sredstva, obezbeđujući vreme za razvoj ćelija perzistera i uspostavljanje antimikrobne rezistencije u dubljim slojevima biofilma (Čabarkapa i sar., 2013). Blokirajući difuziju antimikrobnog sredstva, ECM stupa u interakciju s njim i inaktivira ga (Stewart i Costerton, 2001).
- Promena mikrookoline ćelija biofilma i usporeni metabolizam - Razvojem biofilma menjaju se uslovi mikrookoline bakterija u pogledu dostupnosti

kiseonika i hranljivih materija i uklanjanja produkata metabolizma, a u zavisnosti od toga gde se nalaze (Čabarkapa i sar., 2013). U dubljim slojevima biofilma, gde je u velikoj meri dostupnost hranljivih materija i kiseonika ograničena, a uklanjanje produkata metabolizma otežano, bakterije se nalaze u vijabilnom ali nekultivabilnom stanju - VBNC. Bakterije u VBNC stanju se ne umnožavaju i imaju usporen metabolizam, što ih čini znatno otpornijim na dejstvo antimikrobnih sredstava u poređenju sa ćelijama u površinskom sloju biofilma i planktonskim ćelijama (Cos i sar., 2010). Budući da je dejstvo antibakterijskih sredstava na metabolički aktivne ćelije efikasnije, ćelije usporenog metabolizma doprinose otpornosti biofilma na antibakterijska sredstva (Kaali i sar., 2011).

- Ćelije perzisteri - Mali deo biofilm populacije čine tzv. ćelije perzisteri, koje preživljavaju i nakon dugotrajnog izlaganja delovanju antimikrobnog sredstva. Ćelije perzisteri održavaju svoju metaboličku aktivnost na minimumu, što ih čini neosetljivim na dejstvo antimikrobnih sredstava. Ova uporna biofilm populacija može drastično inhibirati mogućnost potpunog iskorenjivanja biofilмова (Paraje, 2011). Mehanizam odgovoran za njihov nastanak i otpornost još nije potpuno razjašnjen (Mah i O'Toole, 2001; Cos i sar., 2010).



Slika 2.8. Dejstvo antimikrobnog sredstva na biofilm (preuzeto od Davies, 2003)

- Ćelijska smrt - Mrtve ćelije kao sastavni deo matriksa biofilma utiču na povećanje otpornosti biofilma prema dejstvu antimikrobnih sredstava, delujući kao diluzioni gradijent (Hall-Stoodley i Stoodley, 2005).

2.3.5. Antibiofilm metode

Proces formiranja biofilma odvija se u nekoliko faza, stoga, da bi se mogle razviti metode kako za sprečavanje nastanka tako i za uklanjanje već postojećih biofilmova neophodno je poznavanje svih faktora koji su uključeni u svaku fazu formiranja biofilma (Kumar i sar., 2011). Prema dosadašnjim saznanjima razvoj efikasnih metoda radi sprečavanja nastanka i uklanjanja već formiranog biofilma treba da se zasniva na:

- Inhibiciji adhezije i kolonizacije površine;
- Interferenciji QS inhibitora sa signalnim molekulima, što dovodi do modifikacije razvoja biofilma;
- Disagregaciji/razaranju matriksa biofilma (Francolini i Donelli, 2010).

Metoda inhibicije adhezije i kolonizacije površine može da se zasniva na promeni fizičko-hemijskih osobina površine sa ciljem stvaranja antiadhezivne površine koja sprečava adheziju, a time i dalju kolonizaciju, ili inkorporaciji antimikrobnih sredstava na površinu (Rodrigues, 2011). S obzirom na hidrofobnu prirodu površine bakterijske ćelije, inhibicija adhezije se može postići premazivanjem površine hidrofilnim polimerima, kao što je hijaluronska kiselina (Cassinelli i sar., 2000), koja se koristi za premazivanje poliuretanskih katetera. Hidrofilni premazi sprečavaju kondicioniranje površine, posledično ometajući adheziju bakterija (Francolini i Donelli, 2010; Rodrigues, 2011). Sem hijaluronske kiseline, u medicinskoj praksi se često koriste premazi na bazi antibiotika koji sprečavaju razne infekcije do kojih dolazi ugradnjom katetera i drugih implantanata različite namene. Nedostatak ove metode može biti visoka cena antimikrobnog premaza (Harron i sar., 2016).

Metoda interferencije sa signalnim molekulima zasniva se na vezivanju signalnih molekula za druge molekule (QS inhibitore), čime se sprečava međućelijska komunikacija i zajednička ekspresija gena odgovornih za formiranje biofilma kao odgovora na nepovoljne uslove sredine (Francolini i Donelli, 2010). Prema Zhu i sar. (2011), pigmenti koje sintetiše gljiva *Auricularia auricular* mogu da se vežu za signalne molekule, inhibirajući sintezu violaceina kod *Chromobacterium violaceum*. Nedostatak ove metode je u činjenici da se prirodni QS inhibitori proizvode u malim koncentracijama, a mogu biti i toksični.

Treća antibiofilm metoda usmerena je prema razaranju matriksa biofilma - ECM, što zahteva korišćenje supstanci koje mogu da razore fizički integritet ECM. Disperzin B koji proizvodi *Actinobacillus actinomycetemcomitans* može da razori zrele biofilme *Staphylococcus aureus* i *S. epidermidis* razgradnjom polisaharida međućelijske agregacije. Iako su enzimi efikasni u razaranju biofilm matriksa, postoji nekoliko ograničenja njihove upotrebe. Jedna od poteškoća njihove primene je činjenica da svaki enzim ima svoj specifičan način delovanja i stoga je teško identifikovati enzime koji su efikasni protiv svih bakterijskih biofilmova. S druge strane, visoka

cena i niska komercijalna dostupnost takođe ograničavaju njihovu upotrebu u strategiji kontrole biofilma (Sadekuzzaman i sar., 2015).

2.3.5.1. Biofimovi na opremi i njihovo uklanjanje

Sposobnost bakterija da adheriraju na različite površine i formiraju biofilm predstavlja veliki higijenski problem u prehrambenoj industriji koji lako može da preraste u javno-zdravstveni problem. Većinu ovih biofilmova formiraju patogene bakterije, tako da oni predstavljaju kontinuirani izvor kontaminacije koji može da dovede ne samo do kvarenja hrane, već i do prenošenja bolesti. Smatra se da je biofilm uzrok 65-80% humanih infekcija (Coenye i sar., 2010). Bakterije mogu formirati biofilme na različitim materijalima kao što su nerđajući čelik, plastika, guma, teflon, staklo, kao i na namirnicama životinjskog i biljnog porekla (Kerekes i sar., 2015). Konvencionalne metode za uklanjanje biofilmova i dezinfekciju zasnivaju se najčešće na primeni hemijskih sredstava na bazi hlora, vodonik-peroksida, persirćetne kiseline, kvaternernih amonijumovih soli i dr. Ova hemijska sredstva pokazuju različit antibiofilm efekat. Sredstva na bazi hlora pokazala su manji efekat na biofilm koji su zajedno formirali *Pseudomonas* spp. i *L. monocytogenes* na površini od nerđajućeg čelika, u odnosu na sredstva na bazi persirćetne kiseline (Van Houdet i Michiels, 2010). Biofilm *L. monocytogenes* nije bilo moguće ukloniti ni upotrebom dezinficijensa na bazi kvaternernih amonijumovih jedinjenja ili na bazi vodonik peroksida. Dodatni problem upotrebe hemijskih dezinficijensa predstavlja činjenica da je njihova upotreba u prehrambenoj industriji ograničena, jer u kombinaciji sa organskim jedinjenjima može da dođe do stvaranja nusproizvoda štetnih po zdravlje ljudi, a utiču i na zagađenje životne sredine. Pored metoda koje se zasnivaju na primeni hemijskih sredstava, za uklanjanje biofilmova, koriste se i fizičke metode kao što je pranje mlazom pod pritiskom, jonizujuće zračenje, primena ultrazvuka (Gibson i sar., 1999).

2.3.5.2. Biofilmovi na površini hrane i njihovo uklanjanje

Prisustvo biofilmova patogenih bakterija zabeleženo je i na hrani animalnog i biljnog porekla (Kerekes i sar., 2015). Do kontaminacije hrane patogenim bakterijama može doći kontaktom sa površinama, preko ruku radnika, vodom za pranje ili vazduhom. Prema izveštaju Morar i sar. (2010) dokazano je prisustvo bakterijskog biofilma na trupovima svinja i isečenim komadima mesa. Pomenuti autori su ukazali na zavisnost stepena kontaminacije od vlažnosti i sadržaja masti, izveštavajući da sa porastom sadržaja masti opada stepen kontaminacije.

Do kontaminacije hrane biljnog porekla, kao što je sveže voće i povrće patogenim bakterijama, može doći u predberbenom i posleberbenom periodu. Najčešći izvor kontaminacije u predberbenom periodu su zemljište, đubrivo, voda, insekti, domaće i divlje životinje, dok u posleberbenom periodu do kontaminacije najčešće dolazi preko ruku radnika, vode za pranje, opreme (Hui i sar., 2006). Poseban problem predstavljaju bakterijski biofilmovi na svežem lisnatom povrću koje se najčešće konzumira sveže, prethodno oprano, a koje predstavlja pogodan supstrat za vezivanje i formiranje biofilмова patogenih bakterija, kao što su *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus* (Yaron i Römling, 2014). Patogene bakterije koje se nalaze na površini povrća, posebno lisnatog, nemoguće je sasvim ukloniti pranjem vodom, a sam postupak pranja može dovesti do širenja bakterija na sve delove biljke (Kroupitski i sar., 2009). Razvoj novih tehnologija u proizvodnji hrane u cilju dobijanja zdravstveno, nutritivno i tehnološki bezbednih proizvoda nije eliminisao mogućnost kontaminacije svežeg voća i povrća navedenim patogenim bakterijama. U cilju uklanjanja mikrobiološke kontaminacije na ovim proizvodima i onemogućavanja formiranja biofilma najčešće se primenjuju hemijska sredstva bez ili u kombinaciji sa nekom od fizičkih metoda. Fizičke metode dekontaminacije, pored najčešće korišćene metode pranja (ručno ili mašinski), uključuju primenu novijih fizičkih tretmana, kao što su ultrazvuk, magnetna i električna polja, hladna atmosferska plazma, kao i različite vrste zračenja. Pored toga što navedeni fizički tretmani daju dobre rezultate, često su neprimenljivi u industrijskoj upotrebi pre svega iz ekonomskih razloga, jer iziskuju posebne zahteve u pogledu tehničke i prostorne opremljenosti. Poseban problem predstavlja nedovoljna ispitanoost toksikološkog efekta ovako tretiranih proizvoda na ljudski organizam (Martín-Diana i sar., 2007; Coniglio i sar., 2016). Od hemijskih tretmana u cilju mikrobiološke dekontaminacije svežeg voća i povrća najčešće se primenjuje tretman hlorom, vodonik-peroksidom, ozonom, organskim kiselinama i dr. Ova hemijska sredstva pokazuju različit antibiofilm efekat. Sem što se upotrebom ovih jedinjenja nikad ne može postići potpuna dekontaminacija svežeg voća i povrća, neadekvatna primena istih može biti uzrok zaostajanja nepoželjnih hemijskih rezidua potencijalno štetnih po ljudsko zdravlje (Martín-Diana i sar., 2007; Meltem i Akbas, 2007).

Povećanjem životnog standarda, zdravstvene i ekološke svesti potrošača, došlo je do promene prehrambenih navika, tako da danas potrošači traže sveže ili minimalno prerađene namirnice koje ne sadrže ili sadrže minimum hemijskih dodataka. S tim u vezi, poslednjih godina ispitivana su alternativna jedinjenja za uklanjanje biofilмова kao što su enzimi, polisaharidi, bakteriocini, biljni ekstrakti i etarska ulja (Kumar i sar., 1998; Srey i sar., 2013).

2.4. Etarska ulja u prehrambenoj industriji

Etarska ulja (EU) su mirisne smese isparljivih lipofilnih sastojaka koje se sintetišu i lokalizuju u specijalnim sekretornim strukturama biljaka kao produkt sekundarnog metabolizma biljaka (Kavitha i sar., 2016). Biljke koje sadrže EU nazivaju se aromatične biljke. Aromatične biljke su uglavnom kopnene biljke iz porodice *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae* i dr. Široko su rasprostranjene u prirodi i najčešće se nalaze kao samonikle, ali mogu i da se gaje. Najčešća primena aromatičnih biljaka je u farmaceutskoj industriji, gde se koriste kao sirovina za pravljenje različitih lekovitih preparata, u kozmetičkoj industriji za pravljenje kozmetičkih preparata i parfema, u prehrambenoj industriji kao začini i arome (van de Braak i Leijten, 1999). Za samu biljku čiji su produkt, biološka funkcija EU ogleda se u tome da:

- Štite biljku od napada insekata i životinja;
- Štite biljku od bakterijskih i gljivičnih infekcija (u čemu se ogleda njihova antibakterijska i antifungalna aktivnost);
- Pomažu oprašivanje biljke privlačeći insekte;
- Mogu da inhibiraju klijanje semena, kako drugih biljaka tako i sopstvenog;
- Pomažu u stvaranju i održavanju specifične mikrokline koja ih štiti od prekomerne transpiracije (Schafer i Wink, 2009).

Poznato je oko 3000 EU, od kojih je samo 10% (oko 300) našlo praktičnu primenu (Burt, 2004).

Sinteza EU odvija se u svim delovima biljke, posebno u listovima i cvetovima, međutim, mogu se naći i u korenu, kori, drvetu, plodovima i semenu (Bakkali i sar., 2008). Biljke sintetišu EU u tzv. sekretornim tkivima koja mogu biti lokalizovana endogeno (uljne ćelije, sekretorni kanali, sekretorne šupljine) i egzogeno (žlezdane dlake, osmofore) (Kostić i sar., 2012).

Metode koje se koriste za izolovanje EU iz biljnog materijala su:

- Destilacija pomoću vodene pare;
- Ekstrakcija organskim rastvaračima;
- Ekstrakcija gasovima pod pritiskom (npr. ugljen-dioksid) (Kostić-Nikolić, 2011).

Destilacija pomoću vodene pare je jedan od najstarijih postupaka koji se primenjuje još od 1500-te godine i još uvek se najčešće koristi za proizvodnju EU. Zasniva se na relativno velikoj isparljivosti komponenata odgovornih za aromu i može da se izvodi na atmosferskom pritisku, pod pritiskom većim od atmosferskog ili u vakuumu (Milošević, 2011). Iako su EU nerastvorljiva u vodi, isparavaju sa vodenom parom, jer podležu Daltonovom zakonu, po kome će smesa dve tečnosti koje se ne mešaju i međusobno hemijski ne reaguju (u ovom slučaju voda i EU), proključati kada zbir parcijalnih pritisaka pare obe tečnosti postane jednak atmosferskom pritisku (Kovačević, 2004).

Etarska ulja su na sobnoj temperaturi lako pokretljive isparljive tečnosti, uglavnom bezbojne, žute ili žutozelene boje specifičnog intenzivnog mirisa koji potiče od jedinjenja sa kiseoničnim funkcionalnim grupama. Koncentrovana EU imaju oštar nadražujući ukus koji pali. Hlađenjem neka EU mogu da pređu u čvrsto agregatno stanje ili se iz njih mogu izdvojiti čvrsti sastojci, kao što su stearopteni ili kamfori. Zbog svoje lipofilne prirode rastvaraju se u organskim nepolarnim rastvaračima, kao što su petroletar, etar, heksan, ksilen, toluen, u koncentrovanom etanolu i masnim uljima (Dhifi i sar., 2016).

Sa porastom ljudske populacije i promenom životnog stila koji neminovno prate i promene u ishrani, tokom prošlog veka zabeležena je povećana potražnja za gotovom hranom dužeg roka upotrebe, što je dovelo do povećane upotrebe hemijskih aditiva kao što su boje, arome, konzervansi i dr. u prehrambenoj industriji. Njihova prekomerna upotreba se negativno odrazila na zdravlje ljudi, usled česte pojave raznih alergija i drugih bolesti (Kostić-Nikolić, 2011). Danas sa tehnološkog, zdravstvenog, ekonomskog i ekološkog aspekta, problem upotrebe hemijskih aditiva postaje sve veći, kompleksniji i odgovorniji. Zbog toga je velika pažnja posvećena ispitivanju alternativnih, prirodnih prehrambenih dodataka iz lekovitog i aromatičnog bilja (Ivanović i sar., 2007).

Etarska ulja kao i ekstrakti lekovitih i aromatičnih biljaka koriste se u prehrambenoj industriji kao začini, za poboljšanje ukusa, mirisa i svarljivosti hrane, i kao konzervansi, za sprečavanje kvarenja hrane zbog antimikrobnih, antifungalnih i antioksidativnih osobina koje poseduju (Kostić-Nikolić, 2011). Većina biljaka koje se u kulinarsvu inače koriste kao povrće i začini, a čija su EU i ekstrakti našli primenu u prehrambenoj industriji pripada porodici *Apiaceae* ili *Lamiaceae*. Porodici *Apiaceae* i *Laminaceae* pripadaju većinom zeljaste biljke, vrlo malo drvenasti oblici i lijane (Nikolić, 1973).

2.4.1. Porodica *Apiaceae*

Porodica *Apiaceae* (sinonim *Umbelliferae*, štitarke) obuhvata 300 rodova u okviru kojih se razlikuje oko 3000 biljnih vrsta, uglavnom rasprostranjenih u zoni sa umerenom i suptropskom klimom severne hemisfere. Naziv štitarke, štitare ili štitnjače dobili su zbog karakterističnih cvasti u obliku štitova. Mnoge vrste ove porodice su aromatične biljke, specifičnog ukusa i mirisa koji potiče od EU (Nikolić, 1973). Njihova upotreba je raznolika, te se neke od vrsta koriste kao povrće (mrkva - *Daucus carota*), kao začini (kim - *Carum carvi*, mirođija - *Anethum graveolens*, celer - *Apium graveolens*) ili kao lekovite biljke (komorač - *Foeniculum vulgare*, angelika - *Angelica archangelica*) (Jančić i Stojanović, 2008).

2.4.1.1. Mirođija (*Anethum graveolens*)

Mirođija (slika 2.9) je jednogodišnja začinska biljka poreklom iz jugoistočne Azije čija upotreba datira još iz starog Egipta, od pre 5000 godina (Bailer i sar., 2001). Zbog specifičnog prijatnog mirisa i blagog ukusa našla je široku upotrebu u kulinarsvu, a ubraja se i u lekovite biljke. Danas se gaji u skoro svim zemljama sveta. Mnogi je gaje zbog aromatičnog semena čiji ukus podseća na anis. Smatra se da deluje protiv upala disajnih puteva i mokraćne bešike, protiv nadimanja, poboljšava rad želuca, smanjuje arterijski pritisak, stimuliše apetit (Tucakov, 2006). Seme, kao i sveže i osušeno lišće mirođije, koriste se za začinjavanje i aromatizovanje pasterizovanih i mariniranih krastavaca, supa, soseva, salata, jela od ribe (Blank i Grosch, 1991).



Slika 2.9. *Anethum graveolens* (<https://www.plantea.com.hr/kopar/>)

Za dobijanje EU mirođije koje je riznica lekovitih i aromatičnih materija koristi se seme, lišće i stabiljka. Prinos EU kreće se u granicama do 1,2-4 % (v/w). Etarsko ulje mirođije je bezbojna do svetlo žuta tečnost prijatnog mirisa, zbog čega se koristi u industriji začina i hrane (Jirovetz, 2003). Glavnim komponentama ovog ulja smatraju se monoterpeni, d-limonen (do 70%) i d-karvon (min. 30%) (Jirovetz, 1994). Etarsko ulje mirođije poseduje širok spektar antibakterijske i antifungalne aktivnosti (Yiğit i sar., 2000; Derakhshan i sar., 2017), što može biti osnov za njegovu primenu kao potencijalnog konzervansa u prehrambenoj industriji.

2.4.2. Porodica *Lamiaceae*

Porodica *Lamiaceae* (sinonim *Labiatae*, usnatice) obuhvata više od 7200 vrsta svrstanih u 240 rodova (Harley i sar., 2004) kojima najviše odgovaraju suva i dobro osunčana staništa poput Mediterana i oblasti male i centralne Azije, koje obiluju najvećom raznovršnošću rodova i vrsta ove porodice biljaka. Mogu da rastu i u drugim staništima, sem arktičke oblasti (Raja, 2012). Naziv „usnatice“ (lat. labium - usna) potiče od karakterističnog dvousnatog oblika cveta (Marin, 1996). Na području Balkanskog poluostrva *Lamiaceae* sa 371 vrstom, zauzimaju drugo mesto po

zastupljenosti, pri čemu čak 84 vrste spadaju u balkanske endemske vrste (Diklić, 1974). Mnoge vrste pripadnici ove porodice prepoznate su po svojim lekovitim osobinama, pa se i koriste u narodnoj medicini za lečenje digestivnih tegoba, reumatskih obolenja, astme i dr. Lekovite osobine potiču od EU koja ispoljavaju antibakterijsku, antifungalnu, antiviralnu, antiinflamatornu i antioksidativnu aktivnost.

2.4.2.1. Bosiljak (*Ocimum basilicum*)

Bosiljak (slika 2.10) je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*, a poreklom je iz Indije. Kao autohtona vrsta bosiljak raste i u južnoj Aziji, severoistočnoj Africi i tropskom delu Američkog kontinenta. Danas se kultiviše na skoro svim meridijanima zemljine hemisfere sa umerenom klimom (Janković, 1974). Stari Egipćani su poznavali bosiljak još pre 3500 godina p.n.e., o čemu govore pronađeni ostaci ove biljke u grobnicama faraona. Prvobitno su bila prepoznata lekovita svojstva bosiljka, tako da je našao primenu za lečenje urinarnih infekcija, glavobolje, kašlja, grčeva u stomaku, astme (Simon i sar., 1999). Kasnije se koristio kao začim, zbog prijatnog mirisa i specifičnog ukusa koji, sem što daje ukus jelu, poboljšava varenje hrane i čuva hranu od kvarenja.



Slika 2.10. *Ocimum basilicum* (<https://www.plantea.com.hr/bosiljak/>)

Najčešće se koristi kao dodatak jelima od mesa, ribe i salatama (Gutierrez i sar., 2008). Italijanska kuhinja je nezamisliva bez bosiljka, a zanimljivo je da je bosiljak jedan od najvažnijih začina za picu. Sem u narodnoj medicini i kulinarstvu, bosiljak se koristi i kao sirovina za dobijanje EU koje ima izraženu biološku aktivnost: baktericidnu, fungicidnu, antiviralnu, antioksidativnu, radioprotektivnu i repelentnu (Runyoro i sar., 2010). Za dobijanje EU bosiljka biljka se bere u fazi cvetanja, kada je sadržaj EU najveći (u proseku 0,5 do 0,8%) (Tucakov, 2006). Prema geografskom poreklu i dominantnim komponentama u sastavu EU bosiljka razlikuju se evropski ili francuski, egipatski, reunion, bugarski i javanski tip. Smatra se da je evropski tip EU bosiljka najkvalitetniji. Dominantne komponente ovog tipa EU su linalool i metil-kavikol (estragol) (Marotti i sar., 1996).

2.4.2.2. Nana (*Mentha piperita*)

Pitoma nana (slika 2.11) je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*. Prirodni je hibrid nastao spontanom ukrštanjem *Mentha aquatica* i *Mentha spicata*. Od davnina je poznata kao medonosna, lekovita i aromatična biljka. Vrste roda *Mentha* izvorno potiču sa Mediterana. Najviše im odgovaraju vlažna staništa i rastu na svih pet kontinenata od polarnog kruga do tropskih oblasti (Kojić i Jančić., 1998). Od svih vrsta pripadnika roda *Mentha* pitoma nana je najznačajnija i ekonomski najvažnija vrsta zbog visokog sadržaja biološki aktivnih supstanci (Hornok, 1992). Najveća koncentracija biološki aktivnih supstanci nalazi se u EU. Listovi pitome nane sadrže 1,2-3,9% EU, u čijem je sastavu do sada identifikovano više od 300 jedinjenja (McKay i Blumberg, 2006).



Slika 2.11. *Mentha piperita* (<https://www.plantea.com.hr/paprena-metvica/>)

Glavni sastojak EU pitome nane je mentol (30-55%) i menton (14-32%) (Kumar i sar., 2011). Ulje pitome nane je jedno od EU koje se najčešće proizvodi i konzumira. Našlo je primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i industriji parfema (Janković, 1974). Kao lekovito sredstvo koristi se protiv mučnine, bronhitisa, nadimanja, anoreksije, ulceroznog kolitisa i tegoba jetre (Cowan, 1999). Zbog svojstvenog mirisa i ukusa koji „hladi“ koristi se u prehrambenoj industriji kao dodatak u proizvodnji žvaka, bombona, likera i dr. U kulinarstvu se koristi kao sastojak salata, kao začim i za pripremu čaja. Etarsko ulje ove biljke se odlikuje dobrom antioksidativnom i antibiofilm aktivnošću (Sandasi i sar., 2010).

2.4.2.3. Vresak (*Satureja montana*)

Satureja montana (slika 2.12) je višegodišnja žbunasta biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*. Poznata je pod imenom rtanjski čaj, planinski čubar ili vresak. Potiče iz Evrope i severne Afrike.

Dobro uspeva na osunčanom, umereno vlažnom, kamenitom do peskovitom zemljištu. Od davnina se koristi u narodnoj medicini za lečenje gastrointestinalnih, urogenitalnih i plućnih infekcija, grčeva i nadutosti, opšteg umora i nervoze, za čišćenje krvi, ublažavanje simptoma upale kože i sluzokože i za jačanje potencije (Miladi i sar., 2013). Žlezde ispunjene EU nalaze se duž cele biljke (Jančić, 2013). Za dobijanje EU koristi se nadzemni deo biljke u cvetu, pri čemu prinos ulja može biti od 0,9-2,2% (v/w) (Bezić i sar., 2005). Razlikuju se dva hemotipa vrste *Satureja montana*, koja se međusobno razlikuju po tome da li u sastavu EU dominiraju fenolne komponente timol i karvakrol (hemotip A) ili terpeniski alkoholi linalool, p-cimen i α -terpineol (hemotip B) (Serrano i sar., 2011). Biološka aktivnost EU *Satureja montana* ogleda se u antibakterijskom, antifungalnom i antiviralnom dejstvu (Skočibušić i Bezić, 2004; Trifan i sar., 2015).



Slika 2.12. *Satureja montana* (<https://www.plantea.com.hr/primorski-vrisak/>)

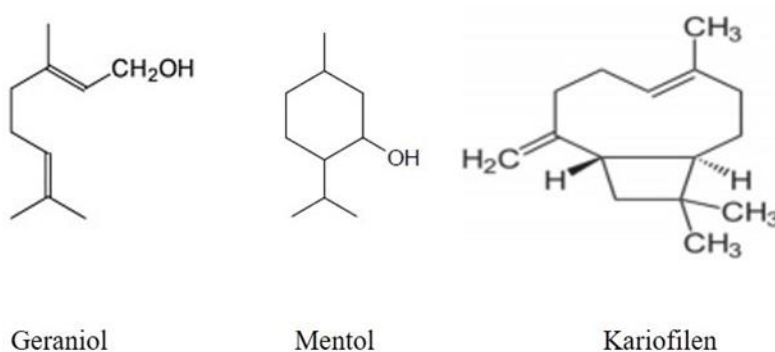
Rezultati ispitivanja Bezić i sar. (2011) pokazuju da EU *Satureja montana* ima antimikrobni i antifungalni potencijal, inhibirajući rast *E. coli*, meticilin rezistentnog soja *S. aureus*, *C. albicans* i *S. cerevisiae*. Isti autori izveštavaju o slabom antimikrobnom potencijalu prema *P. aeruginosa*.

Listovi i nadzemni deo biljke koriste se sveži ili osušeni, kao začini u jelima sa mesom, u kobasicama i jelima sa povrćem.

2.4.3. Hemijski sastav etarskih ulja

Na hemijski sastav EU utiču klimatski uslovi kojima je biljka bila izložena tokom rasta, fenofaza razvoja biljke tokom branja, način obrade biljne sirovine, kao i način izolovanja EU. Razlike u hemijskom sastavu EU uočavaju se i u okviru iste biljne vrste, s obzirom na to da u okviru iste vrste može postojati više različitih hemotipova biljke. Generalno, smatra se da su EU smeše više od 20-200 komponenti pri čemu oko 20-95% čine glavne komponente, 1-20% sporedne, dok su ostale komponente prisutne u tragovima sa zastupljenošću < 1% (Russo i sar., 1998; Bauer i sar., 2001). Hemijska jedinjenja koja ulaze u sastav EU mogu se klasifikovati u pet grupa koje čine terpenoidi, alifatična isparljiva jedinjenja, aromatična isparljiva jedinjenja, isparljiva jedinjenja

koja sadrže azot i sumporna jedinjenja (Kostić i sar., 2012). Terpenoidi su derivati izoprena (2-metil-1,3-butadien). U zavisnosti od broja ugljenikovih atoma (C) u sastav EU u najvećem udelu od terpenoida ulaze monoterpeni koji se sastoje od dve izoprenske jedinice, što znači da imaju skelet koji se sastoji od 10 ugljenikovih atoma (C₁₀H₁₆) i seskviterpeni koji se sastoje od tri izoprenske jedinice i njihov skelet se sastoji od 15 ugljenikovih atoma (C₁₅H₂₄). Od manje zastupljenih terpena nalaze se hemiterpeni (C₅H₈), diterpeni (C₂₀H₃₂), triterpeni (C₃₀H₄₀). U zavisnosti od tipa funkcionalne grupe na skeletu, mono- i seskviterpeni se mogu podeliti na ugljovodonike, alkohole, ketone, estre, etre i dr., a na osnovu građe molekula na aciklične, monociklične i biciklične (Bakkali i sar., 2008). Na slici 2.13. prikazane su strukturne formule geraniola koji pripada grupi acikličnih alkohola, mentola koji pripada monocikličnim alkoholima i kariofilena koji pripada bicikličnim ugljovodonicima.



Slika 2.13. Strukturne formule geraniola, mentola i kariofilena (preuzeto od Burt, 2004)

Alifatična isparljiva jedinjenja po strukturi su jednostavni dugolančani ugljovodonici sa 12-19 C atoma ili njihovi oksid-derivati. Ova jedinjenja su primarno odgovorna za mnoge voćne mirise, npr. etil-2-metilbutirat kod plodova jabuke (Thien i sar., 1975). Aromatična isparljiva jedinjenja u sastavu EU najčešće se nalaze u obliku fenil-propanoida. Ova jedinjenja se u biljnom materijalu nalaze vezana u obliku glikozida ili estara polifunkcionalnih kiselina, što ih čini neisparljivim i rastvornim u vodi. Obradom biljnog materijala ova jedinjenja podležu hidrolizi pod dejstvom enzima ili spoljašnjih faktora, nakon čega oslobođeni liposolubilni, isparljivi fenil-propanoidi postaju deo sastava EU. U grupu fenil-propanoida spadaju i kumarini čije prisustvo predstavlja jednu od glavnih karakteristika biljaka iz porodice *Apiaceae* i *Lamiaceae* (Kostić i sar., 2012). Isparljive supstance koje sadrže azot, a koje ulaze u sastav EU pripadaju derivatima indola ili alifatičnim aminima i daju neprijatan miris EU. Isparljiva jedinjenja sa sumporom u biljkama se nalaze u obliku izosulfocijanata ili organskih disulfida i njihova zajednička karakteristika je da se u neozleđenom biljnom tkivu nalaze u vezanoj neisparljivoj formi. Do njihovog oslobađanja, uz pojavu neprijatnog mirisa dolazi nakon enzimske hidrolize u ozleđenom biljnom tkivu (Kostić i sar., 2012).

Iako se do skora smatralo da su za antimikrobnu aktivnost EU uglavnom odgovorna fenolna jedinjenja (Cosentino i sar., 1999), dokazano je da i ne-fenolne komponente poseduju

antimikrobnu aktivnost (Tajkarimi i sar., 2010). Ispitivanja antimikrobne aktivnosti glavnih komponenti EU pokazala su da one nisu i glavni nosioci antimikrobnog potencijala EU, već da manje zastupljene komponente imaju ključnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti EU, zahvaljujući svom sinergističkom delovanju (Burt i sar., 2004).

2.4.4. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

Etarska ulja su prava riznica bioaktivnih jedinjenja koja se međusobno razlikuju po hemijskom sastavu i strukturi. Zbog svoje hemijske raznolikosti, EU su prepoznata kao moguća grupa novih antimikrobnih sredstava (Yap i sar., 2014). Antimikrobna aktivnost EU i njihovih komponenata može varirati od delimične (bakteriostatične) do potpune inhibicije rasta bakterija (baktericidne), (Griffin i sar., 1999). Etarska ulja ispoljavaju različito antimikrobno dejstvo na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije, što se može pripisati razlikama u strukturi i sastavu citoplazmatske membrane i/ili spoljašnje membrane i ćelijskog zida (Tamboli i Lee, 2013). Kod gram-negativnih bakterija koje se odlikuju većom rezistentnošću prema antimikrobnim sredstvima, ćelijski zid je složeniji i sastoji se od tankog sloja peptidoglikana koji se nalazi uz citoplazmatsku membranu i spoljašnje membrane koju čine fosfolipidi i lipopolisaharidi (Nazzaro i sar., 2013).

Zbog svoje hidrofobnosti molekuli EU mogu da prođu kroz ćelijski zid gram-negativnih bakterija i prodru u lance masnih kiselina spoljašnje fosfolipidne membrane, povećavajući njenu permeabilnost, što dovodi do gubitka osmotske kontrole ćelije i izaziva curenje unutarćelijskog sadržaja, a može kulminirati lizom i ćelijskom smrću (Sikkema i sar., 1994). Odsustvo ove membrane kod gram-pozitivnih bakterija omogućava direktan kontakt hidrofobnih komponenti EU sa lipidnim slojem membrane, što utiče na manju otpornost gram-pozitivnih bakterija prema dejstvu EU.

Sem što dovode do promena permeabilnosti membrane, neka hemijska jedinjenja koja ulaze u sastav EU reaguju sa proteinima ćelijske membrane. Ciklični ugljovodoni reaguju sa ATP-azom, enzimom smeštenim na ćelijskoj membrani koji je okružen molekulima lipida, kao i sa drugim enzimima odgovornim za sintezu strukturnih komponenti ćelije (Burt, 2007).

Od svih jedinjenja koja ulaze u sastav EU, fenoli i alkoholi su primarno odgovorni za antimikrobno dejstvo EU, jer ispoljavaju najjače inhibitorno dejstvo na rast bakterija. Smatra se da je slobodna hidroksilna grupa alkohola i fenola uzrok njihove aktivnosti. Slede aldehidi i ketoni, dok je inhibitorno dejstvo monoterpenskih ugljovodonika vrlo malo (Sikkema i sar., 1995).

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da EU, sem antimikrobne aktivnosti poseduju (Burt, 2004) i antioksidativnu (Čavar i sar., 2013), antiviralnu (Dunkić i sar., 2013), insekticidnu (Kumar i sar., 2011), citotoksičnu (ispitivanja su sprovedena na humanim ćelijama

adenokarcinoma) (Miladi i sar., 2013), antibiofilm (Correa i sar., 2018), „antiquorum sensing“ (Sharifi i sar., 2017) aktivnost.

2.4.5. Etarska ulja i biofilm

Poznato je da su bakterije uklopljene u matriks biofilma manje osjetljive na dejstvo hemijskih (antibiotici, dezinficijensi) i bioloških antimikrobnih sredstava (EU i biljni ekstrakti), što se može uočiti po vrednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), koja je za ćelije uklopljene u matriks biofilma i do hiljadu puta veća u odnosu na planktonske ćelije. Osetljivost biofilm ćelija na dejstvo EU zavisi od njihovog položaja u biofilmu. Spoljašnji sloj biofilma čine ćelije koje se nalaze u eksponencionalnoj fazi rasta i koje su osjetljivije na dejstvo EU, za razliku od ćelija u dubljim slojevima biofilma čiji je metabolizam usporen i koje mogu da razviju tolerantnost ili rezistentnost prema delovanju EU (Singh i sar., 2017). U kontroli i prevenciji formiranja biofilma, EU su našla primenu u sprečavanju inicijalne ćelijske adhezije koja prethodi formiranju biofilma i za eradikaciju već formiranog biofilma. Prema Reichling (2020) potrebna je 2-8 puta veća koncentracija EU za eradikaciju prethodno formiranog biofilma u odnosu na koncentraciju koja sprečava inicijalnu ćelijsku adheziju. Izuzetak su rezultati ispitivanja Kavanaugh i Ribbec (2012), prema kojima je EU *Thymus vulgaris* bilo efikasnije na biofilm ćelije *Pseudomonas aeruginosa* i *P. putida* u odnosu na planktonske ćelije pomenutih mikroorganizama. Isti autori navode i da EU čajevca (*Melaleuca alternifolia*) u koncentraciji od 5% nije pokazalo antimikrobno dejstvo na planktonske ćelije *P. putida*, dok je uočen antibiofilm efekat pri koncentraciji od 4%. Moguće objašnjenje je da je u ovom slučaju ekstracelularni matriks biofilma adsorbovao aktivne komponente EU i povećao njihovu koncentraciju, kao i da se ćelijski zid i ćelijska membrana biofilm ćelija razlikuje u odnosu na planktonske, a razlike su rezultat ekspresije različitih gena kod planktonskih i biofilm ćelija.

Zbog svog jedinstvenog i kompleksnog sastava dejstvo EU na biofilm ćelije je višesmerno i uključuje između ostalog inhibiciju enzima β -laktamaze (enzim koji je odgovoran za razlaganje β -laktamskih antibiotika), inhibiciju efluks pumpi ćelija koje se nalaze na površini biofilma i koje svojom aktivnošću izbacuju EU u spoljašnju sredinu štiteći ćelije u dubljim slojevima biofilma, izaziva poremećaj u propustljivosti ćelijskog zida i membrane kao i „antiquorum sensing“ delovanje, ometajući transfer gena rezistencije između gusto zbijenih ćelija biofilma (Yap i sar., 2014).

3. CILJ RADA

Sposobnost dugotrajnog preživljavanja alimentarnih patogena u zemljištu predstavlja stalnu opasnost od kontaminacije povrtarskih kultura. Kontaminirajući zemljište bilo direktno putem izmeta životinja i ljudi ili indirektno preko vode za navodnjavanje, ovi patogeni lako nalaze put do biljke. Zbog prirode gajenja i načina upotrebe, uglavnom u svežem stanju, zelena salata predstavlja čest izvor kontaminacije i nalazi se pri vrhu izazivača alimentarnih toksikoinfekcija. Kao najčešći kontaminanti zelene salate navode se *E. coli* i vrste roda *Salmonella*. Zahvaljujući adhezivnoj sposobnosti, ova dva patogena mogu da kontaminiraju zelenu salatu spolja, formirajući mikrokolonije na površini lista ili mogu da kontaminiraju njenu unutrašnjost kroz korenov sistem. Nastale mikrokolonije vremenom mogu da prerastu u biofilm koji predstavlja idealnu sredinu za opstanak patogena u spoljašnjoj sredini i koji je nemoguće ukloniti pranjem vodom. Biofilmovi formirani na lisnatom povrću predstavljaju veliki rizik po zdravlje potrošača. Iznalaženje načina za njihovo potpuno i bezbedno uklanjanje predstavlja imperativ na polju bezbednosti hrane.

Formiranje biofilma s jedne, i pojava mikrobne rezistencije usled nekontrolisane upotrebe sintetičkih antimikrobnih sredstava, s druge strane, nametnula je problem za pronalaženjem antimikrobnih supstanci prirodnog porekla. Ovome je doprinela svest i zabrinutost potrošača da sintetički hemijski aditivi mogu imati toksične ili čak kancerogene efekte po zdravlje. Iz ovih razloga, začinske biljke koje se od davnina koriste u kulinarstvu i narodnoj medicini, poslednjih su godina predmet mnogobrojnih naučnih studija. Pažnja naučne javnosti u najvećoj meri usmerena je prema ispitivanju antimikrobnog potencijala EU i ekstrakata ovih biljaka i njihovoj primeni u praksi.

Imajući u vidu navedene činjenice, kao i da je prema podacima objavljenim od strane WHO zelena salata svrstana među prvih deset najrizičnijih namirnica sa aspekta mikrobiološke kontaminacije, cilj ovog istraživanja bio je:

- Ispitivanje sposobnosti preživljavanja odabranog izolata *E. coli* i *S. Typhimurium* (dalje u tekstu testirani mikroorganizmi) u zemljištu pri uslovima konstantne relativne vlažnosti (RV) i temperature (T), (RV = 70%, T = 23 °C) i pri promenljivim uslovima vlage i temperature;
- Ispitivanje sposobnosti testiranih mikroorganizama da formiraju biofilm na temperaturama od 25 °C i 37 °C;
- Ispitivanje sposobnosti adhezije i formiranja biofilma testiranih mikroorganizama na lisnu površinu zelene salate;
- Vizuelizaciju formiranog biofilma testiranih mikroorganizama na lisnoj površini zelene salate primenom skening elektronske mikroskopije (SEM);

- Određivanje hemijskog sastava EU;
- Ispitivanje antimikrobnog efekta EU na bujionske kulture testiranih mikroorganizama i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC);
- Ispitivanje efekta odabranih koncentracija EU na inicijalnu adheziju i formirani biofilm testiranih mikroorganizama u *in vitro* uslovima i na lisnoj površini zelene salate.

4. MATERIJAL I METODE

Najveći deo eksperimentalnog istraživanja ove doktorske disertacije realizovan je u okviru mikrobiološke laboratorije Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Identifikacija testiranih mikroorganizama izvršena je masenom spektrometrijom zasnovanom na matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom (MALDI - MS) uz TOF analizator u laboratoriji Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu. Dodatno potvrđivanje *S. Typhimurium* izvršeno je u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ metodom *real time* PCR (eng. Polymerase Chain Reaction). Destilacija EU je sprovedena u odeljenju za alternativne kulture i organsku proizvodnju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Hemijski sastav EU određen je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Priprema uzoraka za skening elektronsku mikroskopiju sprovedena je na Tehnološkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, a vizuelizacija pripremljenih uzoraka u okviru Univerzitetskog centra za skening elektronsku mikroskopiju Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

4.1. Kulture mikroorganizama

U skladu sa ciljevima ove doktorske disertacije ispitano je 24 izolata *E. coli* izolovanih iz uzoraka hrane životinjskog porekla i laboratorijski tipski soj *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ATCC 14028 (American Type Culture Collection) kwik-stick™ set (MicrobioLogics, Sent Klud, Minesota, SAD). U cilju izdvajanja izolata sa jakom biofilm produkcijom u preliminarnim ispitivanjima sprovedena je skrining biofilm produkcije izolata *E. coli*, nakon čega je izabran izolat sa najboljom biofilm produkcijom. Uporedo je ispitana sposobnost produkcije biofilma *S. Typhimurium*.

4.1.1. Kulturelne i biohemijske karakteristike *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*

Kulturelne osobine *E. coli* i *S. Typhimurium* određivane su nakon kultivacije ispitivanih mikroorganizama na visokoselektivnim, diferencijalnim podlogama:

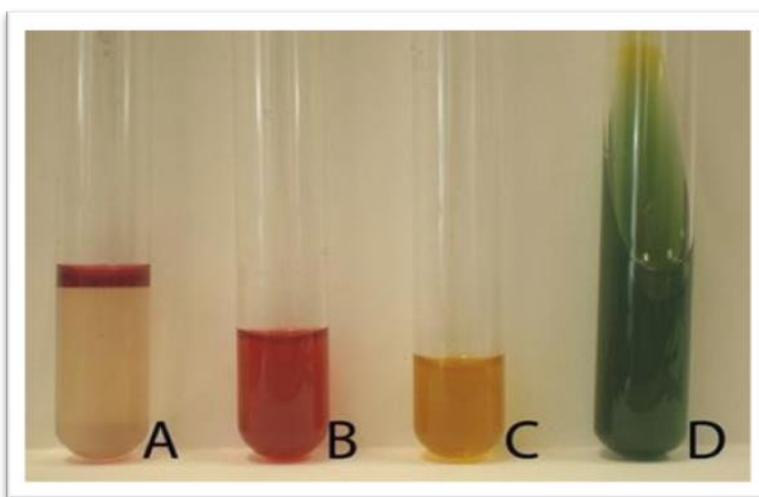
- Tripton žuč glukuronid agar (Tryptone Bile Glucuronic agar, TBX agar, HiMedia, Mumbaj, Indija) za *E. coli* (uslovi inkubiranja: 44 °C, 24 h) (SRPS ISO 16649 - 2: 2008);

- Ksilozna lizin dezoksiholatni agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar, XLD agar, HiMedia, Mumbai, Indija) i Harlekin - Salmonella ABC agar (Harlequin - Salmonella ABC agar, HAL agar, LabM, Hejvud, UK) za *S. Typhimurium* (uslovi inkubiranja: 37 °C, 24 h) (SRPS EN ISO 6579 - 1: 2017).

Biohemijske karakteristike (Test na citrat, Test ispitivanja sposobnosti produkcije indola iz triptofana, Metil crveno/Voges Proskauer test) ispitivanih izolata *E. coli* ispitane su prema navodima Cappuccino i Sherman, (2014). Za biohemijska ispitivanja izolata *E. coli* karakteristične kolonije sa TBX agara inokulisane su na površinu hranljivog agara (Nutrient agar, HA, HiMedia, Mumbai Indija) i inkubirane na 37 °C, 24 ± 1 h. Dobijene kulture *E. coli* podvrgnute su sledećim testovima:

- Test na citrat (slika 4.1 - D). Ovim testom se ispituje sposobnost bakterija da koriste Na-citrat kao jedini izvor ugljenika. Korišćenjem ugljenika iz citrata nastaje natrijumova i amonijumova baza, pri čemu pH vrednost raste iznad 7,6, što ima za uzrok promenu boje indikatora bromtimol plavog iz zelene u plavu boju, što je ujedno dokaz pozitivne reakcije. Test je izveden zasejavanjem kosine i ubodom u dubinu citratnog agara (Simmons citrate agar, HiMedia, Mumbai, Indija) ispitivanom kulturom. Zasejana podloga je inkubirana na 37 °C, 24 h.
- Test ispitivanja sposobnosti produkcije indola iz triptofana. Produkcija indola iz triptofana je osobina bakterija koje sintetišu enzim triptofanazu, pod čijim dejstvom dolazi do razgradnje triptofana u indol. Prisustvo indola dokazuje se dodatkom Kovačevog reagensa koji sadrži p-dimetilaminobenzaldehid sa čijom aldehidnom grupom nastali indol reaguje obrazujući kompleksno jedinjenje crvene boje. Ovo je dokaz pozitivne reakcije koji se vizuelno uočava formiranjem prstena crvene boje u roku od 15 minuta (slika 4.1 - A). Test je izveden zasejavanjem ispitivane kulture u 5 ml podloge koja sadrži triptofan (Tryptophan medium, HiMedia, Mumbai, Indija), koja je zatim inkubirana na 37 °C, 18-24 h. Nakon inkubiranja u podlogu je dodat Kovačev reagens (Kovac's Indole reagent, HiMedia, Mumbai, Indija).
- Metil crveno/Voges Proskauer test (slika 4.1. - B, C). Ovim testom se ispituje tip fermentacije glukoze. Bakterije mogu fermentovati glukozu mešovito - kiselim ili butilenglikolnim putem. U mešovito - kiselom putu fermentacije, glukoza se razlaže uz stvaranje jakih kiselina poput čilibarne, mlečne, mravlje ili sirćetne, koje su dovoljne da nadvladaju puferski sastav podloge (MR - VP medium, HiMedia, Mumbai, Indija) pri produženom inkubiranju (48-72 h, 37 °C) i održe pH podloge ispod 4,4. Dodatkom indikatora metil - crvenog u podlogu nakon inkubiranja, crvena boja je dokaz pozitivne reakcije, odnosno da je došlo do fermentacije glukoze mešovito - kiselim putem. U butilenglikolnom putu fermentacije glukoze kao produkt fermentacije nastaje acetilmetilkarbinol (acetoin), pri čemu stvorena količina kiselina nije dovoljna da snizi pH podloge na 4,4. Test je izveden tako što je nakon inkubiranja zasejane podloge u

epruveti (37 °C, 24 h), u podlogu dodato dve kapi rastvora kreatina ($C_4H_9N_3O_2 \times H_2O$, Merck KGaA, Darmštad, Nemačka), tri kapi rastvora α -naftola ($C_{10}H_7OH$, Merck KGaA, Darmštad, Nemačka) i dve kapi 40% rastvora kalijum hidroksida (KOH, Merck KGaA, Darmštad, Nemačka). Sadržaj epruvete je promućkan i izložen atmosferskom kiseoniku 15 min. U prisustvu atmosferskog kiseonika i KOH i usled katalitičkog delovanja α -naftola i kreatina, acetoin prelazi u crveno obojeni kompleks diacetil. Ovo je ujedno dokaz pozitivne Voges - Proskauer reakcije.



Slika 4.1. *E. coli*: Indol test (A), Metil crveno test (B), Voges Proskauer test (C), Test na citrat (D) (<https://microbeonline.com/imvic-tests-principle-procedure-and-results/>)

Navedeni biohemijski testovi su osnovni testovi za razlikovanje rodova koliformnih bakterija. Detaljnije ispitivanje biohemijskih karakteristika *E. coli* uključuje veći broj testova kao što je: oksidaza test, dokazivanje produkcije β -galaktozidaze, dekarboksilacija arginina, lizina i ornitina, produkcija ureaze, likvefakcija želatina i dr. (Cappuccino i Sherman, 2014). U ovom radu, umesto klasičnih biohemijskih testova, potvrđivanje *E. coli* izvedeno je primenom MALDI - TOF MS tehnike.

Biohemijske karakteristike *S. Typhimurium* ispitane su prema navodima standarda SRPS EN ISO 6579 - 1: 2017. U cilju ispitivanja biohemijskih osobina, tipične kolonije *S. Typhimurium* sa XLD agara presejane su na površinu HA i inkubirane na 37 °C, 24 ± 3h. Ispitivanje biohemijskih osobina *S. Typhimurium* izvedeno je primenom sledećih testova:

- Test na kosom trostrukom šećeru po Kligleru. U sastav trostrukog šećera po Kligleru (Triple sugar iron agar, TSI, HiMedia, Mumbaj, Indija) ulaze tri ugljena hidrata: glukoza, laktoza i saharoza. Fermentacijom ovih šećera nastaje kiselina, pri čemu indikator fenil-crveno menja boju u žuto. Kako su laktoza i saharoza zastupljene u podlozi u znatno većoj koncentraciji (10 ×), njihovom fermentacijom nastaje veća količina kiseline, što

utiče na smanjenje pH i promenu boje indikatora u žutu boju (žuto dno). Stvaranje kiseline iz glukoze, koje ima znatno manje, potisnuto je brzom oksidacijom nastale kiseline, što rezultira neutralnom ili alkalnom pH reakcijom, što se očitava crvenim kosim delom podloge. Žuto dno i crvena kosina podloge ukazuju da je ispitivani mikroorganizam fermentor glukoze, ali ne može da fermentira laktozu i/ili saharozu. U kiseloj sredini dolazi do redukcije natrijum- tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), pri čemu nastaje vodonik-sulfid (H_2S). Nastali H_2S reaguje sa gvožđe-sulfatom (FeSO_4), pri čemu nastaje crno obojeno jedinjenje gvožđe-sulfid (FeS). Test je izveden zasejavanjem kose površine agara, brazdanjem i ubodom u dubinu agara ispitivanom kulturom i inkubiranjem na 37 °C tokom 18-24 h. Crvena (alkalna) kosa površina agara (ne fermentuju laktozu) i žuto (kiselo) dno sa stvaranjem gasa (razlažu glukoze) ili crna boja agara u slučaju stvaranja H_2S (javlja se kod oko 90% izolata) su tipične reakcije za *Salmonella* spp.

- Test ispitivanja sposobnosti hidrolize uree. Urea agar (Urea agar base-Christensen, HiMedia, Mumbaj, Indija) se koristi za identifikaciju bakterija koje sadrže ureazu i hidrolizuju ureu. Kosa površina urea agara je zasejana brazdanjem ispitivanom kulturom i inkubirana na 37 °C, tokom 18-24 h. *Salmonella* spp. ne proizvode enzim ureazu, tako da urea agar nakon inkubiranja ne menja boju indikatora fenol crvenog u ružičasto crvenu, već ostaje žute boje. To je ujedno i dokaz negativne reakcije na urea agaru.
- Test za dekarboksilaciju L-lizina. Dekarboksilacija lizina je reakcija koja se izvodi u cilju razlikovanja bakterija koje sintetišu enzim dekarboksilazu. Lizin dekarboksilaza bujon (Lysine decarboxylase broth w/o peptone, HiMedia, Mumbaj, Indija) je inokulisan ispitivanom kulturom i inkubiran na 37 °C tokom 18-24 h. Ukoliko je ispitivana bakterijska kultura dekarboksilaza pozitivna, dolazi do fermentacije dekstroze uz stvaranje kiseline, što dovodi do promene pH sredine i promene boje indikatora bromkrezol ljubičastog u žutu boju. S druge strane, kisela sredina stimuliše aktivnost dekarboksilaze, pod čijim dejstvom dolazi do dekarboksilacije L-lizina i nastanka kadaverina. Alkalna sredina nastala stvaranjem kadaverina dovodi do promene boje indikatora u prvobitnu ljubičastu boju. Pozitivna reakcija se manifestuje zamućenjem i nepromenjenom ljubičastom bojom podloge nakon inkubiranja, dok je promena boje podloge u žutu dokaz za negativnu reakciju.
- Test za dokazivanje produkcije β -galaktozidaze. Za otkrivanje prisustva enzima β -galaktozidaze koji poseduju laktozu fermentujuće bakterije koriste se ONPG diskovi (ONPG discs, HiMedia, Mumbaj, Indija) koji su impregnirani orto-nitrofenil β -D-galaktopiranozom, sintetičkim bezbojnim jedinjenjem strukturno sličnim laktozi. Fermentacija laktoze zavisi od dva enzima: β -galaktozid permeaze, koja katališe ulazak laktoze u bakterijsku ćeliju, i β -galaktozidaze, koja razgrađuje laktozu u glukozu i galaktozu. β -galaktozidaza nije specifičan enzim za laktozu i može delovati na jednostavne galaktozide uključujući ONPG. Hidroliza ONPG rezultira oslobađanjem galaktoze i žutog hromogenog jedinjenja orto-nitrofenola što se očitava kao pozitivna

reakcija. Bakterijama koje ne fermentuju laktozu nedostaju oba enzima, međutim nekim bakterijama nedostaje permeaza, ali poseduju β -galaktozidazu i to su tzv. kasni fermentori laktoze. Test je izveden tako što je u epruveti sa 0,1 ml fiziološkog rastvora (FR, sastav i način pripreme rastvora su navedeni u prilogu 1) suspendovana ispitivana kultura i dodat dijagnostički disk. Inkubiranje je izvedeno na 37 °C, 6 do 24 h.

- Test ispitivanja sposobnosti produkcije indola iz triptofana izveden je na isti način kao i kod *E. coli*.

4.1.2. Potvrđivanje ispitivanih mikroorganizama MALDI - TOF MS metodom

Finalno potvrđivanje test mikroorganizama izvedeno je jednom od najsavremenijih hemotaksonomskih metoda, masenom spektrometrijom sa matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom - MALDI - MS (eng. matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry). MALDI - MS predstavlja tehniku kojom se analiziraju molekuli na osnovu njihove mase i električnog naboja i zasnovana je na delovanju lasera (azotni laser talasne dužine 337 nm) na uzorak otopljen u matrici, čime se postiže njegova jonizacija i desorpcija (analit prelazi iz tečne u gasovitu fazu) bez bilo kakve hemijske degradacije analita (Clark i sar., 2013). Kao rastvarač odnosno matriks analita koriste se organski rastvarači kao što su: α -ciano-4-hidroksicinaminska kiselina, 2, 5-dihidroksibenzoeva kiselina, ćilibarna kiselina, sinapinska kiselina, nikotinska kiselina i dr. Matriks/rastvarač mora zadovoljiti nekoliko uslova, a to je da može da apsorbuje UV zračenje na talasnoj dužini lasera, mora dobro izolovati molekule analita, te kokristalizovati sa njima i mora da omogućiti dobre jonizacijske uslove kao što je primanje i otpuštanje protona. Nastali joni se ubrzavaju i razdvajaju u TOF (eng. time of flight) analizatoru delovanjem električnog polja, pri čemu lakši joni jače ubrzavaju i prvi dolaze do detektora i obrnuto (Josić i sar., 2009; Singhal i sar., 2015). Kao rezultat analize mikroorganizama MALDI - TOF tehnikom nastaju karakteristični spektri masa proteina za svaki mikroorganizam. Identifikacija i klasifikacija mikroorganizma izvodi se upoređivanjem dobijenog masenog spektra ispitivanog uzorka sa referentnim spektrima deponovanim u biblioteci mikroorganizama, i obradom istih pomoću FlexControl 3.1. softverskog paketa (Bruker Daltonics, Masačusets, SAD).

Pre potvrđivanja pomoću MALDI - TOF MS metode, ispitivani mikroorganizmi su zasejani na selektivne podloge i to *E. coli* na TBX agaru (inkubiranje na 44 °C, 24 h), a *S. Typhimurium* na XLD agaru (inkubiranje na 37 °C, 24 h). Pojedinačno izrasla kolonija je zatim sterilnim štapićem naneta na MALDI matricu (MALDI target plate, Bruker Daltonics, Bremen, Nemačka) i ostavljena da se osuši na vazduhu. Nakon sušenja pripremljeni materijal je preliven sa 1 μ l rastvora matriksa (α -ciano-4-hidroksicinaminska kiselina) (Bruker Matrix HCCA, Bremen, Nemačka). Maseni spektri su automatski snimljeni pomoću Microflex LT/SH BioTyper

spektrometra (Bruker Daltonics, Masačusets, SAD) koji je korišćen u linearnom pozitivnom modu unutar raspona mase od 2 do 20 kDa akumulacijom 240 laserskih snopova ostvarenih pri 30-40% maksimalne snage lasera. Instrumentalni parametri pri snimanju MALDI spektra su bili sledeći: frekvencija lasera 60,00 Hz, napon jonskog izvora 1 20,00 kV, napon jonskog izvora 2 18,15 kV, napon sočiva 6,00 kV. Izlaz u MALDI Biotyperu je logaritamska vrednost rezultata u granicama od 0 do 3,0 koja predstavlja verovatnoću tačne identifikacije izolata, izračunata upoređivanjem pikova nepoznatog izolata sa referentnim spektrom u biblioteci mikroorganizama i predstavlja stepen verovatnoće tačne identifikacije izolata. Logaritamska vrednost rezultata u rasponu od 2,300 do 3,000 ukazuje na vrlo verovatnu identifikaciju na nivou vrste, raspon od 2,000 do 2,299 ukazuje na sigurnu identifikaciju roda sa mogućom identifikacijom vrste, raspon od 1,700 do 1,999 ukazuje na verovatnu identifikaciju na nivou roda, dok se logaritamska vrednost rezultata < 1,700 smatra nepouzdanom za identifikaciju (Schulthess i sar., 2013).

4.1.3. Potvrđivanje *Salmonella Typhimurium* real - time PCR metodom

Polimeraza lančana reakcija - PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) je brza, visokoosetljiva molekularna metoda koja se koristi za identifikaciju bakterija. Princip rada metode PCR se zasniva na amplifikaciji definisane DNK sekvence (imitacija procesa DNK replikacije) *in vitro*, pri čemu se koriste dva oligonukleotida (prajmera) koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i koji su međusobno suprotno orjentisani. Amplifikacija specifičnih sekvenci nukleinske kiseline vrši se tokom cikličnog procesa. Kod klasične metode, proizvodi PCR se otkrivaju gel-elektroforezom nakon bojenja etidijum-bromidom (Dmitrić i sar., 2018). Razlika između real - time i klasične metode PCR je u tome, što je real - time PCR metodom omogućeno kontinuirano praćenje stvaranja PCR produkata tokom čitave reakcije, merenjem fluorescentnog signala koji stvara specifično dvojno obeležena proba ili interkalirajuća boja pri čemu je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini PCR amplikona (Law i sar., 2015; Dmitrić, 2018).

Metodom real - time PCR, detekcija genoma laboratorijskog tipskog soja *Salmonella Typhimurium* koji je korišćen u ovoj studiji, izvedena je korišćenjem prajmera i probe za detekciju *fliA-IS200* gena, a koji su navedeni u tabeli 4.1. (Maurischat i sar., 2015). *Salmonella Typhimurium* specifična proba obeležena je na 5' kraju „reporter“ Hexachloro-Fluorescein (HEX) i „Dark Quencher-om“ na 3' kraju (BHQ-1). Lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 25 µl, koja je sadržala 2 × Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), 400 nM svakog prajmera, po 250 nM svake probe. Dva µl ekstrahovane DNK upotrebljeno je kao template. Amplifikacioni uslovi podrazumevali su „hot start“ tokom 3 minuta na 95 °C, iza koga je sledilo 45 ciklusa: 15 sekundi na 95 °C i 30 sekundi na 61 °C. Nivo fluorescencije analiziran je pomoću softvera real - time PCR uređaja (*Stratagene Mx3005P PCR System, Agilent Technologies, SAD*) (Dmitrić, 2018).

Tabela 4.1. Prajmeri i proba upotrebljeni za detekciju genoma *Salmonella* Typhimurium (*fliA-IS200*) (Maurischat i sar., 2015)

Prajmer/ proba	Sekvenca (5'–3')	Veličina ampikona
<i>fliA-IS200</i> (forward)	CATTACACCTTCAGCGGTAT	
<i>fliA-IS200</i> (reverse)	CTGGTAAGAGAGCCTTATAGG	254 bp
<i>fliA-IS200</i> proba	CGGCATGATTATCCGTTTCTACAG AGG	

4.2. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

Za ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma testiranih mikroorganizama primenjene su kvalitativne i kvantitativne metode. Od kvalitativnih metoda primenjena je metoda određivanja morfotipa kolonija na KCA (sastav i način pripreme podloge su navedeni u prilogu 2) prema Solomon i sar. (2005) i Lu i sar. (2011). Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izvedeno je uz primenu kristal violet testa prema metodi koju navode Stepanović i sar. (2000), Agarwal i sar. (2011) i O'Toole i sar. (2011).

4.2.1. Određivanje morfotipa kolonija *Escherichia coli* i *Salmonella* Typhimurium na Kongo crvenom agaru

Određivanje morfotipa kolonija testiranih mikroorganizama izvedeno je prema metodi koju su opisali Solomon i sar. (2005), Lu i sar. (2011), a koja se zasniva na inokulaciji površine KCA koji je suplementiran sa dve indikatorske boje, kongo crveno, (40 µg/ml) i brilijant plavo, (20 µg/ml). Indikatorske boje inkorporirane u osnovnu podlogu omogućile su identifikaciju osnovnih komponenti matriksa biofilma. Kongo crveno se vezuje za celulozu i fimbrije, dok se brilijant plavo vezuje za proteinske komponente matriksa biofilma- fimbrije. Adsorpcijom ove dve boje od strane komponenti matriksa biofilma dolazi do formiranja fenotipski različitih kolonija na KCA.

Centar prethodno pripremljene podloge KCA u Petri ploči (Ø 90 mm, NOEX, Komorniki, Poljska) inokulisan je jednim ubodom sa delom kolonije ispitivanog mikroorganizma prethodno kultivisanog na HA na 37 °C, 24 h. Svaka testirana bakterija je inokulisana na dve ploče sa prethodno pripremljenim KCA, od kojih je jedna inkubirana na 25 °C, a druga na 37 °C u

trajanju od 96 h. Nakon navedenog perioda inkubiranja morfotip kolonija je određen na osnovu fenotipskih karakteristika navedenih u tabeli 4.2. Test određivanja morfotipa izveden je u tri ponavljanja za svaki testirani mikroorganizam na obe temperature.

Tabela 4.2. Fenotipske karakteristike morfotipova prema Bokranz i sar. (2005) i Römling i sar. (2005)

Oznaka morfotipa	Fenotipski izgled kolonije	Komponente matriksa biofilma
RDAR (eng. red, dry and rough)	Crvena do violet, suva R-forma kolonija	Celuloza, fimbrije
BDAR (eng. brown, dry and rough)	Braon, suva R-forma kolonija	Fimbrije
PDAR (eng. pink, dry and rough)	Roza, suva R-forma kolonija	Celuloza
SBAM (eng. smooth, brown and mucoid)	Braon, mukoidna S-forma kolonija	Kapsularni polisaharid
RAS (eng. red and smooth)	Crvena, S-forma kolonija	Fimbrije
BAS (eng. brown and smooth)	Braon, S-forma kolonija	Fimbrije
PAS (eng. pink and smooth)	Roza, S-forma kolonija	Celuloza
SAW (eng. smooth and white)	Bela, S - forma kolonija	-

4.2.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija za kristal violet test

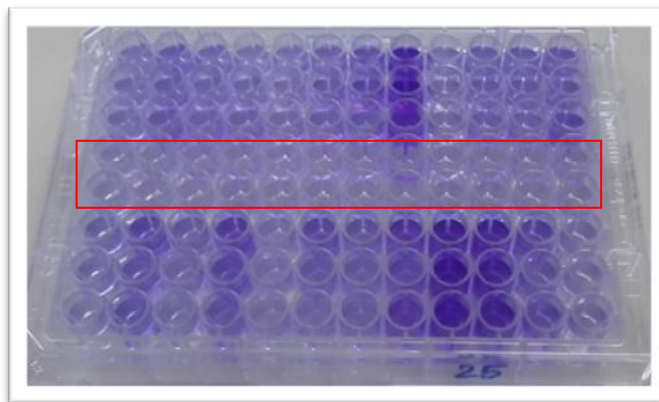
Priprema i standardizacija suspenzija 24 izolata *E. coli* i laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium* izvedena je tako što je za svaki ispitivani mikroorganizam nekoliko identičnih kolonija dobijenih kultivacijom na Trypton soja agaru (Tryptone soya agar, TSA, Oxoid, Bejingstouk, UK), na 37 °C, 24 h, resuspendovano u 5 ml Trypton soja bujona (Tryptone soya broth, TSB, Oxoid, Bejingstouk, UK) koji je zatim inkubiran na 37 °C, 18 h. Nakon inkubiranja dobijena suspenzija ispitivanih mikroorganizama je homogenizovana i razblažena u odnosu 1:40

u svežem TSB. Primenom denzitometra DEN - 1 (Biosan, Riga, Letonija) podešena je optička gustina (OD) suspenzije do gustine koja je odgovarala McFarland standardu 0,5 (1×10^8 cfu/ml), koja je ujedno predstavljala koncentraciju bakterijskih suspenzija koja je korišćena u ispitivanjima sposobnosti formiranja biofilma.

4.2.3. Određivanje sposobnosti formiranja biofilma kristal violet testom

Kristal violet test na mikrotitar pločama se često koristi u laboratorijskoj praksi za ispitivanje sposobnosti mikroorganizama da formiraju biofilm. Najčešće se koriste mikrotitar ploče sa ravnim dnom od polistirena zbog njegove hidrofobne nepolarne prirode (Liu i sar., 2020). Procena sposobnosti formiranja biofilma određuje se na osnovu vrednosti izmerenih apsorbanci (OD_{630}).

Kristal violet test na mikrotitar pločama za kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma testiranih mikroorganizama izveden je prema metodi koju su opisali Stepanović i sar. (2000), Agarwal i sar. (2011) i O'Toole i sar. (2011) uz modifikacije. Test je izveden u polistirenskoj mikrotitar ploči sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, čija je radna zapremina 340 μ l (Greiner Bio-One, Merck KGaA, Darmštad, Nemačka), tako što je 180 μ l TSB u bunarčiću, inokulisano sa 20 μ l bakterijske suspenzije (priprema opisana u potpoglavlju 4.2.2) po principu jedan bunarčić - jedan testirani mikroorganizam. Istovremeno je postavljena i negativna kontrola koja je sadržavala 200 μ l TSB. Pripremljena mikrotitar ploča je inkubirana na 25 °C, 48 h. Nakon isteka vremena inkubiranja neadherisane ćelije su uklonjene inverzijom mikrotitar ploče na apsorbujuću hartiju i ispiranjem svakog prethodno inokulisanog bunarčića tri puta sa po 250 μ l sterilne vode. Adherisane ćelije su fiksirane sušenjem na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori (Aura mini, BIOAIR, Sicijano, Italija), nakon čega su obojene sa 250 μ l 0,5% rastvora kristal violeta (AppliChem, Darmštad, Nemačka) i ostavljene na sobnoj temperaturi, 10 minuta. Višak boje (koja se nije vezala za adherisane ćelije) je uklonjen višekratnim ispiranjem bunarčića sterilnom vodom nakon čega je mikrotitar ploča podvrgnuta sušenju na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja kristal violet vezan za adherisane ćelije je rastvoren dodatkom 250 μ l dekolorizatora (33% sirćetna kiselina) (slika 4.2). Vreme potrebno za potpuno rastvaranje kristal violeta bilo je 15 minuta na sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani spektrofotometrijski upotrebom filtera talasne dužine 630 nm na Elisa čitaču (Elisa Reader, Thermo electron corporation, Šangaj, Kina).



Slika 4.2. Mikrotitar ploča nakon dodatka dekolorizatora (negativna kontrola D, E 1-12)

Vrednosti apsorbanci na osnovu kojih je izvršena klasifikacija jačine biofilm produkcije (tabela 4.3) dobijene su umanjnjem srednje vrednosti apsorbance testiranog mikroorganizma za srednju vrednost apsorbance negativne kontrole (Stepanović i sar., 2007):

$$OD_{tm} = srvOD_{tm} - srvOD_{nk}$$

gde je:

OD_{tm} – optička gustina/apsorbanca testiranog mikroorganizma

$srvOD_{tm}$ – srednja vrednost apsorbanci testiranog mikroorganizma

$srvOD_{nk}$ – srednja vrednost apsorbanci negativne kontrole

Tabela 4.3. Klasifikacija izolata na osnovu apsorbanci prema Stepanović i sar. (2007)

Apsorbanca	Produkcija biofilma
$OD \leq OD_c$	Nema
$OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$	Slab
$(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$	Umeren
$(4 \times OD_c) < OD$	Jak

Pri čemu je:

ODc - granična vrednost (Cut-off) izračunata prema formuli:

$$\text{ODc} = \text{srvODnk} + (3 \times \text{SDnk})$$

gde je:

srvODnk - srednja vrednost apsorbanci negativne kontrole

SDnk - standardna devijacija negativne kontrole

Kristal violet test na temperaturi 37 °C je izveden na identičan način kao i test na temperaturi od 25°C.

Za potrebe daljeg ispitivanja sposobnosti adherencije odabran je izolat *E. coli* (izolovan iz mesa živine) koji je primenom kristal violet testa na osnovu apsorbanci svrstan u jake biofilm producere. Pored izolata *E. coli* ispitivan je i laboratorijski tipski soj *S. Typhimurium* koji prema rezultatima istraživanja Robbe-Saule i sar. (2006) takođe spada u jake biofilm producere.

4.3. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* u zemljištu

4.3.1. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija

Odabrani izolat *E. coli* i laboratorijski tipski soj *S. Typhimurium* su prethodno kultivisani na HA tokom 24 h na temperaturi od 37 °C. Nakon navedenih uslova kultivisanja, nekoliko identičnih kolonija svake ispitivane bakterijske kulture resuspendovano je u 9 ml sterilnog fiziološkog rastvora.

Optička gustina (OD) inokuluma je podešena do gustine McFarland standarda 1 ($\sim 3 \times 10^8$ cfu/ml) korišćenjem denzitometra DEN - 1 koja je ujedno predstavljala i finalnu koncentraciju bakterijskih suspenzija korišćenih u ispitivanjima preživljavanja u zemljištu.

4.3.2. Inokulacija zemljišta

Ispitivanja preživljavanja odabranog izolata *E. coli* i laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium* u zemljištu su izvršena pri promenljivim i konstantnim (u komori - Binder, Tutlingen, Nemačka) uslovima relativne vlažnosti vazduha i temperature tokom 120 dana, a prema metodi koju su opisali Jarak i sar. (2005) i Fornefeld i sar. (2017) uz modifikacije.

Komercijalno humusno zemljište je nakon prosejavanja kroz sito prečnika otvora 2 mm, odmereno u količini od po 200 g u osam erlenmajera zapremine 500 ml. Svi pripremljeni uzorci su sterilisani u autoklavu (Tuttnauer 3870 ELV, Bet Šemeš, Izrael), 30 minuta na 121 °C. Svaki od šest pripremljenih uzoraka zemljišta je inokulisan sa po 20 ml suspenzije *E. coli* i 20 ml suspenzije *S. Typhimurium*, pri čemu je koncentracija suspenzije oba mikroorganizma iznosila 3×10^8 cfu/ml. Erlenmajeri su zatvoreni Whatman filter papirom veličine pora max 100 μm (Whatman®, WHA 10340810, Merck KGaA, Darmštad, Nemačka). Inokulisani uzorci su homogenizovani u orbitalnom šejkeru (IKA® ROCKER 2D basic, Štaufen, Nemačka). Na ovaj način pripremljeni uzorci zemljišta su sadržavali 3×10^7 cfu/g *E. coli* i 3×10^7 cfu/g *S. Typhimurium*. Dva preostala uzorka zemljišta su inokulisana sa 40 ml sterilne vode i oni su predstavljali negativne kontrole. Serija od tri inokulisana uzorka i jedne negativne kontrole je izložena dejstvu konstantne temperature i relativne vlažnosti (T = 23 °C, H = 70%) u komori. Druga serija od tri inokulisana uzorka i jedne negativne kontrole je izložena dejstvu promenljivih vrednosti relativne vlažnosti i temperature (laboratorijski uslovi). Broj preživelih mikroorganizama je određivan nakon 7, 15, 30, 60, 90 i 120 dana uz istovremeno određivanje sadržaja slobodne vode (a_w) u uzorcima negativne kontrole. Broj preživelih mikroorganizama je određen standardnom tehnikom brojanja kolonija na TBX (24 h na 44 °C) za *E. coli* i XLD (24 h na 37 °C) za *S. Typhimurium*, a dobijeni rezultati su izraženi kao log cfu/g.

4.3.3. Određivanje a_w vrednosti zemljišta

Za opstanak mikroorganizama u zemljištu jedan od najznačajnijih parametara je sadržaj slobodne vode koji se izražava kao aktivnost vode (a_w) i predstavlja deo vode koji mikroorganizmi mogu da koriste za svoju metaboličku aktivnost. Aktivnost vode predstavlja odnos između pritiska pare rastvora (rastvorenih materija u vodi) - p i pritiska pare rastvarača - p_0 (obično vode) i usko je povezana sa relativnom vlažnošću atmosfere koja okružuje zemljište (Škrinjar i Tešanović, 2007).

Za određivanje a_w vrednosti zemljišta korišćen je a_w - metar Testo 650 (Testo AG, Sparta, NJ, SAD). Uređaj se sastoji od sonde, merne ćelije i plastične merne posude za uzorak. Postupak je izveden tako da je prethodno dobro homogenizovanim uzorkom napunjena merna posuda do 2/3

zapremine, nakon čega je u nju postavljen merni deo sonde. Merenje je izvršeno na sobnoj temperaturi do uspostavljanja ravnotežnog stanja a_w , očitavanjem prikazane vrednosti na displeju uređaja. Merenje je izvedeno u tri ponavljanja.

4.4. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma na lisnoj površini povrća

4.4.1. Priprema kupona lista zelene salate

Za potrebe ovog dela eksperimenta odabrana je zelena salata domaće sorte Novosadska majska maslena (slika 4.3). Priprema kupona lista zelene salate izvedena je prema metodi koju su opisali Berger i sar. (2009) uz modifikacije. Pre početka eksperimenta odabrani listovi zelene salate su oprani pod mlazom vode radi uklanjanja eventualnih mehaničkih nečistoća, zatim su isprani sterilnom vodom, postavljeni u otvorene Petri ploče prečnika 160 mm i sterilisani UV zracima u laminarnoj komori (Aura mini, BIOAIR, Sicijano, Italija) 30 minuta, uz strujanje vazduha, radi inaktivacije prisutne epifitne mikroflore i uklanjanja ostatka vode.



Slika 4.3. Glavica zelene salate (sorta Novosadska majska maslena)

Odabrani su listovi iz sredine glavice salate (slika 4.4). Od pripremljenih listova salate izrezani su kuponi dimenzija 10×10 mm. U cilju provere sterilnosti, po jedan kupon je aseptički prenet u epruvetu sa 1 ml slanog peptonskog rastvora (SPR, sastav i način pripreme podloge su navedeni u prilogu 3), epruveta je vorteksirana (Velp Scientifica, Uzmate, Italija) i sadržaj epruvete je

zasejan u Petri ploču koja je nalivena podlogom za ukupan broj bakterija (Plate count agar, PCA, HiMedia, Mumbaj, Indija).

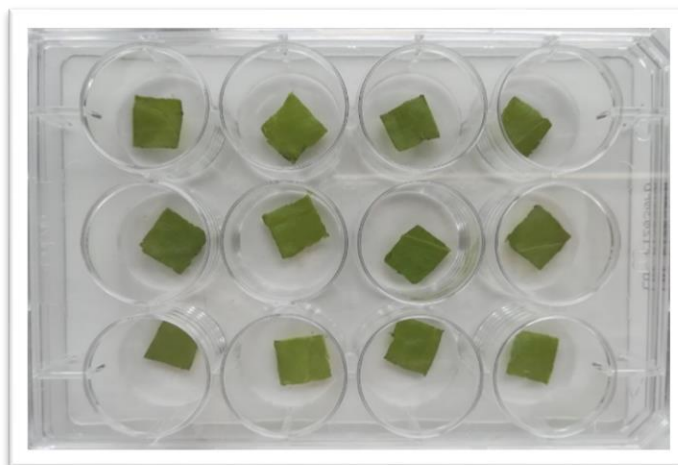


Slika 4.4. Deo lista zelene salate od koga su pripremljeni kuponi

Ploča je inkubirana 72 h na 30 °C. Postupak je izveden u tri ponavljanja a dobijeni rezultati su izraženi kao cfu/cm².

4.4.2. Određivanje sposobnosti adherencije na lisnu površinu povrća

Sposobnost adherencije odnosno određivanje broja ćelija koje formiraju biofilm na lisnoj površini ispitana je prema metodi koju su opisali Kroupitski i sar. (2009) i Patel i Sharma (2010) uz modifikacije. Pripremljeno je ukupno šest pojedinačno postavljenih kupona lista zelene salate u bunarčice mikrotitar ploče sa 12 udubljenja sa ravnim dnom, radne zapremine 2-4 ml (Greiner Bio-One, Merck KgaA, Darmstadt, Nemačka) prema postupku opisanom u potpoglavlju 4.4.1. Prva serija od tri kupona je inokulisana sa po 1 ml suspenzije *E. coli* (potpoglavlje 4.2.2), a druga serija sa po 1 ml suspenzije *S. Typhimurium* (slika 4.5). Adherencija bakterijskih ćelija na kupone je omogućena tokom 3 h inkubiranja na temperaturi od 25 °C. Nakon isteka predviđenog vremena adherencije kuponi su isprani tri puta sa 2,5 ml sterilne vode radi uklanjanja neadherisanih ćelija i ostatka hranljive podloge. Svaki kupon je aseptično prenet u epruvetu sa 1 ml sterilnog SPR. Postupak deadherencije je izveden na dva načina: vorteksiranjem epruveta 1 minut pri najvećoj brzini (40 Hz) i kombinovano izlaganjem epruveta delovanju niske energije ultrazvuka frekvencije 40 kHz 1 minut u ultrazvučnom kupatilu (model ATM 40-3LCD, ATU, Valencija, Španija) i nakon toga vorteksiranjem 1 minut (40 Hz). Sadržaj epruveta je zatim resuspendovan u 9 ml SPR. Broj adheriranih ćelija, je određen standardnom tehnikom brojanja kolonija na TSA, a dobijeni rezultat je izražen kao log cfu/cm². Sposobnost adherencije na lisnu površinu povrća je ispitana i na temperaturi od 37 °C.



Slika 4.5. Mikrotitar ploča sa kuponima lista zelene salate pre inokulacije

4.4.3. Formiranje biofilma na lisnoj površini povrća

Prethodno pripremljeni kuponi lista zelene salate na način koji je opisan u potpoglavlju 4.4.1. su stavljeni pojedinačno u sterilnu polistirensku mikrotitar ploču sa 12 bunarčića sa ravnim dnom. Svaki od tri pripremljena kupona lista zelene salate je inokulisan sa po 1 ml suspenzije *E. coli*, gustine McFarland standarda 0,5 (potpoglavlje 4.2.2). Isti broj kupona lista zelene salate je inokulisan sa po 1 ml suspenzije *S. Typhimurium* istog turbiditeta. Ispitivanja su izvedena na dve temperature 25 °C i 37 °C, a vreme inkubiranja je bilo 24 h. Formirani biofilm je vizualizovan pomoću skening elektronske mikroskopije.

4.4.4. Skening elektronska mikroskopija (SEM)

Nakon isteka vremena za formiranje biofilma na kuponima lista zelene salate, kuponi su odstranjeni iz mikrotitar ploča i isprani tri puta sa po 2,5 ml sterilne vode kako bi se uklonile neadherisane ćelije i ostaci podloge. Dalji postupak pripreme kupona lista zelene salate za SEM izveden je prema protokolu koji su opisali Pathan i sar. (2008). Prema navedenom protokolu fiksiranje biofilмова je izvedeno na temperaturi od 5 °C tokom 18 h sa 3% rastvorom glutaraldehida (Roth, Karlsruhe, Nemačka) u 0,1 M fosfatnom puferu. Glutaraldehyd se koristi da bi ojačao elastične zidove biljnih ćelija čime se sprečava narušavanje strukture biljnog tkiva.

Nakon fiksiranja biofilma, kuponi su isprani dva puta sa po 3 ml sterilne destilovane vode, a zatim podvrgnuti postupku dehidratacije sukcesivnim potapanjem u vodene rastvore etanola

(C₂H₅OH, Zorka *Pharma* - Hemija, Šabac), rastućih koncentracija (30%, 50%, 60%, 70% i 90%), po 5 minuta u svakom. Na kraju je je svaki kupon dva puta potopljen u 96% etanol tokom 10 minuta, nakon čega su kuponi osušeni metodom kritične tačke sušenja (31,1 °C na 71 bar) korišćenjem uređaja za sušenje metodom kritične tačke sušenja (Critical Point Dryer CPD 030, BAL-TEC, Balzers, Lihtenštajn). Ovim postupkom sušenja je izbegnut efekat dejstva sila površinskog napona između dva agregatna stanja (tečnost/gas), što takođe doprinosi očuvanju strukture biljnog tkiva.

Osušeni kuponi napareni su zlatom na uređaju Sputter Coater SCD 005, BAL-TEC SCAN (BAL-TEC, Balzers Lihtenštajn) (WD=50 mm, za 90 s, struja 30 mA) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV (JEOL Ltd. Japan) (napon ubrzanja 25 kV, na WD od 20 do 8 mm).

4.5. Etarska ulja

4.5.1. Biljni materijal

U ovom radu ispitan je hemijski sastav, antimikrobni i antibiofilm potencijal EU četiri biljne vrste gajene na području Bačke, Autonomne pokrajne Vojvodine. Za navedena ispitivanja korišćena su: EU mirođije (*Anethum graveolens* L.) biljke koja pripada porodici *Apiaceae*, EU nane (*Mentha piperita* L.), EU bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) i EU vreska (*Satureja montana* L.), biljaka iz porodice *Lamiaceae*. Identifikacija biljnog materijala izvedena je na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. Herbarski primerci su deponovani u herbarijumu pomenutog departmana (BUNS Herbarijum) i zavedeni pod sledećim vaučer brojevima: mirođija (2-1440), nana (2-1550), bosiljak (2-1441) i vresak (2-1561).

4.5.2. Ekstrakcija etarskih ulja

Ekstrakcija EU iz biljnog materijala izvedena je postupkom hidrodestilacije na aparatu po Clevenger-u (ATICO Medical Pvt., Ambala, Indija) tokom 4 h u skladu sa standardnom procedurom opisanom u Evropskoj farmakopeji (2004). Za ekstrakciju su korišćeni osušeni i samleveni nadzemni delovi biljnog materijala. Dobijeni uzorci ulja čuvani su u tamnim staklenim bocama na temperaturi od 4 °C.

4.5.3. Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja

Hemijski sastav EU određen je gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GH - MS), pri čemu je korišćen gasni hromatograf Agilent 6890, (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) povezan sa selektivnim masenim detektorom Agilent 5973 MSD, (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD), u pozitivnom režimu EI. Razdvajanje je vršeno na kapilarnoj koloni (Agilent 19091S-433 HP-5 MS), dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm . Kao noseći gas korišćen je helijum, sa protokom od 0,1 ml/min, mereno na 210 °C. Temperatura kolone bila je linearno programirana od 60 °C do 285 °C, uz brzinu podizanja temperature od 4,3 °C/min. Temperatura injektora bila je 250 °C; temperatura izvora 200 °C; temperatura interfejsa 250 °C, energija jonskog izvora, 70 eV. Merenje masa vršeno je u opsegu 40-350 Daltona sa 11,47 skanova u minutu. Identifikacija komponenti izvedena je na osnovu retencionih indeksa i poređenjem masenih spektara sa spektrima biblioteka Wiley i NIST. Kvantifikacija je vršena na osnovu internog standarda (Aćimović, 2013).

4.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti EU bosiljka, nane, mirođije i vreska prema odabranom izolatu *E. coli* i laboratorijskom tipskom soju *S. Typhimurium*, izvedeno je primenom modifikovane bujon mikrodilucione metode prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2012) uz modifikacije. Kao indikator bakterijskog rasta, a u cilju lakše vizuelne detekcije minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), korišćen je 0,01% vodeni rastvor resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide, HiMedia, Mumbaj, Indija). Resazurin je plava nefluorescentna boja, koja nakon redukcije nastale pod dejstvom oksidoreduktaza vijabilnih ćelija prelazi u fluorescentno jedinjenje roze boje-resorufin.

4.6.1. Priprema rastvora resazurina

Rastvor resazurina pripremljen je odmeravanjem 0,01 g resazurina u normalni sud zapremine 100 ml i rastvaranjem do 100 ml sterilnom vodom, a zatim sterilisan filtracijom uz primenu membranskog filtera veličine pora 0,20 μm , (Sartorius, Gotingen, Nemačka). Zbog fotoosetljivosti resazurina za svako ispitivanje je pripreman sveži rastvor.

4.6.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Bakterijske kulture su presejane na HA, inkubirane 18 h na 37 °C. Nakon toga, nekoliko identičnih kolonija ispitivane bakterijske kulture resuspendovano je u 9 ml sterilnog FR. Optička gustina suspenzije je podešena do gustine koja je odgovarala McFarland standardu 0,5 korišćenjem denzitometra DEN - 1. Finalna koncentracija suspenzija koja je korišćena u ispitivanju antimikrobne aktivnost je iznosila 10^6 cfu/ml.

4.6.3. Bujon mikrodiluciona metoda

Kako je ranije navedeno, antimikrobna aktivnost EU ispitivana je bujon mikrodilucionom metodom prema protokolu opisanom u Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) primenom mikrotitarskih ploča sa 96 bunarčića. U svaki bunarčić mikrotitar ploče dozirano je 100 µl Mueller-Hinton bujona (Mueller Hinton broth, MHB, HiMedia, Mumbaj, Indija) suplementiranog sa Tween[®] 80 (Polioksietilensorbitan monooleat, HiMedia, Mumbaj, Indija) u koncentraciji 0,5%. Tween[®] 80 ima ulogu emulgatora sprečavajući raslojavanje EU u bujonu čime se obezbeđuje dobar kontakt sa ispitivanim mikroorganizmom. Pored toga odlikuje se time da ne ispoljava sinergistički i antagonistički efekat na aktivnost EU. Rezultati ranijih istraživanja su pokazali da dodatak Tween[®] 80 u koncentraciji većoj od 0,5% može ometati solubilizaciju ćelijske membrane (Saad i sar., 2013). Nakon toga je u prvi bunarčić mikrotitar ploče dodato 100 µl EU. Višekratnim uvlačenjem/ispuštanjem sadržaja prvog bunarčića automatskom pipetom (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) uz korišćenje nastavaka zapremine 200 µl sadržaj bunarčića je homogenizovan, nakon čega je 100 µl sadržaja iz ovog bunarčića prebačeno u sledeći. Postupak je ponavljan sve do poslednjeg 12-og bunarčića iz kojeg je nakon homogenizacije, 100 µl smeše MHB + EU uklonjeno. Na taj način je početna koncentracija EU serijski dvostruko razblaživana. Nakon toga svaki bunarčić je inokulisan sa 10 µl bakterijske suspenzije ispitivanog mikroorganizma (potpoglavlje 4.6.2), pri čemu je finalna zapremina u svakom bunarčiću iznosila 110 µl, što je uzeto u obzir prilikom proračuna tačne koncentracije EU u svakom bunarčiću (tabela 4.4). Uopredno su postavljene sledeće kontrole:

- Pozitivna kontrola - kontrola rasta mikroorganizama: MHB + 0,5% Tween[®] 80 (100 µl) i suspenzija bakterija (10 µl);
- Negativna kontrola - kontrola sterilnosti: MHB + 0,5% Tween[®] 80 (100 µl) i EU (10 µl).

Pripremljene mikrotitar ploče su inkubirane tokom 18 h na temperaturi od 37 °C. U cilju određivanja MIC, nakon 18 h inkubiranja na gore pomenutoj temperaturi, u svaki bunarčić je

dodato 10 μl 0,01% rastvora resazurina. Ploče su reinkubirane 6 h na istoj temperaturi. MIC je definisana kao najniža koncentracija EU koja je inhibirala vidljivi rast ispitivanog mikroorganizma, i predstavljena je onom koncentracijom EU koja je sprečila redukciju resazurina.

Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) je definisana kao koncentracija EU koja dovodi do smrti 99,9% bakterijske populacije i određena je zasejavanjem po 100 μl iz svakog bunarčića u kome nije došlo do promene boje indikatora na površinu agara za ukupan broj bakterija (PCA), pri čemu su inokulisane ploče inkubirane 24 h na 37 °C. Najniža koncentracija EU pri kojoj je zabeleženo potpuno odsustvo rasta mikroorganizama određena je kao MBC.

Testovi su izvedeni u tri ponavljanja, tokom tri sesije ispitivanja sprovedenih pod istim uslovima u različitom vremenskom roku.

Tabela 4.4. Ispitivane koncentracije etarskih ulja

Redni broj bunarčića	Mueller Hinton bujon (μl)	Zapremina suspenzije test mikroorganizma (μl)	Koncentracija etarskog ulja ($\mu\text{l/ml}$)
1.	100	10	454,4
2.	100	10	227,25
3.	100	10	113,62
4.	100	10	56,81
5.	100	10	28,40
6.	100	10	14,20
7.	100	10	7,10
8.	100	10	3,55
9.	100	10	1,77
10.	100	10	0,88
11.	100	10	0,44
12.	100	10	0,22

Radi poređenja antimikrobne aktivnosti EU sa aktivnošću antibiotika, ispitana je i antimikrobna aktivnost antibiotika gentamicina i streptomocina prema izolatu *E. coli* i *S. Typhimurium* pri čemu je korišćen komercijalni MIC Test Strip za gentamicin i MIC Test Strip za streptomicin proizvođača Liofilchem[®], Roseto delji Abruci, Italija. Test se sastoji od test trake koja je impregnirana različitim koncentracijama ispitivanog antibiotika, pri čemu je svaka naredna koncentracija nanetog antibiotika dvostruko niža od prethodne. Test traka se aplicira na površinu

očvrstlog MHA u Petri pločama (Ø 90 mm), koji je pre razlivanja inokulisan sa 200 µl ispitivane bakterijske suspenzije koncentracije 1×10^6 cfu/ml. Nakon aplikacije test trake ploče su inkubirane 18 h na 37 °C. Tokom inkubiranja dolazi do formiranja prozirne zone inhibicije u vidu elipse. Vrednost MIC za dati antibiotik se očitava direktno sa test trake u mestu gde elipsa dodiruje test traku, i izražava se u µg/ml.

4.7. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju i formirani biofilm

4.7.1. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju

Ispitivanje uticaja EU na inicijalnu ćelijsku adheziju izvedeno je metodom koju su opisali Correa i sar. (2018) uz modifikacije. Koncentracije EU korišćene u ovoj metodi iznosile su 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Po 20 µl od svake testirane koncentracije EU inokulisano je u bunarčice sa ravnim dnom, mikrotitar ploče sa 96 bunarčića. Zatim je u svaki bunarčić dodato 160 µl TSB i 20 µl bakterijske suspenzije McFarland 0,5. Uporedo su postavljene kontrole:

- Pozitivna kontrola: 180 µl TSB + 20 µl bakterijskog inokuluma;
- Negativna kontrola: 200 µl TSB.

Mikrotitar ploče su inkubirane na temperaturi od 25 °C u trajanju od 48 h. Nakon inkubiranja, sadržaj bunarčića je uklonjen inverzijom mikrotitar ploča na apsorbujuću hartiju. Neadherisane bakterijske ćelije i ostatak podloge uklonjeni su ispiranjem bunarčića tri puta sa po 250 µl sterilne vode. Ploče su osušene na sobnoj temperaturi u laminarnoj komori. Uticaj određenih koncentracija EU na inicijalnu ćelijsku adheziju odnosno inhibicija formiranja biofilma određena je kvantifikacijom ukupne mase formiranog biofilma primenom kristal violet testa (postupak opisan u potpoglavlju 4.2.3). Test je izveden istovremenom inokulacijom po 3 bunarčića određenom koncentracijom EU.

Za izvođenje ove metode napravljeni su deset puta koncentrovaniji rastvori EU u odnosu na prethodno određene vrednosti MIC, da bi njihova koncentracija u punom bunarčiću odgovarala traženim vrednostima 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Etarsko ulje je rastvoreno u TSB uz dodatak 0,5% Tween® 80.

4.7.2. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm *in vitro*

Za ispitivanje uticaja EU na formirani biofilm *in vitro* odnosno u mikrotitar pločama korišćene su koncentracije EU u vrednosti 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Metoda je izvedena prema navodima Correa i sar. (2018). U 180 µl TSB koji je prethodno doziran u bunarčice sa ravnim dnom, mikrotitar ploče sa 96 udubljenja, dodato je 20 µl bakterijske suspenzije McFarland 0,5. Mikrotitar ploče su inkubirane 48 h na 25 °C radi formiranja biofilma. Nakon isteka navedenog vremena inverzijom mikrotitar ploče na apsorbujuću hartiju sadržaj bunarčica je uklonjen. Ostatak bujona i zaostale neadherisane ćelije dodatno su uklonjeni ispiranjem bunarčica tri puta sa po 250 µl sterilne vode. Ploče su zatim ostavljene na sobnoj temperaturi radi sušenja. Nakon sušenja u svaki bunarčić je dodato 180 µl fosfatnog pufera i po 20 µl deset puta koncentrovanih rastvora EU kako bi njihova koncentracija u bunarčićima odgovarala vrednostima 0,5 MIC, MIC, 2 MIC. Formirani biofilm je izložen dejstvu EU tokom 15, 30 i 60 minuta na sobnoj temperaturi. Uporedo su postavljene kontrole:

- Pozitivna kontrola: 180 µl TSB + 20 µl bakterijskog inokuluma;
- Negativna kontrola: 200 µl TSB.

Za svaku koncentraciju EU i vreme delovanja pripremljena su po tri bunarčica, a ispitivanja su izvedena u dva ponavljanja. Nakon isteka vremena dejstva EU na biofilm, izvedena je kvantifikacija biomase biofilma primenom kristal violet testa.

Uticaj EU na inicijalnu adheziju i formirani biofilm ocenjivan je na osnovu procenta redukcije apsorbanci u odnosu na netretirane uzorke (pozitivna kontrola) prema formuli koju navode Tutar i sar. (2016):

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

gde je:

A_c - apsorbancia pozitivne kontrole

A_s - apsorbancia tretiranog uzorka

Efekat pojedinih koncentracije EU na inicijalnu adheziju i formirani biofilm definisan je određivanjem:

- MBIC₅₀ (eng. minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC) koja predstavlja najnižu koncentraciju primenjenog EU koja je sprečila inicijalnu adheziju i posledično formiranje biofilma u iznosu $\geq 50\%$;

- MBEC₅₀ (eng. minimal biofilm eradication concentration, MBEC) koja predstavlja najnižu koncentraciju primenjenog EU koja je dovela do redukcije prethodno formiranog biofilma u iznosu $\geq 50\%$.

4.7.3. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm na lisnoj površini povrća

Formiranje biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* na kuponima lista zelene salate opisano je u potpoglavlju 4.4.3. Ispitivanje uticaja EU na formirani biofilm na kuponima lista zelene salate izvedeno je po metodi koju su opisali Trevisan i sar. (2018) uz modifikacije. Nakon isteka vremena predviđenog za formiranje biofilma na kuponima lista zelene salate (24 h, 25 °C) svaki kupon je izvađen iz udubljenja mikrotitar ploče i ispran 3 puta sa po 2,5 ml sterilne vode radi uklanjanja neadherisanih ćelija. Kuponi su postavljeni u udubljenja nove polstirenske mikrotitar ploče i preliveni sa 200 μ l TSB suplementiranog sa 0,5% Tween[®]80 u kome su pripremljene testirane koncentracije EU: 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Za svako EU napravljena su tri seta sa po tri kupona lista zelene salate na kojima je formiran biofilm da bi po tri kupona mogla biti izložena delovanju jednoj koncentraciji EU. Dejstvo EU je trajalo jedan sat na sobnoj temperaturi. Tri kupona lista zelene salate na kojima je biofilm formirala *E. coli* i tri kupona na kojima je biofilm formirala *S. Typhimurium* nisu tretirani EU i predstavljaju pozitivnu kontrolu. Nakon isteka predviđenog vremena izloženosti biofilma određenoj koncentraciji EU, kuponi su ponovo isprani tri puta sa po 2,5 ml sterilne vode. Svaki kupon je aseptično prenet u epruvetu sa 1 ml SPR nako čega je sadržaj svake epruvete podvrgnut delovanju ultrazvuka frekvencije 40 kHz, 1 minut u ultrazvučnom kupatilu, i na kraju vorteksiran 1 minut pri maksimalnoj brzini (40 Hz). Sadržaj epruveta je zatim resuspendovan u 9 ml SPR. Broj adheriranih ćelija, odnosno broj ćelija koje formiraju biofilm je određen standardnom tehnikom brojanja kolonija na TSA, a dobijeni rezultat je izražen kao log cfu/cm².

Finalni rezultati su prikazani kao procenat redukcije biofilma.

4.7.4. Vizuelizacija uticaja etarskih ulja na formirani biofilm na lisnoj površini povrća primenom SEM

Za potrebe ovog dela eksperimenta nakon isteka vremena delovanja EU na prethodno formirani biofilm i ispiranja kupona, kuponi su pripremljeni za SEM prema metodi opisanoj u potpoglavlju 4.4.4.

4.8. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata

U ovim istraživanjima za analizu rezultata procenta redukcije biofilma oba ispitivana mikroorganizma, pod uticajem različitih koncentracija EU, za različito vreme delovanja primenjene su višeparametarske matematičke metode: deskriptivna statistika (eng. descriptive statistics), analiza glavnih komponenata (eng. principal components analysis - PCA), veštačke neuronske merže (eng. artificial neural network - ANN).

Deskriptivna statistička analiza koristi se za kvantitativno opisivanje ispitivanih osobina, tj. da bi se opisali podaci i sagledali njihovi uzajamni odnosi. Deskriptivna statistička analiza je korišćena za izračunavanje srednjih vrednosti, standardne devijacije (SD) i varijanse izmerenih vrednosti apsorbanci, a urađena je uz pomoć *Microsoft Excel 2007* softvera. PCA i korelaciona analiza su urađene korišćenjem *StatSoft Statistica 10* programa (Lončar, 2015).

Analiza značajnosti razlika među srednjim vrednostima analiziranih parametara (procentat redukcije biofilma) urađena je na osnovu Takijevog (Tukey) HSD (eng. honestly significant distance) testa, na nivou značajnosti $p < 0,05$, pri nivou poverenja od 95%. Takijev HSD test ukazuje na to koliko treba da su udaljene bilo koje dve srednje vrednosti da bi bile statistički različite (Arsenović, 2013). Za razliku dve srednje vrednosti veću od SD, ovim testom se dokazuje da je statistički značajna. Takijevim HSD testom podataka dobijenih različitim laboratorijskim merenjima, ustanovljeno je da je većina uzoraka statistički značajno različita na nivou $p < 0,05$, čime je dokazano da su ispitivani uzorci dovoljno raznoliki da bi se pristupilo statističkoj analizi i matematičkom modelovanju (Arsenović, 2013; Bunga i sar., 2021).

Metodom PCA su obrađivani rezultati dobijenih vrednosti procenta redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* pod uticajem različitih koncentracija EU, za različito vreme delovanja. PCA je matematički postupak koji vrši ortogonalnu transformaciju eventualno korelisanih podataka u skup linearno nekorelisanih promenljivih koje se nazivaju glavne komponente (Arsenović, 2013). Faktorske koordinate se dobijaju na osnovu linearnih transformacija originalnih promenljivih, tako da prvih nekoliko osnovnih komponenti sadrže veći deo varijabilnosti originalnog seta podataka. Transformacija je definisana tako, da prva glavna komponenta ima najveću moguću varijansu (odnosno najveću moguću varijabilnost podataka), a svaka naredna komponenta zauzvrat ima najveću moguću varijansu pod uslovom da bude ortogonalna (tj. u korelaciji) u odnosu na prethodne komponente (Arsenović, 2013). Rezultati PCA analize se obično tumače na osnovu doprinosa (eng. score) promenljivih u komponentama. PCA je najzastupljenija multivarijaciona analiza koja otkriva međusobni odnos podataka na način koji najbolje objašnjava njihovu varijansu (Abdi, 2010; Arsenović, 2013).

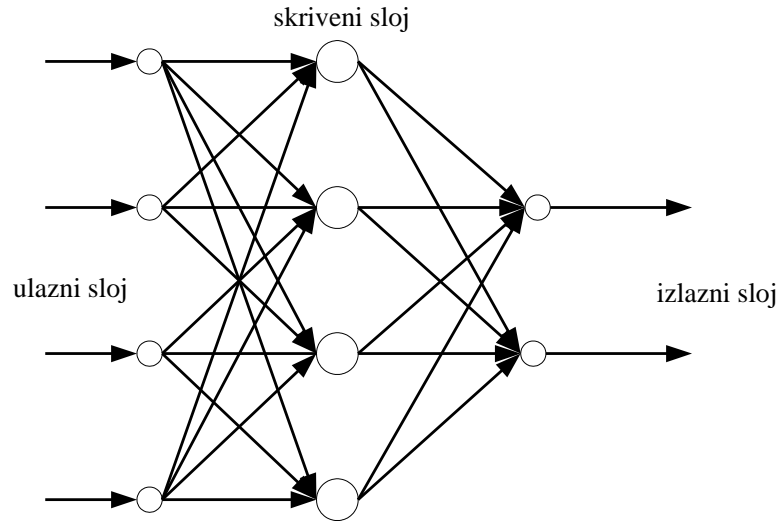
4.8.1. Veštačke neuronske mreže - ANN modeli (Artificial Neural Network)

Matematičko modelovanje primenom ANN modela je u ovom radu korišćeno da se na osnovu eksperimentalnih podataka, koristeći eksperimentalni plan, predvide vrednosti redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* pod uticajem različitih koncentracija EU za različito vreme ekspozicije.

Pri razvijanju ANN modela baza podataka merenih vrednosti iz programa *StatSoft Statistica* se nasumično deli (randomize funkcijom) na podatke za: učenje (60%), proveru (20%) i testiranje neuronske mreže (20%) (Arsenović, 2013; Lončar, 2015). Veštačke mreže „uče” iz setova podataka na osnovu kojih se formira algoritam metodom proba-greška, pri čemu se podešavaju propusni (tzv. težinski) koeficijenti između neurona (Arsenović, 2013). Kako bi ANN bila što preciznija, obučavanje neuronskih mreža se svodi na učenje iz primera, kojih bi trebalo da bude što više. Podaci iz skupa za učenje se periodično propuštaju kroz mreže, a kasnije se dobijene vrednosti upoređuju sa očekivanim i poboljšavaju menjanjem težinskih koeficijenata (Arsenović, 2013; Lončar, 2015).

U ovom istraživanju su korišćeni višeslojni perceptron modeli (eng. multi-layer perceptron - MLP) koji se sastoje od ukupno tri sloja (ulaznog, skrivenog i izlaznog), jer mogu da se primene na širokom dijapazonu problema (slika 4.6). Višeslojni perceptron modeli pogodni su za aproksimiranje nelinearnih zavisnosti, zbog čega su i korišćeni u ovom istraživanju (Taylor, 2006; Nourani i Fard, 2012; Arsenović, 2013). Prenos informacija između slojeva se vrši uz pomoć prenosnih i aktivacionih funkcija. Ove funkcije su uobičajeno linearne za ulazne i izlazne slojeve, a nelinearne u skrivenom sloju. Najčešće nelinearne aktivacione funkcije koje se koriste pri računanju ANN u *StatSoft Statistica* program su: logaritamske, sigmoidalne, hiperboličke i tangentne funkcije (takođe i eksponencijalne, sinusne, softmax, Gausove) (Taylor, 2006; Arsenović, 2013).

MLP neuronske mreže „uče“ korišćenjem povratnog prostiranja (eng. backpropagation), pri čemu se rešavanje skupa nelinearnih jednačina vrši korišćenjem Levenberg-Marquardt algoritma. Ova arhitektura ANN je jedna od najčešće korišćenih i proučavanih za različite inženjerske primene. Srednja kvadratna greška u izračunatoj vrednosti nekog izlaza se šalje unazad kroz sistem neurona, pri čemu dolazi do proporcionalnih promena vrednosti težinskih koeficijenata (eng. weights) i netačnosti računanja (eng. biases), koje se povećavaju ili smanjuju, u zavisnosti od pravca greške u predviđanju izlaza u odnosu na eksperimentalnu vrednost, sa ciljem njenog minimiziranja (Arsenović, 2013; Lončar, 2015).



Slika 4.6. Šematski prikaz neuronske mreže sa tri sloja (Petrović, 2011)

Prvobitna procena potrebnog broja neurona se vrši na osnovu jednačine 4.1. U navedenoj jednačini x i y predstavljaju broj ulaznih i izlaznih neurona respektivno, n je broj neurona u skrivenom sloju, a m broj težinskih koeficijenata odnosno veza između slojeva u neuronskoj mreži (Charalambous, 1992; Demuth i Beale, 1992; Arsenović, 2013):

$$m = n \cdot (x + 1) + y \cdot (n + 1) \quad (4.1.)$$

m se okvirno može smatrati brojem uzoraka korišćenih za učenje mreže podjeljenim sa 10.

Težinski koeficijenti vezani za skriveni sloj i računске greške odnosno ostaci pri računanju, su grupisani u matricama W_1 i B_1 . Koeficijenti koji se odnose na izlazni sloj su grupisani u matricama W_2 i B_2 . Ako je Y matriks izlaznih promenljivih, f_1 i f_2 prenosne funkcije u skrivenom i izlaznom sloju respektivno, a X matriks ulaznih promenljivih, ANN se može predstaviti na sledeći način (Fedajev i Mihajlović, 2009; Lončar, 2015):

$$Y = f_1(W_2 \cdot f_2(W_1 \cdot X + B_1) + B_2) \quad (4.2.)$$

Težinski koeficijenti prenosnih funkcija neurona u matricama W_1 i W_2 se određuju tokom obučavanja mreže korišćenjem optimizacije radi minimizovanja grešaka između izlaza predviđenih mrežom i eksperimentalnih podataka (Charalambous i sar., 1992; Demuth i sar., 1992). Greške se računaju na osnovu SOS i BFGS (Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno) algoritma, da bi se konvergencija ubrzala i stabilizovala (Kollo i Von Rosen, 2005; Arsenović, 2013; Lončar, 2015).

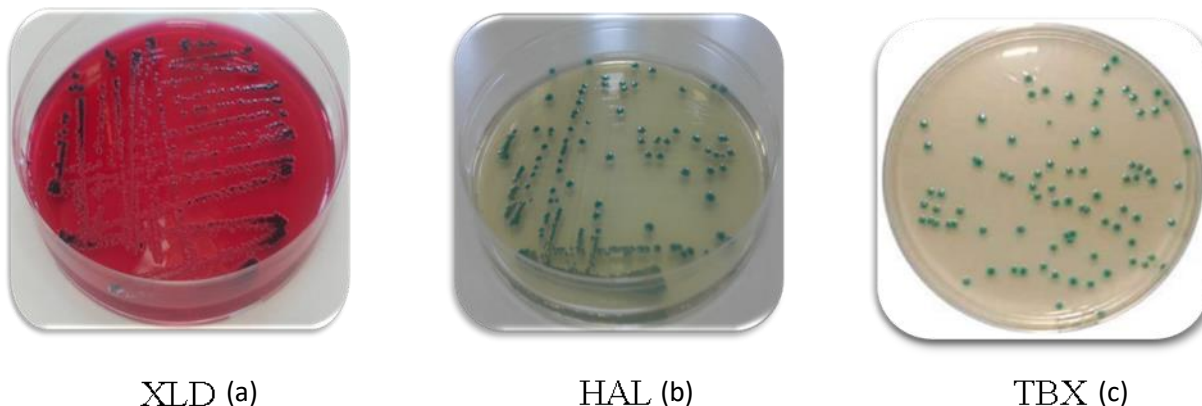
5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Kulturelne i biohemijske karakteristike *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*

Kulturelna i biohemijska ispitivanja su ukazala da ispitivani izolati odgovaraju *E. coli* i *S. Typhimurium*.

Izolati *E. coli* formirali su na TBX agaru okrugle, glatke, plavo-zelene kolonije (slika 5.1.c), pokazali su pozitivnu reakciju na indol i metil crveno i negativnu reakciju na Voges Proskauer i citrat tetstu.

Na XLD agaru (slika 5.1.a) *S. Typhimurium* je formirala okrugle, glatke, sjajne, crvenkase (crvenkasta boja usled fermentacije lizina) kolonije sa crnim centrom (crna boja usled produkcije H₂S), dok je na HAL agaru (slika 5.1.b) formirala okrugle, glatke, sjajne, zeleno obojene kolonije. Ispitivani soj *S. Typhimurium* je pokazao pozitivnu reakciju na testu sa trostrukim šećerom po Kligleru i testu dekarboksilacije lizina, dok su reakcije u slučaju indol, urea i ONPG testa bile negativne.



Slika 5.1. Morfološki izgled kolonija *S. Typhimurium* na XLD (a) i HAL (b) i *E. coli* na TBX (c) agaru

5.2. Identifikacija *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* MALDI - TOF masenom spektrometrijom

Identifikacija odabranog izolata *E. coli* i *S. Typhimurium* izvedena je trenutno najaktuelnijom metodom tj. masenom spektrometrijom zasnovanom na matricom potpomognutom laserskom

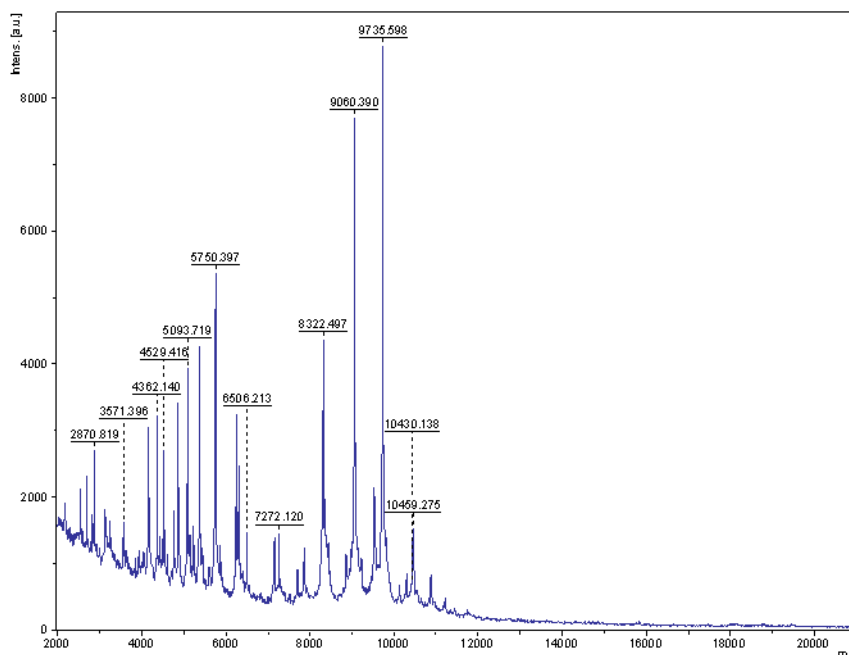
desorpcijom/ionizacijom (MALDI - MS) uz TOF analizator. Maseni spektri *E. coli* i *S. Typhimurium* dobijeni MALDI-TOF masenom spektrometrijom prikazani su u na slikama 5.2. i 5.3.

Tabela 5.1. Rezultati identifikacije *E. coli* i *S. Typhimurium* MALDI - TOF masenom spektrometrijom

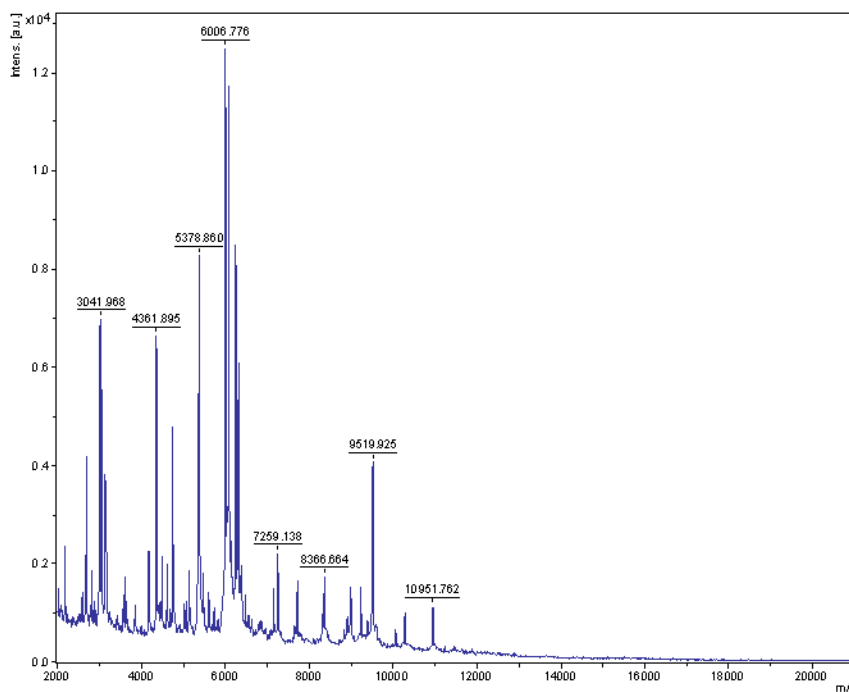
Mikroorganizam	Mikroorganizam (najbolje poklapanje)	Rezultat	Mikroorganizam (drugo najbolje poklapanje)	Rezultat
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2,33	<i>Escherichia coli</i>	2,32
<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2,24	<i>Salmonella</i> spp.	2,22

Značenje dobijenih vrednosti: 2,300 - 3,000 - najverovatnija identifikacija do nivoa vrste; 2,000 - 2,299 - sigurna identifikacija do nivoa roda, verovatna identifikacija do nivoa vrste; 1,700 - 1,999 - verovatna identifikacija do nivoa roda i 0,000 - 1,699 - nepouzdan nivo identifikacije

Prikazani rezultati identifikacije MALDI - TOF masenom spektrometrijom u tabeli 5.1. ukazuju na to, da u slučaju identifikacije *E. coli* dobijeni spektar pokazuje najbolje poklapanje sa spektrom *E. coli* RV412, što ukazuje na visok stepen identifikacije do nivoa vrste. U slučaju *S. Typhimurium* dobijeni rezultat ukazuje na sigurnu identifikaciju do nivoa roda i verovatnu identifikaciju do nivoa vrste. Ovi rezultati su u potpunosti u korelaciji sa rezultatima ispitivanja Zhou i sar. (2014), koji su primenom MALDI - TOF masene spektrometrije svih 154 kliničkih izolata *E. coli* identifikovali do nivoa vrste, dok su 4 izolata salmonela identifikovana do nivoa roda. Ispitujući mogućnost primene MALDI - TOF masene spektrometrije kao rutinske metode za identifikaciju bakterija Neville i sar. (2011) su ispitali 927 bakterijskih izolata u tri ponavljanja i pri tome došli do rezultata da je 84,5% izolata identifikovano do nivoa vrste, a veći procenat izolata (96,4%), uključujući sve salmonele, samo do roda. Isti autori navode, da su za identifikaciju pojedinih rodova iz porodice *Enterobacteriaceae* koji ne fermentuju laktozu ili je fermentuju sporo, potrebna dodatna biohemijska i serološka ispitivanja, da bi se u potpunosti isključili pripadnici roda *Shigella* spp. kao i serotipovi *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi koji su od posebnog značaja za javno zdravlje. Upoređujući rezultate identifikacije kliničkih izolata *E. coli* primenom dve različite metode, VITEK[®]2 i MALDI - TOF masene spektrometrije, MALDI - TOF masenom spektrometrijom je svih 55 izolata identifikovano do roda i vrste dok je primenom VITEK[®]2 identifikovano do roda i vrste 48 izolata (Kassim i sar., 2017). Iako je MALDI - TOF masena spektrometrija brza i jeftina (računajući troškove pripreme uzorka i broj uzoraka koji može biti analiziran u određenom vremenskom roku, ali ne računajući sam uređaj, čija je nabavka skupa) ne može u potpunosti da zameni konvencionalne metode identifikacije, što se pokazalo u slučaju identifikacije *S. Typhimurium*.



Slika 5.2. MALDI - TOF MS Maseni spektar odabranog izolata *E. coli*



Slika 5.3. MALDI - TOF MS Maseni spektar *S. Typhimurium* ATCC 14028

Na prikazanim slikama 5.2. i 5.3. na osi X je prikazan odnos mase i naelektrisanja jona - m/z a na osi Y je prikazan apsolutni intenzitet jona.

Kao i ostali automatizovani sistemi za identifikaciju mikroorganizama (MIDI, VITEK) i MALDI - TOF masena spektrometrija se oslanja na referentnu bazu podataka (Rahi i sar., 2016). Nedostatak referentnih spektara u bazama podataka i nedostatak efikasnog softvera koji može

poboljšati rezoluciju za razlikovanje blisko srodnih vrsta je limitirajući faktor u ograničenoj upotrebi ove metode za potpunu identifikaciju serotipova salmonela. Očekuje se da će u skorije vreme uz stalno ažuriranje baze podataka i njihovu dostupnost, uz optimizovane metode i protokole, ova metoda naći široku upotrebu za brzu i pouzdanu identifikaciju mikroorganizama.

5.3. Identifikacija *Salmonella Typhimurium* real - time PCR metodom

Metodom real - time PCR izvršena je identifikacija laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium*, s obzirom da pomoću metode MALDI - TOF MS nije moguća serotipizacija salmonela. Prajmeri i proba upotrebljeni za identifikaciju genoma *S. Typhimurium* (*fliA-IS200*) prema Maurischat i sar. (2015) navedeni su u tabeli 4.1. (potpoglavlje 4.1.3). Osnova za detekciju *S. Typhimurium* je insercioni element (IS 200) u „*fli*“ operonu ovog serotipa, koji predstavlja specifičan, filogenetski važan marker ovog serotipa. Flagela *S. Typhimurium* zahteva više od 50 gena za formiranje i obavljanje funkcije, a jedan od tih gena je i *fliA* gen koji kodira flagela-specifični sigma faktor *S. Typhimurium* (Dmitrić, 2018). Na osnovu detekcije gena *fliA-IS200* identifikovan je laboratorijski tipski soj *S. Typhimurium* korišćen u ovoj studiji.

5.4. Morfotipovi kolonija *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* na Kongo crvenom agaru

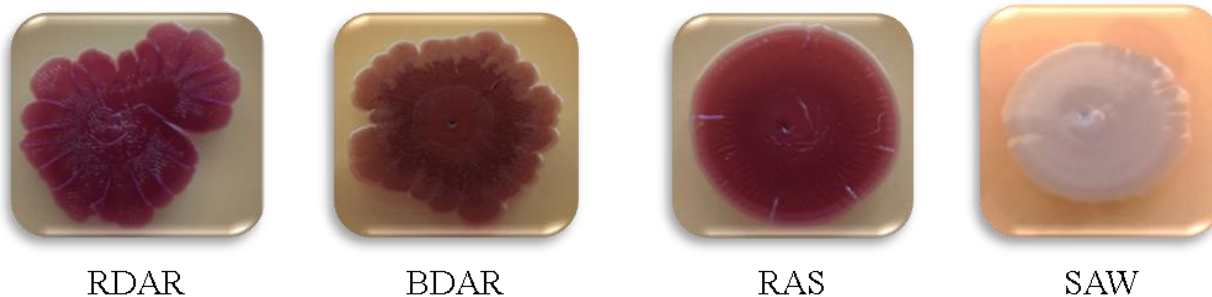
Kultivacijom na KCA tokom 96 h na 25 °C, ispitivani izolati *E. coli* formirali su kolonije sledećih morfotipova:

- RDAR - 10 izolata;
- SAW - 7 izolata;
- BDAR - 4 izolata;
- RAS - 3 izolata.

Kultivacijom na temperaturi od 37 °C u istom vremenskom intervalu ispitivani izolati *E. coli* formirali su kolonije istih morfotipova, ali brojčano različito zastupljene:

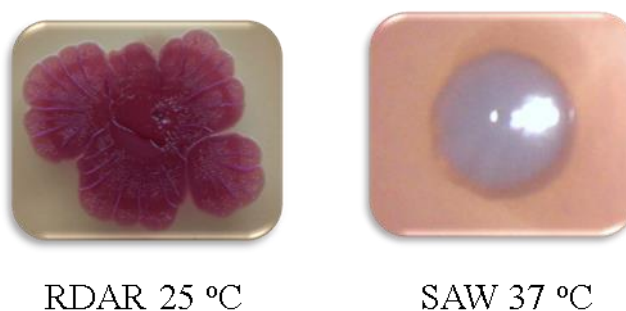
- RDAR - 9 izolata;
- SAW - 7 izolata;
- BDAR - 5 izolata;
- RAS - 3 izolata.

Na slici 5.4. prikazani su morfotipovi kolonija *E. coli* nakon inkubiranja tokom 96 h na temperaturi od 25 °C.



Slika 5.4. Morfotipovi kolonija izolata *E. coli* na KCA (na 25 °C, 96 h)

Salmonella. Typhimurium je kultivacijom na KCA u trajanju od 96 h na temperaturi od 25 °C formirala RDAR morfotip kolonija dok je na temperaturi kultivisanja od 37 °C formirala SAW morfotip kolonija (slika 5.5).



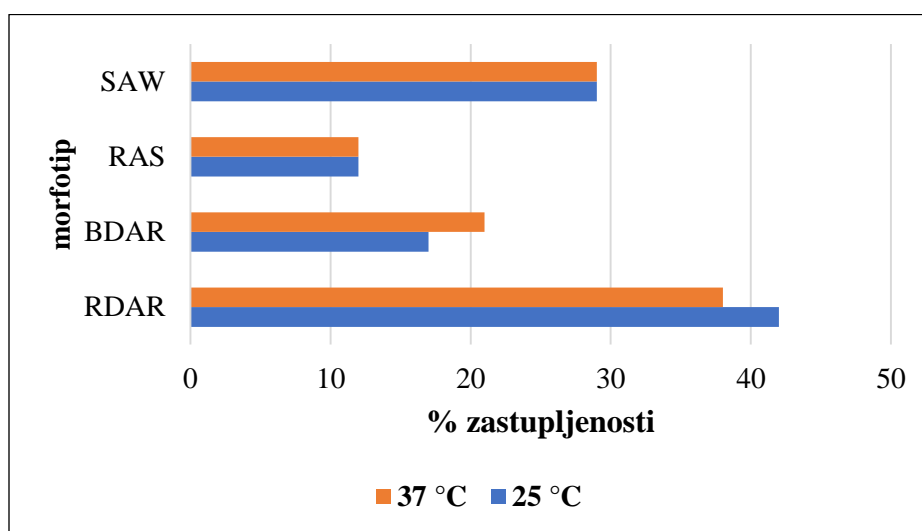
Slika 5.5. Morfotipovi kolonija *S. Typhimurium* na KCA (na 25 °C i 37 °C, 96 h)

Kolonije RDAR morfotipa koje su formirale *E. coli* i *S. Typhimurium* na KCA na temperaturi od 25 °C su heterogene strukture i boje sa jasno vidljivim crveno obojenim naborima koji se protežu od središnjeg dela prema ivici kolonije. Središnji deo je najstariji deo kolonije i predstavlja zreli biofilm, koji čine ćelije koje eksprimuju celulozu i fimbrije. Ivicu kolonije čine kratke flagelirane ćelije bez izražene ekspresije celuloze i fimbrija (Sim i sar., 2014).

Na slici 5.6. prikazana je procentualna zastupljenost kolonija različitog morfotipa koje su formirali izolati *E. coli* na KCA na temperaturama od 25 °C i 37 °C tokom 96 h inkubiranja. Rezultati kultivisanja izolata *E. coli* na KCA su pokazali da je na obe ispitivane temperature *E. coli* formirala iste morfotipove kolonija za koje je karakteristična ekspresija fimbrija i celuloze (RDAR) i fimbrija (BDAR, RAS). Ni jedan izolat na obe temperature nije formirao PDAR ili PAS morfotip kolonija koji karakteriše ekspresija celuloze. Prikazani rezultati su u korelaciji sa rezultatima Milanov i sar. (2015), koji su dobili slične rezultate u pogledu morfotipova kolonija *E. coli* na KCA, ispitujući izolate *E. coli* poreklom iz mleka krava obolelih od mastitisa. Na temperaturi inkubiranja od 25 °C, 4% više izolata je formiralo RDAR morfotip u odnosu na

temperaturu inkubiranja od 37 °C. RDAR morfotip predstavlja sinonim za višecelijske mikrobnе zajednice koje karakteriše sposobnost adhezije na biotičke i abiotičke površine, formiranje biofilma i ekspresija fimbrija i celuloze kao vanćelijskih komponenti matriksa biofilma (Bokranz i sar., 2005).

Ekspresija fimbrija i celuloze kod većine enterobakterija rezultat je ekspresije glavnog transkripcionog regulatora *csgD* koji pokreće transkripciju gena odgovornih za produkciju fimbrija i celuloze. Temperaturno je zavisna i odvija se na temperaturi nižoj od 30 °C (Römling i sar., 2000; Solano i sar., 2002). BDAR i RAS morfotip nastaju kao posledica ekspresije fimbrija. RAS morfotip formirao je najmanji broj izolata (12%) na obe temperature inkubiranja. BDAR morfotip formiralo je 17% izolata na temperaturi inkubiranja od 25 °C, što je za 4% manje u odnosu na temperaturu inkubiranja od 37 °C pri kojoj je 21% izolata formirao BDAR morfotip.



Slika 5.6. Zastupljenost pojedinih morfotipova kolonija ispitivanih izolata *E. coli* na KCA (na 25 °C i 37 °C, 96 h)

Koekspresija fimbrija i celuloze na 28 °C i 37 °C tipična je za fekalne izolate *E. coli* dok je za uropatogene, enteropatogene i enterotoksigene sojeve karakteristično da mogu ekspimirati fimbrije samo na sobnoj temperaturi (Bokranz i sar., 2005; Barnhard i sar., 2007). Ekspresija fimbrija znatno poboljšava ćelijsku agregaciju i sposobnost prijanjanja *E. coli* na biotičke i abiotičke površine doprinoseći time njenoj patogenosti (Beloin i sar., 2008). Iako je poznato da je transkripcioni regulator *csgD* odgovoran za ekspresiju fimbrija i celuloze i da se njihova ekspresija odigrava kao odgovor na nepovoljne uslove životne sredine, još uvek nije razjašnjeno nekoliko aspekata ekspresije fimbrija, kao što je molekularni mehanizam temperaturne zavisnosti (Garavaglia i sar., 2012).

SAW morfotip kolonija nastaje kao posledica odsustva ekspresije ili nefunkcionalnosti glavnog transkripcionog regulatora *csgD* odgovornog za sintezu fimbrija i celuloze (Römling i sar., 2000). Zastupljenost izolata *E. coli* koji su na obe temperature inkubiranja na KCA, formirali SAW morfotip kolonija je 29%. Kultivacijom laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium* na

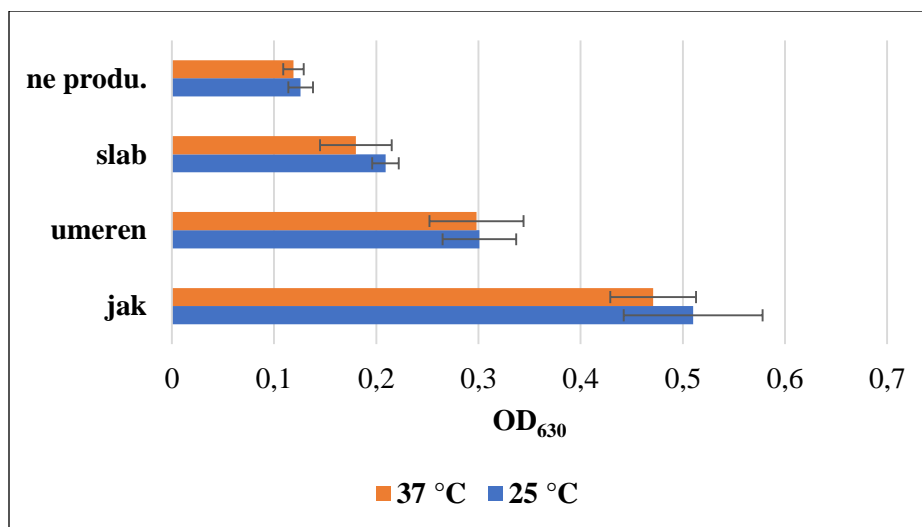
KCA, 96 h na 25 °C, rezultiralo je formiranjem RDAR morfotipa kolonija. Morfotip RDAR prvi su opisali Römling i sar. (1998) ispitujući ekspresiju fimbrija kod *S. Typhimurium* 14028. Prema rezultatima Römling i sar. (2003), čak 90% izolata *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*, izolovanih iz hrane i kliničkog materijala ljudi i životinja, su inkubiranjem na 28 °C formirali RDAR morfotip kolonija. Viša temperatura inkubiranja (37 °C) je inhibirala ekspresiju glavnog transkripcionog regulatora *csgD* čime je inhibirana sinteza obe komponente matriksa biofilma - fimbrija i celuloze što je rezultiralo formiranjem SAW morfotipa kolonija. Da je SAW morfotip kolonija dominantna forma kolonija koje *Salmonella* spp. formira na KCA inkubiranjem na temperaturi od 37 °C pokazuju rezultati Prunić (2017), gde su svih 100 ispitanih izolata salmonela, klasifikovanih u 16 različitih serovarijeteta, inkubiranjem tokom pet dana na temperaturi od 37 °C formirali SAW morfotip kolonija na KCA. Rezultati Čabarkapa i sar. (2015), koji su pokazali da svih 14 analiziranih izolata *S. Enteritidis* na temperaturi inkubiranja od 37 °C u trajanju od 96 h na KCA formiraju SAW morfotip kolonija, dodatno potvrđuju dominaciju SAW morfotipa kolonija salmonela na temperaturi inkubiranja koja je viša od 30 °C, kao i jaku temperaturnu zavisnost ekspresije glavnog transkripcionog regulatora *csgD*.

5.5. Sposobnost formiranja biofilma *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* primenom kristal violet testa

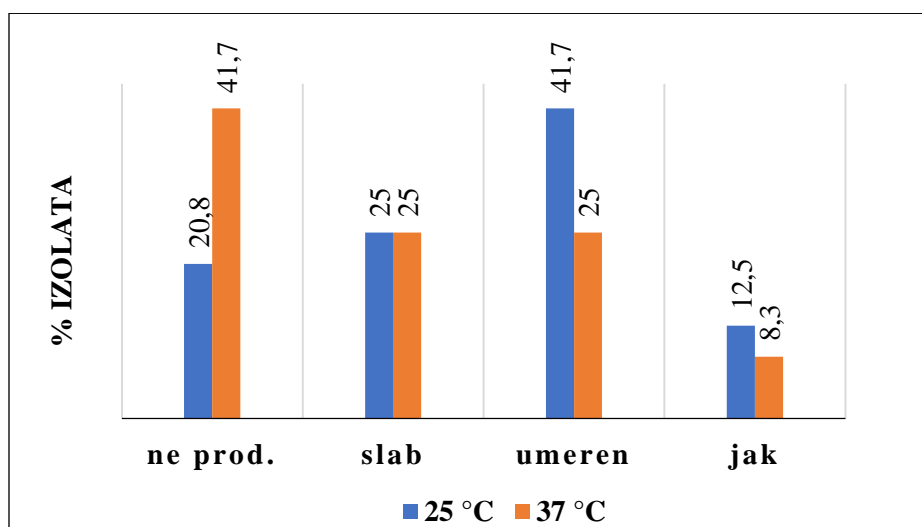
Određivanje sposobnost formiranja biofilma ispitivanih izolata bakterija izvedeno je kristal violet testom na mikrotitar pločama. Ovim testom potvrđena je sposobnost ispitivanih izolata *E. coli* da formiraju biofilm na obe temperature, ali u različitom stepenu. Klasifikacija ispitivanih izolata *E. coli* na jake, umerene, slabe i one koji ne formiraju biofilm izvršena je na osnovu OD_c granične vrednosti, a prema propozicijama datim u tabeli 4.3. Na slici 5.7. prikazane su srednje vrednosti apsorbanci sa standardnim devijacijama jakih, umerenih, slabih i ne biofilm produkujućih izolata *E. coli* na obe ispitivane temperature. Granična OD_c vrednost za temperaturu od 25 °C iznosila je 0,074, a za temperaturu od 37 °C 0,068.

Srednja vrednost apsorbance na temperaturi od 25 °C za jake biofilm producere iznosila je $0,510 \pm 0,068$, za umerene $0,301 \pm 0,036$, za slabe $0,209 \pm 0,013$, a za izolate koji nisu formirali biofilm $0,126 \pm 0,012$. Ove vrednosti su na temperaturi od 37 °C bile očekivano niže pa je dobijena srednja vrednost apsorbance za jake biofilm producere bila $0,471 \pm 0,042$, umerene $0,298 \pm 0,046$, za slabe $0,180 \pm 0,035$, dok je za izolate koji su svrstani u kategoriju ne biofilm produkujućih, srednja vrednost apsorbance bila $0,105 \pm 0,010$.

Rezultati kristal violet testa za *S. Typhimurium* pokazali su da je srednja vrednost apsorbance na temperaturi od 25 °C bila $0,651 \pm 0,042$, što je svrstava u jake biofilm producere, dok je srednja vrednost apsorbance na temperaturi od 37 °C bila $0,127 \pm 0,011$ i na ovoj temperaturi *S. Typhimurium* je formirala slab biofilm i svrstana je u slabe biofilm producer.



Slika 5.7. Utvrđene srednje vrednosti apsorbanci (OD₆₃₀) sa standardnim devijacijama (prikazane na x osi) u testu na mikrotitar pločama i zastupljenost izolata *E. coli* prema jačini produkcije biofilma (prikazana na y osi) (inkubiranje u TSB na 25 °C i 37 °C, 48 h)



Slika 5.8. Klasifikacija izolata *E. coli* prema sposobnosti formiranja biofilma na 25 °C i 37 °C (izražena u %)

Procentualna zastupljenost izolata klasifikovanih prema sposobnosti formiranja biofilma prikazana je na slici 5.8. Prema prikazanim rezultatima primenom kristal violet testa može se zaključiti da je na temperaturi inkubiranja od 25 °C, 12,5% izolata klasifikovano u jake biofilm producere, što je za 1/3 više u odnosu na temperaturu inkubiranja od 37 °C, gde je 8,35% izolata formiralo jak biofilm. Broj izolata koji spadaju u umerene biofilm producere iznosio je 41,7% na 25 °C odnosno 25,0% na 37 °C. Slabih biofilm produkujućih izolata bilo je 25,0% na obe temperature inkubiranja. Izolati koji nisu formirali biofilm na 25 °C bili su zastupljeni sa 20,8%, što je dva puta manje u odnosu na višu temperaturu ispitivanja (37 °C), gde 41,7% izolata nije formiralo biofilm.

Tabela 5.2. Uporedni prilaz rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma izolata *E. coli*: test na KCA i kristal violet test (na 25 °C i 37 °C)

Izolat broj	Morfortip na KCA (25 °C)	Kristal violet test na 25 °C				Morfortip na KCA (37 °C)	Kristal violet test na 37 °C			
		jak	umeren	slab	nije producer		jak	umeren	slab	nije producer
1	BDAR			+		BDAR			+	
2	RDAR		+			RDAR		+		
3	BDAR			+		BDAR			+	
4	RAS		+			RAS				+
5	SAW				+	SAW				+
6	BDAR		+			BDAR			+	
7	RDAR		+			RDAR		+		
8	RDAR	+				RDAR	+			
9	SAW			+		SAW				+
10	SAW				+	SAW				+
11	RAS			+		RAS				+
12	RDAR		+			RDAR		+		
13	SAW			+		SAW				+
14	RDAR		+			RDAR			+	
15	SAW				+	SAW				+
16	RDAR		+			RDAR		+		
17	SAW				+	SAW				+
18	BDAR		+			BDAR			+	
19	RAS			+		RAS				+
20	RDAR		+			RDAR		+		
21	RDAR	+				RDAR	+			
22	RDAR	+				RDAR		+		
23	RDAR		+			BDAR			+	
24	SAW				+	SAW				+

Dobijeni rezultati se mogu porediti sa rezultatima Milanov i sar. (2015), koji su ispitivali sposobnost formiranja biofilma izolata *E. coli* izolovanih iz mleka goveda obolelih od mastitisa, primenom kristal violet testa u mikrotitar pločama. Pomenuti autori navode da je na temperaturi inkubiranja od 37 °C više od dva puta veći broj izolata (76%) klasifikovan u kategoriju ne

biofilm produkujućih, u odnosu na temperaturu inkubiranja od 25 °C, gde 32% izolata nije formiralo biofilm. Ovim je potvrđen uticaj temperature kao jednog od glavnih faktora, na formiranje biofilma na koji još utiču pH, raspoloživost hranljivih materija, karakteristike kontaktne površine i dr. (Stepanović i sar., 2004).

Poređenjem rezultata testa na KCA i kristal violet testa (tabela 5.2) može se zaključiti da su rezultati oba testa u pozitivnoj korelaciji na obe temperature inkubiranja. Kao optimalna temperatura za formiranje biofilma ispitivanih izolata *E. coli* pokazala se temperatura inkubiranja od 25 °C na kojoj je veći broj izolata formirao RDAR morfotip (42%) i veći broj je svrstan u jake biofilm producere (12,5%) u odnosu na temperaturu inkubiranja od 37 °C na kojoj je 38% izolata formiralo RDAR morfotip i samo 8,3% je svrstano u jake biofilm producere. Broj izolata koji je formirao SAW morfotip je 29% na obe temperature. Za razliku od RDAR morfotipa koji se vezuje za jake biofilm producere, SAW morfotip se vezuje za slabe ili ne biofilm producere. Čak 50% više ispitivanih izolata na temperaturi inkubiranja od 37 °C (41,7%) nije formiralo biofilm u odnosu na temperaturu inkubiranja od 25 °C, gde je taj udeo 20,8%. Ovi rezultati su i očekivani, s obzirom da biofilm nastaje kao odgovor bakterija na nepovoljne uslove životne sredine u ovom slučaju temperature, a kako je za *E. coli* optimalna temperatura za rast i razmnožavanje 37 °C to je jedan od razloga zašto veći broj izolata na ovoj temperaturi nije formirao biofilm. Treba istaći da je inhibitorni uticaj temperature na sposobnost formiranja biofilma veći kod nutritivno bogatih medijuma, kao što je TSB (Stepanović i sar., 2004), koji je korišćen u ovim ispitivanjima.

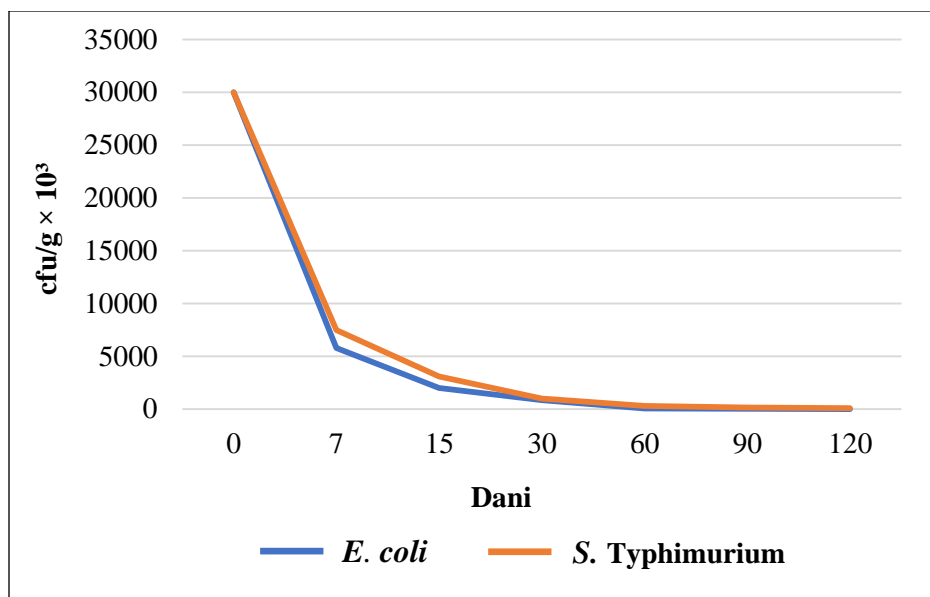
5.6. Preživljavanje *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* u zemljištu

Za ispitivanje preživljavanja *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu, korišćeno je komercijalno humusno zemljište čiji je sastav prema navodima proizvođača prikazan u tabeli 5.3.

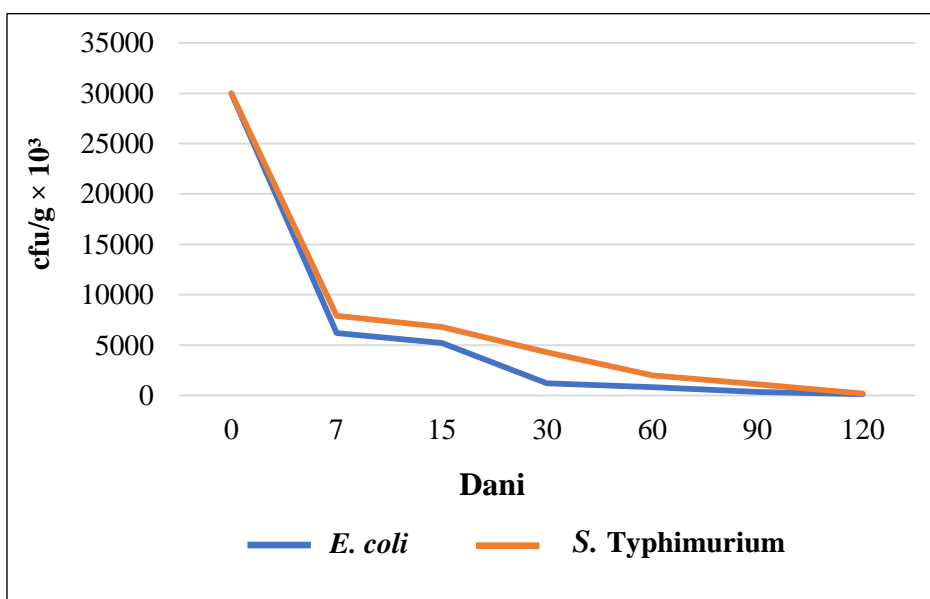
Tabela 5.3. Sastav zemljišta

Azot (N)	min 0,5%
Kalijum (K₂O)	min 1%
Fosfor (P₂O₅)	min 0,5%
Magnezijum (MgO)	min 0,3%
Kalcijum CaCO₃	min 0,5%
Gvožđe Fe₂O	min 0.1%
Humus	min 15%
pH	7,3-7,5

Ispitana je sposobnost preživljavanja izolata *E. coli* koji je primenom kristal violet testa svrstan u jake biofilm producere na obe temperature inkubiranja i laboratorijskog tipskog soja *S. Typhimurium*.



Slika 5.9. Preživljavanje *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu pri promenljivoj relativnoj vlažnosti i temperaturi



Slika 5.10. Preživljavanje *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu pri konstantnoj relativnoj vlažnosti i temperaturi

Prema rezultatima prikazanim na slikama 5.9. i 5.10. oba testirana mikroorganizma su preživela i u uslovima promenljive, i u uslovima konstante relativne vlažnosti i temperature, pri čemu je procenat preživelih ćelija *S. Typhimurium* u oba slučaja veći.

Procenat preživelih ćelija *S. Typhimurium* pri konstantnoj relativnoj vlažnosti (70%) i konstantnoj temperaturi (23 °C) nakon 120 dana iznosio je 0,6%, dok je kod *E. coli* pri istim uslovima preživelo 0,4% populacije. Pri promenljivim uslovima gore navedenih parametara preživelo je 0,27% populacije *S. Typhimurium* i samo 0,03% populacije *E. coli*. Procenat preživelih ćelija oba testirana mikroorganizma prikazan je u tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Broj preživelih ćelija *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu tokom inkubacionog perioda od 120 dana, izražen u %

Dani	Promenljivi uslovi		Konstantni uslovi	
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
7	19,23	24,90	20,77	26,33
15	6,67	10,23	17,43	22,06
30	2,83	3,3	4,00	14,33
60	0,23	1,06	2,73	6,76
90	0,09	0,53	1,13	3,50
120	0,03	0,27	0,40	0,60

Mali procenat preživelih ćelija oba mikroorganizma može se objasniti time da je prirodno stanište *E. coli* digestivni trakt ljudi i životinja, a salmonela digestivni trakt životinja (sa izuzetkom *S. Typhi* i *S. Paratyphi*). Nakon što dospeju u zemljište, mikroorganizmi nailaze na nove uslove životne sredine koji mogu inhibirati njihovu brojnost i aktivnost. Nedostatak hranljivih materija, nedostatak vlage, kisela reakcija zemljišta, niža ili viša temperatura u odnosu na optimalnu, prisustvo autohtone mikroflore i slaba aeracija su faktori od kojih u najvećoj meri zavisi opstanak, ne samo *E. coli* i *S. Typhimurium*, već i ostalih mikroorganizama čije primarno stanište nije zemljište. Pored uslova sredine na preživljavanje utiču i genetske karakteristike soja (Lau i Ingham, 2001).

Otpornost na nepovoljne uslove sredine kod *S. Typhimurium* zavisi od transkripcionog regulatora *RpoS* (sigma faktor) do čije akumulacije u ćelijama dolazi u stacionarnoj fazi rasta ili u uslovima ograničene dostupnosti hranljivih materija i drugih nepovoljnih uslova (Battesti i sar., 2011). Slični geni indukovani aktivacijom transkripcionog regulatora *RpoS*, odgovorni su za otpornost i *E. coli* prema uslovima kisele sredine (Battesti i sar., 2011; Fornefeld i sar., 2017), a prema navodima Muffler i sar. (1996), *RpoS* je odgovoran za opstanak *E. coli* i u ekstremnim temperaturnim uslovima, kao i u uslovima visoke osmolarnosti. Prisustvo somatskog O - antigena povoljno utiče na preživljavanje u uslovima isušivanja (Gibson i sar., 2006), a prema

Lapidot i sar. (2006) sposobnost formiranja biofilma takođe doprinosi boljem prevazilaženju negativnih uticaja sredine.

Sojevi salmonela preživljavaju duže u prirodnim staništima u odnosu na sojeve *E. coli*. Ovo se može objasniti različitim obrascima ekspresije gena (Franz i sar., 2005; Semenov i sar., 2007), pri čemu upravo uslovi okoline direktno utiču na ekspresiju gena odgovornih za rast i opstanak patogena u prirodnim staništima (Bergholz i sar., 2007). Prema rezultatima ispitivanja Islam i sar. (2004), *S. Typhimurium* može da opstane do 231 dana u zemljištu kontaminiranom kompostom u kome su uzgajane salata i peršun pri čemu je ova patogena bakterija otkrivena i na salati i na peršunu.

Escherichia coli može u različitom stepenu preživeti u spoljašnjoj sredini kao što je zemljište, đubrivo, voda (Vital i sar., 2008). Prema rezultatima ispitivanja Lau i Ingham (2001), *E. coli* je preživela 12 nedelja u dva različita tipa zemljišta obogaćena stajskim đubrivom na dve različite temperature 9 °C i 21 °C, dok Jiang i sar. (2002), navode da *E. coli* može opstati danima, čak do godinu dana u zemljištu. Prema Jamieson i sar. (2002), većina koliformnih bakterija bolje preživljava pri nižim temperaturama uz dovoljno vlage i hranljivih materija.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.4., a upoređujući broj ćelija inicijalnog inokuluma sa brojem preživelih ćelija, nakon sedam dana zabeležen je najveći pad broja preživelih ćelija oba patogena pri konstantnim i promenljivim uslovima. Ovo se može objasniti vrednostima izmerene temperature prikazanim u tabeli 5.5. koje se znatno razlikuju od optimalnih vrednosti temperature potrebne za rast i razmnožavanje *E. coli* i *S. Typhimurium*, koja iznosi za oba mikroorganizma 37 °C, što je u odnosu na konstantnu temperaturu komore (23 °C) razlika od 14 °C, odnosno promenljivu sobnu temperaturu (24,2 °C) gde je ta razlika 12,8 °C.

Analizirajući uticaj temperature okoline na preživljavanje enterobakterija u zemljištu, razne studije su pokazale manji stepen preživljavanja salmonela u zemljištu pri višim temperaturama (Arrus i sar., 2006; García i sar., 2010). Prema Semenov i sar. (2007), viša temperatura uzrokuje stres i veću potrošnju energije, a temperaturne promene utiču i na obrasce ekspresije gena.

Prema rezultatima Habteselassie i sar. (2008), i preživljavanje *E. coli* bolje je na nižim temperaturama. Niže temperature inhibiraju sintezu proteina (Broeze i sar., 1978), što u kombinaciji sa ograničenim resursima hranljivih materija u zemljištu, dovodi do trošenja bakterijskih resursa na disanje radi opstanka u odnosu na rast i razmnožavanje. Ovim se objašnjava bolji opstanak oba mikroorganizma pri konstantnoj temperaturi komore (23 °C) u odnosu na promenljivu i višu sobnu temperaturu čija je srednja vrednost tokom trajanja oglada iznosila 24,21 °C. Na višoj temperaturi bakterijski resursi su podeljeni na disanje, rast i razmnožavanje pri čemu ostaje manje energije za opstanak, što rezultira odumiranjem određenog broja ćelija.

Pored temperature, dostupnost vode (slobodna voda - a_w) je drugi ključni faktor za preživljavanje *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu. Sadržaj a_w u zemljištu u kontrolisanim uslovima gde je održavana stalna relativna vlažnost vazduha od 70%, je i nakon 30 dana odgovarao minimalnoj

a_w neophodnoj za rast i razmnožavanje salmonela (min $a_w = 0,94$) odnosno *E. coli* (min $a_w = 0,93$). Pri promenljivim sobnim uslovima srednja vrednost relativne vlažnosti vazduha tokom trajanja ogleada je iznosila 44,5%, što je uticalo da je a_w u zemljištu nakon 30 dana bio dvostruko niži ($a_w = 0,48$) u odnosu na konstantne uslove komore i u odnosu na minimalnu a_w vrednost neophodnu za rast oba mikroorganizma, što se odrazilo na njihovo preživljavanje.

Tabela 5.5. Vrednosti merenih parametara (temperatura, relativna vlažnost vazduha i a_w zemljišta) tokom ispitivanja preživljavanja *E. coli* i *S. Typhimurium* u zemljištu

Vreme (dan)	Promenljivi uslovi			Konstantni uslovi		
	Temperatura (° C)	Relativna vlažnost (%)	a_w	Temperatura (° C)	Relativna vlažnost (%)	a_w
0	24,70	44,00	0,98	23,00	70,00	0,98
7	24,20	40,00	0,91	23,00	70,00	0,95
15	24,20	41,00	0,73	23,00	70,00	0,95
30	24,80	41,00	0,48	23,00	70,00	0,94
60	25,00	46,00	0,46	23,00	70,00	0,79
90	24,60	50,00	0,43	23,00	70,00	0,74
120	22,00	49,50	0,43	23,00	70,00	0,72

Procenat broja preživelih ćelija oba mikroorganizma (tabela 5.4) ukazuje na bolje preživljavanje u kontrolisanim uslovima niže temperature i više relativne vlažnosti koje direktno utiču na viši a_w u zemljištu. Dobijeni rezultati ovog ogleada su u korelaciji sa rezultatima Bernstein i sar. (2007), i Holley i sar. (2006), koji navode da opstanak salmonela u zemljištu podstiče visoka vlažnost vazduha, koja doprinosi višem sadržaju a_w u zemljištu, dok niska relativna vlažnost vazduha i niska a_w u zemljištu dovode do njihovog odumiranja.

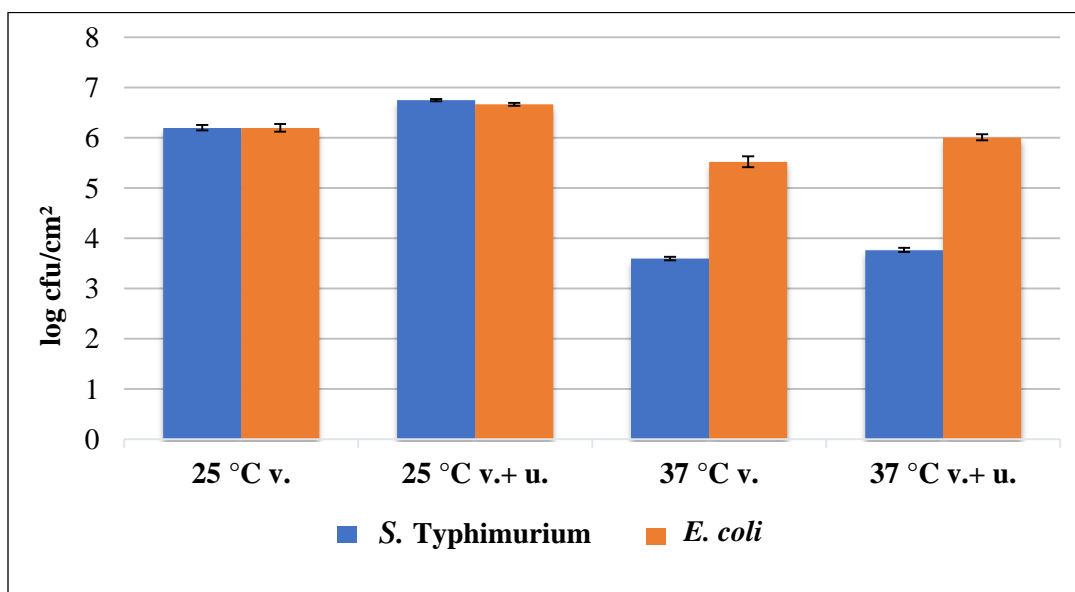
Rezultati ispitivanja preživljavanja salmonela u različito tretiranim uzorcima zemljišta od strane García i sar. (2010), su pokazala da su najkraće opstale salmonela u zemljištu obogaćenom stajskim đubrivom, nešto duže one u netretiranom zemljištu, dok su najduže opstale u sterilisanom zemljištu. Prema Unc i sar. (2006), Semenov i sar. (2007), van Elsas i sar. (2011), i *E. coli* duže preživljava u sterilisanom zemljištu u odnosu na nesterilisano i obogaćeno stajskim

đubrivom, što se objašnjava time da prisustvo autohtone mikroflore zemljišta dovodi do povećane konkurencije za hranljivim materijama, predatorstva i antagonizma među mikrobnom populacijom.

Iako laboratorijski uslovi ne odražavaju u potpunosti uslove u spoljašnjoj sredini, gde bi populacija *S. Typhimurium* i *E. coli* bila izložena drugačijim vrednostima vlage, temperature i dostupnosti hranljivih materija, dobijeni podaci pružaju dokaz da bi oba mikroorganizma mogla preživeti više meseci u zemljištu u prirodnim uslovima, čime se povećava verovatnoća kontaminacije useva.

5.7. Određivanje sposobnosti adherencije *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* na lisnu površinu povrća

Rezultati stepena adherencije na površinu kupona lista zelene salate *E. coli* i *S. Typhimurium* prikazani su na slici 5.11.



Slika 5.11. Stepen adherencije *E. coli* i *S. Typhimurium* na površinu lista zelene salate nakon inkubiranja 3 h na 25 °C i 37 °C; v - deadherencija primenom vorteksa; v.+ u. - deadherencija primenom vorteksa i ultrazvuka

Na osnovu prikazanih rezultata stepen adherencije na površinu lista zelene salate na temperaturi od 25 °C za *S. Typhimurium* iznosio je $6,75 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,023$, a za *E. coli* $6,64 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,028$. Stepen adherencije oba mikroorganizma na temperaturi od 37 °C je niži i za *S. Typhimurium* iznosi $3,76 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,041$, a za *E. coli* $6,01 \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,063$.

Iz prikazanih rezultata sposobnosti adherencije na temperaturi inkubiranja od 25 °C oba testirana mikroorganizma su pokazala sličan stepen adherencije. Međutim temperatura inkubiranja od 37

°C različito je uticala na stepen adherencije ispitivanih mikroorganizama, generalno ga redukujući pri čemu je kod *S. Typhimurium* redukcija čak 50%, dok je kod *E. coli* 10%. Različit uticaj temperature na adherentnu sposobnost bakterija na površine je u korelaciji sa formiranjem RDAR morfotipa i sintezom komponenti matriksa biofilma. Na osnovu rezultata prikazanih u potpoglavlju 5.3. i 5.4. temperatura od 37 °C je kod *S. Typhimurium* inhibirala ekspresiju glavnog transkripcionog regulatora *csgD*, čime je inhibirana sinteza obe komponente matriksa biofilma - fimbrija i celuloze, što je rezultiralo formiranjem SAW morfotipa. Određeni stepen adherencije koji je postignut se može pripisati prisustvu fimbrija tipa 1 čija je sinteza uslovljena temperaturom od 37 °C.

Izolat *E. coli* koji je korišćen u ogledu ispitivanja sposobnosti adherencije, prema rezultatima prikazanim u potpoglavlju 5.3. i 5.4., je na obe temperature formirao RDAR morfotip kolonija koji karakteriše formiranje obe komponente matriksa biofilma - fimbrija i celuloze te je kod njega uticaj temperature na stepen adherencije znatno manji (10%) nego kod *S. Typhimurium*. Lapidot i Yaron (2009), navode da flagele i fimbrije mogu uticati na početnu reverzibilnu adheziju na površinu biljaka, koja je posredovana van der Waals-ovim interakcijama i vodoničnim vezama. Ovu početnu adheziju prati dalje ireverzibilno vezivanje koje je posredovano elektrostatičkim silama i zavisi od sinteze ekstracelularnog polimernog jedinjenja kao što je celuloza. Ispitujući adheziju različitih serotipova salmonela za listove bosiljka, zelene salate i kupusa Berger i sar. (2009), su ustanovili da serotipovi *S. Senftenberg* i *S. Typhimurium* u većem broju adheriraju u odnosu na serotipove *S. Agona* i *S. Arizonae*. Razlike se uočavaju i u tipu adherencije o čemu izveštava Shaw i sar. (2011), navodeći rezultate ispitivanja adherencije tri serotipa salmonela za plodove paradajza prema kojima su serotipovi *S. Senftenberg* i *S. Typhimurium* adherirali formirajući ćelijske agregate, dok je kod serotipa *S. Thompson* uočena difuzna adherencija.

Zanimljivo je da mnogi do sada identifikovani geni koji imaju ulogu u adheziji *E. coli* i *S. Typhimurium* na biljna tkiva, sem što su identifikovani kao faktori vezivanja, identifikovani su i kao faktori virulencije prilikom infekcije životinja. Najveći uticaj na sposobnost vezivanja imaju geni koji učestvuju u sintezi vanćelijskih ugljenih hidrata kao što je *pgaC* [(sinteza poli-β-, 6-N-acetilglukozamina (PGA)], *wcaD* (sinteza kolanske kiseline) kod *E. coli* O157:H7 i *ycfR* (sinteza membranskog proteina) koji je uključen u formiranje biofilma kod salmonela. Dobijeni su kontradiktorni rezultati u vezi sa ulogom flagela prilikom adhezije *E. coli* i salmonela na biljne površine. Brisanjem gena *fliC* odgovornog za kodiranje podjedinice flagela kod *E. coli* O157: H7 i *S. Senftenberg*, dovelo je do toga da ove bakterije u znatno manjem broju adheriraju na listove spanaća i zelene salate (Xicohtencatl-Cortes i sar., 2009), odnosno listove bosiljka (Berger i sar., 2009), ali brisanje istog gena kod *S. Typhimurium* nije uticalo na njenu sposobnost adherencije (Berger i sar., 2009). Ova kontradiktornost kod *S. Typhimurium* se može objasniti činjenicom da je alternativna podjedinica flagelarnog proteina *fliB* funkcionalna kada *fliC* nije izražen.

5.8. SEM biofilmova *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* formiranih na površini lista zelene salate

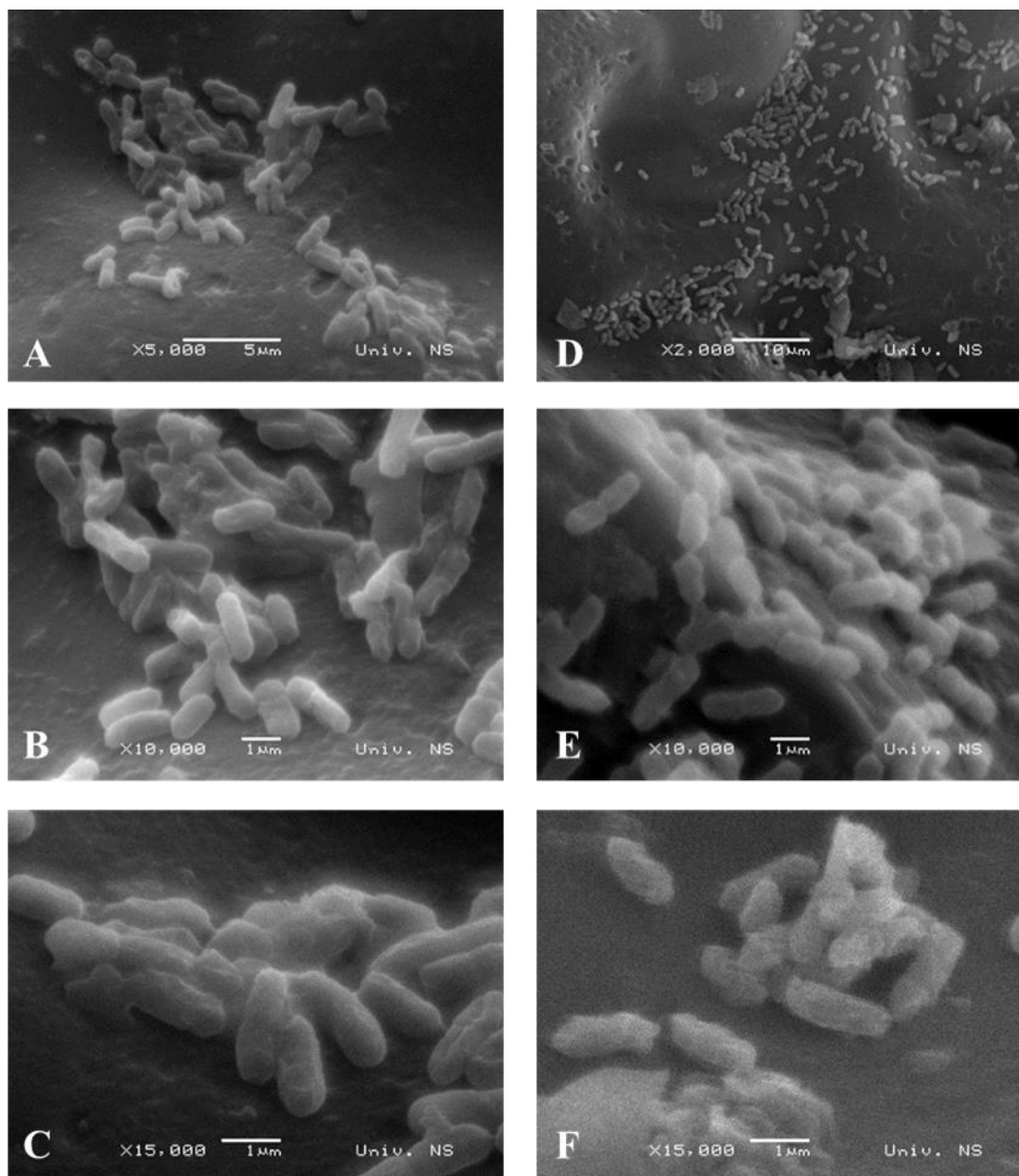
Vizuelizacija formiranih biofilmova *E. coli* i *S. Typhimurium* na površini lista zelene salate izvedena je primenom SEM i prikazana u vidu setova mikrografija uvećanja od 2000 ×, 5000 ×, 10000 × i 15000 ×. Na mikrografijama manjeg uvećanja može se uočiti stepen adheriranih bakterijskih ćelija za lisnu površinu, dok se na mikrografijama većeg uvećanja može uočiti interkonekcija između ćelija i formirani matriks biofilma.

Na slici 5.12. na SEM mikrografijama prikazan je biofilm *E. coli* formiran na 25 °C, 24 h (A, B; C) i 37 °C, 24 h (D, E, F) na površini lista zelene salate.

Na mikrografijama manjeg uvećanja (slika 5.12 A i D) uočava se kolonizacija površine lista zelene salate *E. coli* na obe temperature inkubiranja. Slika D koja je snimljena pri najmanjem uvećanju (2000 ×) i koja obuhvata veću površinu, daje uvid u neravnomernu adherenciju ćelija na površini lista, a što se može objasniti time da bakterije kolonizujući biljke traže pogodne niše koje im pružaju izvestan stepen zaštite od nepovoljnih uslova spoljašnje sredine ili predstavljaju izvor hranljivih materija (Hunter i sar., 2015). Na većim uvećanjima (slika 5.12 B i E) može se zapaziti intenzivna ćelijska agregacija uz formiranje mikrokolonija mestimično prekrivenih i međusobno povezanih matriksom. Upoređujući ove dve slike (slika 5.12 B i E) može se uočiti razlika u količini formiranog matriksa biofilma kojim su formirane mikrokolonije na slici 5.12. B skoro potpuno prekrivene u odnosu na mikrokolonije prikazane na slici 5.12. E, a što se može objasniti ranije iznetom činjenicom da niža temperatura aktivira setove gena koji su odgovorni za ćelijsku agregaciju i sintezu komponenti matriksa biofilma.

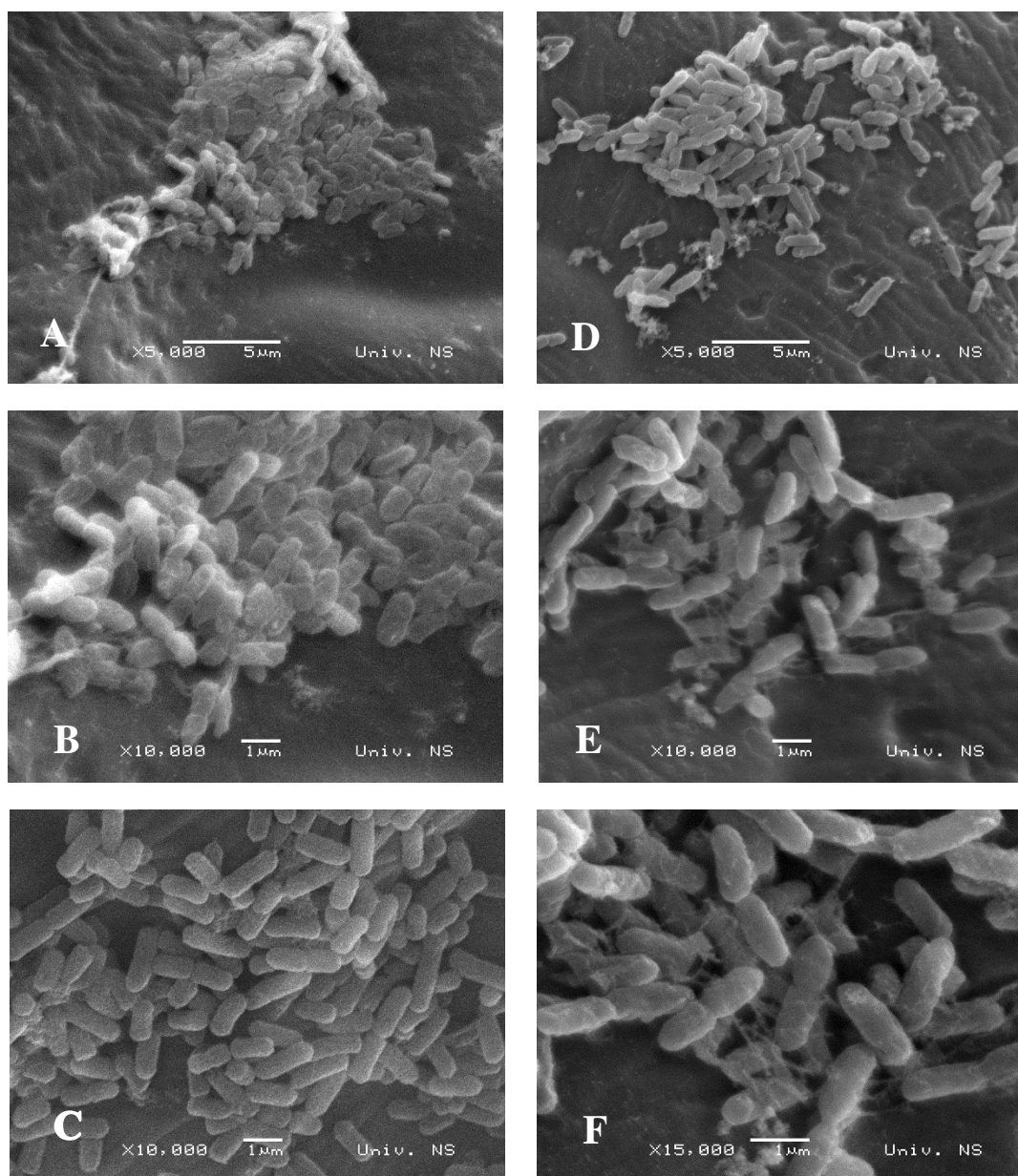
Iako je matriks biofilma visoko hidrirana struktura, na prikazanim slikama 5.12. C i F se može jasno uočiti u vidu sasušene mase. Ovo je posledica postupaka pripreme preparata za SEM koji uključuju sukcesivnu dehidrataciju koja dovodi i do dehidratacije matriksa biofilma. Da bi se ovaj nedostatak SEM pored odličnih performansi, koje ova metoda pruža kompenzovao, preporučuje se nedestruktivna *in situ* tehnika vizuelizacije biofilma kao što je konfokalna laserska skening mikroskopija (CLSM). Kombinacijom SEM i CLSM omogućuje se vizuelizacija bakterijskih površinskih struktura kao što su flagele, fimbrije, kapsule, diferencijacija vijabilnih/nevijabilnih ćelija kao i detekcija komponenti matriksa biofilma (Hannig i sar., 2010).

Fimbrije imaju ključnu ulogu u adherenciji i formiranju biofilma *E. coli* na površinama biljaka. Torres i sar. (2005), su izveli ogled koristeći soj *E. coli* K12 koji je imao sposobnost ekspresije fimbrija i koji se vezao za klice lucerke i mutante kojima je obrisao gen *csgA* koji je odgovoran za sintezu fimbrija i koji se nisu vezali za klice lucerke. U suprotnosti sa navedenim, brisanje gena *bcsA* odgovornog za ekspresiju celuloze nije uticalo na sposobnost adherencije i formiranje biofilma *E. coli* za klice lucerke, što potvrđuje značaj fimbrija u formiranju biofilma *E. coli*.



Slika 5.12. SEM mikrografije biofilma *E. coli* na kuponima lista zelene salate uvećanja 2000 ×, 5000 ×, 10000 × i 15000 ×: A, B, C (na 25 °C, 24 h) i D, E, F (na 37 °C, 24 h)

Na slici 5.13. prikazane su SEM mikrografije biofilma formiranog od strane *S. Typhimurium* na površini lista zelene salate. Ovde se kao i kod *E. coli* uočava negativan uticaj više temperature na formiranje biofilma. Na slikama 5.13. A i D koje su snimljene pri najmanjem uvećanju jasno se uočava formiranje ćelijskih aglomerata koji su veći i sastavljeni od znatno gušće povezanih ćelija *S. Typhimurium* pri temperaturi inkubiranja od 25 °C (slika 5.13 A) u odnosu na temperaturu od 37 °C (slika 5.13 D).



Slika 5.13. SEM mikrografije *S. Typhimurium* na kuponima lista zelene salate uvećanja 5000. \times , 10000. \times i 15000 \times : A, B, C (na 25 °C, 24 h) i D, E, F (na 37 °C, 24 h)

Na slikama 5.13. E i F na kojima je prikazan biofilm *S. Typhimurium* pri temperaturi inkubiranja od 37 °C uočavaju se peritrihijalnim flagelama slične strukture kojima su ćelije povezane za površinu lista. Iako je *S. Typhimurium* primenom testa na KCA pri temperaturi inkubiranja od 37 °C formirala SAW morfotip kolonija koji nastaje kao posledica nefunkcionalnosti glavnog transkripcionog regulatora *csgD*, formiranje biofilma nastaje kao posledica aktivacije različitih setova gena koji omogućavaju sintezu fimbrija tipa 1 koja je uslovljena upravo temperaturom od 37 °C (Steenackers i sar., 2012). Prema navodima Berger i sar. (2009), ove končaste strukture su flagele i fimbrije tipa 1, koje čine komponente matriksa biofilma *S. Typhimurium* formiranog na 37 °C. U manjoj meri su izražene u biofilmu *S. Typhimurium* formiranom na temperaturi od 25

°C zbog sinteze celuloze koja je u ovom slučaju glavni činilac međucelijskog vezivanja (slika 5.13 C).

Prikazane SEM mikrografije su u korelaciji sa rezultatima adhezije testiranih mikroorganizama na lisnu površinu povrća.

5.9. Hemijski sastav etarskih ulja

5.9.1. Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum*)

Hemijski sastav EU bosiljka prikazan je u tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Hemijski sastav EU bosiljka

Broj pika	Komponenta	RI	RT	Procentat (%)
1.	α -pinen	934	5,851	0,3
2.	kamfen	949	6,253	0,1
3.	sabinen	973	6,927	0,1
4.	β -pinen	977	7,036	0,6
5.	mircen	991	7,417	0,3
6.	α -terpinen	1017	8,283	0,1
7.	p-cimen	1025	8,547	0,2
8.	limonen	1028	8,685	0,2
9.	1,8-cineol	1030	8,768	5,7
10.	trans- β -ocimen	1047	9,371	0,1
11.	cis-sabinen hidrat	1067	10,087	0,1
12.	cis-linalool oksid	1073	10,286	0,2
13.	trans-linalool oksid	1090	10,907	0,3
14.	linalool	1103	11,498	69,2
15.	hotrienol	1105	11,563	0,4
16.	kamfor	1143	13,157	0,7
17.	menton	1153	13,565	0,2
18.	trans-pinokamfon	1159	13,843	0,3
19.	mentol	1171	14,365	0,4
20.	cis-pinokamfon	1172	14,425	0,7
21.	terpinen-4-ol	1175	14,574	0,4
22.	α -terpineol	1189	15,155	0,4
23.	metil kavikol	1197	15,509	1,6
24.	linalool acetat	1254	18,026	0,3
25.	bornil acetat	1284	19,35	0,6
26.	mentil acetat	1293	19,72	0,1
27.	α -kubeben	1349	22,179	0,1

Nastavak tabele 5.6.

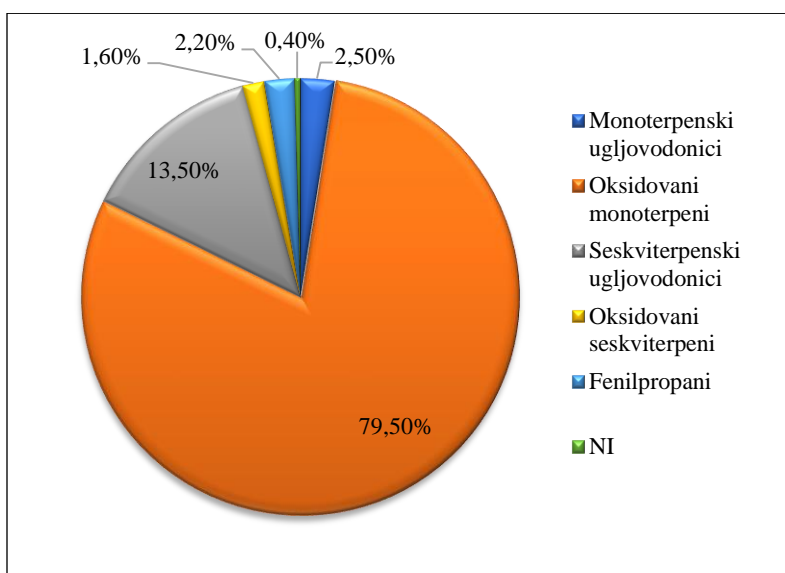
28.	eugenol	1356	22,56	0,5
29.	α -kopaen	1375	23,331	0,3
30.	β -bourbonen	1384	23,726	0,4
31.	β -kubeben	1389	23,973	0,1
32.	β -elemen	1391	24,042	1,8
33.	metil eugenol	1406	24,672	0,1
34.	trans-kariofilen	1418	25,218	0,6
35.	β -kopaen	1429	25,637	0,1
36.	β -gurjunen	1432	25,765	0,1
37.	trans- α -bergamoten	1435	25,923	2,3
38.	α -guaien	1439	26,046	0,8
39.	α -humulen	1453	26,677	0,5
40.	trans- β -farnesen	1457	26,831	0,1
41.	allo-aromadendren	1461	26,991	0,1
42.	epi-bicikloseskviuifelandren	1463	27,083	0,3
43.	γ -murolen	1477	27,669	0,1
44.	germakren D	1481	27,857	1,9
45.	NI	1486	28,013	0,1
46.	β -selinen	1486	28,063	0,2
47.	viridifloren	1496	28,478	0,2
48.	biciklogermakren	1497	28,511	0,3
49.	acifilen	1499	28,619	0,1
50.	α -bulnesen	1506	28,905	1,1
51.	γ -kadinen	1514	29,244	1,8
52.	δ -kadinen	1523	29,621	0,4
53.	maliol	1566	31,394	0,2
54.	NI	1577	31,838	0,2
55.	NI	1583	32,05	0,1
56.	1,10-di-epi-kubenol	1614	33,32	0,2
57.	epi- α -kadinol	1641	34,326	1,0
Ukupno identifikovano				99,7

RI - retencioni indeks, RT - retenciono vreme, NI - nije identifikovano

Analizom EU bosiljka identifikovano je 54 jedinjenja. Identifikovana jedinjenja su klasifikovana u pet grupa, pri čemu dominantnu grupu čine oksidovani monoterpeni (79,5%), zatim seskviterpenski ugljovodonici (13,5%), monoterpenski ugljovodonici (2,5%), fenilpropani (2,2%) i oksidovani seskviterpeni (1,6%), (slika 5.14). Od pojedinačno identifikovanih jedinjenja najzastupljeniji je linalool (69,2%), dok je 1,8-cineol drugo jedinjenje po zastupljenosti (5,7%). Zastupljenost ostalih jedinjenja je u rasponu od 0,1% do 1,9%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Nurzyńska-Wierdak i sar. (2012), prema kojima evropske sorte bosiljka karakteriše visok sadržaj linaloola. Navedeni autori su ispitali hemijski sastav EU dve sorte bosiljka „Kasia“ i „Wala“ poreklom iz Poljske, pri čemu su dobili rezultate da sorta „Kasia“ sadrži više

linalool (67,7%) u odnosu na sortu „Wala“ (60,5%). Ista studija je pokazala da sorta „Wala“ sadrži veću količinu 1,8-cineola (6,4%) u odnosu na sortu „Kasia“ (3,9%).

Da visok sadržaj linalool nije karakteristika samo evropskih sorti bosiljka, pokazali su rezultati ispitivanja Silva i sar. (2015), prema kojima je EU bosiljka gajenog u Brazilu kao dominantno jedinjenje sadržavalo linalool (55,2%) i 1,8-cineol (8,8%), slično kao evropske sorte. Suprotno rezultatima dobijenim u ovoj studiji, Özcan i sar. (2002), su ispitujući hemijski sastav EU bosiljka gajenog u Turskoj, dobili rezultat da je dominantna komponenta EU metil eugenol (78,02%) i α -kubeben (6,17%).



Slika 5.14. Sadržaj dominantnih grupa jedinjenja u EU bosiljka

NI - nije identifikovano

5.9.2. Hemijski sastav etarskog ulja nane (*Mentha piperita*)

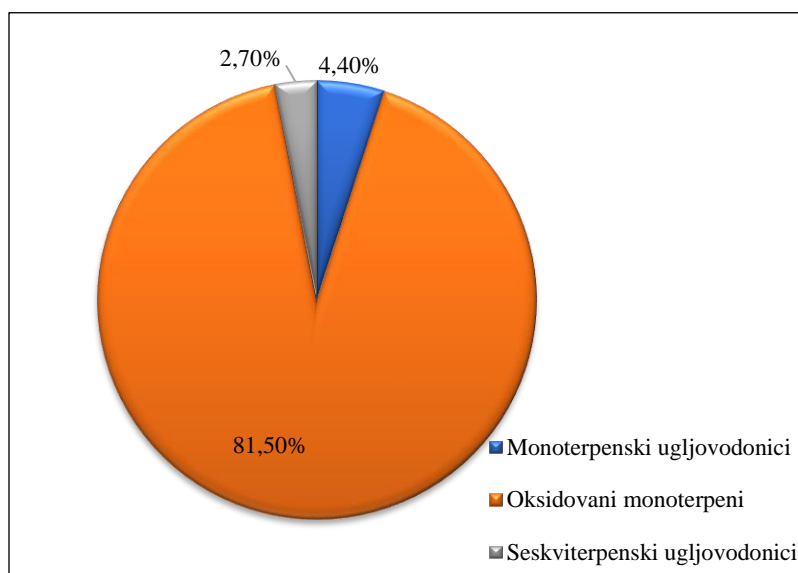
Hemijski sastav EU nane prikazan je u tabeli 5.7. Analizom hemijskog sastava EU nane identifikovano je 19 jedinjenja, koja su klasifikovana u tri grupe. Najzastupljeniju grupu činili su oksidovani monoterpeni (81,5%), zatim monoterpeni ugljovodoni (4,4%), a najmanje zastupljena su bila jedinjenja koja pripadaju u seskviterpenske ugljovodonike (2,7%) (slika 5.15). Kao najzastupljenije jedinjenje u EU nane identifikovan je mentol (30,8%) i menton (28,8%). Zastupljenost ostalih jedinjenja je u rasponu od 5,9% do 0,2%. Rezultati analize hemijskog sastava EU *Mentha x piperita* sprovedeni od strane Bassolé i sar. (2010) takođe pokazuju da su mentol (39,3%) i menton (25,2%) najzastupljenija jedinjenja. Mahboubi i sar. (2014), analizom EU nane gajene u Iranu kao najzastupljenija jedinjenja navode mentol (36,9%) i menton

(28,8%). Ovi rezultati su u bliskoj korelaciji sa rezultatim analize hemijskog sastava EU nane korišćene u ovom istraživanju.

Tabela 5.7. Hemijski sastav EU nane

Broj pika	Komponenta	RI	RT	Procenat (%)
1.	α -pinen	921	5,801	0,8
2.	sabinen	970	6,889	0,4
3.	β -pinen	975	6,998	1,1
4.	limonen	992	8,659	1,9
5.	1,8-cineol	998	8,740	5,9
6.	γ -terpinen	1025	9,765	0,2
7.	cis-sabinen hidrat	1028	10,056	0,3
8.	menton	1031	13,558	28,8
9.	mentofuran	1056	14,008	5,9
10.	izomenton	1056	14,015	5,0
11.	mentol	1064	14,359	30,8
12.	terpinen-4-ol	1084	14,575	1,1
13.	izomentol	1095	14,844	0,3
14.	pulegon	1143	17,285	0,5
15.	piperiton	1152	17,968	0,2
16.	mentil acetat	1163	19,745	2,7
17.	trans-kariofilen	1164	25,258	1,7
18.	germakren D	1173	27,895	0,8
19.	biciklogermakren	1178	28,553	0,2
Ukupno identifikovano				88,6

RI - retencioni indeks, RT - retenciono vreme



Slika 5.15. Sadržaj dominantnih grupa jedinjenja u EU nane

5.9.3. Hemijski sastav etarskog ulja vreska (*Satureja montana*)

Rezultat hemijske analize EU vreska prikazan je u tabeli 5.8.

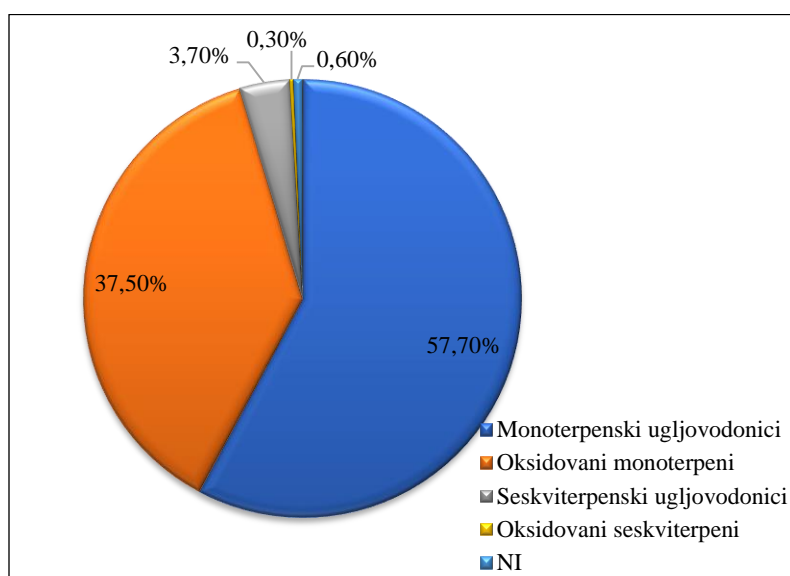
Tabela 5.8. Hemijski sastav EU vreska

Broj pika	Komponenta	RI	RT	Procenat (%)
1.	α -tujen	928	5,674	0,6
2.	α -pinen	935	5,861	1,4
3.	kamfen	949	6,262	0,5
4.	β -pinen	978	7,046	1,1
5.	mircen	992	7,421	1,3
6.	α -felandren	1006	7,890	0,2
7.	δ -3-karen	1012	8,086	0,1
8.	α -terpinen	1017	8,287	1,6
9.	p-cimen	1027	8,630	33,8
10.	limonen	1029	8,719	0,9
11.	1,8-cineol	1031	8,792	0,4
12.	γ -terpinen	1059	9,825	15,9
13.	cis-sabinen hidrat	1067	10,088	0,1
14.	terpinolen	1090	10,923	0,1
15.	p-cimenen	1092	10,980	0,1
16.	linalool	1101	11,336	1,4
17.	menton	1153	13,600	0,1
18.	borneol	1164	14,089	1,2
19.	mentol	1171	14,385	0,4
20.	terpinen-4-ol	1176	14,593	0,7
21.	p-cimen-8-ol	1185	14,968	0,1
22.	α -terpineol	1190	15,191	0,1
23.	karvakrol, metil etar	1243	17,533	0,1
24.	NI	1245	17,624	0,1
25.	NI	1287	19,477	0,1
26.	timol	1294	19,747	0,1
27.	NI	1297	19,909	0,2
28.	karvakrol	1305	20,318	32,9
29.	NI	1322	20,987	0,1
30.	α -kopaen	1375	23,356	0,1
31.	β -bourbonen	1384	23,750	0,1
32.	trans-kariofilen	1419	25,240	1,4
33.	trans- α -bergamoten	1436	25,940	0,1
34.	aromadendren	1439	26,077	0,1
35.	α -humulen	1454	26,698	0,1
36.	γ -murolen	1477	27,684	0,2

Nastavak tabele 5.8.				
37.	β -selinen	1487	28,092	0,1
38.	viridifloren	1496	28,469	0,1
39.	β -bisabolen	1509	29,025	0,9
40.	γ -kadinen	1515	29,254	0,2
41.	δ -kadinen	1524	29,639	0,3
42.	kariofilen oksid	1582	32,054	0,3
43.	NI	1931	44,769	0,1
Ukupno identifikovano				99,8

RI - retencioni indeks, RT - retenciono vreme, NI - nije identifikovano

Analizom hemijskog sastava EU vreska identifikovano je 38 jedinjenja, klasifikovanih u četiri grupe. Dominantnu grupu jedinjenja činili su monoterpeni ugljovodoni (57,7%), oksidovani monoterpeni (37,5%), seskviterpeni ugljovodoni (3,7%), a najmanje zastupljeni su bili oksidovani seskviterpeni (0,3%), što je prikazano na slici 5.16.



Slika 5.16. Sadržaj dominantnih grupa jedinjenja u EU vreska

NI - nije identifikovano

Od pojedinačno identifikovanih jedinjenja najzastupljeniji je p-cimen (33,8%), karvakrol (32,9%) i γ -terpinen (15,9%). Jedinjenja čiji je sadržaj veći od 1% su α -terpinen (1,6%), linalool (1,4%), α -pinen (1,4%), trans-kariofilen (1,4%), mircen (1,3%), borneol (1,2%) i β -pinen (1,1%). Sadržaj ostalih jedinjenja je manji od 1%. Rezultati hemijske analize EU vreska od strane Miladi i sar. (2013), pokazuju dominantan sadržaj karvakrola (53,35%), γ -terpinena (13,54%) i p-cimena (13,03%) tri najzastupljenije komponente EU vreska korišćenog u ovom ispitivanju, ali u drugačijem odnosu. Skočibušić i sar. (2004), takođe izveštavaju o visokom sadržaju karvakrola EU vreska sa područja Hrvatske i Bosne i Hercegovine (< 84,19%). Dominantan sadržaj

karvakrola (63,4%) i njegovog izomera timola (19,4%) identifikovan je u EU vreska poreklom sa Biokova u Hrvatskoj, određujući mu pripadnost fenolnom hemotipu (Ćavar i sar., 2013).

5.9.4. Hemijski sastav etarskog ulja mirođije (*Anethum graveolens*)

Hemijski sastav EU mirođije prikazan je u tabeli 5.9.

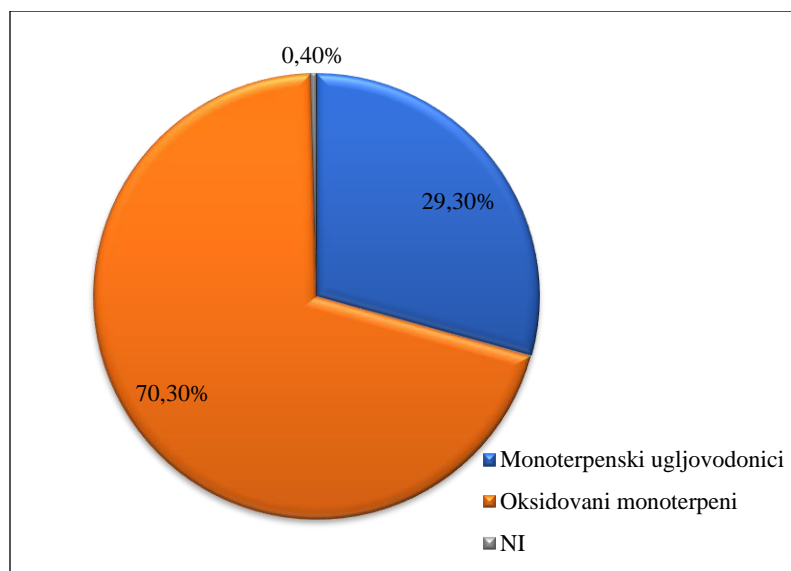
Tabela 5.9. Hemijski sastav EU mirođije

Broj pika	Komponenta	RI	RT	Procenat (%)
1.	α -pinen	936	5,886	0,3
2.	α -felandren	1007	7,905	1,3
3.	NI	1008	7,972	0,3
4.	p-cimen	1025	8,566	2,4
5.	limonen	1029	8,704	25,3
6.	dil eter	1185	14,974	0,5
7.	cis-dihidro karvon	1196	15,459	1,1
8.	trans-dihidro karvon	1203	15,777	2,1
9.	NI	1227	16,893	0,1
10.	karvon	1243	17,549	66,6
Ukupno identifikovano				100,0

RI - retencioni indeks, RT - retenciono vreme, NI - nije identifikovano

Analizom hemijskog sastava EU mirođije identifikovano je 8 jedinjenja, koja su klasifikovana u dve grupe. Dominantnu grupu činili su oksidovani monoterpeni (70,3%) i monoterpeni ugljovodoni (29,3%), što je prikazano na slici 5.17.

Od pojedinačno identifikovanih jedinjenja u EU mirođije najzastupljeniji su bili karvon (66,6%) i limonen (25,3%). Jedinjenja čiji je sadržaj veći od 1% su p-cimen (2,4%), trans-dihidro karvon (2,1%), α -felandren (1,3%) i cis-dihidro karvon (1,1%). Ostala jedinjenja su bila zastupljena u udelu manjem od 1%. Rezultati analize hemijskog sastava EU semena mirođije gajene u Rumuniji (Radulescu i sar., 2010) i Estoniji (Vokk i sar., 2011), pokazuju visoku podudarnost u pogledu sadržaja dominantnih jedinjenja EU mirođije koje je korišćeno u ovom ispitivanju. Prema navodima ovih autora, EU mirođije gajene u Rumuniji sadržavalo je 45,9% karvona i 18,4% limonena, odnosno 75,2% karvona i 21,6% limonena koliko je sadržavalo EU mirođije gajene u Estoniji.



Slika 5.17. Sadržaj dominantnih grupa jedinjenja u EU mirođije

NI - nije identifikovano

Yili i sar. (2009) takođe izveštavaju da su karvon i limonen najzastupljenija jedinjenja EU mirođije gajene u Uzbekistanu. U suprotnosti sa ovim rezultatima su rezultati analize hemijskog sastava EU mirođije gajene na Tajlandu, gde je od identifikovanih jedinjenja najzastupljeniji dilapiol (48,9%), D-limonen (26,97%) i D-karvon (18,05%) (Ruangamart i sar., 2015).

Upoređujući hemijski sastav EU koja su korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji sa hemijskim sastavom EU istih biljnih vrsta koje potiču sa različitih geografskih područja, uočavaju se sličnosti, ali i razlike u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sastava. Ovo navodi na zaključak da na biosintezu i hemijski sastav EU iste biljne vrste utiče geografski položaj, agroklimatski uslovi, sezonski uslovi, fenofaza u kojoj se biljka nalazi prilikom branja, deo biljke koji se koristi za destilaciju ulja, tehnika destilacije i drugi činioci (Delaquis i sar., 2002). Iz ovih razloga, nemoguće je pronaći 100% podudaranje hemijskog sastava EU neke biljne vrste, čak i ako se radi o istom hemotipu iste vrste.

5.10. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

Antimikrobna aktivnost EU prema ispitivanom izolatu *E. coli* i laboratorijskom tipskom soju *S. Typhimurium* izražena je vrednošću MIC i MBC.

Prema rezultatima antimikrobne aktivnosti EU koji su prikazani u tabeli 5.10., a na osnovu dobijenih MIC/MBC vrednosti, ispitivana EU se umereno razlikuju po svom antimikrobnom potencijalu prema testiranim mikroorganizmima. Uzimajući u obzir činjenicu da je antimikrobna aktivnost obrnuto proporcionalna koncentraciji, od ispitivanih ulja, EU mirođije je pokazalo najbolji antimikrobni potencijal sa vrednostima MIC/MBC 3,55 µl/ml. Nasuprot ovome, *E. coli* i

S. Typhimurium su pokazali visok stepen otpornosti prema EU nane sa vrednostima MIC/MBC 14,20/56,81 $\mu\text{l/ml}$. Zanimljivo je da su MIC/MBC vrednosti EU bosiljka i vreska iste za oba testirana mikroorganizma i iznose 7,10 $\mu\text{l/ml}$. Do ovakvog rezultata je najverovatnije došlo usled primene niza razblaženja ulja u intervalu 1:2, jer što je veći opseg razblaženja ulja to je niža preciznost procene MIC. Za dobijanje preciznijih rezultata kod EU koja pokazuju slično antimikrobno delovanje, preporučuje se niži interval razblaženja (Saad i sar., 2013).

Tabela 5.10. Vrednosti MIC i MBC ispitivanih EU za *E. coli* i *S. Typhimurium*

Etarsko ulje	Latinski naziv	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
		MIC/MBC ($\mu\text{l/ml}$)	MIC/MBC ($\mu\text{l/ml}$)
mirodija	<i>Anethum graveolens</i>	3,55	3,55
bosiljak	<i>Ocimum basilicum</i>	7,10	7,10
vresak	<i>Satureja montana</i>	7,10	7,10
nana	<i>Mentha piperita</i>	14,20	56,81

Upotreba antibiotika kao pozitivne kontrole je standardna procedura koja se navodi u brojnim istraživanjima u vezi sa antimikrobnom aktivnošću EU (Roldán i sar., 2010). Dobijeni rezultati antimikrobne aktivnosti antibiotika prema ispitivanim mikroorganizmima pružaju korisne informacije radi poređenja antimikrobnog potencijala ispitivanih EU prema istim.

Dobijene vrednosti MIC antibiotika gentamicina i streptomocina prikazane su u tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Vrednosti MIC antibiotika gentamicina i streptomocina za *E. coli* i *S. Typhimurium*

Mikroorganizam	Gentamicin	Streptomicin
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	2,0	4,0
<i>S. Typhimurium</i>	0,5	2,0

Prikazani rezultati u tabeli 5.11. pokazuju da je gentamicin pokazao jači antimikrobni efekat na oba mikroorganizma u odnosu na streptomocin. Vrednosti koncentracije oba antibiotika pri kojoj dolazi do inhibicije rasta (MIC) više su za *E. coli* u odnosu na *S. Typhimurium*, što znači da je *E.*

coli pokazala veću rezistentnost na dejstvo antibiotika. Ovo je rezultat njihove česte primene u humanoj i veterinarskoj medicini (Aarestrup, 2012).

Antimikrobna aktivnost EU biljaka uglavnom se pripisuje prisustvu fenolnih jedinjenja. Analizirajući hemijski sastav, EU se sastoji od dva ili tri glavna jedinjenja koja određuju njihovu biološku aktivnost i koja su prisutna u relativno visokim koncentracijama (20-95%) i niza ostalih jedinjenja prisutnih u tragovima. Međutim, studije Bassolé i Juliani (2012), su pokazale da EU često pokazuje veću antimikrobnu aktivnost nego smeše njihovih glavnih jedinjenja, sugerišući da su sporedna jedinjenja ključna za sinergističku aktivnost, doprinoseći antimikrobnom potencijalu EU.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.10. EU mirođije je pokazalo najbolju antimikrobnu aktivnost prema testiranim mikroorganizmima, koja je rezultat visokog sadržaja aktivnih jedinjenja karvona i limonena. Kako navode Selles i sar. (2018), mehanizam dejstva karvona nije do kraja razjašnjen, ali je dokazano da dovodi do destabilizacije spoljašnje fosfolipidne membrane koja je skoro potpuno nepropusna za lipofilna jedinjenja, ulazi u interakcije sa enzimima i proteinima membrane i deluje kao izmenjivač protona smanjujući pH gradijent membrane. Rezultati studije Varga i sar. (2016), koji su ispitivali antimikrobnu aktivnost EU mirođije poreklom iz Srbije su pokazali da ovo EU poseduje antimikrobni potencijal prema *E. coli*. Hemijskom analizom je utvrđeno da su i u ovom EU dominantna jedinjenja karvon i limonen. Antimikrobnu aktivnost EU mirođije (*Anethum graveolens*) poreklom sa Tajlanda koje je dobijeno postupkom hidrodestilacije i destilacijom parom, ispitivali su Ruangarnart i sar. (2015), prema 11 patogenih mikroorganizama uključujući *E. coli* ATCC 8739 i *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dobijene vrednosti za MIC/MBC za oba ulja u slučaju *S. Typhimurium* su bile iste i iznose $10^7 > 10$ mg/ml. Kod *E. coli* MIC/MBC vrednost kod EU dobijenog hidrodestilacijom iznosila je $10^7 > 10$ mg/ml, dok je u slučaju EU dobijenog destilacijom parom MIC/MBC vrednost bila $> 10^7 > 10$ mg/ml. Kako navode autori u hemijskom sastavu EU mirođije dobijenom destilacijom vodenom parom najzastupljenije jedinjenje bio je d-limonen (44,61%), d-karvon (28,02%) i dilapiol (19,98%), dok je EU dobijeno hidrodestilacijom sadržavalo najviše dilapiol (48,9%), d-limonen (26,96%) i d-karvon (18,05%). Prema tome postupak destilacije je znatno uticao na hemijski sastav EU, neznatno na antimikrobnu aktivnost prema *E. coli*, dok nije uopšte uticao na antimikrobnu aktivnost prema *S. Typhimurium*.

Značajno antimikrobno dejstvo prema *E. coli* i *S. Typhimurium* ispoljilo je EU vreska što se pripisuje visokom sadržaju karvakrola čije je dejstvo potpomognuto sinergističkim delovanjem p-cimena i γ -terpinena. Naime p-cimen dovodi do promene permeabilnosti ćelijske membrane omogućavajući time lakši transport karvakrola u bakterijsku ćeliju (Roldán i sar., 2010). Sam karvakrol ne deluje direktno na permeabilnost ćelijske membrane (Nazzaro i sar., 2013).

Etarsko ulje bosiljka je takođe pokazalo značajnu antimikrobnu aktivnost prema *E. coli* i *S. Typhimurium*. Soković i sar. (2007) su primenom bujon mikrodilucione metode ispitivali antimikrobni potencijal EU bosiljka (*Ocimum basilicum*) i nane (*Mentha piperita*) prema *E. coli* ATCC O157:H7 i *S. Typhimurium* ATCC 13311. Dobijene vrednosti MIC/MBC za EU nane za

E. coli iznosile su 2,5/3,0 µg/ml odnosno 2,5/2,5 µg/ml za *S. Typhimurium*. Etarsko ulje bosiljka je pokazalo slabiji antimikrobni efekat definisan odnosom vrednosti MIC/MBC koji za *E. coli* iznosi 6,0/6,0 µg/ml a za *S. Typhimurium* 5,0/6,0 µg/ml. Rezultati antimikrobne aktivnosti EU bosiljka i nane korišćenih u ovoj studiji pokazuju da je antimikrobni potencijal EU bosiljka prema *E. coli* i *S. Typhimurium* veći u odnosu na EU nane, što je u skladu sa rezultatima Varga i sar. (2019), a u suprotnosti sa napred navedenim rezultatima autora Soković i sar. (2007). Prema studiji Soković i sar. (2007), u hemijskom sastavu EU nane dominantne komponente su bile mentol (37,4%) i menton (12,7%) dok je EU bosiljka najviše sadržavalo linalool (59,25%) što je u korelaciji sa sadržajem dominantnih jedinjenja koja su identifikovana u EU bosiljka i nane korišćenih u ovoj studiji. Rezultati ispitivanja Kotan i sar. (2007), koji su ispitivali disk difuzionom metodom antimikrobni potencijal različitih oksidovanih monoterpena prema 63 bakterijska soja, pokazala su da je linalool u odnosu na mentol i 1,8-cineol pokazao antimikrobnu aktivnost čak prema 42 bakterijska soja. Silva i sar. (2015), su dokazali da je linalool pokazao antimikrobno dejstvo prema različitim izolatima *Pseudomonas aeruginosa*. Ovi rezultati navode da je linalool jedinjenje koje je primarno odgovorno za antimikrobni potencijal bosiljka. Prema Greay i Hammer (2015), linalool utiče na integritet i funkciju ćelijske membrane i inhibira respiratornu funkciju bakterijske ćelije.

Od ispitivanih ulja u ovoj studiji EU nane je pokazalo umerenu aktivnost prema *E. coli* i *S. Typhimurium*. Zaidi i Dahiya (2015), su ispitivali antimikrobno dejstvo EU *Mentha spicata* i *Mentha x piperita* prema 11 bakterijskih kliničkih izolata (uključujući *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *S. Typhi*, *S. Paratyphi* i *P. aeruginosa*) i 4 klinička fungalna izolata (*Aspergillus* spp., *Aspergillus niger*, *Candida albicans* i *Rhizopus nigricans*). Oba EU su pokazala različit stepen inhibitornog dejstva prema bakterijskim izolatima. Među testiranim gram-negativnim bakterijama *Acinetobacter* spp. je bio osetljiviji u poređenju sa *E. coli* i *Klebsiella* spp. U slučaju *S. Typhi*, *S. Paratyphi* i *P. aeruginosa* efekat inhibicije nije postignut. Rezultati ove studije su pokazali da je EU nane prema *S. Typhimurium* bilo najmanje efikasno.

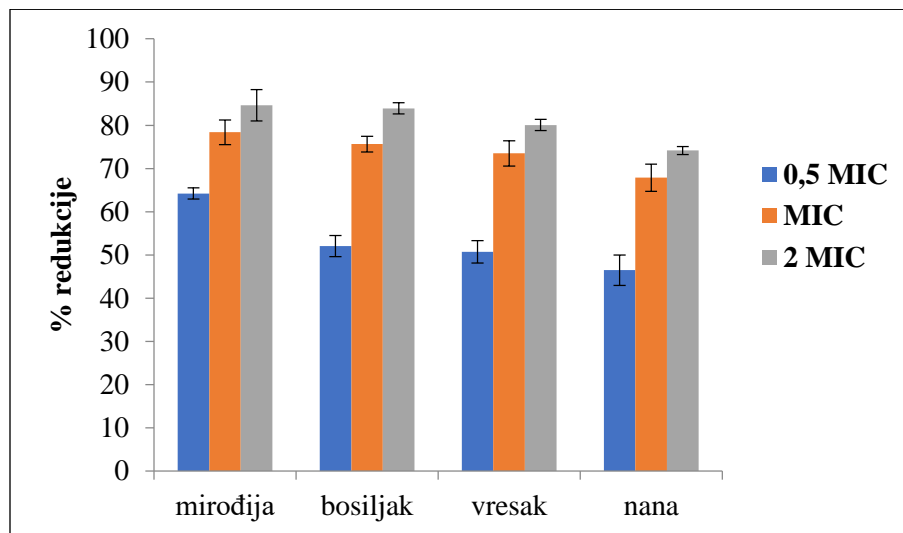
Oliveira i sar. (2010), su zaključili da na antimikrobnu aktivnost EU utiče sadržaj monoterpena koji svojim delovanjem ometaju funkciju ćelijske membrane utičući na njenu permeabilnost i dovodeći na kraju do ćelijske smrti.

Budući da hemijski sastav EU utiče na njihove antimikrobne osobine, poređenje rezultata različitih istraživanja nije uvek moguće.

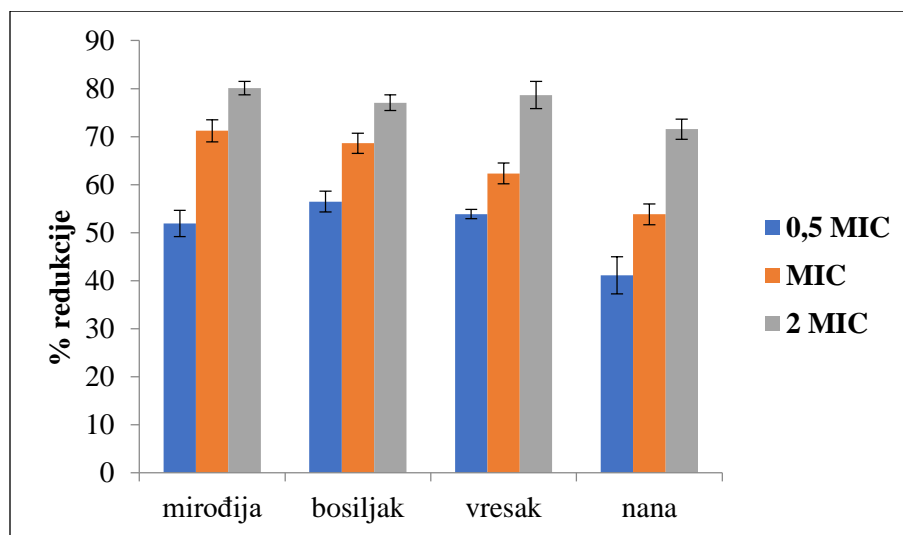
5.11. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium in vitro*

Na osnovu prethodno određenih vrednosti MIC EU prikazanih u potpoglavlju 5.9. za ispitivanje uticaja EU na inicijalnu ćelijsku adheziju *E. coli* i *S. Typhimurium*, odabrane su koncentracije

EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koje odgovaraju vrednostima 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Rezultati uticaja EU mirođije, bosiljka, vreska i nane na inicijalnu ćelijsku adheziju *E. coli* i *S. Typhimurium* prikazani su na slikama 5.18. i 5.19.



Slika 5.18. Uticaj različitih koncentracija EU mirođije, bosiljka, vreska i nane na inicijalnu adheziju *E. coli*



Slika 5.19. Uticaj različitih koncentracija EU mirođije, bosiljka, vreska i nane na inicijalnu adheziju *S. Typhimurium*

Prema rezultatima koji su prikazani na slici 5.18. i 5.19. može se zaključiti da sa porastom koncentracije EU dolazi do povećanja inhibitornog efekta na inicijalnu adheziju i posledično na

formiranje biofilma. Vrednosti procenta redukcije adhezije *E. coli* i *S. Typhimurium* primenom različitih koncentracija EU prikazane su u tabeli 5.12.

Tabela 5.12. Redukcija adheriranih ćelija *E. coli* i *S. Typhimurium* primenom koncentracija EU mirođije, bosiljka, vreska i nane od 0,5 MIC, MIC i 2 MIC

Etarsko ulje	<i>E. coli</i>			<i>S. Typhimurium</i>		
	% redukcije			% redukcije		
	0,5 MIC	MIC	2 MIC	0,5 MIC	MIC	2 MIC
Mirođija	64,23	78,39	84,63	51,93	71,22	80,13
Bosiljak	52,08	75,67	83,90	56,46	68,62	77,05
Vresak	50,74	73,51	80,07	53,86	62,31	78,65
Nana	46,48	67,87	74,17	41,11	53,84	71,55

Rezultati prikazani u tabeli 5.12. ukazuju na to da je % redukcije adheriranih ćelija oba testirana mikroorganizma u korelaciji sa primenjenim koncentracijama EU, odnosno pri većoj koncentraciji se postiže veći procenat redukcije. Ispitujući uticaj EU hajdučke trave (*Achillea millefolium*) koncentracije 0,5 MIC, MIC i 2 MIC na inicijalnu ćelijsku adheziju *L. monocytogenes* i Jadhav i sar. (2013), su takođe ustanovili smanjenu adherenciju oba soja primenom veće koncentracije EU. U pozitivnoj korelaciji sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji i rezultatima Jadhav i sar. (2013), su i rezultati studije Soni i sar. (2013), koji su ispitivali uticaj EU origana i majčine dušice kao i karvakrola koji je jedno od najzastupljenijih jedinjenja oba EU, na inicijalnu ćelijsku adheziju i formirani biofilm tri soja *S. Typhimurium* (ATCC 23564, ATCC 19585 i ATCC 14028). Autori navode da je primenom subletalnih koncentracija (0,006-0,012%) primenjenih EU i karvakrola došlo do redukcije broja adheriranih ćelija na površinu kupona od polistirena i nerđajućeg čelika. Prema istim autorima za redukciju ukupne mase biofilma do nivoa koji se ne može detektovati potrebna je minimalna koncentracija EU i karvakrola od 0,05-01%.

Prema rezultatima ove studije, primenom najniže koncentracije EU od 0,5 MIC postignut je i najniži procenat redukcije koji se kod *S. Typhimurium* kretao u intervalu 41,11-56,46%, odnosno 46,48-64,23% kod *E. coli*. Primenom EU koncentracije koja je odgovarala prethodno određenoj vrednosti MIC postignuta je redukcija u intervalu 53,84-71,22% za *S. Typhimurium* odnosno 67,87-78,39% za *E. coli*. Tretman EU koncentracije od 2 MIC doveo je do redukcije adheriranih ćelija u intervalu 71,55-80,13% za *S. Typhimurium* odnosno 74,17-84,63% za *E. coli*. Etarsko ulje mirođije koncentracije 2 MIC pokazalo je najveći uticaj na inicijalnu ćelijsku adheziju i za *S. Typhimurium* (80,13%) i za *E. coli* (84,63%), dok je EU nane iste koncentracije (2 MIC) imalo najmanji uticaj na adherentnu sposobnost oba ispitivana mikroorganizma. Suprotno rezultatima prikazanim u ovoj studiji su rezultati prikazani od strane Bazargani i Rahloff (2016), koji su

ispitivali uticaj EU korijandera (*Coriandrum sativum* L.), anisa (*Pimpinella anisum* L.) i nane (*Mentha piperita* L.) koncentracije koja je odgovarala prethodno određenoj vrednosti MIC, na inicijalnu ćelijsku adheziju *E. coli* tokom 8 h pri temperaturi od 37 °C. Od ova tri EU, najveća redukcija od 98,4% je postignuta primenom EU nane koje je slično EU nane koje je korišćeno u ovoj studiji, sadržavalo mentol (33,19%) i menton (23,69%) kao najzastupljenija jedinjenja. Različiti rezultati ove dve studije su posledica razlike u eksperimentalnim uslovima, u testiranju izolata *E. coli* različitog porekla kao i u razlici u sastavu i zastupljenosti sem mentola i mentona i ostalih jedinjenja EU nane pri čemu upravo ova manje zastupljena jedinjenja svojim sinergističkim dejstvom često određuju antimikrobni potencijal ulja.

Subletalne koncentracije EU (0,5 MIC) prouzrokovale su slabljenje sposobnosti adhezije oba mikroorganizma i posledično smanjenje stvaranja biofilma. Ovo ukazuje na potencijalni supresorski efekat subletalnih koncentracija EU na mehanizme ćelijske adhezije i sinteze matriksa biofilma.

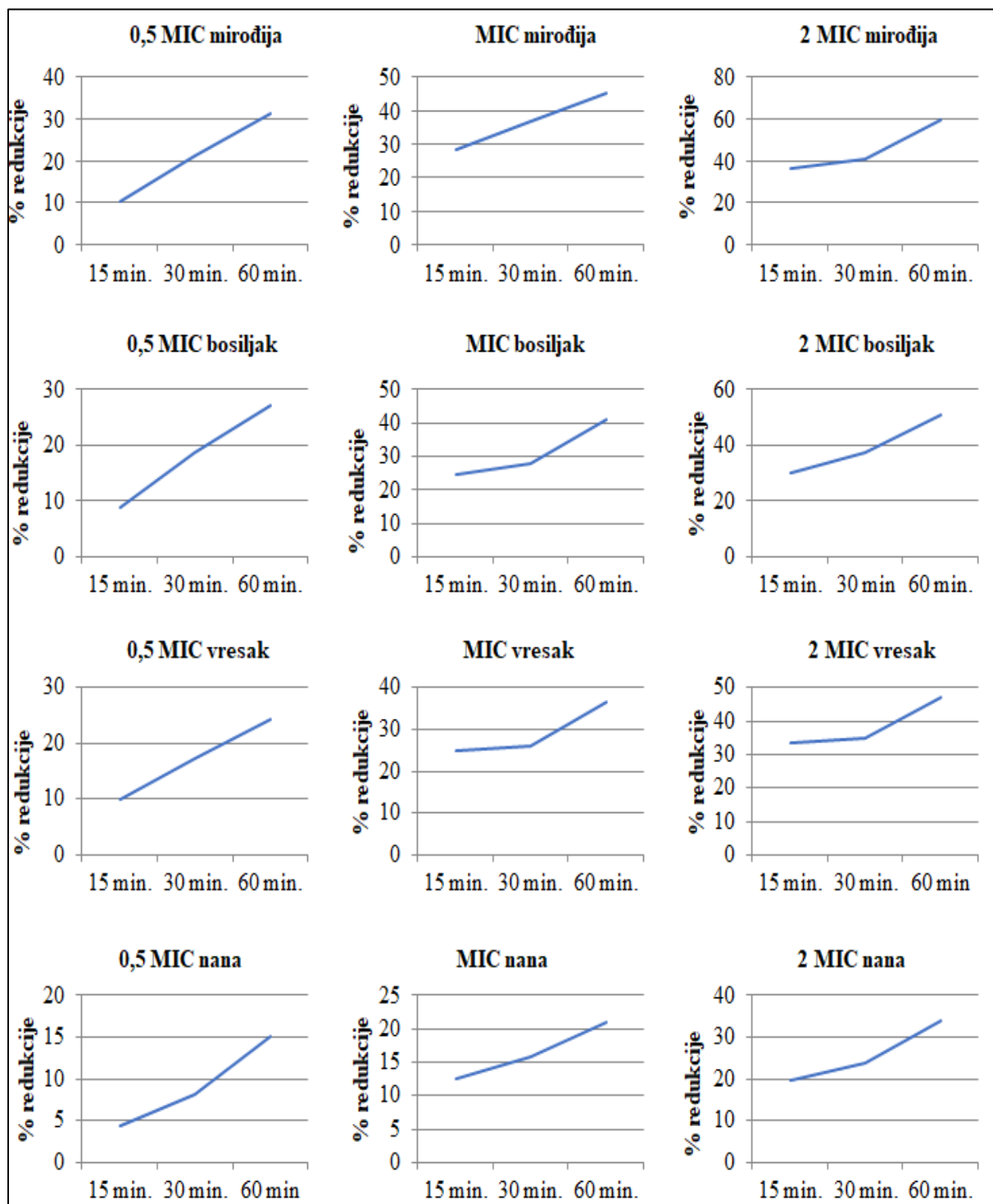
Visok procenat redukcije adheriranih ćelija ispitivanih mikroorganizama koji je postignut pri višim koncentracijama EU (2 MIC) može biti posledica inhibicije ćelijskog rasta ili ćelijske smrti.

Redukcija adheriranih ćelija *E. coli* i *S. Typhimurium* u vrednosti $\geq 50\%$ (MBIC₅₀) postignuta je primenom EU mirođije, bosiljka i vreska koncentracije 0,5 MIC, MIC i 2 MIC. Kod EU nane MBIC₅₀ za oba testirana mikroorganizma je postignuta pri koncentraciji MIC i 2 MIC.

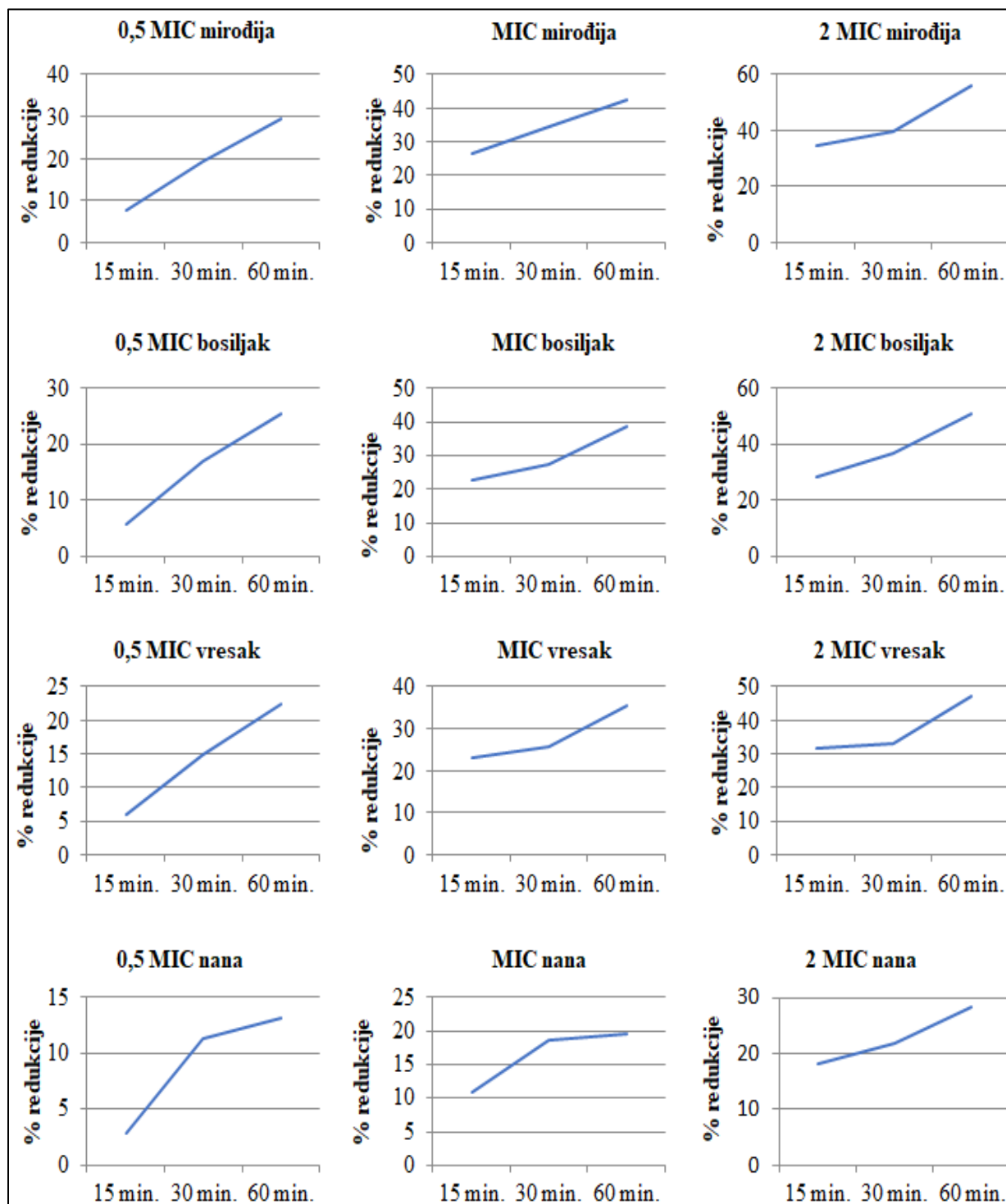
5.12. Uticaj etarskih ulja na prethodno formirani biofilm *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium in vitro*

Rezultati ispitivanja uticaja EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije 0,5 MIC, MIC i 2 MIC tokom različitog vremena delovanja na prethodno formirani biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* u polistirenskim mikrotitar pločama, izraženi kao procenat redukcije ukupne mase biofilma, prikazani su na slikama 5.20 i 5.21.

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 5.20. i 5.21. može se videti da je uticaj EU na prethodno formirani biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* dozno i vremenski zavistan tako da se najveći procenat eradikacije ukupne mase biofilma postiže pri najvećoj primenjenoj koncentraciji (2 MIC) za najduže vreme ekspozicije (60 minuta). Radi lakšeg sagledavanja i poređenja uticaja EU na prethodno formirani biofilm, određena je minimalna biofilm eradikaciona koncentracija (MBEC₅₀) pri kojoj je došlo do redukcije ukupne mase biofilma za $\geq 50\%$. Vrednosti koncentracija EU pri kojima je došlo do redukcije ukupne mase biofilma $\geq 50\%$ prikazane su u tabeli 5.13.



Slika 5.20. Uticaj različitih koncentracija EU mirođije, bosiljka, vreska i nane na prethodno formirani biofilm *E. coli* u funkciji vremena



Slika 5.21. Uticaj različitih koncentracija EU mirođije, bosiljka, vreska i nane na prethodno formirani biofilm *S. Typhimurium* u funkciji vremena

Tabela 5.13. Vrednosti koncentracije EU pri kojima je postignuta minimalna biofilm eradikaciona koncentracija MBEC₅₀ koja je uzrokovala min 50% redukcije ukupne mase biofilma

Etarsko ulje	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
	MBEC ₅₀	MBEC ₅₀
Mirođija	2 MIC ⁶⁰	2 MIC ⁶⁰
Bosiljak	2 MIC ⁶⁰	2 MIC ⁶⁰
Vresak	-	-
Nana	-	-

Kao što se vidi iz prikazanih rezultata u tabeli 5.13. vrednost MBEC₅₀ je postignuta nakon 60 minuta ekspozicije delovanjem EU mirođije i bosiljka koncentracije 2 MIC kod oba ispitivana mikroorganizma. Niže koncentracije EU mirođije i bosiljka kao i kraće vreme ekspozicije nisu dovele do redukcije ukupne mase biofilma u vrednosti $\geq 50\%$.

Tretman prethodno formiranog biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* EU vreska i nane koncentracije 2 MIC u trajanju od 60 minuta nije uzrokovao redukciju ukupne mase biofilma u vrednosti $\geq 50\%$.

Na biofilm *E. coli* najjači uticaj imalo je EU mirođije koncentracije 2 MIC nakon ekspozicije u trajanju od 60 minuta uzrokujući redukciju od 59,90%. Slabiji uticaj istih koncentracija EU (2 MIC), za isto vreme delovanja (60 minuta) pokazala su: EU bosiljka sa redukcijom od 50,86%, EU vreska (47,03%), dok je najslabiji uticaj pokazalo EU nane (34,00%).

Sličan uticaj imala su EU i na biofilm *S. Typhimurium*. Najveći procenat redukcije postignut je korišćenjem EU najveće koncentracije od 2 MIC uz najduže vreme delovanja od 60 minuta prema sledećem redosledu: EU mirođije (56,23%), EU bosiljka (51,23%), EU vreska (47,13%) i EU nane (28,36%). Nakon 60 minuta ekspozicije ni jedno EU najveće primenjene koncentracije od 2 MIC nije dovelo do redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* u vrednosti od 90%. Jedan od razloga ovih rezultata je RDAR morfotip kolonija koji su oba mikroorganizma formirala na KCA, a koji karakteriše formiranje kompleksnog matriksa biofilma sastavljenog većinom od celuloze i fimbrija, koji ometa difuziju antimikrobnih sredstava kroz biofilm.

Shodno očekivanim rezultatima najslabiji uticaj na biofilmove *E. coli* i *S. Typhimurium* imala su EU kada su primenjena u najnižim koncentracijama (0,5 MIC) u kombinaciji sa najkraćim vremenom delovanja u trajanju od 15 minuta. Tokom 15 minuta dejstva EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije 0,5 MIC došlo je do redukcije 10,30%, 8,93%, 9,86% i 4,33% prethodno formiranog biofilma *E. coli*. Ista koncentracija EU za isto vreme ekspozicije dovela je do redukcije 7,80% (EU mirođije), 5,66% (EU bosiljka), 5,96% (EU vreska) i 2,86% (EU nane) prethodno formiranog biofilma *S. Typhimurium*.

S obzirom na ranije pomenutu činjenicu da je narušavanje strukture ćelijske membrane čime se znatno povećava njena propustljivost, jedan od najčešćih mehanizama dejstva antimikrobnih supstanci, niža koncentracija EU i kratko vreme delovanja nisu bili dovoljni da naruše njenu strukturu u toj meri, da bi to uticalo na vijabilnost ćelija. Nasuprot ovome, veća koncentracija antimikrobnih supstanci dovodi do većih oštećenja ćelijske membrane pa i do ćelijske smrti.

Redukcija biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* pod uticajem EU koncentracije MIC i za vreme ekspozicije od 30 minuta iznosila je 36,67% (*E. coli*) i 34,57% (*S. Typhimurium*) primenom EU mirođije, 27,70% (*E. coli*) i 27,30% (*S. Typhimurium*) primenom EU bosiljka, 26,13% (*E. coli*) i 25,56% (*S. Typhimurium*) primenom EU vreska, 15,76% (*E. coli*) i 18,63% (*S. Typhimurium*) primenom EU nane. Poređenjem dobijenih rezultata redukcije biofilma za oba mikroorganizma i za svako ispitivano EU, može se zaključiti da za 60 minuta ekspozicije nije postignut dvostruko veći procenat redukcije biofilma u odnosu na ekspoziciju u trajanju od 30 minuta. Ovakav način delovanja EU u zavisnosti od vremena prikazan je u istraživanju sprovedenom od strane Somrani i sar. (2020). Pomenuti autori su ispitivali uticaj EU crnog luka, belog luka i cimeta, koncentracije 0,5 MIC, MIC i 2 MIC na biofilm *L. monocytogenes* u trajanju od 1, 5 i 20 h. Sva tri EU najveće primenjene koncentracije od 2 MIC su uzrokovala najveću redukciju biofilma, ali za najkraće vreme delovanja (1 h). Prema tome vreme izloženosti biofilma antimikrobnim sredstvima ne igra ključnu ulogu za njegovu redukciju. Ovo se objašnjava time da ćelije biofilma „smanjuju“ svoju metaboličku aktivnost, postepeno prvo one koje se nalaze u najdubljim slojevima biofilma usled nedostatka hranljivih materija i kiseonika, postajući time otpornije prema delovanju antimikrobnih sredstava koja su efikasnija prema metabolički aktivnim ćelijama (Sandasi i sar., 2010). Dozno-vremenska zavisnost na redukciju prethodno formiranog biofilma u polistirenskim mikrotitar pločama (48 h star biofilm) dva izolata *S. Enteritidis*, pod uticajem različitih koncentracija (0,5 MIC, MIC, 2 MIC, 4 MIC), EU origana (*Origanum heracleoticum* i *Origanum vulgare*), EU majčine dušice (*Thymus serpyllum* i *Thymus vulgaris*), karvakrola i timola, prikazana je u rezultatima studije autora Čabarkapa i sar. (2019). Pomenuti autori su ustanovili da je pod uticajem najveće primenjene koncentracije EU, karvakrola i timola od 4 MIC i za najduže vreme ekspozicije od 60 minuta zabeležen najveći procenat eradikacije biofilma. Ovakav način delovanja EU na prethodno formirani biofilm autori su objasnili time da sa produženjem vremena izlaganja biofilma delovanju EU, dolazi do veće difuzije EU kroz matriks biofilma.

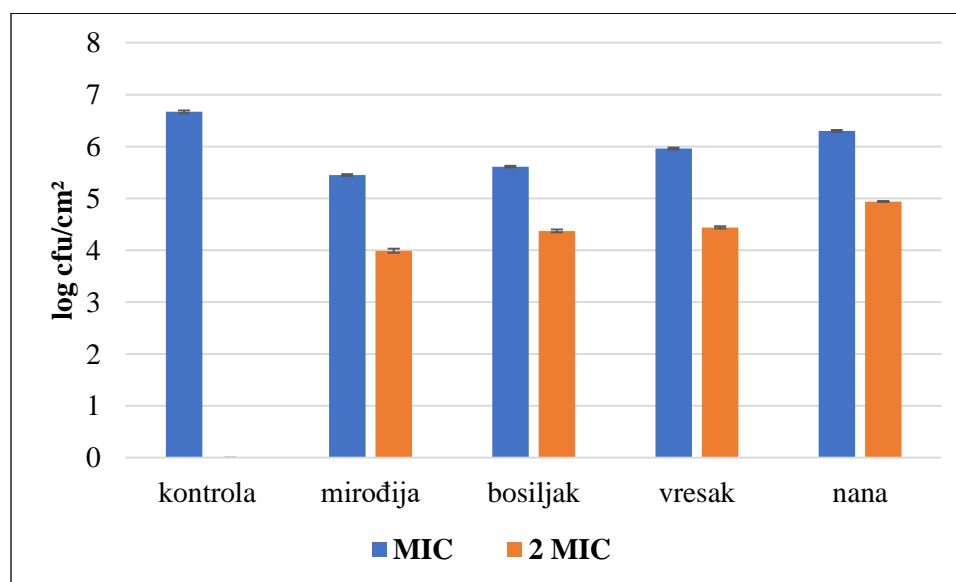
Poređenjem rezultata prikazanih od strane Somrani i sar. (2020) i Čabarkapa i sar. (2019), može se zaključiti da najveći uticaj na procenat redukcije ukupne mase biofilma ima primenjena koncentracija EU, dok s druge strane, vreme delovanja EU ima uticaja, ali ne dovodi do linearnog povećanja procenta redukcije ukupne mase biofilma, što pokazuju i rezultati ove studije.

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja EU na inicijalnu ćelijsku adheziju i prethodno formirani biofilm pokazuju da je slabiji efekat EU na prethodno formirani biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* u odnosu na efekat istih koji je postignut na inicijalnu ćelijsku adheziju, i može se objasniti

prisustvom ekstracelularnog polimernog matriksa u biofilmu, koji deluje kao difuziona barijera i dilucioni gradijent.

5.13. Uticaj etarskih ulja na prethodno formirani biofilm *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* na lisnoj površini povrća

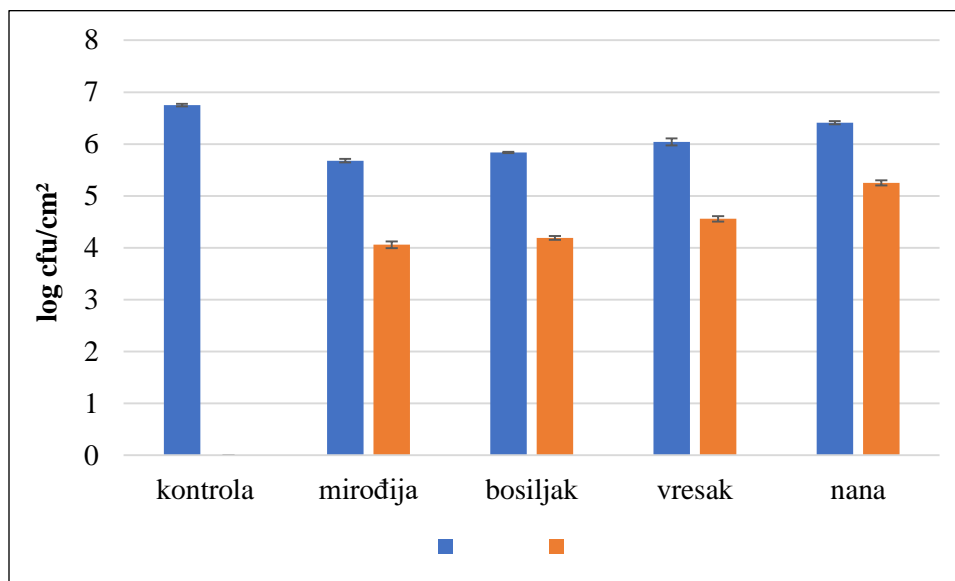
Uticaj EU na biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* formiran na lisnoj površini zelene salate analiziran je sa aspekta određivanja broja vijabilnih ćelija nakon izlaganja prethodno formiranog biofilma koncentracijama EU u vrednosti MIC i 2 MIC. Na slikama 5.22. i 5.23. prikazan je broj preostalih vijabilnih ćelija biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* nakon delovanja EU mirođije, bosiljka, vresaka i nane koncentracije MIC i 2 MIC.



Slika 5.22. Broj vijabilnih ćelija biofilma *E. coli* formiranog na površini lista zelene salate (log cfu/cm²) nakon dejstva EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije MIC i 2 MIC

Iz prikazanih rezultata na slikama 5.22. i 5.23. vidi se da je uticaj EU na biofilmove *E. coli* i *S. Typhimurium* prethodno formirane na površini lista zelene salate dozna zavistan. Najveći uticaj na biofilmove oba mikroorganizma imalo je EU mirođije koncentracije 2 MIC uzrokujući smanjenje broja vijabilnih ćelija biofilma za 2,69 log cfu/cm² kod *S. Typhimurium* odnosno 2,68 log cfu/cm² kod *E. coli*. Ista koncentracija EU nane (2 MIC) imala je najmanji efekat uzrokujući smanjenje broja vijabilnih ćelija biofilma *S. Typhimurium* za 1,5 log cfu/cm² odnosno za 1,73 log cfu/cm² kod *E. coli*. Koncentracija EU mirođije koja je odgovarala vrednosti MIC, dovela je do smanjenja broja vijabilnih ćelija biofilma *S. Typhimurium* za 1,07 log cfu/cm², odnosno za

1,22 log cfu/cm² kod *E. coli*, što je znatno više u odnosu na istu koncentraciju EU nane koje je pokazalo najslabiji uticaj na biofilmove oba mikroorganizma redukujući broj vijabilnih ćelija biofilma *S. Typhimurium* za 0,34 log cfu/cm², odnosno za 0,37 log cfu/cm² kod *E. coli*.



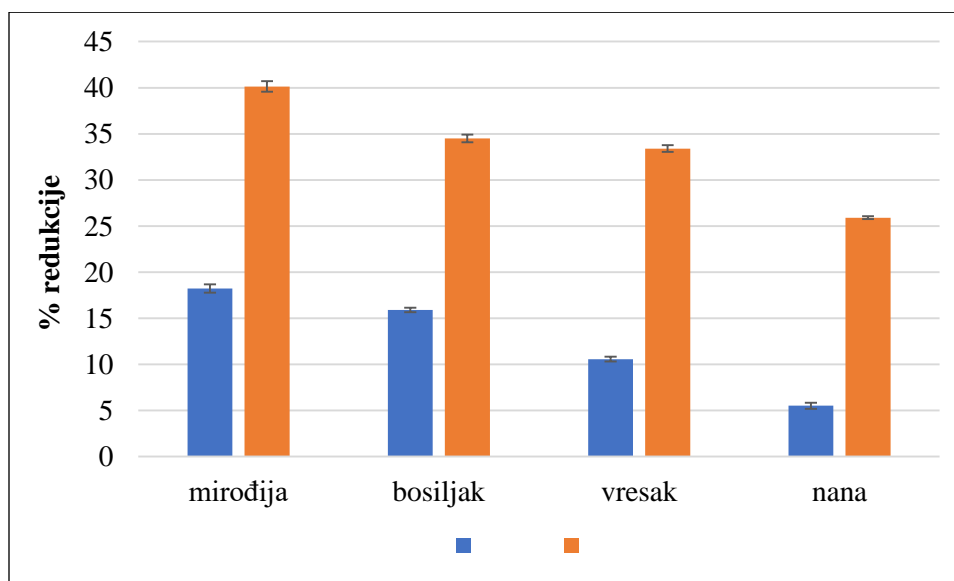
Slika 5.23. Broj vijabilnih ćelija biofilma *S. Typhimurium* formiranog na površini lista zelene salate (log cfu/cm²) nakon dejstva EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije MIC i 2 MIC

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja EU na prethodno formirani biofilm u ovoj studiji potvrđuju ranije iznetu konstataciju Borges i sar. (2017), da sa povećanjem koncentracije EU broj vijabilnih ćelija biofilma opada.

Prema Burt i sar. (2004), dejstvo EU koncentracije MIC i 2 MIC na biofilm zasniva se na inhibiciji rasta i naknadne ćelijske smrti usled interakcije EU sa lipidnim slojem citoplazmatske membrane što dovodi do njenog oštećenja, i do curenja ćelijskog sadržaja. Za neka antimikrobna jedinjenja kao što su timol i karvakrol se pretpostavlja da prodirući u matriks biofilma usled njihove hidrofilne prirode dolazi do odvajanja ćelijskih aglomerata i time narušavanja strukture biofilma (Nostro i sar., 2007).

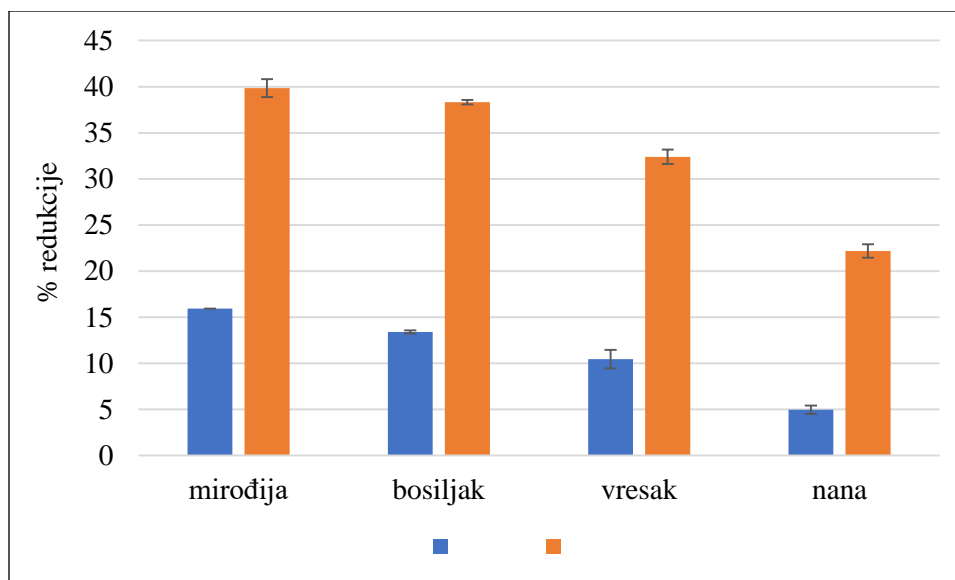
Soni i sar. (2013), su sproveli kompleksno ispitivanje tri laboratorijska tipska soja *S. Typhimurium* iz ATCC kolekcije mikroorganizama - *S. Typhimurium* ATCC 23564, *S. Typhimurium* ATCC 19585 i *S. Typhimurium* ATCC 14028, koje je obuhvatilo ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma u polistirenskim mikrotitar pločama na temperaturama inkubiranja od 22, 30 i 37 °C, kao i uticaj EU origana i majčine dušice i čiste komponente karvakrola različite koncentracije na sposobnost formiranja biofilma i prethodno formirani biofilm. Rezultati ovih ispitivanja su pokazali da su sojevi *S. Typhimurium* ATCC 19585 i 23564 jači biofilm produceri u odnosu na soj *S. Typhimurium* ATCC 14028 pri čemu su sva tri ispitivana soja formirala 1,5-2 puta jače biofilmove na temperaturi inkubiranja od 22 °C u odnosu na biofilmove koje su formirali na temperaturama inkubiranja od 30 °C i 37 °C, do čega

je došlo usled temperaturne zavisnosti ekspresije glavnog transkripcionog regulatora *csgD*. Uticaj subletalnih koncentracija (0,006 i 0,012%) karvakrola, EU majčine dušice i origana na sposobnost formiranja biofilma na 22 °C tokom 24 h, bio je najveći kod soja *S. Typhimurium* ATCC 14028 kod koga je nakon isteka 24 h izmerena najmanja masa biofilma primenom kristal violet testa, a što je autore navelo na zaključak da je redukcija formiranog biofilma u funkciji soja i koncentracije antimikrobnog sredstva. Delovanjem letalnih koncentracija (0,05 i 0,1%) karvakrola i EU majčine dušice i origana na 24 h star biofilm kod sva tri ispitivana soja *S. Typhimurium* došlo je do znatne redukcije ukupne mase biofilma, pri čemu je redukcija veća primenom veće koncentracije antimikrobnog sredstva.



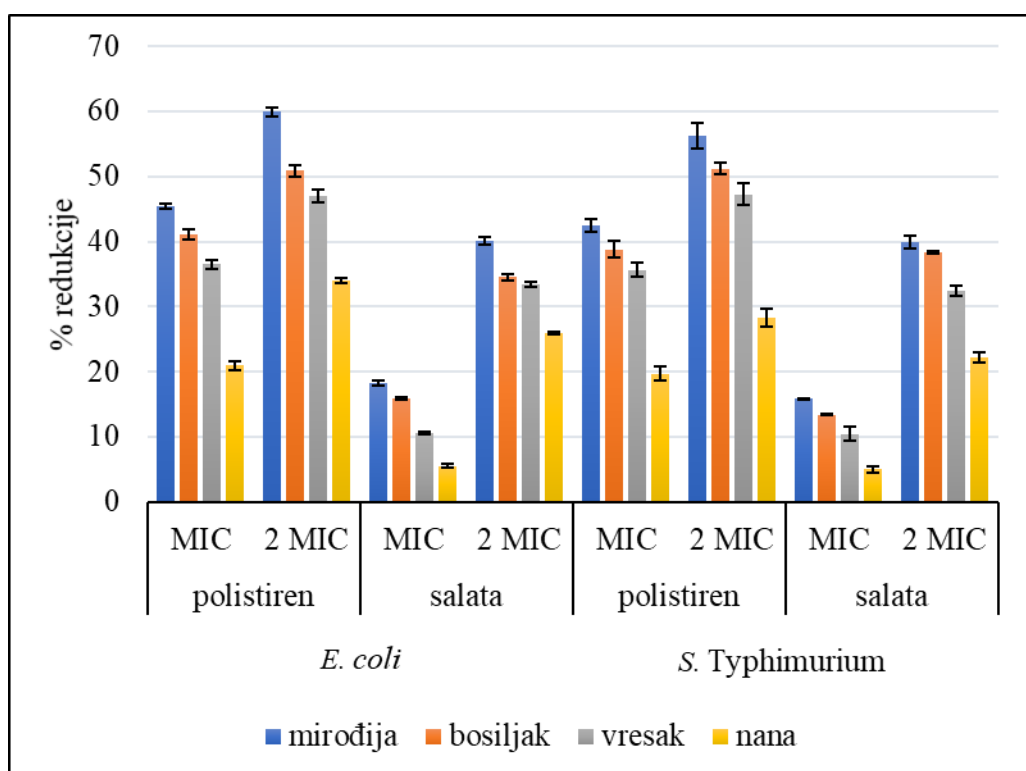
Slika 5.24. Redukcija ukupne mase biofilma *E. coli* formiranog na površini lista zelene salate nakon dejstva EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije MIC i 2 MIC

Rezultati ispitivanja koja su predmet ove doktorske disertacije su pokazala da je najveći procenat redukcije ukupne mase biofilma kod oba mikroorganizma postignut je delovanjem EU mirođije koncentracije 2 MIC pri čemu je postignuta redukcija 40,14% biofilma *E. coli* odnosno 39,84% biofilma *S. Typhimurium* (slike 5.24 i 5.25). Ista koncentracija EU nane (2 MIC) ispoljila je najslabije dejstvo na biofilm *S. Typhimurium* redukujući ga 22,18% odnosno 25,90% koliko je postignuta radukcija biofilma *E. coli*. Delovanjem EU koncentracije koja je odgovarala MIC došlo je do redukcije biofilma *S. Typhimurium* i to 15,93% pod dejstvom EU mirođije, 13,41% pod dejstvom EU bosiljka, 10,46% pod dejstvom EU vreska i 4,98% pod dejstvom EU nane. Iste koncentracije EU (MIC) uzrokovale su redukciju biofilma *E. coli* i to 18,23% (EU mirođije), 15,89% (EU bosiljka), 10,57% (EU vreska) i 5,52% (EU nane).



Slika 5.25. Redukcija ukupne mase biofilma *S. Typhimurium* formiranog na površini lista zelene salate nakon dejstva EU mirođije, bosiljka, vreska i nane koncentracije MIC i 2 MIC

Ni jedno od korišćenih EU ni u jednoj koncentraciji nije dovelo do potpunog razaranja strukture biofilma a time i njegovog uklanjanja.



Slika 5.26. Uporedni prikaz procenta redukcije ukupne mase biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* formiranog u polistirenskoj mikrotitar ploči i na površini lista zelene salate

Ispitujući uticaj EU karanfilića na biofilm *E. coli* O157:H7 formiran na površini kupona od nerđajućeg čelika i na površini kupona lista zelene salate Cui i sar. (2016), su ustanovili da je procenat redukcije biofilma na kuponu od nerđajućeg čelika veći u odnosu na redukciju biofilma na površini kupona lista zelene salate. Ispitivanja Rossi i sar. (2019), su pokazala veći afinitet salmonela da se vežu za površinu listova zelene salate i formiraju biofilm u odnosu na kupone od nerđajućeg čelika i polipropilena. To je autore dovelo do zaključka da karakteristika površine kao što je hrapavost sem što utiče na afinitet i stepen vezivanja mikroorganizama, može i da smanji efikasnost EU na formirani biofilm.

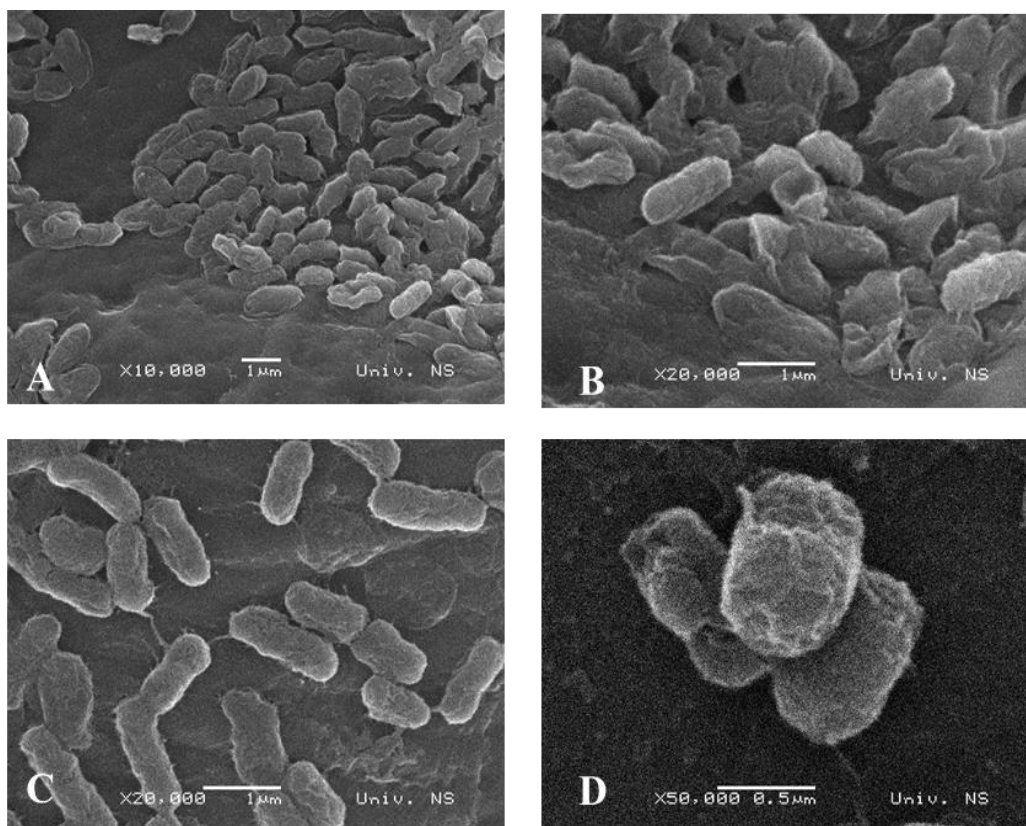
Sem hrapavosti i druge karakteristike biljne površine kao što je prisustvo voštane prevlake i prisustvo stoma sem što pozitivno utiču na adheziju salmonela i formiranje biofilma, mogu i da pruže delimičnu mehaničku zaštitu prema dejstvu antimikrobnih sredstava (Hunter i sar., 2015).

Rezultati dobijeni u ovoj studiji o uticaju EU koncentracije MIC i 2 MIC na biofilm formiran *in vitro* u polistirenskim mikrotitar pločama i na kuponima lista zelene salate su u korelaciji sa napred iznetom konstatacijom i prikazani su na slici 5.26. gde se uočava manji procenat redukcije biofilma oba mikroorganizma formiranog na kuponima lista zelene salate u odnosu na biofilm formiran u polistirenskim mikrotitar pločama.

5.14. SEM biofilmova *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium* formiranih na površini lista zelene salate nakon delovanja etarskih ulja

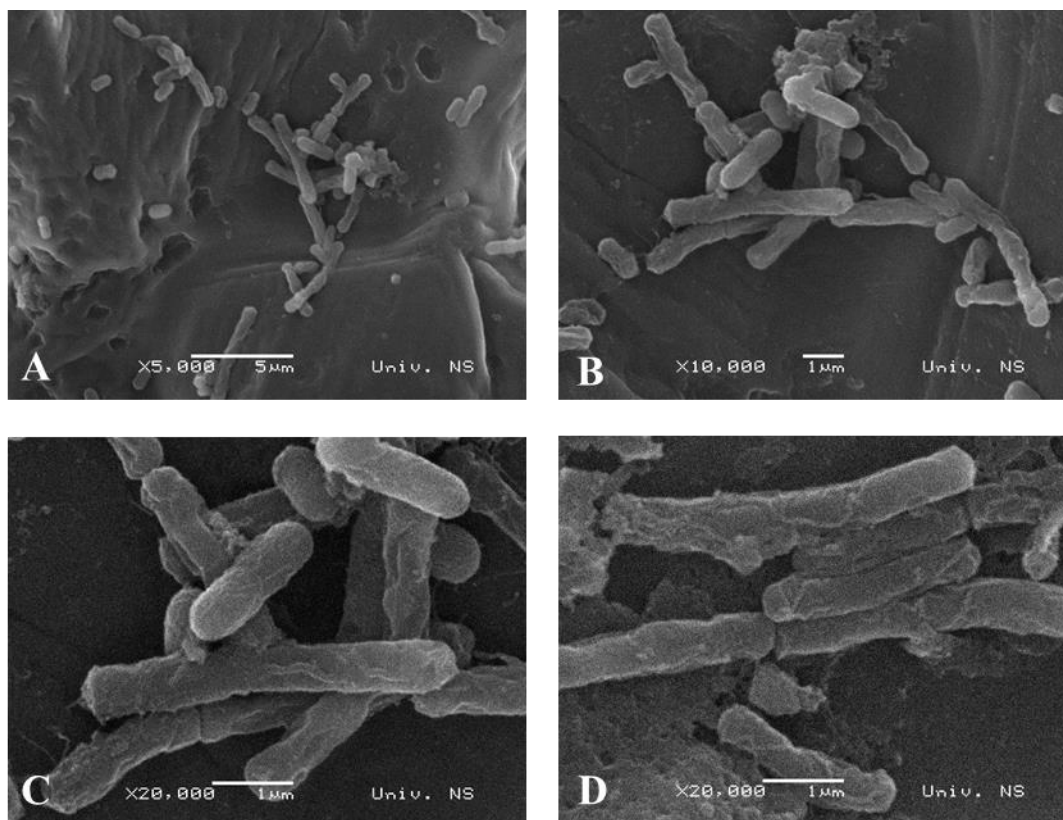
Za prikaz uticaja EU na biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* prethodno formiran na površini lista zelene salate, odabrane su SEM mikrografije koje prikazuju delovanje EU mirođije koncentracije 2 MIC koje je pokazalo najbolje rezultate sa aspekta redukcije primarne ćelijske adhezije i biofilma kod oba testirana mikroorganizma.

SEM mikrografije prikazane na slikama 5.27. A i C, kao i 5.28. A i C prikazuju narušene delove biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* nakon delovanja EU mirođije koncentracije 2 MIC u vidu manjih mikrokolonija, a bez većih ćelijskih aglomerata koji se uočavaju kao sastavni deo biofilma. Na slici 5.27. B prikazane su izrazito deformisane ćelije *E. coli* usled curenja unutarćelijskog sadržaja pod dejstvom EU (Miladi i sar., 2017).



Slika 5.27. SEM mikrografije biofilma *E. coli* nakon izloženosti delovanju etarskog ulja mirođije koncentracije 2 MIC (A - uvećanje 10000 ×, B i C - 20000 ×, D - 50000 ×)

Narušavanje strukture ćelijskog zida može se jasno uočiti na slici 5.27. - D kod ćelija biofilma *E. coli*, koje se uočava izrazito hrapavom strukturom. Iste promene se mogu uočiti i kod ćelija biofilma *S. Typhimurium*, što je prikazano na slici 5.28. - C. Ispitujući uticaj EU semena komorača (*Foeniculum vulgare*) na biofilm *Shigella dysenteriae* Diao i sar. (2014), su utvrdili da EU mogu promeniti morfološke i fizičke osobine bakterija. SEM mikrografije ovih autora otkrile su opsežne morfološke i fizičke promene ćelijske membrane, što bi moglo biti uzrok gubitka unutarćelijskih komponenti kao što su DNK i ATP i oštećenja enzimskih sistema ćelije. Dakle ćelijska membrana je bila prva meta delovanja EU, a njen integritet je presudan za preživljavanje ćelija jer predstavlja ključni element za osnovne biološke aktivnosti koje se odvijaju u ćelijama. Iako je još uvek nepoznanica na kojim mestima dolazi do oštećenja lipopolisaharida ili membranskih proteina uzrokujući morfološke i fizičke promene, krajnji rezultat je dekompozicija ćelija i njihova smrt uz smanjenje broja vijabilnih ćelija u biofilmu (Lu i sar., 2011).

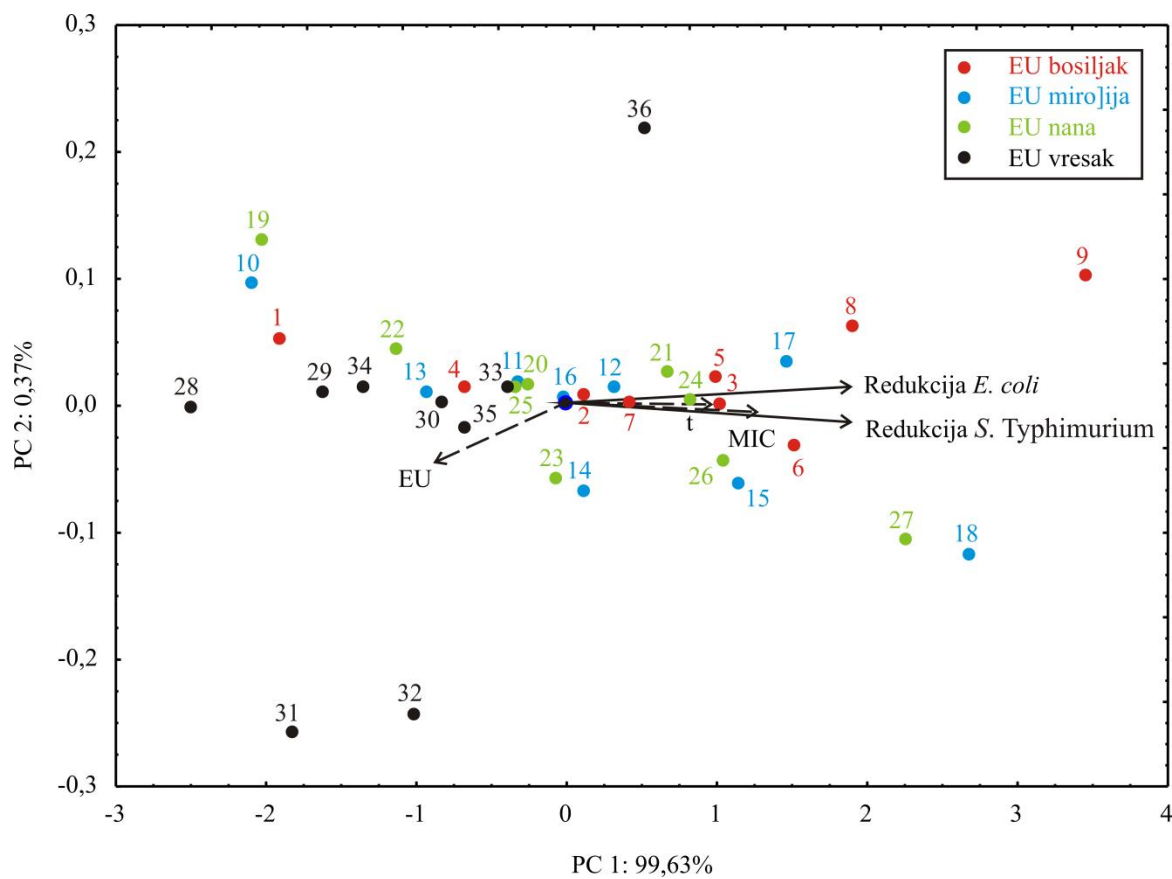


Slika 5.28. SEM mikrografije biofilma *S. Typhimurium* nakon izloženosti delovanju EU mirođije koncentracije 2 MIC (A - uvećanje 5000 ×, B - 10000 ×, C i D - 20000 ×)

5.15. Analiza glavnih komponentata (PCA analiza)

Analiza glavnih komponentata, odnosno faktorskih koordinata pri čemu svaka faktorska koordinata sadrži izvestan deo varijanse ispitivanih parametara (u ovom slučaju to je redukcija biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium*, u zavisnosti od vremena delovanja, vrste EU i koncentracije EU) kao ortogonalna transformacija, primenjena je za prikazivanje i grupisanje rezultata (praćenjem mogućih korelacija među grupama podataka) u faktorskoj ravni na osnovu rezultata eksperimentalnih merenja.

Tačke prikazane na PCA dijagramu (slika 5.29) koje su geometrijski blizu jedna drugoj, ukazuju na sličnost uzoraka koje predstavljaju (na osnovu eksperimentalnih merenja). U ovom slučaju to se odnosi na najveći procenat redukcije biofilma oba ispitivana mikroorganizma uz primenu EU najveće koncentracije (2 MIC) za najduže vreme ekspozicije (60 minuta). Ukoliko glavne komponente pokrivaju veći deo ukupne varijanse, onda su i merene vrednosti iz eksperimentalnih merenja slične za geometrijski bliske tačke na PCA dijagramu.



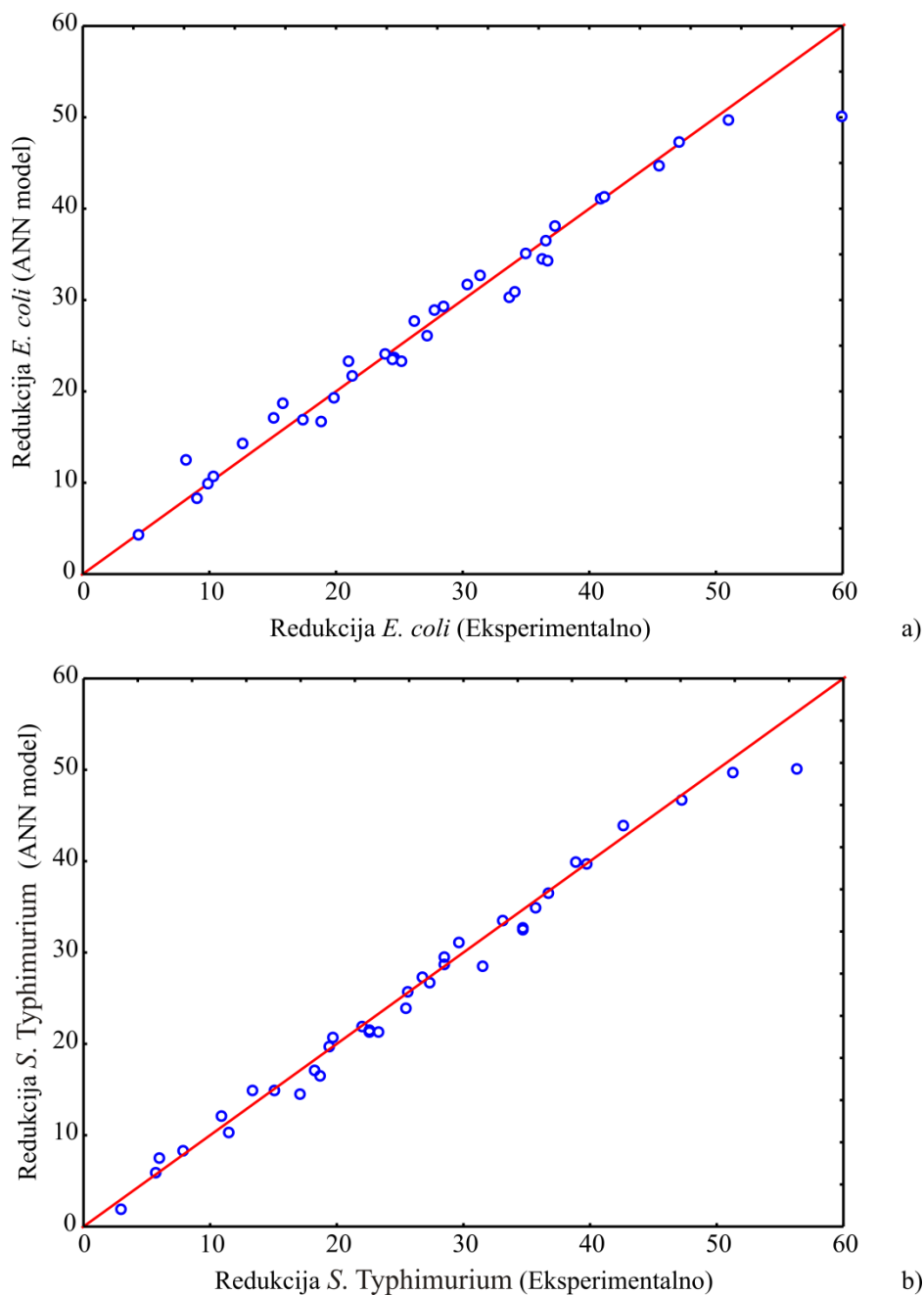
Slika 5.29. Grafički prikaz PCA: raspored polova i uzoraka (redukcija biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* pod uticajem različitih koncentracija EU, pri različitom vremenu ekspozicije) u faktorskoj ravni

Usmerenost vektora koji opisuju promenljivu u faktorskom dijagramu (obeleženo kao EU, t i MIC) ukazuje na trend porasta te promenljive, a dužina vektora je proporcionalna kvadratnoj vrednosti korelacije između fitovanih vrednosti za promenljivu i same promenljive.

5.16. Veštačke neuronske mreže

ANN model je predvideo eksperimentalne promenljive redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* za širok spektar procesnih promenljivih (različito vreme delovanja i različite koncentracije EU). U tome je i suština matematičkog modelovanja, da se na osnovu eksperimentalnih podataka, koristeći eksperimentalni plan, predvide vrednosti, u ovom slučaju procenat redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* pod uticajem različitih koncentracija EU za različito vreme ekspozicije.

Tačnost ANN modela se može vizuelno proceniti na osnovu raspodele tačaka oko dijagonalne linije na graficima predstavljenim na slici 5.30. Za model ANN predviđene vrednosti su u većini slučajeva bile vrlo blizu izmerenih vrednosti.



Slika 5.30. ANN model raspodele tačaka oko dijagonalne linije za *E. coli* (a) i *S. Typhimurium* (b)

Korišćeni MLP su označeni u *StatSoft Statistica* programu na sledeći način: nakon oznake MLP sledi broj ulaza, broj neurona u skrivenom sloju, a zatim broj izlaza. Optimalni broj skrivenih neurona je izabran minimiziranjem razlika između vrednosti predviđenih mrežom i onih eksperimentalno dobijenih. Kao indikatori performanse mreža korišćene su sume r^2 i sume SOS između merenih i izračunatih izlaza za svaku dobijenu ANN, tokom faza učenja, testiranja i validacije (Arsenović, 2013). U ovom istraživanju broj skrivenih neurona je varirao od $n = 3 - 10$, optimalno 4, što je predloženo korišćenim programom (*StatSoft Statistica*). Bilo je $x = 8$ ulaza, $y = 2$ izlaza, i $m = 46$ težinskih koeficijenata. Za modelovanje ANN korišćen je BFGS

algoritam, koji je ugrađen u korišćeni program (tabela 5.14). Prenosna funkcija za skrivene i izlazne slojeve, je bila tangens hiperbolikus funkcija. Rezultati za predviđanje redukcije biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium* tokom testiranja prikazani su u tabeli 5.15. Tabela 5.15. prikazuje r^2 vrednosti za svaku od proučavanih promenljivih tokom faza učenja, testiranja i validacije.

Tabela 5.14. Rezime modela veštačke neuronske mreže (performanse i greške) za cikluse treninga, testiranja i validacije

Mreža	Performanse			Greška			Trening algoritam	Funkcija greške	Funkcija aktivacije	
	Trening	Test	Validacija	Trening	Test	Validacija			skriveni	izlazni
MLP 8-4-2	0,995	0,994	0,999	1,448	3,202	17,334	BFGS 38	SOS	Tanh	Tanh

Termin „performansa“ predstavlja koeficijente determinacije (r^2), dok termin „grešaka“ ukazuju na nedoslednost podataka za ANN model.

Vrednosti r^2 između eksperimentalnih merenja i izlaza ANN modela, tokom ciklusa treninga, *E. coli* i *S. Typhimurium* bile su: 0,995 i 0,996, respektivno što je prikazano u tabeli 5.15. Na osnovu prikazanih vrednosti (r^2) može se zaključiti da se eksperimentalni podaci i matematički modeli zadovoljavajuće i statistički značajno poklapaju.

Tabela 5.15. Koeficijenti determinacije (r^2) između eksperimentalno izmerenih i ANN izlaza tokom ciklusa treninga, testiranja i validacije

	Redukcija <i>E. coli</i>	Redukcija <i>S. Typhimurium</i>
Trening	0,995	0,996
Testiranje	0,999	0,988
Validacija	0,999	0,999

U tabeli 5.16. su predstavljeni elementi matrice W_1 i vektora B_1 , za skriveni sloj, a u tabeli 5.17. su predstavljeni elementi matrice W_2 i vektora B_2 za izlazni sloj, korišćeni za proračun u jednačini 4.2.

Tabela 5.16. Elementi matrice W_1 i vektora B_1 (prikazan u redu)

	1	2	3	4
t	1,834	1,853	-0,357	-1,652
0,5 MIC	-1,438	-2,306	0,793	0,011
2 MIC	0,124	1,063	-0,576	-0,462
MIC	-0,713	0,481	-0,021	-0,456
EU bosiljak	0,013	0,484	0,023	-0,230
EU mirođija	0,125	0,378	-0,641	-0,064
EU nana	-1,738	-1,099	0,843	-0,185
EU vresak	-0,415	-0,582	0,020	-0,315
Nulti član	-2,006	-0,758	0,168	-0,849

Tabela 5.17. Elementi matrice W_2 i vektora B_2 (prikazan u koloni)

	1	2	3	4	Nulti član
Redukcija biofilma <i>E. coli</i>	1,447	0,020	-0,307	-1,193	0,841
Redukcija biofilma <i>S. Typhmuriium</i>	1,383	0,011	-0,300	-1,164	0,765

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Određivanjem morfotipa kolonija na KCA izolati *E. coli* na nižoj temperaturi inkubiranja od 25 °C formirali su morfotip RDAR (42,0%), SAW (29,0%), BDAR (17,0%) i RAS (12,0%). Na višoj temperaturi inkubiranja od 37 °C morfotip RDAR formiralo je 38,0% izolata, SAW (29,0%), BDAR (21,0%) i RAS (12,0%) izolata *E. coli*. Laboratorijski tipski soj *S. Typhimurium* formirao je RDAR morfotip na temperaturi od 25 °C i SAW morfotip na 37 °C.
- Kvantifikacijom ukupne mase biofilma formiranog u mikrotitar pločama na temperaturi inkubiranja od 25 °C primenom kristal violet testa, testirani izolati *E. coli* klasifikovani su na jake biofilm producere (12,5%), umerene (41,7%), slabe (25,0%) i one koji ne formiraju biofilm (20,8%). Pri temperaturi inkubiranja od 37 °C, 8,3% testiranih izolata svrstano je u jake biofilm producere, 25,0% u umerene, 25,0% u slabe i 41,7% izolata u one koji ne formiraju biofilm na ovoj temperaturi.
- Temperatura inkubiranja imala je značajnog uticaja na sposobnost formiranja biofilma u smislu većeg broja testiranih izolata *E. coli* koji su svrstani u jake biofilm producere pri temperaturi od 25 °C u odnosu na temperaturu od 37 °C, gde veći procenat izolata nije formirao biofilm.
- U poređnom analizom rezultata primenjenih skrining testova za određivanje sposobnosti formiranja biofilma na obe temperature, uočena je pozitivna korelacija između broja izolata *E. coli* koji su formirali RDAR morfotip i broja izolata koji su svrstani u jake biofilm producere.
- Ispitivanjem sposobnosti preživljavanja u zemljištu pri promenljivim i konstantnim uslovima relativne vlažnosti i temperature, ustanovljeno je prisustvo vijabilnih ćelija oba testirana mikroorganizma nakon 120 dana inkubiranja. Broj preživelih ćelija bio je veći u uslovima konstantne relativne vlažnosti i temperature.
- Sadržaj slobodne vode u zemljištu (a_w) je nakon 120 dana pri promenljivim uslovima relativne vlažnosti i temperature bio niži za 55,10%, dok je pri konstantnim uslovima relativne vlažnosti i temperature bio niži za 26,53% u odnosu na početnu vrednost, što je uticalo na veći broj preživelih ćelija oba testirana mikroorganizma pri konstantnim uslovima relativne vlažnosti i temperature.
- Step adhezije na površinu lista zelene salate na temperaturi inkubiranja od 25 °C tokom 3 h, za *S. Typhimurium* iznosio je $6,75 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,023$, a za *E. coli* $6,64 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,028$. Step adhezije oba izolata na temperaturi inkubiranja od 37 °C za isto vreme ekspozicije je bio niži i za *S. Typhimurium* je iznosio $3,76 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,041$ a za *E. coli* $6,01 \log \text{ cfu/cm}^2 \pm 0,063$. Na temperaturi inkubiranja od 25 °C oba testirana mikroorganizma su pokazala sličan step adhezije. Međutim temperatura inkubiranja od 37 °C različito je uticala na step adhezije ispitivanih mikroorganizama, generalno

ga redukujući, pri čemu je kod *S. Typhimurium* redukcija čak 50%, dok je kod *E. coli* 10%. Različit uticaj temperature na adherentnu sposobnost bakterija na biotičke i abiotičke površine je u korelaciji sa uticajem temperature na formiranje RDAR morfotipa i posledično u zavisnosti od formiranog morfotipa, na sintezu komponenti matriksa biofilma.

- Primenom SEM omogućena je vizuelizacija formiranih biofilmova odabranog izolata *E. coli* i *S. Typhimurium* na površini lista zelene salate. Rezultati su prikazani u vidu setova mikrografija različitog uvećanja. Na mikrografijama manjeg uvećanja uočava se stepen adheriranih bakterijskih ćelija za lisnu površinu i formiranje ćelijskih agregata koji su sastavni deo biofilma, dok se na mikrografijama većeg uvećanja uočava interkonekcija između ćelija i formirani matriks biofilma. Ista tehnika posmatranja biofilma nakon njegovog izlaganja dejstvu EU omogućila je vizuelizaciju oštećenja ćelija, koja se ogledaju u vidu ćelija promenjenog oblika, netipične hrapave površine usled curenja unutarćelijskog sadržaja, često sa rupturama na površini, nastalim pod uticajem EU.
- Rezultati ispitivanja hemijskog sastava EU bosiljka, mirođije, nane i vreska pokazala su da sva ulja sadrže visok procenat monoterpena. Najzastupljenije identifikovano jedinjenje EU bosiljka je linalool (69,2%) i ovo ulje pripada evropskom hemotipu za koji je karakterističan visok sadržaj linaloola. Najzastupljenija jedinjenja u EU nane su mentol (30,8%) i menton (28,8%) i ovo ulje pripada hemotipu 9, koji je definisan mentolom kao dominantnim jedinjenjem. Dominantna jedinjenja u EU vreska su p-cimen (33,8%) i karvakrol (32,9%) i ovo ulje pripada hemotipu A, za koji je karakterističan visok udeo karvakrola. U EU mirođije najzastupljenija identifikovana jedinjenja su karvon (66,6%) i limonen (25,3%) i ovo ulje pripada hemotipu 3, koji je definisan sa ova dva jedinjenja kao dominantna.
- Najbolji antimikrobni potencijal prema *E. coli* i *S. Typhimurium* pokazalo je EU mirođije sa MIC i MBC vrednostima od 3,55 $\mu\text{l/ml}$ za oba mikroorganizma. Sledi EU bosiljka i vreska (sa MIC/MBC vrednostima od 7,10 $\mu\text{l/ml}$ za oba mikroorganizma), dok je najmanji antimikrobni potencijal pokazalo EU nane, sa najvišim vrednostima za MIC i MBC (MIC/MBC = 14,20 $\mu\text{l/ml}$ za *E. coli* i MIC/MBC = 56,81 $\mu\text{l/ml}$ za *S. Typhimurium*).
- Etarska ulja su na inicijalnu ćelijsku adheziju *E. coli* i *S. Typhimurium* na kupone lista zelene salate pokazala dozno zavistan uticaj. Najveći inhibitorni efekat zabeležen je korišćenjem EU koncentracija u vrednosti od 2 MIC, prema sledećem redosledu: EU mirođije > EU bosiljka > EU vreska > EU nane.
- Redukcija adheriranih ćelija *E. coli* i *S. Typhimurium* u vrednosti $\geq 50\%$ (MBIC₅₀) postignuta je primenom EU mirođije, bosiljka i vreska u koncentraciji od 0,5 MIC, MIC i 2 MIC i EU nane koncentracije MIC i 2 MIC.
- Ispitivana EU su na prethodno formirani biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* u polistirenskim mikrotitar pločama - *in vitro* pokazala uticaj koji je dozno i vremenski zavistan tako da je najveći procenat eradikacije biofilma postignut nakon 60 minuta

ekspozicije primenom EU koncentracije 2 MIC prema sledećem redosledu: EU mirođije > EU bosiljka > EU vreska > EU nane.

- Redukcija ukupne mase biofilma formiranog *in vitro* u iznosu $\geq 50\%$ (MBEC₅₀) postignuta je primenom EU mirođije i bosiljka koncentracije 2 MIC za vreme ekspozicije od 60 minuta.
- Etarska ulja su na biofilm *E. coli* i *S. Typhimurium* formiran na kuponima lista zelene salate ispoljila dozno zavistan uticaj. Najefikasnije je bilo EU mirođije koncentracije 2 MIC, a najmanje efikasno EU nane koncentracije MIC. Najveći procenat redukcije ukupne mase biofilma oba mikroorganizma zabeležen je korišćenjem EU koncentracije 2 MIC, prema sledećem redosledu: mirođija > bosiljak > vresak > nana. Ni jedno od korišćenih EU koncentracije 2 MIC nije dovelo do redukcije ukupne mase biofilma u vrednosti $\geq 50\%$. Poređenjem rezultata redukcije ukupne mase biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium*, formiranog na kuponima lista zelene salate sa rezultatima redukcije ukupne mase biofilma formiranog u polistirenskim mikrotitar pločama, veći procenat redukcije zabeležen je kod biofilmova formiranih u polistirenskim mikrotitar pločama. Hrapavost površine lista zelene salate je ograničila kontakt između EU i biofilma *E. coli* i *S. Typhimurium*, što je dovelo do manjeg procenta redukcije.

Prikazani rezultati ispitivanja antimikrobne i antibiofilm aktivnosti EU začinskih biljaka u cilju prevencije nastanka i eliminacije već formiranih biofilmova, mogu da doprinesu kao osnova za njihovu praktičnu primenu u recepturama za salatne prelive, zatim mogu da se inkorporiraju u ambalažne materijale, u atmosferu pakovanja ili se mogu inkorporirati u polimere jestivih i biorazgradivih premaza, pri čemu bi pored poboljšanja senzornih svojstava, doprineli i zdravstvenoj bezbednosti povrća koje se konzumira sveže.

7. LITERATURA

1. Aarestrup, F. (2012). Get pigs off antibiotics. *Nature*, 486, 465-466.
2. Abdi, H., Williams, L.J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2, 433-459.
3. Aćimović, M. (2013). Produktivnost i kvalitet kima, anisa i korijandra u sistemu organske poljoprivrede. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
4. Agarwal, R.K., Singh, S., Bhilegaonkar, K.N., Singh, V.P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*, 18, 1493-1498.
5. Akbas, M.Y., Ölmez, H. (2007). Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2609-2616.
6. Allende, A., Castro, Ibáñez, I., Lindqvist, R., Gil, M. I., Uyttendaele, M., Jacxsens, L. (2017). Quantitative contamination assessment of *Escherichia coli* in baby spinach primary production in Spain: Effects of weather conditions and agricultural practices. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 238-246.
7. Allison, D.G. (2003). The Biofilm Matrix. *Biofouling*, 19, 139-150.
8. Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D.G., Normark, S. (1992). The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Molecular Microbiology*, 6, 2443-52.
9. Arrus, K.M., Holley, R.A., Ominski, K.H., Tenuta, M., Blank, G. (2006). Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Science*, 102, 226-236.
10. Arsenović, M., Radojević, Z., Stanković, S., Lalić, Ž., Pezo, L. (2013). What to expect from heavy clay, *Ceramics International*, 39, 1667-1675.
11. Arsenović, M. (2013). Optimizacija i predviđanje kvaliteta materijala, procesa i krajnjih osobina opekarskih proizvoda matematičkim modelovanjem karakterističnih parametara. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.
12. Back, D.S., Shin, G.W., Wendt, M., Heo, G.J. (2016). Prevalence of *Salmonella* spp. in pet turtles and their environment. *Laboratory Animal Research*, 32, 166-170.
13. Bailer, J, Aichinger, T, Hackl, G, Hueber, K.D, Dachler, M. (2001). Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Industrial Crops and Products*, 14, 229-239.
14. Bakkali, F, Averbeck, S, Averbeck, D, Idaomar, M (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
15. Barak, J.D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P., Charkowski, A.O. (2005). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5685-5691.

16. Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L., Charkowski, A.O. (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 20, 1083-1091.
17. Barak, J.D., Schroeder, B.K. (2012). Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 241-266.
18. Barnhart, M.M., Chapman, M. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131-147.
19. Bassolé, I.H.N., Meda-Lamien, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15, 7825-7839.
20. Bassolé, I.H.N., Juliani, R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.
21. Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S. (2011). The RpoS - mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65, 189-213.
22. Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2001). Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Wiley-VCH, Weinheim, 293.
23. Bazaka, K., Jacob, M.V., Truong, V.K., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. (2011). The effect of polyterpenol thin film surfaces on bacterial viability and adhesion. *Polymers*, 3, 388-404.
24. Bazargani, M.M., Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plants extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 154-164.
25. Beattie, G.A., Lindow, S.E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359.
26. Beld, M.J.C., Reubsæet, F.A.G. (2012), Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 899-904.
27. Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249-289.
28. Bem, Z., Adamič, J. (1991). Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
29. Berger, C.N., Shaw, R.K., Brown, D.J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G., Pallen, M.J., Frankel, G. (2009). Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *The ISME Journal*, 3, 261-265.
30. Bergholz, T.M., Wick, L.M., Qi, W., Riordan, J.T., Ouellette, L.M., Whittam, T.S. (2007). Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. *BMC Microbiology*, 7, 97.
31. Bernstein, N., Sela, S., Neder - Lavon, S. (2007). Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrigation Sciences*, 26, 1-8.

32. Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4, 413-423.
33. Bezić, N., Skočibušić, M., Dunkić, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64, 313-322.
34. Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., Normark, S. (2000). Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 602-612.
35. Blank, I., Grosch, W. (1991). Evaluation of potent odorants in dill seed and dill herb (*Anethum graveolens* L.) by aroma extract dilution analysis. *Journal of Food Science*, 56, 63-67.
36. Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1171-1182.
37. Boland, T., Latour, R.A., Sutzenberger, F.J. (2000). Molecular basis of bacterial adhesion, In: An, Y.H., Friedman, R.J., Eds, *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, New Jersey: Humana Press, 29-41.
38. Boller, T., Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
39. Borges, A., Lopez-Romero, J.C., Oliveira, D., Giaouris, E., Simões, M. (2017). Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 104-115.
40. Brandl, M.T., Amundson, R. (2008). Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2298-2306.
41. Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2465-2467.
42. Broeze, R.J., Solomon, C.J., Pope, D.H. (1978). Effects of low temperature on *in vivo* and *in vitro* protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 134, 861-874.
43. Bunga, S., Ahmmed, M.K., Carne, A., Bekhit, A.E.-D.A. (2021). Effect of salted-drying on bioactive compounds and microbiological changes during the processing of karasumi-like Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) roe product. *Food Chemistry*, 357.
44. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
45. Burt, S.A., Van der Zee, R., Koets, A.P., de Graaff, A.M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4484-4490.
46. Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriaqpu, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Ø., Seifert, H.,

- Woodford, N., Nordmann, P. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology Infection*, 18, 413-431.
47. Cappuccino, J.G., Sherman, N. (2014). *Microbiology: a laboratory manual*. Pearson Education, Inc., USA, 10th edition, 171-182.
48. Cassinelli, C., Morra, M., Pavesio, A., Renier, D. (2000). Evaluation of interfacial properties of hyaluronan coated poly (methylmethacrylate) intraocular lenses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11, 961-977.
49. CDC Centers for Disease Control and Prevention Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce. <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html>
50. CDC/a Centers for Disease Control and Prevention Multistate Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Leafy Greens. <https://www.cdc.gov/ecoli/2017/o157h7-12-17/index.html>
51. CDC/b Centers for Disease Control and Prevention List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html> 2017
52. CDC Centers for Disease Control and Prevention Multistate Outbreak of *Escherichia coli* 157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce. <https://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettuce-3-23-12.html>
53. CDC Centers for Disease Control and Prevention Multistate Outbreak of Human *Escherichia coli* O145 Infections Linked to Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility. <https://www.cdc.gov/ecoli/2010/shredded-romaine-5-21-10.html>
54. CDC Centers for Disease Control and Prevention Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach. <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>
55. Charalambous, C. (1992). Conjugate gradient algorithm for efficient training of artificial neural networks. *IEEE Proceedings*, 139, 301-310.
56. Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 547-603.
57. Coenye, T., Nelis, H.J. (2010). Review, In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 89-105.
58. Coniglio, M.A., Faro, G., Marranzano, M. (2016). The importance of the microbiological quality of ready-to-eat salads from a public health perspective. *Journal of Food Processing & Technology*, 7, 1-3.
59. Cooley, M.B., Chao, D., Mandrell, R.E. (2006). *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection*, 69, 2329-2335.

60. Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K., Verhaegen, J. (2001). Survival of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*, 17, 53-62.
61. Correa, M.S., Schwambach, J., Mann, M.B., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. *Pharmacology*, 86, 1-8.
62. Cos, P., Tote, K., Horemans, T., Maes, L. (2010). Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 2279-2295.
63. Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.
64. Costerton, J.W., Lewandowski Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
65. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-82.
66. Crosa, J.F., Brenner, D.J., Ewing, W.H., Falkow, S. (1973). Molecular relationships among *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology*, 115, 307-315.
67. Cui, H., Ma, C., Liu, L. (2016). Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on lettuce. *Food Control*, 66, 8-16.
68. Čabarkapa, I., Lević, J., Djuragic, O. (2013). Biofilm. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. In A. Méndez-Vilas (Ed.), 1, 42-51: Formatex Research Center.
69. Čabarkapa, I., Škrinjar, M., Lević, J., Kokić, B., Blagojević, N., Milanov, D., Suvajdžić, Lj. (2015). Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. *Acta Veterinaria*, 65, 371-389.
70. 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*, 35, 361-375.
71. Čavar, S., Šolić, M.E., Maksimović, M. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*, 37, 159-165.
72. Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology*, 37, 424-432.
73. Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 114-122.
74. Deibel, V., Schoeni, J. (2003). Biofilms: Forming a defense strategy for the food plant. *Food safety magazine*, 8, 49-54.
75. DeKeersmaecker, S.C., Vanderleyden, J. (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology*, 149, 1953-1956.

76. Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
77. Demuth, H., Beale, M. (1992). *Neural Network Toolbox: For use with Matlab*, The Math-Works, Inc., Natick, MA, USA.
78. Denny, J., Threlfall, J., Takkinen, J., Löfdahl, S., Westrell, T., Varela, C., Adak, B., Boxall, N., Ethelberg, S., Torpdahl, M., Straetmans, M., van Pelt, W. (2007). Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August-December 2007. *Europe's Journal on Infections Disease Surveillance, Epidemiology, Prevention and Control*, 12, 3332.
79. Derakhshan, S., Navidinia, M., Ahmadi, A. (2017). Antibacterial activity of dill (*Anethum graveolens*) essential oil and antibiofilm activity of cumin (*Cuminum cyminum*) alcoholic extract. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 3, 122-126.
80. 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 (Basel)*, 3, 1-16.
81. Diacono, M., Montemurro, F. (2010). Long - term effects of organic amendments on soil fertility: A review. *Development*, 30, 401-422.
82. 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, 109-116.
83. Diklić, N. (1974). Rod *Salvia* L. U: Josifović, M. (Ed.), *Flora SR Srbije*. SANU, Beograd, 432- 453.
84. Dmitrić, M., Vidanović, D., Matović, K., Šekler, M., Šarić, Lj., Arsić, M., Karabasil, N. (2017). 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*, e13455.
85. Dmitrić, M. (2018). Detekcija salmonela vrsta i karakterizacija *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium poreklom iz lanca hrane animalnog porekla. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
86. Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature*, 11, 539-548.
87. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
88. Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193.
89. Đukić, D.A., Jemcević, V.T., Mandić, L.G. (2011). Sanitarna mikrobiologija zemljišta. Agronomski fakultet, Čačak.
90. Đurovka, M. (2008). Gajenje povrća na otvorenom polju. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
91. Dunne, W.M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166.

- 92.** Dunkić, V., Vuko, E., Bezić, N., Kremer, D., Ruščić, D. (2013). Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. *Chemistry and Biodiversity*, 10, 1894-1902.
- 93.** Elviss, N.C., Little, C.L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., de Pinna, E., Threlfall, E.J. (2009). Food, water and environmental surveillance network. Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 83-88.
- 94.** Erickson, M.C., Webb, C., Diaz-Perez, J.C., Phatak, S., Silvoy, J., Davey, L., Payton, A., Liao, J., Ma, L., Doyle, M. (2010). Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*, 73, 1023-1029.
- 95.** Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelsø, C., Müller, L. (2010). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce. *Eurosurveillance*, 15, 2-4.
- 96.** European Food Safety Authority (EFSA), (2021). The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal*, 9 (2), 6406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
- 97.** European Food Safety Authority (EFSA), (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13 (1), 3991. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- 98.** European Pharmacopoeia (2004): 5th Ed. Cedex, Council of Europe, 217 pp.
- 99.** Fàbrega, A., Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 308-341.
- 100.** FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- 101.** Fedajev, A., Mihajlović, V. (2009). Neuronske mreže kao metod multivarijacione analize, Studijski istraživački rad, Ekonomski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.
- 102.** Filipović, I., Mišić, D., Ašanin, R. (2007). Investigation of the presence of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in multiresistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* species originated from domestic animals. *Acta Veterinaria*, Beograd, 57, 369-379.
- 103.** Fink, R.C., Black, E.P., Hou, Z., Sugawara, M., Sadowsky, M.J., Diez-Gonzalez, F. (2012). Transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 and O157:H7 associated with lettuce leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1752-1764.
- 104.** Flemming, H.C., Wingender, J., Griegbe, T., Mayer C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans L.V. (ed) *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic, Amsterdam, 19-34.
- 105.** Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- 106.** Fongaro, G., García - González, M.C., Hernández, M., Kunz, A., Barardi, C.R.M., Rodríguez - Lázaro, D. (2017). Different behavior of enteric bacteria and viruses in clay and sandy soils after biofertilization with swine digestate. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-9.

- 107.** Fornefeld, E., Schierstaedt, J., Jechalke, S., Grosch, R., Schikora, A., Smalla, K. (2017). Persistence of *Salmonella* Typhimurium LT2 in soil enhanced after growth in lettuce medium. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.
- 108.** Francolini, I., Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm based medical device related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 227-238.
- 109.** Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J., van Bruggen, A.H.C. (2005). Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6165-6174.
- 110.** Fux, C.A., Wilson, S., Stoodley, P. (2004). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *Journal of Bacteriology*, 186, 4486-4491.
- 111.** Garavaglia, M., Rossi, E., Landini P. (2012). The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in *Escherichia coli*. *PlosOne*, 7, 7-10.
- 112.** García, R., Bælum, J., Fredslund, L., Santorum, P. and Jacobsen, C.S. (2010): Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5025–5031.
- 113.** Gerstel, U., Römling, U. (2003). The *csgD* promoter, -control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 154, 659-667.
- 114.** Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P.N., Nychas, G.J. (2012). Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments, in: Barakat, S.M.M. (Ed.), *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*. InTech, Rijeka, Croatia, 57-180.
- 115.** Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., Kay, W.W. (2006). *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188, 7722-7730.
- 116.** Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., Holah, J.T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 41-48.
- 117.** Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.
- 118.** Greay, S.J., Hammer, K.A. (2015). Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, 14, 1-6.
- 119.** Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 322-332.
- 120.** Grimont, P.A.D., Weill, F.H. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.

- 121.** Gueye, M., Diouf, M. (2007). Traditional leafy vegetables in Senegal: diversity and medicinal uses. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4, 469-475.
- 122.** Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemühl, J., Grimont, P.A. Weill, F.X. (2010). Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161, 26-29.
- 123.** Gunell, M. (2010). *Salmonella* Enterica: Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance. Thesis PhD. University of Turku, Finland.
- 124.** Gutierrez, J., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008). The antimicrobial efficacy of plants oils combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.
- 125.** Haahtela, K., Tarkka, E., Korhonen, T.K. (1985). Type 1 fimbria-mediated adhesion of enteric bacteria to grass roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1182-1185.
- 126.** Habteselassie, M., Bischoff, M., Blume, E., Applegate, B., Reuhs, B., Brouder, S., Turco, R.F. (2008). Environmental controls on the fate of *Escherichia coli* in soil. *Water Air Soil Pollution*, 190, 143-155.
- 127.** Hald, T. (2013). Pathogen update: *Salmonella*. *Advances in Microbial Food Safety*, 25-46.
- 128.** Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Miller, W.G., Sikora, R.A., Lindow, S.E. (2001). Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology*, 91, 415-422.
- 129.** Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, 13, 7-10.
- 130.** Hamilton, W.A. (1987). Biofilm: microbial interaction and metabolic activities. In: Fletcher M, Gray TRG, Jones J.G. (eds) *Ecology of microbial communities*. Society for general microbiology symposium 41. Cambridge University Press, Cambridge, 361-387.
- 131.** Han, Y., Mielsen, S.S, Nelson, P.E, Sherman, D.M, Linton, R.H. (2000). The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology*, 17, 521-533.
- 132.** Hanna, A., Berg, M., Stout, V., Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4474-4481.
- 133.** Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1-7.
- 134.** Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., de Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upsoni, T. (2004). *Labiatae*. In: Kadereit, J. W. (Ed.), *Flowering plants: dicotyledons (Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae)*, in: Kubitzki, K. (Ed.), *The families and genera of vascular plants*. Springer Verlag Berlin and Heidelberg, 167-275.
- 135.** Harron, K., Mok, Q., Dwan, K., Ridyard, C.H., Moitt, T., Millar, M., Ramnarayan, P., Tibby, S.M., Muller-Pebody, B., Hughes, D.A. (2016). Catheter infections in children (CATCH):

a randomised controlled trial and economic evaluation comparing impregnated and standard central venous catheters in children. *Health Technology Assessment*, 20, 1-219.

136. Hedges, L.J., Lister, C.E. (2005). Nutritional attributes of salad vegetables. *Crop & Food research*, 1473, 1-29.

137. Herman, K.M., Hall, A.J., Gould, L.H. (2015). Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables. *Epidemiology & Infection*, 143, 3011-3021.

138. Holley, R.A., Arrus, K.M., Ominski, K.H., Tenuta, M., Blank, G. (2006). *Salmonella* survival in manure - treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *Journal of Environmental Quality*, 35, 1170-1180.

139. Holt, B.F., Mackey, D., Dangl, J.L. (1999). Recognition of pathogens by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 255-338.

140. Hornok, L. (1992). *Cultivation and Processing of Medicinal Plants*, L. Hornok, Ed., John Wiley & Sons, 187-196.

141. <https://microbeonline.com/imvic-tests-principle-procedure-and-results/>

142. Hui, Y.H., Processing technology. In: Hui, Y.H., Barta J., Cano M.P., Gusek T., Sidhu JS, Sinha N.K., editors. (2006): *Handbook of fruits and food processing*. USA: Blackwell Publishing, 10-11.

143. Hunter, P.J., Shaw, R.K., Berger, C.N., Frankel, G., Pink, D., Hand, P. (2015): Older leaves of lettuce (*Lactuca* spp.) support higher levels of *Salmonella enterica* ser. Senftenberg attachment and show greater variation between plant accessions than younger leaves. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 1-7.

144. Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X. (2004). Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1, 27-35.

145. Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., Weill, F.X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165, 526-30.

146. Ivanović, J., Aničić, N., Žižović, I., Petrović, S.D. (2007). Natkritični CO₂ biljni ekstrakti kao dodaci u proizvodnji i preradi mesa. *Tehnologija mesa*, 48, 236-241.

147. Ivanović, M., Vučetić, M. (2006). Mikrobno biofilmovi - I deo; Ekološki i genetski aspekti. *Stomatološki glasnik Srbije*, 53, 35-41.

148. Iwu, D.Ch., Okoh, I.A. (2019). Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1-34.

149. Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planctonic cell and biofilms. *Food Control*, 29, 125-130.

150. Jamieson, R.C., Gordon, R.J., Sharples, K.E., Stratton, G.W., Madani, A. (2002). Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water. A review. *Canadian Biosystems Engineering*, 44, 1-9.

- 151.** Jančić, R. (2013). Botanika farmaceutika. Službeni glasnik, Beograd.
- 152.** Jančić, R., Stojanović, D. (2008). Ekonomska botanika, korisne biljke i njihovi proizvodi, Zavod za udžbenike, Beograd.
- 153.** Janković, M.M. (1974). Rod *Mentha* L. i *Ocimum* L. U: Josifović, M. (ur.) Flora SR Srbije VI. SANU Beograd, 509-519.
- 154.** Jarak, M., Čolo, J. (2007). Mikrobiologija zemljišta, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- 155.** Jarak, M., Hajnal, T., Đurić, S., Žurkić, J. (2005). Preživljavanje rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta u zemljištima različite kiselosti. Letopis naučnih radova, 1, 41-49.
- 156.** Jašić, M. (2007). Tehnologija voća i povrća. Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet.
- 157.** Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M.P. (2002). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. Applied and Environmental Microbiology, 68, 2605-2609.
- 158.** Jirovetz, L., Buchbauer, G., Nikiforov, A. (1994). Comparative analysis of different dill herb and dill seed oils constituents by means of GC/FID and GC/MS. Ernährung/Nutrition, 18, 534-536.
- 159.** Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V, Damianova, S.T. (2003). Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3854-3857.
- 160.** Johnson, J.R., Sannes, M.R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M.A., Bender, J., Smith, K.E., Winokur, P.L. Belonga, E.A. (2007). Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. Emerging Infectious Diseases, 13, 838-846.
- 161.** Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. BMC Microbiology, 70.
- 162.** Jones, D.J., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature, 444, 323-329.
- 163.** Josić D., Kovač S. (2009). Masena spektrometrija molekuskog oslikavanja. Kemijska industrija, 58, 207-2013.
- 164.** Kaali, P., Strömberg, E., Karlsson, S. (2011). Prevention of biofilm associated infections and degradation of polymeric materials used in biomedical applications. Biomedical Engineering, Trends in Materials Science, A. N Laskovski (Ed), InTech: Rijeka, 513-540.
- 165.** Kabir, M.R., Hossain M.A., Paul, S.K., Mahmud, C., Ahmad, S., Mahmud, N.U., Sultana, S., Yesmin, T., Hoque, S.M., Habiba, U., Rahman, M.A., Kobayashi, N. (2012). Enteropathogens associated with acute diarrhea in a tertiary hospital of Bangladesh. Mymensingh Medical Journal, 21, 618-623.
- 166.** Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2, 123-140.
- 167.** Kaplan, J.B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of Dental Research, 3, 205-218.

- 168.** Karakašević, B., Banič, S., Bezjak, V., Bogdanov, L., Drndarski, K., Đurišić, M., Fried, R., Gvozdrenović, M., Ikić, D., Likar, M., Milovanović, M., Miljković, A., Mršević, S., Rajković, A., Richter, B., Sretenović, M., Stefkov, S., Terzin, A., Tomašić, P., Trausmiller, O. (1969). Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga, Beograd.
- 169.** Karatan, E., Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 310-347.
- 170.** Karch, H., Tarr, P.J., Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 405-418.
- 171.** Karch, H. (2001). The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, Jun, 27, 207-213.
- 172.** Kassim, A., Pflüger, V., Premji, Z., Daubenberger, C., Revathi, G. (2017). Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI - TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BioMed Central Microbiology*, 17, 1-8.
- 173.** Katz, S.H., Weaver, W.W. (2003). *Encyclopedia of Food and Culture*, 2, 283-284, 377-378.
- 174.** Kavanaugh, N.L., Ribbec, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4057-4061.
- 175.** Kavitha, R., Bopaiyah, A.K., Kolar, A.B. (2016). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Cipadessa baccifera* (Roth) Miq. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 392-396.
- 176.** Keifer, D., Ulbricht, C., Abrams, T.R., Basch, E., Giese, N., Giles, M., DeFranco Kirkwood, C., Miranda, M., Woods, J. (2007). Peppermint (*Mentha piperita*): an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7, 91-143.
- 177.** Kerekes, E.B., Vidács, A., Török Jenei, J., Gömöri, Cs., Takó, M., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs. (2015). Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms. In book: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* Edition: Microbiology Book 1 Publisher: Formatex Research Center Editors: Méndez-Vilas AFORMAREX, 429 - 437.
- 178.** Kim, S.H., Wei, C.I. (2007). Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. *Journal of Food Protection*, 70, 22-29.
- 179.** Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Ramos, C., Molin, S., Klemm, P. (2000). Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environmental Microbiology*, 2, 695-702.
- 180.** Klerks, M.M., van Gent-Pelzer, M., Franz, E., Zijlstra, C., van Bruggen, A.H. (2007). Physiological and molecular responses of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4905-4914.

- 181.** Kljujev, I. (2012). Kontaminacija biljaka patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- 182.** Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Tanackov, I. (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, 426-432.
- 183.** Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Pavlović, H. (2022). Mikrobiologija hrane-praktikum. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 184.** Kojić, M., Jančić, R. (1998). Pitoma nana (*Mentha x piperita* L.) i druge vrste roda *Mentha* L. Izdavač: Institut za proučavanje lekovitog bilja dr Josif Pančić, Beograd strana 258.
- 185.** Kollo, T., Von Rosen, D. (2005). Advanced multivariate statistics with matrices, In: Mathematics and its applications, Springer, Netherlands.
- 186.** Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J. (2013). Bacterial biofilms: Development, dispersal and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3, 1-24.
- 187.** Kostić-Nikolić, S. (2011). Ekstrakcione tehnike za lekovito i aromatično bilje i savremena proizvodnja prehrambenih proizvoda. *Ekonomika poljoprivrede*, 4, 621-636.
- 188.** Kostić, I., Marković, T., Krnjajić, S. (2012). Sekretorne strukture aromatičnih biljaka sa posebnim osvrtom na strukture sa etarskim uljima, mesta sinteze ulja i njihove važnije funkcije. *Lekovite sirovine*. 32, 3-25.
- 189.** Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A. (2007). Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung*, 62, 507-513.
- 190.** Kovačević, N. (2004). Osnovi farmakognozije. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Institut za farmakognoziiju. Srpska školska knjiga, Beograd, treće izdanje.
- 191.** Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M.T., Belausov, E., Sela S. (2009). Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1876-1885.
- 192.** Kumar, C.G., Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- 193.** Kumar, P., S. Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial. Crops and Products*, 34, 802-817.
- 194.** Lalošević, V., Jarak, M., Vidić, B., Pašić, Š., Mihajlović Ukropina, M., Jelesić, Z., Kulauzov, M., Boboš, S. (2011). Mikrobiologija za studente veterinarske medicine. Mala knjiga, Novi Sad.
- 195.** Lapidot, A., Yaron, S. (2009). Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *Journal of Food Protection*, 2009, 72, 618-623.
- 196.** Laranjo, M. Fernández-Léon, A. M., Potes, M. E., Agulheiro-Santosand, A.C., Elias, M. (2017). Use of essential oils in food preservation. In: *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.), Formatex Research Center, Badojaz, Španija, 177-188.

- 197.** Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R. Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 329, 849-857.
- 198.** Lau, M.M., Ingham, S.C. (2001). Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 131-136.
- 199.** Laus, M.C., van Brussel, A.A., Kijne, J.W. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 533-538.
- 200.** Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-19.
- 201.** Lazić, B., Vasić, M., Anačkov, G. (2017). Genetički resursi gajenog i samoniklog povrća u Srbiji. *Selekcija i semenarstvo*, 23, 75-90.
- 202.** Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., Baker, B. (2012). Micro RNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 1790-1795.
- 203.** Lim, J., Lee, H.D., Heu, S. (2014). The interaction of human enteric pathogens with plants. *The Plant Pathology Journal*, 30, 109-116.
- 204.** Lintas, C. (1992). Nutritional aspects of fruit and vegetable consumption. In: Lauret F. (ed.). *Les fruits et légumes dans les économies méditerranéennes: acts du colloque de Chania*. Montpellier: CIHEAM, 19, 79-87.
- 205.** Liu, Y., Zhang, J., Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Science Progress*, 103, 1-14.
- 206.** Lončar, B. (2015). Hemometrijski pristup analizi osmotske dehidracije srebrnog karaša (*Carassius gibelio*). Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 207.** López-Martín, J.I., González-Acuna, D., García, C.A., Carrasco, L.O. (2016). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in fecal samples from animals. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2, 1-6.
- 208.** Lopez-Velasco, G., Tydings, H. A., Boyer, R. R., Falkinham, J. O., Ponder, M. A. (2012). Characterization of interactions between *Escherichia coli* O157:H7 with epiphytic bacteria *in vitro* and on spinach leaf surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 351-357.
- 209.** Lu, Y., Dong, H., Chen, S., Chen, Y., Peng, D., Liu, X. (2011). Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Pullorum strains. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 2428-2437.
- 210.** Macarisin, D., Patel, J., Sharma, V.K. (2014). Role of curli and plant cultivation conditions on *Escherichia coli* O157:H7 internalization into spinach grown on hydroponics and in soil. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 48-53.
- 211.** Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.

- 212.** Mahboubi, M., Kazempour, N. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 36, 83-87.
- 213.** Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGII in biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, 129, 360-366.
- 214.** Marin, P. (1996). Orašice i trihome u familiji *Lamiaceae*. Biološki fakultet, Beograd.
- 215.** Marković, T., (2011). Etarska ulja i njihova bezbedna primena. Naučna monografija. Institut za proučavanje lekovitog bilja "dr Josif Pančić". Beograd.
- 216.** Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E. (1996). Differences in essential oil composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3926-3929.
- 217.** Marriott, N. G., Gravani, R. B. (2006). *Principles of Food Sanitation*, Springer, USA.
- 218.** Martín-Diana, A.B., Rico, D., Barry-Ryan, D., Frias, J.M., Henehan, G.T.M., Barat, J.M. (2007). Efficacy of steamer jet-injection as alternative to chlorine in fresh-cut lettuce. Postharvest. *Biology and Technology*, 45, 97-107.
- 219.** Martinez-Urtaza, J., Liebana, E., Garcia-Migura, L., Perez-Piñeiro, P., Saco, M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4030-4034.
- 220.** Matthyse, A.G., Deora, R., Mishra, M., Torres, A.G. (2008). Polysaccharides cellulose, poly-B-1,6-N-acetyl-Dglucosamine, and colanic acid are required for optimal binding of *Escherichia coli* O157:H7 strains to alfalfa sprouts and K-12 strains to plastic but not for binding to epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2384-2390.
- 221.** 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.
- 222.** McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1664-1668.
- 223.** McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20, 619-633.
- 224.** Meltem, Y., Akbas, H.Ö. (2007). Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh cut iceberg lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2609-2616.
- 225.** Merget, B., Forbes, K.J., Brennan, F., McAteer, S., Shepherd, T., Strachan, N.J.C., Holden, N.J. (2019). Influence of plant species, tissue type, and temperature on the capacity of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* to colonize, grow, and be internalized by plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 123-142.

- 226.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition, January 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 227.** Miladi, H., Slama, R.B., Mili, D., Zouari, A.B., 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, 1-9.
- 228.** Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Mohammed, Y., Al Quarashi, Y.M.A., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., Mahdouani K., Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 112, 156-1636.
- 229.** Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J. (2008). Biofilm - organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine*, 1, 5-15.
- 230.** Milanov, D., Prunić, B., Velhner, M., Todorović, D., Polaček, V. (2015). Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Acta Veterinaria*, 65, 202-216.
- 231.** Miljković-Selimović, B., Babić, T., Stojanović, P. (2010). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis-aktuelnost i značaj. *Acta Medica Mediane*, 49, 71-75.
- 232.** Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). *Quorum sensing* in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199.
- 233.** Miloš, S., Hengl, B., Matijević, L. (2016). Znanstveno mišljenje o riziku nitrata iz povrća. Hrvatska agencija za hranu. OB -34 - 02, 1-30.
- 234.** Milošević, S. (2011). Ekstrakcija ginka (*Ginkgo biloba* L.) ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 235.** Miri, S.T., Dashti, A., Mostaan, S., Kazemi, F., Bouzari, S. (2017). Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iranian journal of microbiology*, 9, 33-37.
- 236.** Morar, A., Sala, C., Decun, M., Morvay, A., Imre, K., Cerna, D. (2010). Microbial biofilm and bacterial contamination on pig carcasses. *Animal Science and Biotechnologies*, 43, 373-376.
- 237.** Mou, B. (2009). Nutrient content of lettuce and its improvement. *Current Nutrition and Food Science*, 5, 242-248.
- 238.** Muffler, A., Traulsen, D.D., Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1996). Posttranscriptional regulation of the sigma (S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 1607-1613.
- 239.** Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., Coppola, R., de Feo, V., (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451-1474.
- 240.** Neville, S.A., LeCordier, A., Ziochos, H., Chater, M.J., Gosbell, I.B., Maley, M.W., VanHal, S.J. (2011). Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 2980-2984.

- 241.** Nikolić, V. (1973). Porodica *Apiaceae* L. U: Josifović, M. (ed.) Flora SR Srbije V. SANU Beograd, 222-348.
- 242.** Noel, J.T., Arrach, N., Alagely, A., McClelland, M., Teplitski, M. (2010). Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by *in vivo* expression technology. PLoS ONE, 5, e1 2406.
- 243.** Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology, 56, 519-523.
- 244.** Nourani, V., Fard, M.S. (2012). Sensitivity analysis of the artificial neural network outputs in simulation of the evaporation process at different climatologic regimes, Advances in Engineering Software, 47, 127-146.
- 245.** Nürnberger, T., Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Current Opinion in Plant Biology, 5, 318-324.
- 246.** Nurzyńska-Wierdak, R., Bogucka-Kocka, A., Kowalski, R., Borowski, B. (2012). Changes in the chemical composition of the essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on the plant growth stage. Chemija, 23, 216-222.
- 247.** O'Toole G.A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of visualized experiments, 47, 1-2.
- 248.** Odu, N.N., Okomuda, M.O. (2013). Prevalence of *Salmonella* species and *Escherichia coli* in fresh cabbage and lettuce sold in Port Harcourt Metropolis, Nigeria. Report and Opinion, 5, 1-8.
- 249.** Oguntibeju, O., O. Truter, E., J., Esterhuysen, A., J. (2013). The role of fruit and vegetable consumption in human health and disease prevention. Chapter 7. InTech.
- 250.** Olaimat, A. N., Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology, 32, 1-19.
- 251.** Oliveira, M., Vinas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M. (2012). Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated contaminated compost and irrigation water. International Journal of Food Microbiology, 156, 133-140.
- 252.** Oliveira, M.M.M., De Brugnera, D.F., Cardoso, M.D.G., Alves, E., Piccoli, R.H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. Food Control, 21, 549-553.
- 253.** Oliver, D.M., Haygarth, P.M., Clegg, C.D., Heathwaite, L. (2006). Differential *Escherichia coli* die off patterns associated with agricultural matrices. Environmental Science & Technology, 40: 5710-5716.
- 254.** Olsen, A., Wick, M.J., Mörgelin, M., Björck, L. (1998). Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. Infection and Immunity, 66, 944-949.

- 255.** Özcan, M., Chalchat, J.C. (2002). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. Czech Journal of Food Science, 20, 223-228.
- 256.** Ozkalp, B., (2012). Isolation and identification of *Salmonellas* from different samples. In: Salmonella - A dangerous foodborne pathogen (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 124-156.
- 257.** Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34, 577-588.
- 258.** Paraje, M.G. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms, Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. A. Méndez-Vilas, A. (Ed.). Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 736-744.
- 259.** Patel, J. Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. International Journal of Food Microbiology, 139, 41-47.
- 260.** Patel, J., Millner, P., Nou, X., Sharma, M. (2010). Persistence of enterohaemorrhagic and nonpathogenic *Escherichia coli* on spinach leaves and in rhizosphere soil. Journal of Applied Microbiology, 108, 1789-1796.
- 261.** Patel, R (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. Clinical Orthopaedics and Related Research, 437, 41-47.
- 262.** Pathan, A.K., Bond, J., Gaskin, R.E. (2008). Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces-Horses forcourses. Micron, 39, 1049-1061.
- 263.** Pavlović, N., Maris, S., Zlatar, B., Purčić-Kljajić, D. (2014). Hrana izvor zaražavanja u epidemijama salmoneloza-istraživanje jačine dokaza. 4. Simpozijum - Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla, 6. i 7. novembar, Beograd, 6-18.
- 264.** Petrović, M. (2011). Osnovi veštačkih neuronskih mreža i značaj njihove primene, Zbornik radova, 20, 47-55.
- 265.** Pezzoli, L., Elson, R., Little, C.L., Yip, H., Fisher, I., Yishai, R., Anis, E., Valinsky, L., Biggerstaff, M., Patel, N., Mather, H., Derek, J.B., Coia, J.E., van Pelt, W., Nielsen, E.M., Ethelberg, S., de Pinna, E., Hampton, M.D., Peters, T., Threlfall, J. (2008). Packed with *Salmonella*-Investigation of an international outbreak of *Salmonella* Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007. Foodborne Pathogens and Disease, 5, 661-668.
- 266.** PHE Public Health England. Foodborne Illness in Humans: General outbreaks in England and Wales in 2014. <https://www.gov.uk/government/publications/foodborne-illness-in-humans-general-outbreaks-in-england-and-wales-in-2014>
- 267.** Plančak, D., Musić, L., Puhar, I. (2015). Međustanična komunikacija parodontopatogenih bakterija. Acta Stomatologica Croatica, 49, 234-241.
- 268.** <http://polj.uns.ac.rs/wp-content/uploads/files/povrtarstvo/prezentacije/specijalno/03-kupusnjace-lisnato.pdf>
- 269.** Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P. (2012). Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. Infection, Genetics and Evolution, 12, 883-893.
- 270.** Popović, M. (1991). Povrtarstvo. Nolit, Beograd.

- 271.** Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2, 450-464.
- 272.** Prunić, B. (2017). Ispitivanje mogućnosti formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeteta *Salmonella* vrsta izolovanih iz hrane za životinje. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
- 273.** Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18, 465-473.
- 274.** Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Pruger, R., Tschäpe, H., Adams, L.G., Bäumler, A.J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and Immunity*, 70, 2249-2255.
- 275.** Radulescu, V., Popescu, M.L., Ilies, D.C. (2010). Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (*Umbelliferae*) cultivated in Romania. *Farmacia*, 58, 594-600.
- 276.** Rahi, P., Prakash, O., Shouche, Y.S. (2016). Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-12.
- 277.** Raja, R.R. (2012). Medicinally potential plants of *Labiatae* (*Lamiaceae*) family: An overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6, 203-213.
- 278.** Reichling, J. (2020). Anti-biofilm and virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. *Planta Medica*, 86, 520-537.
- 279.** Robbe-Saule, V., Jaumovillé, V., Prévost, MCh., Guadagnin, S., Talhouarne, Ch., Mathout, H., Kolb, A., Norel, F. (2006). Crl Activates Transcription Initiation of RpoS-Regulated Genes Involved in the Multicellular Behavior of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188, 3983-3994.
- 280.** Robinson, L.S., Ashman, E.M., Hultgren, S.J., Chapman, M.R. (2006). Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Molecular Microbiology*, 59, 870-881.
- 281.** Rock, C., Sonnenberg, M.S. (2014). Human pathogenic *Enterobacteriaceae*. Reference Module in Biomedical Sciences, 1-8.
- 282.** Rodrigues, L.R. (2011). Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 351-367.
- 283.** Roldán, L.P., Díaz, G.J., Durringer, J.M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 451-461.
- 284.** Römling, U. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behavior in *Enterobacteriaceae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1234-1246.

- 285.** Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., Tschäpe, H. (2003). Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology* 293: 273-285.
- 286.** Römling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normak, S., Reinköster J. (2000). AgfD the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36, 10-23.
- 287.** Römling, U., Sierralta, D.W., Eriksson, K., Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Molecular Microbiology*, 28, 249-264.
- 288.** Rossi, C., Chaves - López, C., Smole Možina, S., Di Mattia, C., Scuota, S., Luzzi, I., Jenič, T., Paparella, A., Serio, A. (2019). *Salmonella enterica* adhesion: Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on lettuce. *LWT - Food Science and Technology*, 111, 16-22.
- 289.** Ruangarnart, A., Buranaphalin, S., Temsiririkkul, R., Chuakul, W., Pratuangdejkul, J. (2015). Chemical compositions and antibacterial activity of essential oil from dill fruits (*Anethum graveolens* L.) cultivated in Thailand. *Pharmaceutical Sciences Asia*, 42, 135-143.
- 290.** Ruiz, J., Pons, M.J. Gomes, C. (2012). Transferable mechanisms of quinolone resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 196-203.
- 291.** Runyoro, D., Ngassapa, O., Vagionas, K., Aligiannis, N., Graikou, K., Chinou, I. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 119, 311-316.
- 292.** Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3741-3746.
- 293.** Ryu, J.H., Kim, H., Beuchat, L.R. (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, 67, 2123-2131.
- 294.** Saad, N.Y., Muller, Ch.D., Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 269-279.
- 295.** Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M., Ha, S. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 491-509.
- 296.** Salazar, J.K., Deng, K., Tortorello, M.L., Brandl, M.T., Wang, H., Zhang, W. (2013). Genes *ycfR*, *sirA* and *yigG* contribute to the surface attachment of *Salmonella enterica* Typhimurium and Saintpaul to fresh produce. *PLoS ONE*, 8, e57272.
- 297.** Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R. (2012). A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 9-13.

- 298.** 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, 30-35.
- 299.** Sanderson, K.E., Nair, S. (2013). Taxonomy and species concepts in the genus *Salmonella*. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. Second edition CAB International, Wallingford, 1-19.
- 300.** Schafer, H., Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology. Journal*, 4, 1684-1703.
- 301.** Schulthess, B., Brodner, K., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., Böttger, E.C., Hombach, M. (2013). Identification of gram-positive cocci by use Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 1834-1840.
- 302.** Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Zahraei Salehi, T., Mahmoodi, P. (2017). Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 124, 379-388.
- 303.** Schifferstein, H.N.J., Fritjers, J.E.R. (1990). Sensory integration in citric acid/sucrose mixtures. *Chemical senses*, 15, 87-109.
- 304.** Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Hirt, H. (2008). The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS ONE* 3, e2279.
- 305.** Selles, S.M.A., Kouidri, M., Bellik, Y., Amrane, A.A., Belhamiti, B.T., Benia, A.R., Hammoudi, S.M., Boukraa, L. (2018). Chemical composition, antioxidant and *in vitro* antibacterial activities of essential oils of *Mentha spicata* leaf from Tiaret area (Algeria). *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 217, 87-96.
- 306.** Semenov, A.V., van Bruggen, A.H.C., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J., Semenov, A.M., (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 419-428.
- 307.** Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueiro, J., Nunes, M.L., Marques, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1554-1560.
- 308.** Shaw, R.K., Lasa, I., Garcia, B.M., Pallen, M.J., Hinton, J.C., Berger, C.N., Frankel, G. (2011). Cellulose mediates attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to tomatoes. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 569-573.
- 309.** Sheffield, C.L., Crippen, T.L. (2012). Invasion and survival of *Salmonella* in the environment: The role of biofilms, in: Kumar, Y. (Ed.), *Salmonella - A diversified superbug* InTech, Rijeka, Croatia.

- 310.** Sifri, C.D. (2008). *Quorum sensing*: Bacteria talk sense. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 1070-1076.
- 311.** Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022-8028.
- 312.** Sikkema, J., de Bont, J.A., B. Poolman, B (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201-222.
- 313.** Silva, V.A., Sousa, J.P., Guerra, F.Q.S., Pessôa, H.L.F., Freitas, A.F.R., Alves, L.B.N., Lima, E.O. (2015). Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and linalool on bacterial isolates of clinical importance. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7, 1066-1071.
- 314.** Sim, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S., Römling, U. (2014). Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Medicine*, 9, 1261-1282.
- 315.** Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 573-583.
- 316.** Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W.B., Vieira, R.F., Hao, Z. (1999). Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: Janick, J. (ed.) *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA., 499-505.
- 317.** Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial drugs. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53-62.
- 318.** Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-16.
- 319.** Skočibušić, M., Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 967-970.
- 320.** Soković, M., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food Global Science Books*, 1, 1-7.
- 321.** Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104.
- 322.** Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43, 793-808.
- 323.** Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M., Annous, B.A. (2005). Biofilm formation, cellulose production, curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of Food Protection*, 68, 906-912.
- 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, 1-12.
- 325.** Soni, K.A., Oladunjoye, A., Nannapanen, i R., Wes Schilling, R., 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, 205-212.

- 326.** Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 2, 572-585.
- 327.** SRPS EN ISO 6579 - 1: 2017: Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* - Deo 1: otkrivanje *Salmonella* spp.
- 328.** 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 - hlora - 3 - indolil β - D - glukuronida.
- 329.** Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45, 502-531.
- 330.** Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G., Đukić, 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. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 115, 891-899.
- 331.** 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, 428-432.
- 332.** Stepanović S, Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179.
- 333.** Stevens, M.P., Humphrey, T.J., Maskell, D.J. (2009). Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2709-2723.
- 334.** Stewart, P.S., Costerton, W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, 135-138.
- 335.** Stewart, P.S., Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 199-210.
- 336.** Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- 337.** Sulaiman, S.F., Yusoff, N.A.M., Eldeen, I.M., Seow, E.M., Sajak, A.A.B., Supriatno, O.K.L., (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1-10.
- 338.** Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9, 222-227.
- 339.** Škrinjar, M., Tešanović, D. (2007). Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za geografiju, turizam i hotelijerstvo.
- 340.** Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- 341.** Tamboli, D.P., Lee, D.S. (2013). Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 878-884.

- 342.** Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L. (2005). Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365, 1073-1086.
- 343.** Tarver, T. (2009). BIOFILMS: A threat to food safety. *Food Technology*, 63, 46-52.
- 344.** Taylor, B.J. (2006). *Methods and Procedures for the verification and validation of Artificial neural networks*, Springer Science, Business Media, Inc., USA.
- 345.** Telgman, U., Horn, H., Morgenroth, E. (2004). Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water research*, 38, 3671-3684.
- 346.** Tepić Horecki, A. (2019). *Tehnologija proizvoda od voća i povrća*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 347.** Thien, L. B., Heimermann, W. H., Holman, R. T. (1975). Floral odors and quantitative taxonomy of *Magnolia* and *Liriodendron*. *Taxon*, 24, 557-568.
- 348.** Thilmony, R., Underwood, W., He, S.Y. (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157: H7. *The Plant Journal*, 46, 34-53.
- 349.** Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., Spormann, A.M (2006). Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 188, 2681-2691.
- 350.** Titchenal, C., Dobbs, J. (2004). Nutritional value of vegetables. In: Hui Y.H., Ghazala, S., Graham, D.M., Murell, K.D., Nip, W.K. (Eds.): *Handbook of vegetable preservation and processing*. Marcel Dekker, Inc, USA.
- 351.** Todor, K. (2007). Pathogenic *Escherichia coli*. Online Textbook of bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- 352.** Torres, A.G., Jeter, C., Langley, W., Matthyse, A.G. (2005). Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8008-8015.
- 353.** Trevisan, D.A.C., Silva, A.F., Negri, M., Abreu, Filho, B.A. Machinsky, 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, 1-8.
- 354.** Trifan, A., Aprotosoai, A.C, Brebu M., Cioancă, O., Gille, E., Hăncianu, M., Miron, A. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L. *Farmacia*, 63, 413-416.
- 355.** Tsuda, K., Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 459-465.
- 356.** Tucakov, J. (2006): *Lečenje biljem: fitoterapija*. Rad, Beograd.
- 357.** Tutar, U., Celik, C., Karaman, I., Atas, M., Hepokur, C. (2016). Anti-biofilm and antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 1039-1046.

- 358.** Uhlich, G.A., Keen, J.E., Elder, R.O. (2001). Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2367-2370.
- 359.** Uhlich, G.A., Cooke, P.H., Solomon, E.B., (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157: H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2564-2572.
- 360.** Ukuku, D.O., Fett, W.F. (2006). Effects of cell surface charge and hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella* serovars to cantaloupe rind and decontamination with sanitizers. *Journal of Food Protection*, 69, 1835-1843.
- 361.** Ultee, A., Kets, E.P., Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610.
- 362.** Unc, A., Gardner, J., Springthorpe, S. (2006). Recovery of *Escherichia coli* from soil after addition of organic wastes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2287-2289.
- 363.** Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D. J., Olsen, J.E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125, 229-255.
- 364.** van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J. (1999). Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union; CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries: Rotterdam, The Netherlands 116.
- 365.** van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors J.T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *International Society for Microbial Ecology*, 5, 173-183.
- 366.** van Houdet, R., Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacteria outer surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1117-1131.
- 367.** Varga, A., Kocić-Tanackov, S., Čabarkapa, I., Aćimović, M., Tomičić, Z. (2019). Chemical composition and antibacterial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety and Food Quality/Archiv für Lebensmittelhygiene*, 70, 177-185.
- 368.** Varga, A., Aćimović, M., Čabarkapa, I., Filipčev, B., Plavšić, D., Nježić, Z. (2016). Anethum graveolens seed oil-antibacterial activity against *Escherichia coli*. III International Congress "Food Technology, Quality and Safety", 25-27.10., Novi Sad, 438-442.
- 369.** Vella, F.M., Calandrelli, R., Cautela, D., Laratta, B. (2020). Screening of bioactivity in extracts from different varieties of lettuce. the 1st International Electronic Conference on Plant Science, Proceedings, 1-15 December, 4, 1-5.
- 370.** Vestby, L.K., Møretrø, T., Balance, S., Langsrud, S., Nesse, L.L. (2009). Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. *BMC Veterinary Research*, 5, 43.
- 371.** Vial, P.A., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro J.P., Maneval, D., Elsayed, A., Levine, M.M., (1988). Characterisation of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 158, 70-79.

- 372.** Vital, M., Hammes, F., Egli, T. (2008). *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. *Environmental Microbiology*, 10, 2387-2396.
- 373.** Vokk, R., Lougas, T., Mets, K., Kravets, M. (2011). Dill (*Anethum graveolens* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) from Estonia: Seasonal differences in essential oil composition. *Agronomy Research*, 9, 515-520.
- 374.** Vračar, Lj. 2012. Tehnologija zamrzavanja povrća. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 375.** Wadamori, Y., Goonerante, R., Hussain, M.A. (2017). Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1396-1403.
- 376.** Wang, X. (2008). Characterization of *Escherichia coli* colonizing the gastrointestinal tract and urinary tract catheters. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- 377.** Warriner, K., Namvar, A. (2010). The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 131-136.
- 378.** 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.
- 379.** Watnick, P, Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-2679.
- 380.** Weintraub, A. (2007). Enteroaggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 4-8.
- 381.** Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Michalska, K., Kisiel, W., Chojnacka-Wójcik, E. (2006). Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin - like guaianolides in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 254-258.
- 382.** Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295, 1487-1487.
- 383.** White-Ziegler, C.A., Davis, T.R. (2009). Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 191, 1106-1110.
- 384.** WHO/FAO, 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting report. Microbiological risk assessment series, Food Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization, Rome, Italy, 158.
- 385.** Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A., Schikora, A., Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-18.
- 386.** Winn, Jr. W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G: Konemanns (2006). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- 387.** Wong, D.M.A.L.F, Hald, T., van der Wolf, P.J., Swanenburg, M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*, 76, 215-222.

- 388.** Xicohtencatl-Cortes, J., Sanchez, Chacon, E., Saldana, Z., Freer, E., Giron, J.A., (2009). Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection*, 72, 1531-1537.
- 389.** Xu, H., Lee, H.-Y. Ahn, J. (2010). Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under different acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7910-7917.
- 390.** Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6-14.
- 391.** Yaron, S., Römling, U. (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 7, 496-516.
- 392.** Yiğit, F., Özcan, M., Akgül, A. (2000). Inhibitory effect of some spice essential oil on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. *Grasas y Aceites* 51, 237-240.
- 393.** Yili, A., Aisa, H.A., Maksimov, V.V., Veshkurova, O.N., Salikhov, Sh.I. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* growing in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 280-281.
- 394.** Zaidi, S., Dahiya, P. (2015). *In vitro* antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *International Food Research Journal*, 22, 2440-2445.
- 395.** Zhou, Ch., Hu, B., Zhang, X., Huang, S., Shan, Y., Ye, X., (2014). The value of matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identifying clinically relevant bacteria: a comparison with automated microbiology system. *Journal of Thoracic Disease*, 6, 545-552.
- 396.** Zhu, H., He, C.C., Chu, Q.H. (2011). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 269-274.
- 397.** Zita, A., Hermansson, M. (1997). Effect of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1168-1170.
- 398.** Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39, 1452-1463.

PRILOZI

Prilog 1. Priprema i sastav Fiziološkog rastvora (FR).

NaCl	8,5 g
Destilovana voda	1000 ml
pH	7

Odmeriti NaCl i rastvoriti ga u destilovanoj vodi. Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

Prilog 2. Priprema i sastav podloge Kongo crvenog agara (KCA).

Osnovna podloga KCA je Luria Bertrani agar (LBA) u čiji sastav ulazi:

Ekstrakt kvasca	5,0 g
Kazein hidrolizat	10,0g
Agar	15,0 g
Destilovana voda	990,0 ml
pH	~ 7,0

Dodati sve sastojke u 990,0 ml destilovane vode. Zagrevati dok se agar ne rastvori. Nakon toga sterilisati podlogu u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

Priprema indikatorske boje Kongo crveno:

Kongo crveno	0,04 g
Sterilna destilovana voda	5,0 ml

Sterilno odmeriti indikatorsku boju i rastvoriti je u sterilnoj destilovanoj vodi. Sterilisati filtracijom uz primenu membranskog filtera veličine pora 0,20 µm, (Sartorius, Gotingen, Nemačka).

Priprema indikatorske boje Brillijant plavo:

Brilijant plavo	0,02 g
Sterilna destilovana voda	5,0 ml

Sterilno odmeriti indikatorsku boju i rastvoriti je u sterilnoj destilovanoj vodi. Sterilisati filtracijom uz primenu membranskog filtera veličine pora 0,20 µm, (Sartorius, Gotingen, Nemačka).

Kompletna podloga KCA se dobija tako što se u prethodno prohladenu (45-47 °C) sterilnu podlogu LBA dodaju pripremljene indikatorske boje, podloga se homogenizuje i razliva u Petri ploče.

Prilog 3. Priprema i sastav Slanog peptonskog rastvora (SPR).

NaCl	8,5 g
Mesni pepton	1,0 g
Destilovana voda	1000 ml

Odmeriti oba sastojka i rastvoriti ih u destilovanoj vodi. Sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Утицај старских уља на биофилмове одабраних сојева ентеробактерија формираних на лисној површини поврћа
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду, Република Србија
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом финансирана су од стране Покрајинског секретаријата за високо образовање и научноистраживачку делатност, Аутономне покрајине Војводине, кроз пројекат „ Микробиолошки ризици из поврћа на подручју АП Војводине“, евиденциони број пројекта 142-451-3589/2017-01/02.
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту: зелена салата ђ) снимци, фотографије: навести врсту: микрографије биофилма испитиваних микроорганизама, слике купона листа зелене салате е) текст, навести врсту: литературни наводи ж) мапа, навести врсту _____ з) остало: описати web садржај</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке: а) Excel фајл, датотека : .xlsx б) SPSS фајл, датотека _____ с) PDF фајл, датотека pdf</p>

d) Текст фајл, датотека: .docx

e) JPG фајл, датотека: .tiff

f) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

a) број варијабли: велики број

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) : велики број

1.3.3. Поновљена мерења

a) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

a) временски размак између поновљених мера је између неколико минута и неколико дана

б) варијабле које се више пута мере односе се на експерименталне анализе

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

a) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

a) експеримент, навести тип биолошке, физичке, хемијске, инструменталне,

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип тумачење експериментално добијених резултата, извођење закључака и поређење са литературним подацима

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Хемијски састав етарских уља – Гасни хроматограф – Agilent 5975C GC-MSD

Обрада података статистички софтвер – Statistika 12.StatSoft

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

a) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да
Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати
Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и понављањем добијених експерименталних резултата.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?
Контрола уноса података у матрицу је извршена упоређивањем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у НаРдУс – Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs/>,
<http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnost-rada-2/javni-uid-doktorske>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? **Да Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? **Да Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? **Да Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? **Да Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ана Варга, ana.varga@fins.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ана Варга, ana.varga@fins.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ана Варга, ana.varga@fins.uns.ac.rs