



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Čabarkapa

**Sposobnost formiranja biofilma
različitih sojeva *Salmonella Enteritidis*
i inhibitorni efekat etarskih ulja na
inicijalnu adheziju i formirani biofilm**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Marija Škrinjar

Kandidat:
Ivana Čabarkapa

Novi Sad, 2015.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska publikacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivana Čabarkapa, dipl. biolog, Specijalista mikrobiologije hrane
Mentor: MN	dr Marija Škrinjar, redovni profesor
Naslov rada: NR	Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva <i>Salmonella</i> Enteritidis i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm
Jezik publikacije: JP	srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 170 stranica, 73 slike, 16 tabela, 223 literaturna navoda
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica: PO	<i>Salmonella</i> Enteritidis, biofilm, etarska ulja
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj tezi finansirana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije – III46012 i III46009

Izvod:
IZ

Poznavanje i razumevanje adhezivne sposobnosti i formiranja biofilma patogenih bakterija, kao i njihovog odnosa prema faktorima koji mogu stimulisati ili inhibirati razvoj biofilma, je od fundamentalnog značaja za iznalaženje mera za njihovu efikasnu prevenciju i eliminaciju.

Imajući u vidu navedenu činjenicu kao i da je *Salmonella enterica* serotip Enteritidis epidemiološki najfrekventniji serotip cilj ovog istraživanja je bio da se ispita: sposobnost različitih sojeva *Salmonella* Enteritidis izolovanih iz kliničkog materijala, hrane za životinje i odabranog referentnog soja da formiraju biofilm, adherentnost na površine od stakla i nerđajućeg čelika, sposobnost preživljavanja odabranih biofilm produkujućih sojeva kao i mogućnost primene konfokalne laserske i skening elektronske mikroskopije u vizuelizaciji trodimenzionalne strukture biofilma.

Određivanjem morfotipa kolonija na Kongo red agaru na temperaturi inkubiranja od 25°C među testiranim izolatima detektovana su tri morfotipa RDAR (red, dry and rough), BDAR (brown dry and rough) i SAW (smooth and white). Polovina testiranih izolata je eksprimirala RDAR morfotip. Izolati koji su eksprimirali karakterističan morfotip na ovoj temperaturi su formirali na vazduh tečnost međufazi isti tip pelikule.

Uporednom analizom rezultata primenjenih skrining testova za utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma pri temperaturi inkubiranja od 25°C ustanovljena je korelacija između pojave određenog morfotipa na Kongo crvenom agaru i sposobnosti formiranja biofilma u kristal violet i pelikula testu. Međutim, sa povećanjem temperature inkubiranja na 37°C, ova korelacija nije ustanovljena, sa izuzetkom izolata SE8.

Svi testirani izolati su pokazali sposobnost adherencije na površinu stakla i nerđajućeg čelika, ali u različitoj meri. Na sposobnost

adherencije povoljniji uticaj je imala temperatura inkubiranja od 25°C ($p < 0,05$), sa izuzetkom izolata SE3 ($p > 0,05$). Između stepena adherencije izolata na površine stakla i nerđajućeg čelika nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Praćenjem stope preživljavanja tokom 28 dana u uslovima isušivanja evidentirana je znatno veća stopa preživljavanja ćelija izolata RDAR morfotipa u odnosu na stopu preživljavanja ćelija BDAR morfotipa ($p < 0,05$). Praćenjem stope preživljavanja tokom 90 dana u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija, zabeležena je veća stopa preživljavanja u odnosu na stopu preživljavanja u uslovima isušivanja. U uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija nakon devedeset dana ispitivanja kod obe grupe izolata procenat vijabilnih ćelija je iznosio više od 50%.

Primenjenim mikroskopskim tehnikama (CLSM i SEM) omogućena je detaljna vizualizacija formiranih biofilmova. Na modelu izolata SE_{RDAR} morfotipa, ustanovljeno je da se formiranje biofilma pod primenjenim eksperimentalnim uslovima, odvija u tri faze: 1) inicijalna adhezija za površinu i formiranje manjih ćelijskih agregata (24h); 2) formiranje većih ćelijskih agregata uz produkciju EPS (48h); 3) sazrevanje biofilma uz značajnu produkciju EPS što omogućava formiranje stabilne trodimenzionalne strukture biofilma (96h).

Nasuprot karakteristikama koje bakterije pokazuju tokom rasta u medijumima koji obiluju hranljivim materijama, bakterije u biofilmovima pokazuju drugačije osobine u pogledu ekspresije gena i karakteristika rasta. Zahvaljujući ovim razlikama, bakterije u biofilmovima pokazuju povećanu rezistenciju na antibiotike i dezinficijense, zbog čega se konstantno razvijaju nove kontrolne strategije u cilju iznalaženja potencijalnih bioloških rešenja koja pored različitih enzima, faga, antimikrobnih jedinjenja proizvedenih od strane mikroorganizama uključuju i antimikrobna jedinjenja biljnog porekla kao što su biljni ekstrakti, etarska ulja i različiti začini. Stoga, je u okviru drugog segmenta ovog istraživanja ispitivan hemijski sastav etarskih ulja, antimikrobni efekat etarskih ulja (*O. heracleoticum*, *O. vulgare*, *Th. vulgaris* i *Th. serpyllum*) i pojedinačnih komponenti etarskog ulja (karvakrola i timola) na bujonske kulture testiranih sojeva *Salmonella* Enteritidis kao i uticaj odabranih koncentracija etarskih ulja na inicijalnu adheziju i već formirani biofilm odabranih sojeva *Salmonella* Enteritidis.

Etarska ulja je karakterisao visok zbirni udeo glavnih fenolnih komponenti karvakrola i timola: *O. heracleoticum* (71,6%), *O. vulgare* (63,6%), *Th. vulgaris* (59,77%), *Th. serpyllum* (40,04%). Etarska ulja su ispoljila antimikrobni efekat sledećim redosledom: *O. heracleoticum* > *O. vulgare* = *Th. vulgaris* > *Th. serpyllum*. Antimikrobni efekat etarskih ulja je bio direktno srazmeran zbiru fenolnih komponenti (karvakrola i timola) u etarskom ulju. U odgovoru na tretman etarskim uljima između izolata *S. Enteritidis* nisu ustanovljene razlike.

Etarska ulja, karvakrol i timol su pokazali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i posledično na formiranje biofilma testiranih izolata *S. Enteritidis* na dozno zavisani način. Upoređivanjem uticaja etarskih ulja na inhibiciju inicijalne adhezije i metaboličke aktivnosti ćelija

između izolata RDAR i BDAR morfotipa ustanovljene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Ispitivanjem uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na ukupnu biomasu biofilma i metaboličku aktivnost ćelija dokazano je da etarska ulja u primenjenim koncentracijama ispoljavaju uticaj na redukciju ukupne biomase formiranog biofilma i metaboličke aktivnosti bakterijskih ćelija na dozno zavisani način u funkciji vremena. Znatno veća efikasnost primenjenih tretmana je pokazana u slučaju njihove primene na biofilmove formirane od strane izolata BDAR morfotipa ($p < 0,05$).

Datum prihvatanja teme: 19.07.2013.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

dr Vladimir Tomović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik komisije

dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

dr Jovanka Lević, naučni savetnik, Institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, član

University of Novi Sad

Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monographic publication
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Ivana S. Čabarkapa, BSc of Science
AU in Biology, Specialist of Food
Microbiology

Mentor: Marija Škrinjar PhD, full professor
MN

Title: Ability of biofilm formation the different
TI strains of *Salmonella* Enteritidis and
inhibitory effect of essential oils on the
initial adhesion and preformed biofilm

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: 2015
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: 7 chapters, 170 pages, 73 figures, 16
PD tables, 223 references

Scientific field: Biotechnical sciences
SF

Scientific discipline	Food engineering
SD	
Subject, Key words	<i>Salmonella</i> Enteritidis, biofilm,
SKW	essential oil
UC	
Holding data:	Library of Faculty of Technology, Novi
HD	Sad
Note:	Researches in this thesis were funded
N	by Ministry of Education, Science and
	Technological Development of the
	Republic of Serbia – III46012 and
	III46009

Abstract:

AB

Knowledge and understanding ability of the pathogenic bacteria that adhere to surface and form biofilm, as well as their relationship between these abilities and factors that stimulate or inhibit biofilm development, are essential to develop strategies for their prevention and elimination.

Considering also the fact that *Salmonella enterica* serotype Enteritidis has been epidemiologically the most frequently found serotype, the aims of this study were to evaluate: biofilm forming ability of several *Salmonella* Enteritidis strains isolated from clinical material, feed and selected control strain, their ability to adhere to glass and stainless steel surfaces, survival of selected biofilm-producing strains, as well as the possibility of applying confocal laser scanning (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM) for visualization of biofilm three-dimensional structure.

Determination of colony morphotype on Congo red agar at incubation temperature of 25°C revealed that among all tested isolates three morphotypes were detected: RDAR (red, dry and rough), BDAR (brown dry and rough) and SAW (smooth and white). Half of all tested isolates expressed RDAR morphotype. All isolates that expressed specific morphotype at this incubation temperature also formed the corresponding type of pellicle at air-liquid interface.

Comparing the results of the applied assays was ascertained the correlation between specific morphotype on Congo red agar and biofilm forming ability in Cristal violet and pellicle tests, at incubation temperature of 25°C. In the case of assays conducted at 37°C, this correlation was not established, except for the isolate SE8.

All tested isolates showed varying degree of the ability to adhere to glass and stainless steel surfaces. Incubation temperature of 25°C had more favorable effect on the adherence, with the exception of isolate SE3 ($p > 0.05$). There were no statistically significant differences between adherence ability of all isolates to glass and stainless steel surfaces ($p > 0.05$).

Accompaniment of the survival rate during 28 days in the conditions of desiccation, the significantly higher survival rate was

obtained for RDAR than BDAR morphotype isolates ($p < 0.05$). Accompaniment of the survival rate during 90 days in the conditions of occasional availability of nutrients, it was detected the higher survival rate than in condition of desiccation. Under these conditions, after 90 days, there were more than 50% of viable cells among both groups of isolates.

Applied microscopic techniques (CLSM and SEM) provided detailed visualization of formed biofilms. On model of SE_{RDAR} morphotype isolate, it was established that biofilm formation under this experimental conditions has three phases: 1) initial adhesion to the surface and formation of small cell aggregates (24h); 2) formation of large cell aggregates followed with production of extracellular polymer substance (EPS) (48h); 3) maturation of biofilm followed with significant EPS production, which allows formation of stable three dimensional structure of the biofilm (96h).

Contrary to characteristics that bacteria expressed during their growth in the nutrient media, bacteria in biofilms show different properties in terms of genes expression and growth characteristics. Due to these differences, bacteria in biofilms showed higher resistance to antibiotics and disinfectants. For these reasons are being constantly developed new potential biological control strategies that aim at finding the potential biological solutions that besides different enzymes, phages, antimicrobial compounds produced by microorganisms, also include antimicrobial compounds of plant origin, such as extracts, essential oils and different spices.

Therefore, the other segment of this research was investigation of the chemical composition and antimicrobial properties of different essential oils (*O. heracleoticum*, *O. vulgare*, *Th. vulgaris* and *Th. serpyllum*) and their components (carvacrol and thymol), against broth cultures of *Salmonella* Enteritidis. Also, selected concentrations of essential oils were tested against initial adhesion and preformed biofilm of selected *Salmonella* Enteritidis isolates.

Essential oils were characterized by high amount of phenol compounds carvacrol and thymol: *O. heracleoticum* (71.6%), *O. vulgare* (63.6%), *Th. vulgaris* (59.77%) and *Th. serpyllum* (40.04%). Essential oils showed antimicrobial potential as follows: *O. heracleoticum* > *O. vulgare* = *Th. vulgaris* > *Th. serpyllum*. Antimicrobial effect was directly proportional to the total content of phenolic components (carvacrol and thymol) in essential oil. Between responses of different *S. Enteritidis* isolates to essential oil treatment, there was no significant difference.

Essential oils, carvacrol and thymol demonstrated inhibitory effect on initial adhesion and consequently, on biofilm formation of *S. Enteritidis* isolates, in a dose-dependent manner. Comparing influence of essential oil on the inhibition of initial cell adhesion and metabolic activity of cells RDAR and BDAR morphotype, no statistically significant differences were established ($p > 0.05$).

Examination of the influence of essential oils, carvacrol and thymol on total biomass of preformed biofilms and metabolic activity of cells, it was revealed that essential oils in applied concentrations cause reduction of total biomass of preformed biofilm and metabolic activity

of bacterial cells in a time and dose dependent manner. Applied treatments demonstrated significantly higher efficiency on BDAR morphotype biofilms ($p < 0.05$).

Accepted on Scientific Board 19.07.2013.

on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

dr Vladimir Tomović, associate professor,
Faculty of Technology, University of Novi Sad, chairman

dr Marija Škrinjar, full professor,
Faculty of Technology, University of Novi Sad, menthor

dr Jovanka Lević, research fellow,
Institute of Food Technology, University of Novi Sad, member

dr Dubravka Milanov, senior research associate, Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, member

Sadržaj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	ii
Spisak skraćenica.....	xii
1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Osnovne karakteristike salmonela.....	4
2.1.1. Morfološke, kulturne i biohemijske osobine.....	4
2.1.2. Nomenklatura i taksonomija salmonela.....	5
2.1.3. Salmoneloze.....	7
2.1.4. Rasprostranjenost salmonela.....	8
2.1.5. Epidemiološki podaci.....	9
2.2. Biofilm.....	11
2.2.1. Istorijat biofilma.....	11
2.2.2. Definicija biofilma.....	12
2.2.3. Formiranje biofilma.....	12
2.2.3.1. Adhezija.....	13
2.2.3.2. Faza agregacije, formiranje mikrokolonija i maturacija biofilma.....	14
2.2.3.3. Disperzija.....	15
2.2.4. „Quorum sensing“.....	16
2.2.5. Ekstracelularni matriks.....	17
2.2.6. Strukturne komponente ECM biofilma <i>Salmonella</i> spp.....	19
2.2.6.1. Proteinska frakcija matriksa biofilma.....	19
2.2.6.2. Egzopolisaharidna frakcija matriksa biofilma.....	20
2.2.7. Biofilm fenotip.....	21
2.2.8. Rezistencija bakterija u biofilmu.....	26
2.2.9. Posledice formiranja biofilma u industriji.....	29
2.2.10. Prevencija i kontrola biofilma.....	31
2.3. Etarska ulja.....	32
2.3.1. Hemijski sastav etarskih ulja.....	32
2.3.2. Mehanizam antimikrobnog delovanja.....	35
2.3.3. Uticaj etarskih ulja na biofilm.....	40
3. CILJ RADA.....	43
4. MATERIJAL I METODE.....	44
4.1. Kulture mikroorganizama.....	44
4.1.1. Kulturne, biohemijske i serološke karakteristike izolata <i>S. Enteritidis</i>	44
4.2. Ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma.....	45
4.2.1. Određivanje morfotipa.....	46
4.2.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija.....	46
4.2.3. Pelikula test.....	47
4.2.4. Kristal violet test na mikrotitar pločama.....	47
4.2.5. Određivanje sposobnosti adhezije izolata na staklo i čelik.....	49
4.2.6. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja.....	50
4.2.7. Vizuelizacija formiranog biofilma.....	50
4.2.7.1. Konfokalna laserska skeniranje mikroskopija.....	51
4.2.7.2. Skeniranje elektronska mikroskopija.....	52
4.3. Biljni materijal.....	52
4.3.1. Destilacija etarskog ulja.....	52
4.4. Hemijska analiza etarskog ulja.....	53
4.4.1. Gasna hromatografija (GC- FID).....	53
4.4.2. Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom (GC/MS).....	53

4.4.3. Identifikacija komponenti etarskog ulja	53
4.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	54
4.5.1. Pojedinačne komponente etarskog ulja	54
4.5.2. Rastvor resazurina	54
4.5.3. Standardizacija inokuluma.....	55
4.5.4. Bujon mikro-diluciona metoda	55
4.6. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm	58
4.6.1. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju	58
4.6.1.1. Određivanje nivoa metaboličke aktivnosti ćelija.....	59
4.6.2. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm	59
4.7. Statistička obrada podataka.....	61
5. REZULTATI I DISKUSIJA	62
5.1. Potvrđivanje kulturelnih, biohemijskih i seroloških karakteristika korišćenih izolata	62
5.2. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma	64
5.2.1. Određivanje morfotipa	64
5.2.2. Pelikula test.....	68
5.2.3. Kristal violet test	72
5.2.3.1. Kristal violet test (25°C).....	73
5.2.3.2. Kristal violet test (37°C).....	74
5.3. Sposobnost adherencije.....	82
5.4. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja	85
5.5. Vizuelizacija strukture biofilma	92
5.5.1. CLSM	92
5.5.2. SEM	103
5.6. Ispitivanja sadržaja i hemijskog sastava etarskih ulja	110
5.6.1. Sadržaj etarskih ulja	110
5.6.2. Hemijski sastav etarskih ulja.....	111
5.6.2.1. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja <i>Origanum heracleoticum</i>	114
5.6.2.2. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja <i>Origanum vulgare</i>	116
5.6.2.3. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja <i>Thymus vulgaris</i>	118
5.6.2.4. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja <i>Thymus serpyllum</i>	121
5.7. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja.....	125
5.8. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm	131
5.8.1. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju	131
5.8.2. Uticaj etarskih ulja na formirani biofilm	136
6. ZAKLJUČAK.....	143
6.1. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma	143
6.2. Sposobnost adherencije.....	144
6.3. Sposobnost preživljavanja	144
6.4. Vizualizacija biofilma	145
6.5. Hemijski sastav etarskih ulja	145
6.6. Antimikrobna aktivnost.....	146
6.7. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju.....	146
6.8. Uticaj etarskih ulja na formirani biofilm	147
6.9. Značaj rezultata i buduća istraživanja	148
7. LITERATURA	150

Spisak skraćenica

adrA	eng. „ <i>aggD</i> -dependent regulator“
AI	Autoinducer
ATCC	eng. „American Type Culture Collection“
a_w	Aktivnost vode
BapA	eng. „ <i>biofilm-associated protein</i> “
BDAR	eng. „ <i>brown dry and rough</i> “
bsc	eng. „ <i>bacterial cellulose synthase</i> “
c-di-GMP	Ciklični di-guanozin mono fosfat
CFU	eng. „ <i>colony forming unit</i> “
CLSI	eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“
CLSM	Konfokalna laserska skening mikroskopija
csg	eng. „ <i>curli subunit gene</i> “
CV	Kristal violet test
D.L.	Medijum za dekarboksilaciju L-lizina
ECM	Ekstracelularni matriks
EFSA	eng. „European Food Safety Authority“
EPS	Ekstracelularna polimerna supstanca
FDA	Fluorescein diacetat
FIC _{index}	Frakcioni inhibicioni koncentracijski indeks
FIC	Frakciona inhibiciona koncentracija
GC/MS	Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom
GC-FID	Gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom
HAL	Harlequin-Salmonella ABC agar
„H“ _{f1}	Flagelarni antigen faze 1
„H“ _{f2}	Flagelarni antigen faze 2
¹ H NMR	eng. „Proton Nuclear Magnetic Resonance“
LBA	Luria-Bertani agar
LB	Luria-Bertani bujon
LSM	Laserska skening mikroskopija
MA	Određivanje metaboličke aktivnosti
MBB	Metoda brojanja bakterija
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija
MBEC	Minimalna biofilm eradikaciona koncentracija
MBIC	Minimalna biofilm inhibitorna koncentracija
McF	McFarland standard
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
O	Orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid
„O“	Somatski antigen
OD	eng. „Optical density“
PCA	Agar za ukupan broj bakterija
PDAR	eng. „ <i>pink dry and rough</i> “
PI	Propidium jodid
QS	eng. „quorum sensing“
RDAR	eng. „ <i>red, dry and rough</i> “
rpoS	eng. „ <i>RNA polimeraza, sigma</i> “
SAW	eng. „ <i>smooth and white</i> “
SBAM	eng. „ <i>smooth brown and mucoid</i> “
SEM	Skening elektronska mikroskopija
SS	Salmonella-Shigella agar
tafi	Tanke agregativne fimbrije
TSA	Trypton soja agar
TSB	Trypton soja bujon
TSI	Trostruki kliglerov šećer
U	Urea agar
V.P	Medijum za Voges-Proskauer reakciju
VBNC	eng. „ <i>viable but nonculturable state</i> “
XLD	Ksiloza lizin dezoksiholatni agar
lem	Talasna dužina emisije
lex	Talasna dužina ekscitacije

1. UVOD

Sposobnost formiranja biofilmova je drevna karakteristika bakterija, i drugih prokariota koja sa evolucione tačke gledišta predstavlja strategiju preživljavanja u promenljivim i često veoma nepovoljnim uslovima okruženja. Nasuprot karakteristikama koje bakterije pokazuju tokom rasta u medijumima koji obiluju hranljivim materijama, bakterije u biofilmovima pokazuju drugačije osobine u pogledu ekspresije gena i karakteristika rasta.

Zahvaljujući ovim razlikama, bakterije u biofilmovima pokazuju povećanu rezistenciju na antibiotike i dezinficijense, zbog čega je danas izuzetno teško izlečiti infekcije izazvane bakterijama koje formiraju biofilm primenom konvencionalnih antibiotika, kao što se i primenom dezinficijensa u preporučenim koncentracijama vrlo teško mogu kontrolisati bakterije u bolničkim okruženjima i mestima proizvodnje namirnica. U medicinskoj i industrijskoj mikrobiologiji, koncept biofilmova koje formiraju bakterije prihvaćen je devedesetih godina prošlog veka i on je danas jedan od najvećih izazova u oblasti zaštite zdravlja ljudi i proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane.

Činjenica da bakterije formiraju biofilm na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom kao i na opremi u prehrambenoj industriji, otvara novu oblast istraživanja o ulozi biofilma kao potencijalnog izvora kontaminacije namirnica bakterijama. Biofilmovi patogenih bakterija nađeni su ne samo na pokretnim trakama, mašinama za seckanje, pakovanje i ostalim površinama koje dolaze u kontakt sa hranom već i na površinama različitih namirnica. Biofilmovi koje bakterije formiraju na različitim površinama u pogonima prehrambene industrije mogu predstavljati dugotrajan izvor kontaminacije namirnica, ne samo bakterijama koje izazivaju njihovo kvarenje, već i vrstama koje se prenose hranom: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*.

Bakterije roda *Salmonella* se već decenijama smatraju jednim od najvažnijih patogena koji imaju veliki zdravstveni značaj, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. Stoga, poznavanje i

razumevanje adhezivne sposobnosti i formiranja biofilma ovih vrsta, kao i njihovog odnosa prema faktorima koji mogu stimulirati ili inhibirati razvoj biofilma, ima veliki značaj sa aspekta prevencije njegovog stvaranja, kao i njegove eliminacije. Poznato je da pojedini sojevi patogenih vrsta bakterija u pogonima za proizvodnju hrane mogu egzistirati tokom dužeg vremenskog perioda. Ovakvi sojevi su poznati kao „house strains“, a pretpostavlja se da je egzistencija takvih sojeva omogućena upravo njihovom sposobnošću da formiraju biofilm. Jednom formirani biofilmovi u industrijskim pogonima se teško uklanjaju i dovode do pojave perzister populacija uzrokujući konstantnu kontaminaciju kroz ceo proizvodni pogon. Spoznajom da biofilm predstavlja neospornu biološku opasnost, prevencija i kontrola biofilмова u pogonima prehrambene industrije postaju imperativ u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane.

Poslednjih decenija ubrzan tehnološki napredak je doveo do uvođenja novih tehnologija u proizvodnji hrane što je kao posledicu imalo povećanje potreba za unapređenjem sanitarnih procedura i higijenskih uslova, kako u prehrambenoj, tako i u industriji hrane za životinje. Pored uspostavljenih sistema Dobre proizvođačke prakse (DPP) i Dobre higijenske prakse (DHP) u cilju prevencije i kontrole biološke opasnosti kao što je bakterijski biofilm, mogu se primeniti različiti fizički i hemijski tretmani sanitacije. Iako pojedini fizički tretmani poput ultrazvuka, magnetnih i električnih polja imaju dobre rezultate, iz ekonomskih razloga metode eliminacije se uglavnom svode na upotrebu hemijskih tretmana. Poznato je da sprovođenje konvencionalnih hemijskih metoda sanitacije obično uključuje upotrebu agresivnih jedinjenja kao što su hlor, peroksidi i kvartenerna amonijumova jedinjenja koja osim što mogu imati rezidualan efekat, potencijalno štetan po ljudsko zdravlje mogu izazvati i nepoželjne senzorne osobine krajnjih proizvoda. Takođe, sukcesivna primena dezinficijensa iste vrste može prouzrokovati redukciju osetljivosti pojedinih vrsta mikroorganizama koji ostaju na površinama uzrokujući konstantnu kontaminaciju. Osim toga, efikasnost dezinficijensa u preporučenim koncentracijama je rezultat ispitivanja na bujonskim kulturama bakterija. Dok je njihova primena na bujonske kulture efikasna i do 100%, primena istih koncentracija na bakterije u biofilmu pokazuje značajno smanjenu efikasnost, tako da je za njihovu eliminaciju često potrebna znatno veća koncentracija.

U skladu sa trendom proizvodnje i upotrebe zdravstveno bezbedne hrane potrošači u sve većoj meri zahtevaju upotrebu prirodnih proizvoda tzv. „zelenih hemikalija“ zbog čega se konstantno razvijaju nove kontrolne

strategije u cilju iznalaženja potencijalnih bioloških rešenja koja pored različitih enzima, faga, antimikrobnih jedinjenja proizvedenih od strane mikroorganizama uključuju i antimikrobna jedinjenja biljnog porekla kao što su ekstrakti, etarska ulja i različiti začini.

Dosadašnjim istraživanjima na ovom polju uglavnom je pokazana efikasnost etarskih ulja i njihovih konstituenata u inhibiciji rasta vegetativnih bakterijskih ćelija, dok se samo mali broj istraživanja bazira na ispitivanju efekata ovih prirodnih supstanci na bakterije u biofilmu. Time postoji više nego opravdana potreba da se napravi realna, naučno zasnovana procena upotrebe supstanci biljnog porekla u cilju prevencije i eliminacije bakterijskih biofilmova.

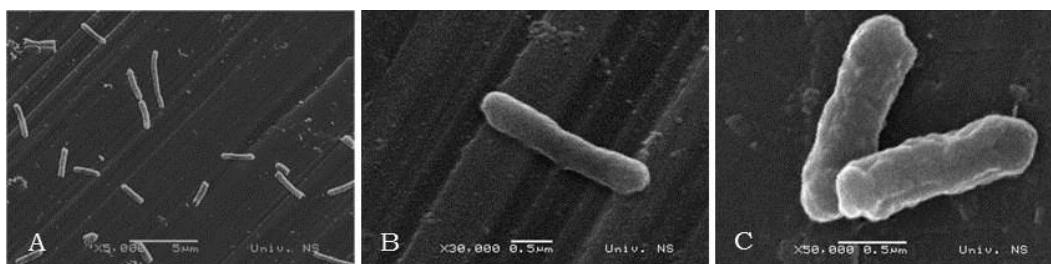
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Osnovne karakteristike salmonela

Rod *Salmonella* pripada familiji *Enterobacteriaceae*. Prvu salmonelu uzročnika tifusa, otkrio je Eberth 1880. godine u slezini i mezenterijalnim limfnim žlezdama bolesnika koji je umro od crevnog tifusa. Četiri godine kasnije Gaffky je uspeo da je kultiviše i detaljnije opiše. Drugu bakteriju koja je po mnogim osobinama ličila na uzročnika crevnog tifusa, izolovali su Salmon i Smith iz svinja koje su болоvale od svinjske kolere. Na predlog francuskog bakteriologa Liginerésa, u čast Salmonu, ova bakterija je nazvana salmonela (Ellermeier i Slauch, 2006).

2.1.1. Morfološke, kulturelne i biohemijske osobine

Salmonele su gramnegativni, fakultativno anaerobni, nesporogeni štapići širine od 0,7 do 1,5 μm i dužine od 2 do 5 μm (Slika 2.1.). Salmonele nemaju vidljivu kapsulu, sve su pokretne (osim *S. Gallinarum* i *S. Pullorum*), zahvaljujući peritrihijalno raspoređenim flagelama, a pojedini sojevi proizvode i fimbrije (Škrinjar, 2001).



Slika 2.1. Skening elektronske mikrografije ćelija *Salmonella* Enteritidis; uvećanja 5. 000 (A), 30.000 (B) i 50.000 (C)

Salmonele fermentišu veliki broj ugljenih hidrata do kiseline i gasa. Pojedini serotipovi salmonela se međusobno razlikuju u metabolizmu ugljenih hidrata, a *S. Typhi* je jedini serotip koji ne produkuje gas prilikom fermentacije šećera. Zajedničke biohemijske karakteristike većine salmonela su prikazane u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Biohemijske karakteristike salmonela

Biohemijski test	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi</i>	Ostale salmonele
Fermentacija glukoze (TSI)	+	+	+
Stvaranje gasa iz glukoze (TSI)	-	+	+
Fermentacija laktoze (TSI)	-	-	-
Fermentacija saharoze (TSI)	-	-	-
Produkcija H ₂ S (TSI)	+	-/+	+
Hidroliza uree	-	-	-
Dekarboksilacija lizina	+	-/+	+
β-galaktosidaza	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Indol	-	-	-

TSI (trostruki kliglerov šećer)

Salmonele se razmnožavaju u širokom temperaturnom opsegu (7 - 45°C), sa optimalnom temperaturom od 37°C. Optimalne vrednosti pH za salmonele kreću se u intervalu 6,5 - 7,5, a razmnožavanje je moguće i u opsegu pH 4,05 - 9,7.

Danas je za izolaciju salmonela iz različitih uzoraka na raspolaganju niz diferencijalnih i selektivnih čvrstih podloga (ksiloza lizin dezoksiholatni agar, Salmonella-Shigella, Wilson-Blair, Harlequin Salmonella agar i dr.). Primena ovih podloga u kombinaciji sa podlogama za umnožavanje (puferisana peptonska voda) i uz primenu bujona koji vrše eliminaciju propratnih mikroorganizama daje zadovoljavajuće rezultate. Konačna identifikacija salmonela izvodi se primenom biohemijskih testova i serološkom tipizacijom.

2.1.2. Nomenklatura i taksonomija salmonela

Osnova za klasifikaciju i identifikaciju salmonela je serološka tipizacija koju je napravio White, a usavršio Kauffmann i drugi autori. Sistem serološke tipizacije se bazira na identifikaciji razlika u

polisaharidnom delu lipopolisaharidnog sloja (O ili somatski antigen), filamentoznog dela flagela (H ili flagelarni antigen) i ovojnog antigena (Vi antigen) koji su prisutni na površini bakterije.

Na osnovu rezultata serotipizacije rod *Salmonella* je prvobitno bio podeljen u vrste po principu: „jedan serotip - jedna vrsta“, a nazivi serotipova su davani prema Lineovoj binominalnoj nomenklaturi (na primer *Salmonella enteritidis*). Nomenklatura roda *Salmonella* od ovog prvobitnog koncepta „jedan serotip - jedna vrsta“ doživljava potpuni preokret početkom sedamdesetih godina kada su Crosa i saradnici primenom DNK-DNK hibridizacije dokazali da su svi serotipovi salmonela vrlo srodni i da sličnost u DNK sekvenci između različitih serotipova iznosi 95-99% sa izuzetkom vrste *Salmonella bongori*. Nakon objavljivanja ovih genetičkih dokaza sve salmonele (izuzev *S. bongori*) su objedinjene u jednu vrstu koja je nazvana *Salmonella enterica* (Brenner et al., 2000).

Prema današnjoj nomenklaturi rod *Salmonella* je predstavljen sa dve vrste, *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Vrsta *Salmonella enterica* obuhvata šest podvrsta: *enterica* (podvrsta I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) i *indica* (VI). Vrste *Salmonella enterica* pripadaju svi najvažniji serotipovi patogeni za ljude. U okviru ove vrste do danas je identifikovano preko 2500 serotipova (Tabela 2.2.).

Tabela 2.2. Vrste i podvrste salmonela (Grimont i Weill, 2007)

Vrsta i podvrsta	Broj serotipova u okviru podvrste
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1 531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i> (V)	22
Ukupno	2 579

Imena serotipova se uobičajeno daju prema sindromu koji izazivaju (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B i C), specifičnim domaćinima (*S. Gallinarum*) ili prema geografskom poreklu novog serotipa (*S. Kentucky*, *S. London*, *S. Panama*). Tokom promena u taksonomiji, ime serotipa ostaje glavna taksonomska definicija izolata salmonela. Široko je prihvaćeno da se

umesto *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis koristi naziv *Salmonella* Enteritidis (gde je Enteritidis oznaka serotipa, a ne vrste) (Grimont i Weill, 2007).

2.1.3. Salmoneloze

Na osnovu stepena adaptacije na domaćina salmonele se mogu podeliti u tri grupe. U prvu grupu spadaju ubikvitarni serotipovi sa visokim stepenom adaptacije na različite vrste domaćina („generalist“ - *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*). Zahvaljujući često kolonizaciji i visokom nivou izlučivanja putem fecesa kod životinja gajenih za ljudsku ishranu, ubikvitarni serotipovi ulaze u lanac ishrane i izazivaju slučajeve salmoneloza kod ljudi. U drugu grupu spadaju serotipovi koji su primarno adaptirani na jednu vrstu domaćina, ali mogu da izazovu bolest kod drugih vrsta („host adapted“ - *S. Dublin* izaziva ozbiljnu bolest kod goveda, ali takođe može da izazove oboljenje i kod ljudi). Treću grupu predstavljaju serotipovi koji su isključivo adaptirani na jednu vrstu domaćina. Serotipovi ove grupe su sposobni da izazovu ozbiljne sistemske infekcije samo kod ograničenog broja srodnih vrsta („host specific“ - *S. Gallinarum* kod živine, *S. Typhi* kod čoveka ili *S. Abortus-ovis* kod ovaca) (Xu, 2007).

Serotipovi *Typhi* i *Paratyphi* su primarno patogeni za čoveka. Ovi serotipovi u humanoj populaciji izazivaju nezoonotske septikemično-tifoidne forme oboljenja (crevna groznica). Ostale vrste salmonela su visoko adaptirane na životinje, ali mogu izazvati oboljenja kod ljudi, uglavnom u vidu crevnih infekcija, takođe mogu izazvati i septikemije, a često i postojanje dugotrajnog kliconoštva. U oko 5% slučajeva simptomi mogu biti ozbiljniji, praćeni jakom dehidracijom. Kod imunokompromitovanih osoba moguć je i smrtni ishod (u oko 2% slučajeva), posebno kod infekcije rezistentnim serotipovima salmonela. Najvažniji zoonotski serotipovi koji izazivaju alimentarne infekcije kod ljudi su *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*.

Infektivna doza, kada su u pitanju infekcije salmonelama, varira u zavisnosti od soja i stanja imunološkog sistema. Dostupni epidemiološki podaci ukazuju da infekcija može nastati ingestijom od <10 do 10⁹ CFU/g („colony forming unit“ - broj bakterija koje formiraju kolonije). Infektivna doza je niža ukoliko se salmonela nalazi u namirnicama sa visokim sadržajem masti i proteina koji štite bakterijsku ćeliju od uticaja niske pH vrednosti želudačnog soka.

2.1.4. Rasprostranjenost salmonela

Salmonele su ubikvitarni mikroorganizmi. Ubikvitarna priroda omogućava salmonelama životni ciklus koji se sastoji od prolaza kroz domaćina u prirodnu sredinu i nazad u novog domaćina. Unutar domaćina obezbeđena im je sredina pogodna za rast i razmnožavanje. Izlučivanjem u spoljnu sredinu putem fecesa, bakterije dospevaju u potpuno drugačije okruženje suočavajući se sa ograničenjima u pogledu hranljivih materija, niskom vlažnošću, osmotskim stresom, varijacijama temperature, pH vrednosti i prisustvom predatora (Karabasil, 2006). Mnogi autori smatraju da salmonele preživljavaju ovakve uslove ulazeći u vijabilno, ali nekultivabilno stanje („viable but nonculturable state“ – VBNC). U ovom stanju bakterije su „uspavane“, ali metabolički aktivne i ne mogu se kultivisati u laboratorijskim uslovima. Nakon dospevanja u povoljne uslove dolazi do njihovog rasta i razmnožavanja (Gupte et al., 2003). Formiranje biofilma i ulaz u vijabilno, ali nekultivabilno stanje su moguća objašnjenja za višegodišnju perzistenciju ove vrste bakterija na raznim mestima kao što su farme, industrijski pogoni i zemljište.

Zahvaljujući ubikvitarnosti salmonele se mogu naći u vodi, zemljištu pa čak i biljnim vrstama. Iako se biljne vrste tradicionalno ne smatraju kao domaćini za enterobakterije, u poslednjih nekoliko godina broj epidemija izazvanih namirnicama neanimalnog porekla je u velikom porastu. Istraživanja su potvrdila da kontaminacija zemljišta preko voda za navodnjavanje ili svežeg stajnjaka može uzrokovati kontaminaciju velikog broja poljoprivrednih kultura kao što su paradajz, zelena salata, peršun, rotkvica, šargarepa i do šest meseci nakon kontaminacije, ukazujući na visoku perzistentnost salmonela u prirodnom okruženju (Steenackers et al., 2012). Opstanak i perzistencija salmonela i drugih enterobakterija na spoljašnjoj površini biljaka u velikoj meri je posledica njihove široke adaptivne sposobnosti.

Istraživanja na ovom polju ukazuju da salmonela može kolonizirati različite delove biljaka: seme, izdanke, listove i koren pa čak i zrele plodove zbog čega biljke predstavljaju vrlo važan vektor u transmisiji salmonela između domaćina. Pored kontaminacije površine voća i povrća spoljašnjim izvorima, dokazana je i sposobnost salmonela da aktivno inficiraju biljke, uz intracelularnu poziciju i aktivno umnožavanje, sa posledičnim patogenim efektima u svim stadijumima razvića biljaka (Schikora et al., 2008).

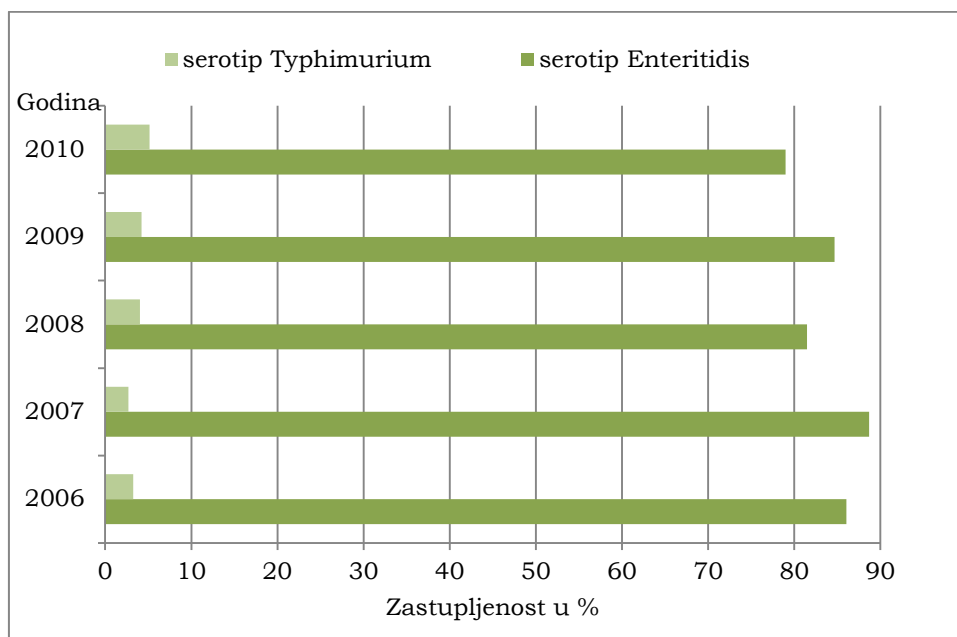
2.1.5. Epidemiološki podaci

Uprkos značajnom napretku na polju bezbednosti proizvodnje i distribucije hrane, infekcije izazvane salmonelama su široko rasprostranjene u svetu, pogađajući celokupnu strukturu humane populacije zbog čega predstavljaju veliki javno zdravstveni problem.

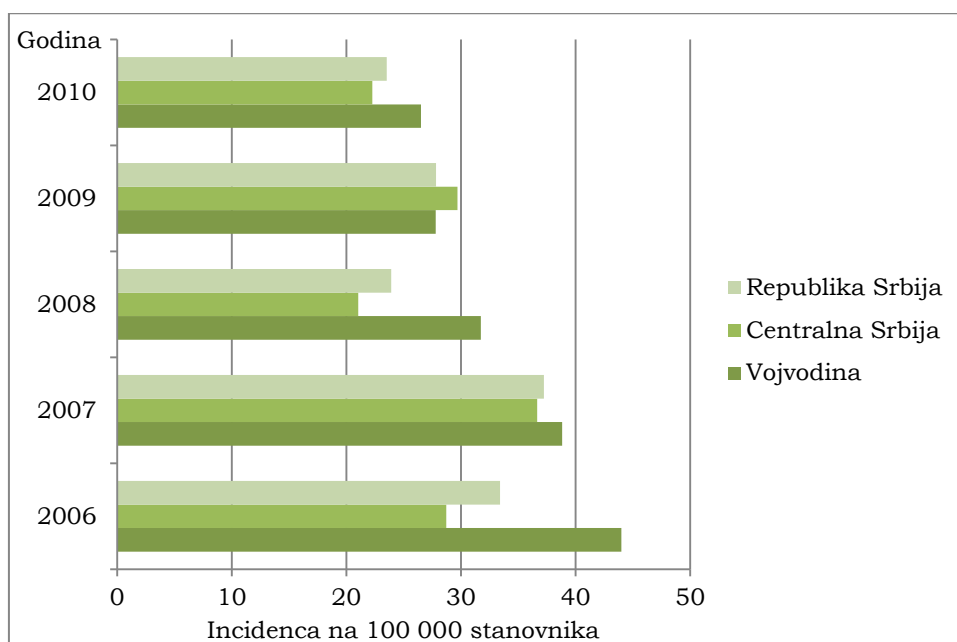
Glavni rezervoar *Salmonella* spp. u prirodi su životinje, a živinsko, svinjsko i druge vrste mesa, jaja i mlečni proizvodi su najčešći izvori epidemija izazvanih ovim patogenom. Prema podacima koje je objavila EFSA (European Food Safety Authority) u periodu od 2007-2011 godine samo na području Evropskih država (EFSA članica) je evidentirana 1271 epidemija izazvana salmonelom iz namirnica animalnog porekla. Zabrinjavajući je podatak da se sve učestalija transmisija ovog patogena vrši preko namirnica neanimalnog porekla. Tako su u poslednjih pet godina kod 37 epidemija salmoneloze, kao izvor infekcije identifikovane namirnice neanimalnog porekla, kao što su: sveža salata, paradajz, naklijala semena, voćni sokovi, dinje i orasi (EFSA, 2013b).

Prema podacima Evropskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control) na području EU tokom 2011. godine salmoneloze su kod ljudi posle kampilobakterioze najučestalije alimentarne infekcije. *Salmonella enterica* serotip Enteritidis je jedan od najčešćih uzročnika salmoneloze u humanoj populaciji, s obzirom da je 44,4% infekcija salmonelom izazvano upravo ovim serotipom. Od ostalih serotipova zastupljeni su Typhimurium (24,9%), monofazični Typhimurium (4,7%) i Infantis (2,2%) (EFSA, 2013a).

Prema podacima centra za kontrolu i prevenciju bolesti Republike Srbije kao najfrekventniji uzročnik salmoneloze u humanoj populaciji je takođe zabeležen serotip Enteritidis (Slika 2.2.). Tokom 2011. godine na području Evropskih država (EFSA članica) registrovano je 99.548 slučajeva salmoneloze sa incidencom 20,7/100.000 stanovnika. Upoređivanje broja slučajeva salmoneloze zabeleženih tokom 2011. godine sa brojem slučajeva evidentiranih u predhodnim godinama ukazuje da se broj alimentarnih infekcija izazvanih ovim patogenom smanjio za 5,4% u odnosu na 2010. godinu i čak 37,9% u odnosu na 2007. godinu. Opadajući trend alimentarnih infekcija izazvanih salmonelom zabeležen je kroz sukcesivan niz godina i u Republici Srbiji (Slika 2.3.).



Slika 2.2. Zastupljenost serotipova Typhimurium i Enteritidis u periodu od 2006-2010 godine u Republici Srbiji



Slika 2.3. Incidenca salmoneloze u Republici Srbiji

Predpostavlja se da je jedan od razloga smanjenja broja slučajeva salmoneloze uglavnom rezultat implementacije specijalnih programa za kontrolu salmonela na farmama i HACCP sistema (Hazard Analysis Critical Control Point) u procesima proizvodnje (EFSA, 2013a), ali i povećane informisanosti konzumenata.

2.2. Biofilm

2.2.1. Istorijat biofilma

Antonie van Leeuwenhoek je još 1684. godine, uočio naslage mikroorganizama na površini zubne gleđi što bi se moglo smatrati prvim otkrićem biofilma. Nakon van Leeuwenhoek-ovog otkrića ispitivanja u ovoj oblasti nastavljena su tek tridesetih godina XIX veka (Costerton et al., 1978).

U ovim početnim istraživanjima fenomen adherencije bakterija ispitivali su Zobell, Henrici, Windogradsky, Cholodny i Conn. Važna konstatacija ovih ranih istraživanja bila je da bakterije adherirane za površinu pokazuju drugačiji fenotip od onih koje rastu u tečnoj sredini (Lappin-Scott, 1999).

U okviru ovog razdoblja najveći naučni doprinos u ovoj oblasti imao je Zobell. Zobell i Allen (1935), su prvi konstruisali aparat specijalno dizajniran za ispitivanje adherencije bakterija za površine. Aparat je predstavljao nosač za 16 staklenih slajdova i bio je dizajniran da bude spušten u okean kako bi morski mikroorganizmi adherirali za staklene slajdove. Primenom ove aparature Zobell i Allen su pronašli mnogo veću raznovrsnost mikroorganizama u biofilmu formiranom na staklenim slajdovima nego što se moglo naći kultivacijom morske vode.

Obimnija istraživanja u ovoj oblasti započela su tek krajem 60-tih, i početkom 70-tih godina XX veka. Jones et al. (1969) su po prvi put upotrebili transmisioni elektronski mikroskop za proučavanje biofilma stvorenog na filterima sistema za navodnjavanje biljaka, dok su istovremeno primenom boje rutenijum-crveno, ovi naučnici pokazali da je matriks u koji su bakterije uronjene polisaharidne prirode.

Termin biofilm je prvi put upotrebljen u naučnoj literaturi 1977. godine u Švedskom naučnom časopisu „Vatten“. Do tog vremena upotrebljavao se samo nezvanično između istraživača, nekoliko godina pre nego što je postao prihvatljiv kao termin za publikovanje.

Prekretnicu u proučavanju biofilma predstavlja 1978. godina, kada su Costerton i saradnici po prvi put definisali pojam biofilma i postavili teoriju o načinu njegovog formiranja. Prema njihovoj teoriji, većina bakterija u vodenim ekosistemima siromašnim hranljivim materijama raste pričvršćena za površinu, uronjena u matriks koji same produkuju formirajući biofilm (Costerton et al., 1978).

2.2.2. Definicija biofilma

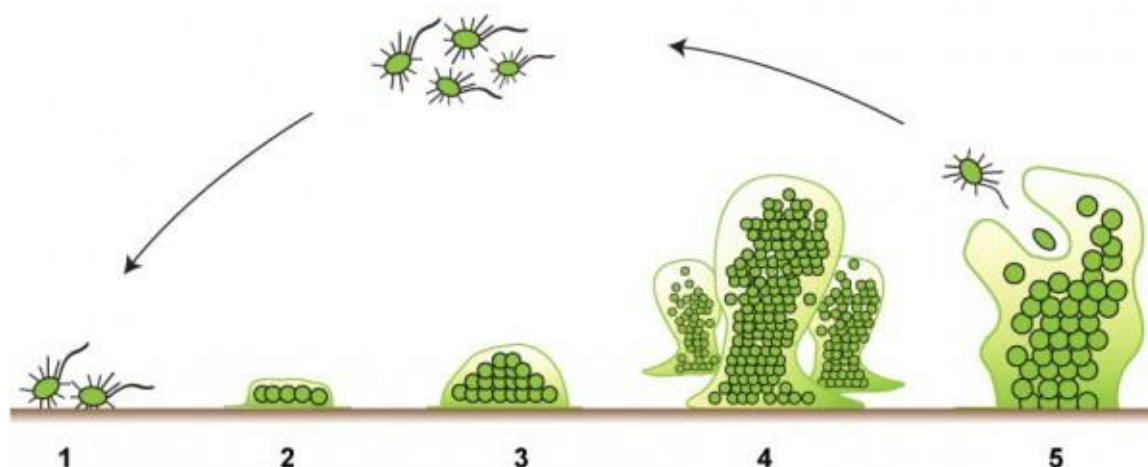
U protekle dve decenije definicija biofilma se neprestano menjala jer svako novo istraživanje nadograđuje postojeće znanje o formiranju, strukturi, maturaciji i rezistenciji biofilma. Objedinjavanjem saznanja o već poznatim karakteristikama, i novootkrivenih fizioloških osobina, biofilm je danas definisan kao strukturna zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za supstrat i uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstance koju sami proizvode, a koji pokazuju izmenjeni fenotip usled promene brzine rasta i transkripcije gena koje ne uočavamo kod planktonskih organizama (Donlan i Costerton, 2002).

U svim prirodnim ekosistemima mikroorganizmi pokazuju tendenciju vezivanja za žive i nežive površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom biofilm. Danas je opšte prihvaćeno da je biofilm najčešći način života mikroorganizama (Steenackers et al., 2012). Smatra se da je ovakav način života bakterija star koliko i same bakterije.

2.2.3. Formiranje biofilma

Tokom poslednje decenije primenom novih mikroskopskih i molekularnih metoda, pokazano je da biofilmovi nisu proste bakterijske naslage na različitim površinama, već da su u pitanju biološki sistemi sa visokim stepenom organizacije, u kojima mikroorganizmi grade koordinisane i funkcionalne zajednice. Bez obzira na to da li su sastavljeni od jedne ili više bakterijskih vrsta, biofilmovi se razvijaju po obrascima višecelijskog ponašanja (Scheie i Petersen, 2004).

Formiranje biofilma je složen proces koji se odigrava u nekoliko faza: faza adhezije (1), faza agregacije (2), faza formiranja mikrokolonija (3), faza maturacije i formiranja zrelog biofilma (4) i faza disperzije (5) (Slika 2.4.). Neki autori kondicioniranje površine smatraju prvim korakom u formiranju biofilma, iako kondicioniranje predstavlja interakciju površine i njene okoline (Milanov et al., 2008; Percival et al., 2011). U prirodnom okruženju mikroorganizmi ne adherišu za supstrat sami po sebi već se pridržavaju za ovaj tzv. kondicionirani sloj za koji je poznato da se formira na većini supstrata kao rezultat hemijske modifikacije površine (Percival et al., 2011).



Slika 2.4. Faze razvoja biofilma
(<http://www.emerypharmaservices.com/>)

Adhezija bakterija je na taj način uslovljena kompatibilitetom makromolekula kondicionirane površine sa površinskim osobinama bakterije, što može ili da olakša ili da redukuje bakterijsku adheziju na supstrat. Uloga kondicioniranog sloja je u njegovoj sposobnosti da modifikuje fizičko hemijske osobine supstrata kao i da posluži kao izvor hranljivih materija i važnijih mikroelemenata.

2.2.3.1. Adhezija

Adhezija mikroorganizama za supstrat ima ključnu ulogu u formiranju biofilma. Proces adhezije za neku površinu se odvija kroz dve faze: primarna adhezija (faza reverzibilnog vezivanja) i sekundarna adhezija (faza ireverzibilnog vezivanja).

Prvi korak u formiranju biofilma je susret mikroorganizma i površine što omogućava primarnu bakterijsku adheziju. Bakterijska ćelija može biti pokrenuta pasivno (efektima hidrodinamike, Braunovim kretanjem ili sedimentacijom) (Ginn et al., 2002) ili aktivno (lokomotornim organima, taksijom). Kada se bakterija primakne dovoljno blizu površine adhezija će zavisiti od neto sume sila privlačenja i odbijanja stvorenih između dve površine.

Privlačne i odbojne sile uključene u proces adhezije bakterijske ćelije za površinu uključuju Van der Waals-ove sile na rastojanju od 50 nm, Van der Waals-ove i elektrostatičke sile na rastojanju od 20 nm, a u ovom momentu veza između bakterijskih ćelija i supstrata je reverzibilna. Na rastojanju od 1,5 nm prisutne su jonske veze i hidrofobne interakcije

(Zottola i Sasahara, 1994; Liu i Tay, 2001). Kada sile privlačenja postanu veće od sila odbijanja, vezivanje za supstrat postaje ireverzibilno. Tokom tranzicije od reverzibilne do ireverzibilne adhezije uključene su i različite sile kratkog dometa koje podrazumevaju kovalentne, jonske i vodonične veze kao i hidrofobne interakcije.

Zbog malih dimenzija bakterijske ćelije gravitacija (tj. sedimentacija) je zanemarljivo mala, a najveći značaj u kontaktu bakterije sa površinom ima prvenstveno pokretljivost bakterije.

2.2.3.2. Faza agregacije, formiranje mikrokolonija i maturacija biofilma

Faza agregacije je rezultat istovremene akumulacije, rasta i razmnožavanja mikroorganizama. Deoba ćelija pokreće „quorum sensing“¹(QS) molekule i dalju produkciju ekstracelularne polimerne supstance (EPS), odnosno ekstracelularnog matriksa (ECM) biofilma. ECM biofilma osim što omogućava agregaciju bakterijskih ćelija formirajući mikrokolonije doprinosi i daljem učvršćivanju biofilma za površinu na kojoj se formira (Kaplan, 2010).

Dalji rast biofilma je rezultat adhezije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija i produkcijom ECM. Unutar formiranih mikrokolonija bakterije su povezane intercelularnim vezama, okružene ECM koji ih povezuje. Potencijal rasta jednog bakterijskog biofilma je limitiran raspoloživošću hranljivih materija, njihovom perfuzijom do ćelija i eliminacijom metaboličkih produkata bakterija. Drugi faktori koji utiču na sazrevanje biofilma su pH, perfuzija kiseonika, izvori ugljenika i osmolalnost (Milanov et al., 2008). Maturacijom biofilma se menjaju uslovi mikrookoline koja okružuje bakterije u pogledu gustine ćelijske populacije, prisustva hranljivih materija, pH vrednosti i kiseonika, a kao posledica heterogenosti okoline dolazi do razlika u metaboličkoj i reproduktivnoj funkcionalnosti ćelija (Kaplan, 2010).

Tokom inicijalne kolonizacije kiseonik ne predstavlja ograničavajući faktor, ali u višeslojnom robusnom biofilmu mesto individualnih ćelija određuje njen fiziološki status. Ćelije u gornjim delovima lakše dobijaju hranljive materije i kiseonik i lako se oslobađaju otpadnih produkata metabolizma. Fiziološki status ovih ćelija je sličan onom kod

¹ Intercelularna komunikacija između mikroorganizama koja se odvija preko produkcije signalnih molekula označenih kao autoinduceri

planktonskih ćelija. Bakterije u zoni sa oslabljenim dotokom kiseonika nastavljaju respiraciju pri čemu kao akceptor elektrona služi nitrat i druga neorganska jedinjenja. Transport hranljivih materija do ćelija i eliminacija otpadnih produkata metabolizma su omogućeni preko intersticijalnih vodenih kanala.

Razvojni proces biofilma je dosta spor, a može se proceniti kao zreo nakon nekoliko dana (Stoodley et al., 2002). Potpuno zreo biofilm je sačinjen od bakterijskih ćelija, ECM i intersticijalnih vodenih kanala koji omogućavaju razmenu hranljivih materija i eliminaciju otpadnih produkata metabolizma (Fux et al., 2004).

2.2.3.3. Disperzija

Disperzija je poslednji stadijum razvoja biofilma u okviru koga dolazi do deadherencije mikroorganizama iz strukture biofilma. Disperzija nastaje kao odgovor na izmenjene uslove sredine, bilo da su oni izazvani nedostatkom hranljivih materija ili drugim nepovoljnim uticajima. Mehanizam disperzije može biti aktivan (podrazumeva mehanizme inicirane od samih bakterijskih ćelija) ili pasivan (odnosi se na disperziju bakterija posredovanu silama trenja, abrazijom, ljudskim faktorima, predatorstvom nad bakterijama u biofilmu) (Kaplan, 2010).

Disperzija bakterija iz biofilma može se odvijati putem erozije, otkidanja, rasejavanja i abrazije (Kaplan, 2010; Sheffield i Crippen, 2012). Erozija predstavlja kontinuirano odvajanje pojedinačnih ćelija ili manjih fragmenata biofilma koje se u vrlo niskoj stopi javlja tokom procesa formiranja biofilma. Stopa erozije biofilma raste sa povećanjem debljine matriksa i pri povećanom dejstvu sila trenja.

Otkidanje biofilma podrazumeva otkidanje masivnih komada biofilma, obično tokom kasnih faza formiranja biofilma. Smatra se da najčešće nastaje kao posledica nedostatka hranljivih materija i kiseonika.

Do erozije i otkidanja najčešće dolazi kada lokalne sile trenja nadvladaju kohezivne sile koje učvršćuju biofilm. Generalno kohezivnost je pod jakim uticajem strukture i kompozicije matriksa biofilma koja zavisi od uslova rasta i razvojnog stadijuma biofilma.

Disperzija rasejavanjem podrazumeva otpuštanje velikog broja pojedinačnih ćelija ili manjih agregata iz unutrašnjosti biofilma. Erozija i otkidanje mogu biti i pasivni i aktivni procesi, dok je rasejavanje uvek aktivan proces (Kaplan, 2010).

Kao mehanizam disperzije biofilma navodi se i abrazija pod kojom se podrazumeva gubitak biofilma pokrenut sudarima čestica iz okolne tečnosti koja okružuje biofilm (Sheffield i Crippen, 2012).

Kao što je slučaj sa svim procesima uključenim u formiranje biofilma i procesi uključeni u njegovu disperziju su vrlo složeni. Ovi procesi obuhvataju širok spektar biohemijskih, ekoloških i fizičkih okidača kao i aktivaciju signalnih transdukcionih puteva. Od biohemijskih faktora uključenih u procese disperzije najčešće se spominju: produkcija enzima koji razgrađuju ECM, litička aktivacija bakteriofaga, ekspresija fosfodiesteraza i „quorum sensing“ signali. Ekološki faktori koji su uključeni u procese disperzije podrazumevaju uglavnom ograničenje hranljivih materija, akumulaciju metabolita, promenu osmolalnosti i visoku stopu rasta. Dok je od fizičkih faktora najzastupljenije prisustvo sile trenja nastale kontinuiranim protokom tečnosti (Thormann et al., 2006).

Rast i disperzija biofilma su međusobno zavisni procesi, stopa disperzije se povećava sa rastom biofilma. U suštini disperzija mikroorganizama iz biofilma se može definisati kao vrsta adaptivnog odgovora na uslove sredine u kojoj se biofilm razvija. Kao adaptivni odgovor na uslove gladovanja, ćelije *Pseudomonas aeruginosa*, proizvode enzim alginat liazu koji razgrađuje polisaharid biofilma alginat (Alipour et al., 2009). Sličan enzim, dispersin B detektovan je kod vrste *Staphylococcus epidermidis* (Kaplan et al., 2004). Na ovaj način omogućeno je korišćenje matriksa kao izvora hranljivih materija kako bi se izbeglo gladovanje, a sa druge strane enzimska razgradnja matriksa omogućava disperziju mikroorganizama pružajući im na taj način mogućnost potrage za nišama sa više raspoloživih hranljivih materija što je od ključnog značaja za dugotrajan opstanak.

2.2.4. „Quorum sensing“

„Quorum sensing“ predstavlja intercelularnu komunikaciju između bakterija koja se odvija preko produkcije signalnih molekula označenih kao autoinduceri (AI) (Antunes et al., 2010; Giaouris et al., 2012). Pri niskoj gustini populacije produkcija signalnih molekula se nalazi na bazalnom nivou, kako se gustina populacije povećava, raste i produkcija signalnih molekula. Obzirom da signalni molekuli prolaze kroz membranu bakterijske ćelije, njihova koncentracija u okruženju je približno jednaka koncentraciji unutar ćelije. Po dostizanju kritične koncentracije signalnih molekula oni se vraćaju nazad u ćeliju difuzijom

ili vezivanjem za specifične receptore što dovodi do pokretanja niza kaskadnih reakcija kojima omogućavaju koordinisanu ekspresiju ili represiju odgovarajućih setova gena. Kako je ova pojava uslovljena gustinom populacije, odnosno javlja se kada se postigne odgovarajuća gustina populacije (kvorum) nazvana je „quorum sensing“ (Antunes et al., 2010).

„Quorum sensing“ se smatra ključnim procesom u regulaciji ekspresije gena odgovornih za različite fiziološke aktivnosti poput kompeticije, simbioze, kretanja, sporulacije, biolumiscencije, produkcije antimikrobnih peptida, regulacije virulencije, a takođe su i neki od gena odgovornih za formiranje biofilma regulisani „quorum sensing“ sistemom (Annous et al., 2009; Giaouris et al., 2012). Kako „quorum sensing“ zavisi od gustine populacije, on se ne javlja u početnim već u kasnijim fazama formiranja biofilma.

Ranije je smatrano da je intercelularna komunikacija prisutna samo kod nekoliko vrsta (*Vibrio fisheri*, *Vibrio harveyi*, *Enterococcus faecalis*, *Myxococcus xanthus* i *Streptomyces* sp.). Istraživanja u oblasti intercelularne komunikacije otkrila su postojanje velikog broja signalnih molekula. Do sada su detaljno opisane četiri vrste ovih molekula: N - acetil-homoserin lakton (AHL) ili autoinducer-1 (AI-1) kod gramnegativnih bakterija, autoinducerski polipeptidi (AI-P) kod grampozitivnih bakterija, furanozil bor diestar ili autoinducer-2 (AI-2) kod gramnegativnih i grampozitivnih bakterija i autoinducer-3/epinefrin/norepinerine (AI-3/epi/norepi) kod nekih vrsta enterobakterija (Giaouris et al., 2012).

2.2.5. Ekstracelularni matriks

Sinteza ekstracelularne polimerne supstance ili matriksa biofilma je osnovni preduslov za formiranje biofilma (Branda et al., 2005; Kolter i Greenberg, 2006; Flemming et al., 2007a).

Matriks biofilma je visoko hidrirana supstanca koja se sastoji od vode, egzopolimera i produkata aktivnosti mikroorganizama. Egzopolimere matriksa biofilma uobičajeno čine polisaharidi (40-95%), proteini (1-60%), nukleinske kiseline (1-10%) i lipidi (1-40%). Sastav ECM zavisi od prisutnih mikroorganizama i uslova okruženja (Flemming i Wingender, 2002). ECM predstavlja osnovu trodimenzionalne strukture biofilma i odgovoran je za adheziju biofilma na površine kao i za njegovo učvršćivanje (kohezija). Iako veliki broj egzopolimera i njihovih funkcija kao sastavnog dela ECM još uvek nije ispitan do detalja, ustanovljene funkcije pokazuju širok spektar prednosti života u biofilmu (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Funkcije ekscelularnog matriksa u bakterijskom biofilmu (Flemming i Wingender, 2010)

Funkcija	Značaj za biofilm	Komponenta ECM
Adhezija	Omogućava inicijalnu adheziju planktonskih ćelija na abiotičke i biotičke površine i dugotrajnu adheziju biofilma za površinu	Polisaharidi, proteini, DNA,
Agregacija bakterijskih ćelija	Omogućava vezivanje između ćelija, privremenu imobilizaciju bakterijske populacije, povećanje gustine ćelija, ćelija-ćelija prepoznavanje	Polisaharidi, proteini i DNA
Kohezija biofilma	Formira i hidrira matriks biofilma, uslovljava mehaničku stabilnost biofilma (često sa multivalentnim katjonima) i posredstvom strukture ECM određuje arhitekturu biofilma	Neutralni i naelektrisani polisaharidi, proteini (kao što su amiloidi i lektin) i DNA
Retencija vode	Održava hidratisanost mikrookoline, što omogućava toleranciju biofilma na isušivanje	Hidrofilni polisaharidi, moguće i proteini
Zaštitna barijera	Obezbeđuje rezistenciju na ćelije imunog odgovora i različite antimikrobne agense	Polisaharidi i proteini
Apsorpcija organskih molekula	Omogućava akumulaciju hranljivih materija iz spoljašnje sredine i apsorpciju ksenobiotika (čime doprinosi detoksifikaciji sredine)	Naelektrisani ili hidrofobni polisaharidi i proteini
Apsorpcija neorganskih jona	Obezbeđuje formiranje polisaharidnog gela, izmenu jona, formiranje minerala i akumulaciju jona teških metala (čime doprinosi detoksifikaciji sredine)	Naelektrisani polisaharidi, proteini uključujući neorganske supstituente kao što su sulfat i fosfat
Enzimski aktivnost	Obezbeđuje razgradnju egzogenih makromolekula radi stvaranja hranljivih materija, degradaciju strukturnih komponenti ECM u cilju oslobađanja ćelija iz biofilma.	Proteini
Izvor hranljivih materija	Obezbeđuje izvor C, N i P	Potencijalno sve komponente ECM-a
Razmena genetskog materijala	Olakšava horizontalni transfer gena između ćelija u biofilmu	DNA
Donor/akceptor elektrona	Omogućava redoks aktivnost u matriksu biofilma	Proteini (koji formiranu pile)
Eksport ćelijskih komponenti	Otpuštanje ćelijskih komponenti kao rezultat metaboličkog obrta	Membranske vezikule sa nukleinskim kiselinama, enzimi, lipopolisaharidi i fosfolipidi
Depo viška energije	Skladišti višak ugljenika pri neuravnoteženom odnosu C/N	Polisaharidi
Vezivanje enzima	Akumulacija, zadržavanje i stabilizacija enzima kroz njihovu interakciju sa polisaharidima	Polisaharidi i enzimi

Ekstracelularna polimerna supstanca ili matriks biofilma ima funkciju da prolazno imobilizuje bakterijske ćelije u formaciju biofilma, omogućavajući na taj način brojne interakcije između ćelija, uključujući intercelularnu komunikaciju i formiranje ćelijskih agregata (mikrokolonija). Formiranje i održavanje viševićijskih zajednica, odnosno strukture biofilma zavisi od produkcije, količine i sastava ECM.

Matriks biofilma obezbeđuje i fizičku strukturu koja razdvaja heterogene delove biofilma tzv. mikrodomene koji u zavisnosti od uslova sredine imaju i različito biohemijsko okruženje. Prisustvo bakterijskih struktura kao što su flagele, fimbrije i pile takođe ima uticaj na stabilizaciju strukture matriksa biofilma.

Struktura matriksa biofilma je uslovljena brojnim faktorima uključujući hidrodinamičke uslove sredine, koncentraciju hranljivih materija, pokretljivost bakterija i postojanje intercelularne komunikacije (Flemming i Wingender, 2010). Matriks biofilma ima i protektivnu ulogu, štiti bakterije od isušivanja, dejstva biocida, antibiotika, metalnih katjona, UV zračenja i ćelija imunog odgovora omogućavajući bakterijama dugoročnu egzistenciju.

2.2.6. Strukturne komponente ECM biofilma *Salmonella* spp.

Adhezivnost salmonela za biotičke i abiotičke površine i sposobnost formiranja biofilma u najvećoj meri su zavisne od strukturnih komponenti ekstracelularnog matriksa čija se sinteza nalazi pod kontrolom složenih molekularnih mehanizama.

Proteinska frakcija matriksa biofilma salmonela je sačinjena od adhezivnih fimbrija (tanke agregativne fimbrije-tafi) i BapA proteina (biofilm-associated protein), dok egzopolisaharidnu frakciju u najvećoj meri čini celuloza, ali takođe i prisustvo O-kapsularnog antigena, kolanske kiseline i drugih kapsularnih polisaharida i lipopolisaharida (Steenackers et al., 2012).

2.2.6.1. Proteinska frakcija matriksa biofilma

Tanke agregativne fimbrije (tafi) ili kovrdžave fimbrije (eng. curli) predstavljaju spiralne, amiloidima slične proteinske strukture ćelijske površine, a sastoje se od jedne subjedinice fimbrina (curlin) koja obično formira filamente širine od 2 do 7 nm (Collinson et al., 1991). Ove površinske strukture su uključene u kolonizaciju ćelija domaćina,

adheziju na površine, ćelijsku agregaciju, perzistenciju u spoljašnjoj sredini i formiranje biofilma (White i Surette, 2006; Steenackers et al., 2012).

BapA (biofilm-associated protein) je veliki protein ćelijske površine za koji je pokazano da ima ulogu u formiranju biofilma *S. Enteritidis*. Ovaj protein pokazuje homologiju i funkcionalnu povezanost sa BapA proteinom identifikovanim kod *S. aureus* (Latasa et al., 2005). Predpostavlja se da je biološka uloga ovog proteina povezana sa ćelijskom agregacijom.

Primenom atomske mikroskopije sila (AFM), Jonas et al. (2007) su pokazali da ovaj protein ima uticaj na formiranje i morfologiju biofilma, ali ne veći u poređenju sa celulozom i fimbrijama.

2.2.6.2. Egzopolisaharidna frakcija matriksa biofilma

Celuloza (β -1 \rightarrow 4-D - glukozni polimer) je uz tanke agregativne fimbrije druga najvažnija komponenta matriksa biofilma salmonela. Sposobnost biosinteze ovog glukoznog polimera je odavno poznata kod vrsta *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens* i *Rhizobium* spp. (Ross et al., 1991). Tokom proteklih decenija sposobnost biosinteze celuloze dokazana je kod *Escherichia coli* (Serra et al., 2013), *S. Typhimurium* (Anriany et al., 2006), *S. Enteritidis* (Solano et al., 2002) i dr., i uglavnom je udružena sa sposobnošću ovih mikroorganizama da formiraju biofilm.

Kolanska kiselina predstavlja kapsularni ekstracelularni polisaharid koji produkuje veliki broj mikroorganizama iz grupe enterobakterija. Strukturu ovog polisaharida čine ponavljajuće subjedinice D-glukoze, D-fruktoze, D-galaktoze i D-glukuronske kiseline sa bočnim lancima piruvata i O-acetila. Produkcija ovog egzopolisaharida se odvija konstantno u malim količinama, dok se produkcija veće količine uglavnom javlja kao odgovor na specifične mutacije i uslove sredine. Generalno do sinteze kolanske kiseline ne dolazi na temperaturama iznad 30°C u tipičnim laboratorijskim medijumima (Wang et al., 2013b). Saznanja na ovom polju sugerišu da se biološka uloga kolanske kiseline ogleda u preživljavanju u nepovoljnim fizičko hemijskim uslovima i uslovima sredine.

O-kapsularni antigen se sastoji od preko 2300 visokohidratiranih ponavljajućih tetrasaharidnih jedinica anjonskog karaktera, kovalentno povezanih sa lipidima koji ga učvršćuju za ćelijsku membranu.

Istraživanja su pokazala da prisustvo ovog antigena omogućava dugotrajno preživljavanje u uslovima isušivanja (Gibson et al., 2006).

Ustanovljeno je prisustvo još jednog kapsularnog polisaharida iz ECM *S. Typhimurium* DT104 za koji je utvrđeno da ima značajnu ulogu u adheziji na polistiren na temperaturama od 25°C i 37°C. Ovaj kapsularni polisaharid je sačinjen uglavnom od ponavljajućih jedinica glukoze i manoze i u manjoj meri galaktoze (de Rezende et al., 2005). Malcova et al. (2008) su potvrdili značaj ovog kapsularnog polisaharida u formiranju biofilma kod sojeva kod kojih ne dolazi do ekspresije celuloze i fimbrija.

Prisustvo različitih masnih kiselina uobičajenih lipopolisaharidnih (LPS) komponenti kao i nekih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina je takođe uočeno u sastavu matriksa biofilma *S. Enteritidis* (Gibson et al., 2006).

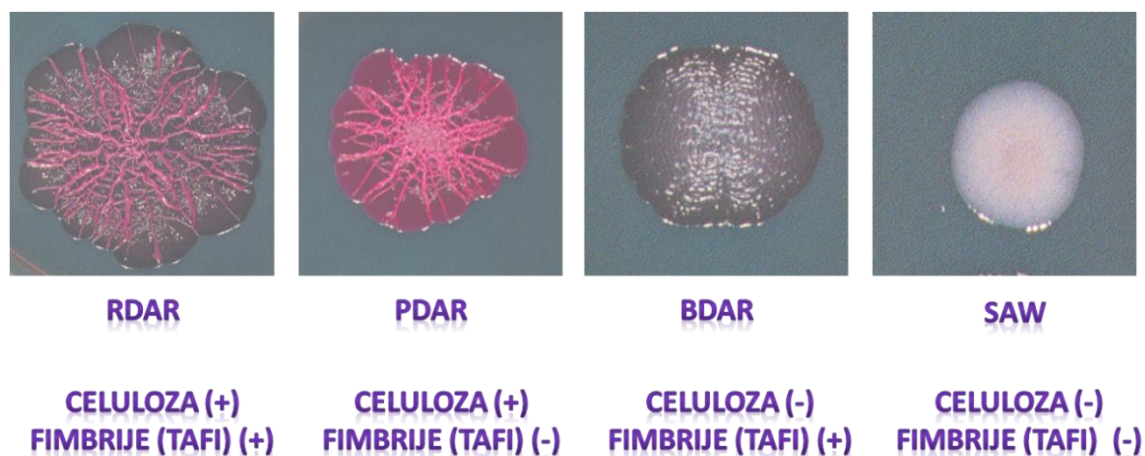
2.2.7. Biofilm fenotip

S obzirom da je formiranje biofilma u velikoj meri uslovljeno sposobnošću produkcije ECM, biofilm produkujući sojevi se mogu evidentirati na osnovu karakterističnog morfotipa kolonija na čvrstom agaru u koji su inkorporirane odgovarajuće indikatorske boje. Već je spomenuto da tanke agregativne fimbrije (tafi) zajedno sa celulozom predstavljaju glavne komponente matriksa biofilma salmonela vrsta (Jonas et al., 2007). U cilju identifikacije ovih strukturnih komponenti matriksa biofilma kroz fenotipski izgled kolonija kao indikatorske boje najčešće se u medijum inkorporiraju kongo crveno i brilijant plavo.

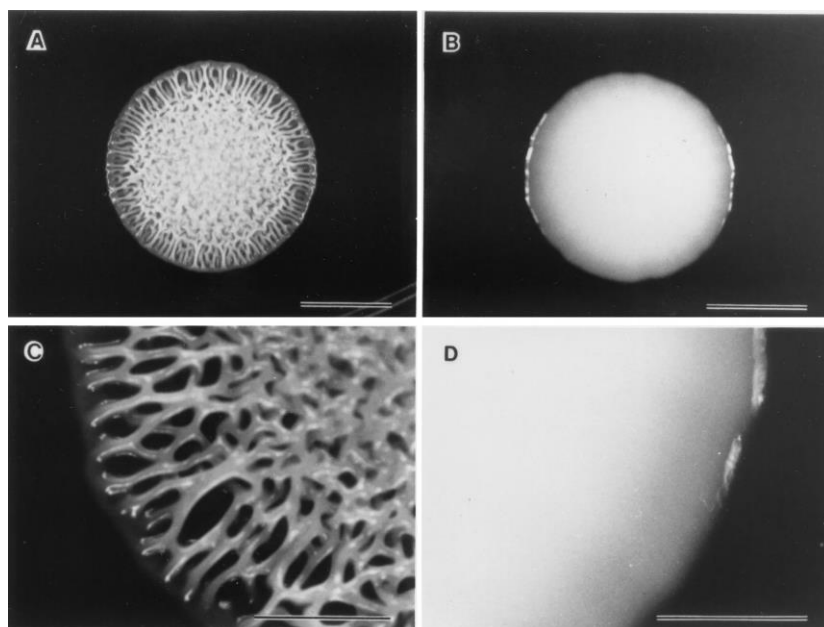
Kongo crveno je nespecifična diazo boja sa karakterističnim spektrofotometrijskim osobinama. Spektar apsorbanaci ove boje se razlikuje u zavisnosti da li je boja vezana za tanke agregativne fimbrije ili celulozu omogućavajući detekciju obe komponente kada su prisutne pojedinačno ili u kombinaciji, dok je brilijant plava ograničena na apsorpciju samo od strane proteinskih komponenti matriksa biofilma (tanke agregativne fimbrije).

Inkorporacijom ovih indikatorskih boja u medijum omogućena je detekcija produkcije obe ispitivane komponente, tankih agregativnih fimbrija i celuloze, dve najvažnije komponente matriksa biofilma salmonela koje imaju značajnu ulogu u formiranju biofilma. Sojevi koji u okviru matriksa biofilma produkuju obe komponente na Kongo crvenom agaru pokazuju karakterističan morfotip violet-crvenih, suvih kolonija (Bokranz et al., 2005), R-forme (Slika 2.5.) koji je u literaturi označen kao RDAR (red, dry and rough)(Römling, 2005). R forma kolonija se može

evidentirati i nakon kultivacije u odgovarajućim uslovima na medijumima bez indikatorskih boja (Slika 2.6.)(Anriany et al., 2001).

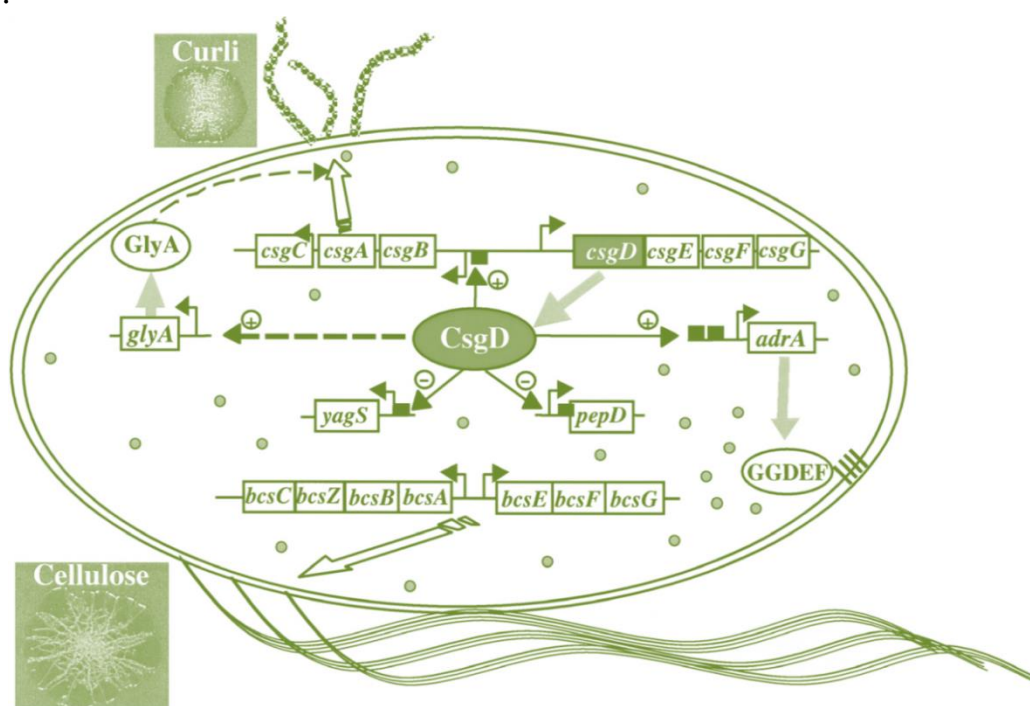


Slika 2.5. Ekspresija različitih komponenti matriksa biofilma *S. enterica* serotip Typhimurium
(Barnhart i Chapman, 2006)



Slika 2.6. Različite forme kolonija *S. enterica* serotip Typhimurium DT104 nakon 96h inkubiranja na Trypton soja agaru na temperaturi od 25°C (A i C) R-forma, i 37°C (B i D) S-forma kolonija
(Anriany et al., 2001)

Sinteza obe pomenute komponente matriksa biofilma je pod kontrolom kompleksnog regulatornog sistema (Slika 2.7.). Subjedinica gena tankih agregativnih fimbrija *csg* (*c*urli *s*ubunit gene), koja je uključena u sintezu fimbrija organizovana je u dva odvojena transkripciona operona *csgBAC* i *csgDEFG* (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b). Regulatorni protein LuxR aktivacijom transkripcionog aktivatora CsgD stimuliše produkciju fimbrija preko transkripcione aktivacije *csgBAC* operona koji kodira strukturne gene neophodne za formiranje tankih agregativnih fimbrija (Gerstel i Römling, 2003).



Slika 2.7. Fiziologija ćelija RDAR morfotipa; U stacionarnoj fazi rasta ekspresija *csgD* aktivira biosintezu strukturnih komponenti matriksa biofilma, tafi i celuloze. *csgD* aktivira transkripciju *csgBA(C)* operona koji je odgovoran za sintezu tafi; Nakon transkripcione aktivacije *csgD*, AdrA stimuliše produkciju c-di-GMP preko njegovog GGDEF domena; C-di-GMP vezujući se za subjedinicu *bcsB* celuloza sintetaznog kompleksa stimuliše biosintezu celuloze (Römling, 2005)

Regulacija ekspresije *csgD* je vrlo kompleksna i nalazi se pod kontrolom velikog broja intergenskih regiona smeštenih između *csgBAC* i *csgDEFG* operona. Ovaj region predstavlja ciljno mesto za nekoliko regulatornih proteina čije vezivanje utiče na ekspresiju *csgD* (Barnhart i Chapman, 2006). I sinteza celuloze se takođe odvija pod kontrolom dva operona *bcs* (*b*acterial *c*elulose *s*ynthase), označenih kao *bcsABZC* i

bcsDEFG. Regulacija aktivnosti pomenutih celulozних operona je regulisana takođe preko csgD, ali indirektno preko ekspresije AdrA proteina koji je član GGDEF familije proteina koja je takođe regulisana preko csgD proteina (Römling et al., 2000). AdrA kodira gene za di-guanilat ciklazu koja je uključena u sintezu c-di-GMP. c-di-GMP je efektorni molekul koji aktivira celuloza sintetazu vezivanjem za bcsB (Römling et al., 2005).

García et al. (2004) su pokazali da je većina GGDEF proteina *S. Typhimurium* funkcionalno povezana najverovatnije kontrolisanjem nivoa istog finalnog proizvoda cGMP, sekundarnog glasnika koji kontroliše različite ćelijske funkcije uključujući i produkciju celuloze i formiranje biofilma. Takođe je pokazano da pored tankih agregativnih fimbrija i celuloze, csgD ima uticaj i na ekspresiju BapA i O-antigena kapsule (Latasa et al., 2005; Gibson et al., 2006; Jonas et al., 2007), zbog čega se često spominje u kontekstu ključnog aktivatora višćelijskog ponašanja salmonela u procesu adhezije za površne i formiranja biofilma (Zogaj et al., 2001; Gerstel i Römling, 2003; Römling et al., 2003).

Varijabilnost različitih spoljašnjih uticaja kao što su temperatura, pH, osmolalnost, dostupnost hranljivih materija i kiseonika mogu uticati na ekspresiju csgD transkripcionog regulatora koji reguliše produkciju obe komponente matriksa, fimbrija i celuloze (Gerstel i Römling, 2003). Transkripcija csgD zavisi od stacionarnom fazom induciranih sigma faktora RpoS, zbog čega je njegova transkripcija maksimalna krajem kasne eksponencijalne faze ili tokom rane stacionarne faze (Steenackers et al., 2012).

U odsustvu ekspresije csgD morfotip kolonija na Kongo crvenom agaru se odlikuje S-formom kolonija bele-krem boje, a u literaturi se označava kao SAW (smooth and white) (Slika 2.5.). Kolonije sa ovakvim morfotipom ne proizvode ni jednu od pomenutih komponenti ekstracelularnog matriksa (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Römling et al., 2000).

Blokada (nefunkcionalnost) gena koji kodira subjedinicu za sintezu tankih agregativnih fibrija (tafi) rezultira u pojavi morfotipova rozih i suvih kolonija, R-forme na Kongo crvenom agaru. Ovaj tip morfotipa karakteriše produkcija celuloze, dok je biogeneza fimbrija inhibirana, a u literaturi se označava kao PDAR (pink dry and rough) morfotip (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Römling et al., 2000; Jain i Chen, 2007).

Nefunkcionalnost gena koji kodira subjedinicu za sintezu celuloze na Kongo crvenom agaru dovodi do pojave braon, suvih kolonija R-forme

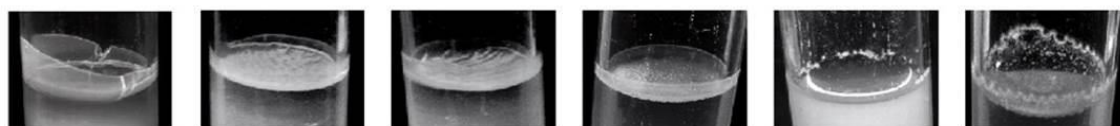
za koji je karakteristična biogeneza tankih agregativnih fimbrija, dok je sinteza celuloze inhibirana. Ovaj morfotip je u literaturi označen kao BDAR (brown dry and rough) (Slika 2.5.) (Römling et al., 2000; Römling, 2005).

Prekomerna produkcija kapsularnog polisaharida dovodi do razvoja S-formi kolonija, mukoidnog tipa i braon boje. Ovakav morfotip je označen kao SBAM morfotip (smooth brown and mucoid) (Slika 2.5.). Kod ovakvih morfotipova dolazi do prekomerne produkcije kapsularnog polisaharida, dok je ekspresija celuloze i tankih agregativnih fimbrija inhibirana (Malcova et al., 2008).

Neki autori smatraju da je pojava RDAR morfotipa fiziološka adaptacija povezana sa agregacijom i dugoročnim preživljavanjem (White i Surette, 2006), nasuprot Stocki et al. (2007) smatraju da ovaj morfotip nema suštinskog značaja za perzistentnost (upornost).

Kod salmonela pojava RDAR morfotipa je ograničena na temperature ispod 30°C i nisku osmolarnost, ali se biogeneza fimbrija može odvijati i kao posledica gladovanja na temperaturi od 37°C.

Osim karakterističnog morfotipa sposobnost formiranja pelikule na međufazi vazduh-tečnost je još jedna od karakterističnih manifestacija produkcije biofilma kod *Salmonella* spp. (Scher et al., 2005). Manifestacija ovakvog biofilm fenotipa se ogleda u pojavi agregacije ćelija u vidu pelikule i/ili prstena na granici između dva agregatna stanja (Slika 2.8.). Kako agregacija ćelija u ovoj zoni predstavlja uobičajen fenotip za *Salmonella* spp. (Scher et al., 2007) ovaj test je u velikom broju istraživanja primenjivan u svrhe detekcije biofilm produkujućih izolata *Salmonella* spp. u statičkim sistemima (Solano et al., 2002; Vestby et al., 2009b; Karaca et al., 2013; O'Leary et al., 2013; Seixas et al., 2014).



Slika 2.8. Formacija pelikule *S. Typhimurium*

(Latasa et al., 2012)

Naime, pod statičkim uslovima većina mikroorganizama kao rezultat gravitacije ima tendenciju da tone na dno ili prijanja na zidove. Istraživanja su pokazala da kod *Salmonella* spp., ali i drugih vrsta gramnegativnih bakterija, pored prijanjanja za dno i zidove u velikoj meri dolazi do kolonizacije vazduh-tečnost međufaze (Armitano et al., 2014). Kolonizacija vazduh-tečnost međufaze predstavlja selektivnu prednost za

aerobne i fakultativno aerobne mikroorganizme pružajući im pristup kako gasovitoj (kiseonik) tako i tečnoj (izvor hranljivih materija i vode) fazi.

Formiranje biofilm fenotipa u vidu pelikule je povezano sa produkcijom ekstracelularne supstance svojstvene biofilmu, ali i pokretljivošću mikroorganizama (Armitano et al., 2014).

2.2.8. Rezistencija bakterija u biofilmu

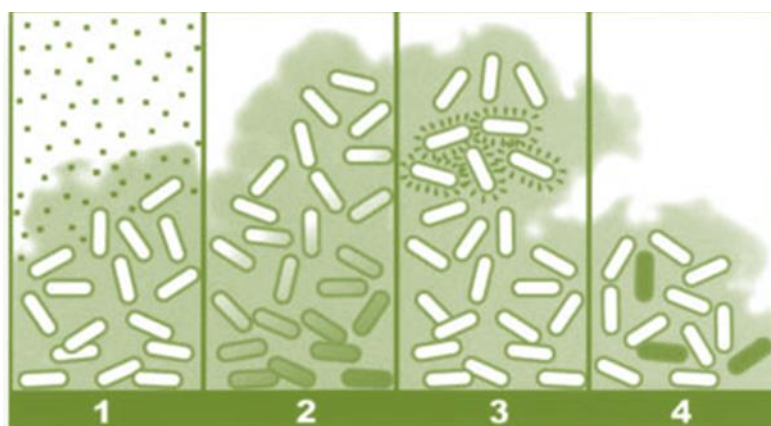
Rezistencija na antimikrobne agense podrazumeva mogućnost bakterija da izbegnu letalni efekat primenjenog antimikrobnog jedinjenja. Izbegavanje letalnog efekta bakterije mogu postići na više načina: njegovim smanjenim usvajanjem iz spoljašnje sredine, modifikacijom ciljnog mesta na receptoru ili smanjenjem propustljivosti membrana, povećanjem njegovog izlučivanja iz ćelije (aktivni efluks), kao i inaktivacijom i hidrolizom antimikrobnog agensa, čime se sprečava njegova aktivacija u samoj ćeliji (Sabo et al., 2001).

Mikroorganizmi uklopljeni u matriks biofilma pokazuju veću rezistenciju na antimikrobne supstance u poređenju sa bujonskim kulturama istog mikroorganizma (Costerton et al., 1995). Istraživanja na ovom polju ukazuju da rezistencija mikroorganizama u formi biofilma može biti i do 1000 puta veća (Mah i O'Toole, 2001).

Ukupnoj otpornosti bakterija u biofilmu na različite vrste antimikrobnih supstanci svakako doprinose i konvencionalni mehanizmi rezistencije, ali takođe i mehanizmi rezervisani isključivo za rast bakterija u formi biofilma (Slika 2.9.) posredovani ekstracelularnim matriksom, smanjenom stopom rasta, adaptivnim odgovorom na stres, promenama uslova mikrookoline, pojavom perzister ćelija kao i genetskom razmenom između ćelija (Fux et al., 2005; Høiby et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Ekstracelularni matriks predstavlja barijeru za antimikrobne supstance, onemogućavajući njihov transport do bakterija najčešće interakcijom sa antimikrobnim supstancama i njihovom inaktivacijom, ili produkcijom enzima koji ih razgrađuju. Ekstracelularni matriks koji okružuje biofilm u različitom stepenu deluje kao difuziona barijera, molekularno sito ili adsorbent i veoma je efikasan u zaštiti biofilma od ćelija imunog odgovora i antimikrobnih supstanci veće molekulske mase. Difuzijom antimikrobne supstance kroz ekstracelularni matriks prema dubljim slojevima dolazi do redukcije njene koncentracije, tako da su letalnim koncentracijama izložene samo bakterije u površinskim slojevima biofilma. Ekstracelularni matriks biofilma usporavajući prodor

antimikrobnih supstanci deluje i kao dilucionni gradijent čime obezbeđuje dodatno vreme za ćelije kako bi uspele da eksprimiraju nove gene za otpornost, pre ekspozicije antimikrobnim supstancama (Jefferson et al., 2005).



Slika 2.9. Osnovni mehanizmi rezistencije bakterija u biofilmu; spora i nekompletna difuzija antimikrobne supstance (1), pojava metabolitički heterogenih populacija (2), adaptivni odgovor (3), pojava perzister ćelija (4) (Stewart, 2002)

Kao adaptivni odgovor na uslove sredine bakterije su sposobne da razviju različite mehanizme što im omogućava da se adaptiraju na novonastale uslove sredine kao što su nagla promena temperature, oksidativni stres, niska aktivnost vode, DNA oštećenja, gladovanje. Veliki broj adaptivnih odgovora ovog tipa je okarakterisan do detalja kod bakterija suspendovanih u tečnim medijumima, i najverovatnije je da su takve adaptacije prisutne kod bakterija uklopljenih u biofilm. Jedan od prostih primera adaptivnog odgovora usled promena uslova sredine jeste produkcija enzima katalaze kod *Pseudomonas aeruginosa* u odgovoru na tretman sa 50 mM vodonik peroksida aktivacijom *kat B* inducibilnog gena. Primena istog tretmana na bakterijsku populaciju suspendovanu u tečnom medijumu ne dovodi do aktivacije pomenutog gena (Stewart, 2002).

Razvojem biofilma menjaju se uslovi mikrookoline koja okružuje bakterije u pogledu dostupnosti hranljivih materija, kiseonika i produkata metabolizma (Mah i O'Toole, 2001; Stewart i Costerton, 2001). Smatra se da pojava metabolitički heterogenih populacija u okviru biofilma sa aerobno rastućim ćelijama na površini i ćelijama sa redukovanom metabolitičkom aktivnošću i smanjenom stopom rasta unutar biofilma koje su lišene hranljivih materija i kiseonika mogu imati

ulogu u povećanju otpornosti na antimikrobne agense (Hall-Stoodley i Stoodley, 2009; Brodi i Bentzmann, 2011). Neki autori smatraju da je ograničenje hranljivih materija u zonama biofilma bez kiseonika pre razlog pojave rezistencije nego ECM u svojstvu fizičke barijere (Borriello et al., 2006).

Osim povećane otpornosti na širok spektar antimikrobnih jedinjenja, bakterije biofilma postaju sve veći problem zbog pojave ćelija perzistera. Perzister ćelije predstavljaju mali deo populacije biofilma, koji ostaje sposoban za život i pored dugotrajnog izlaganja visokim dozama antimikrobnog agensa. Od vremena kada su prvi put opisane 1944. godine (Bigger, 1944), mehanizam odgovoran za njihovu pojavu i egzistenciju još uvek je nepoznat. Pretpostavlja se da objašnjenje leži u njihovoj dormantnoj prirodi. Usporavanjem svog metabolizma perzisteri mogu izbeći oštećenja, što ih čini neosetljivim na antimikrobni tretman. Roberts i Stewart (2004) su ispitivanjem efekta antibiotika na bakterije utvrdili da dostupnost hranljivih materija i stopa rasta mogu uticati na otpornost na antibiotike. Do sličnih saznanja došli su Aridesi et al. (2003) utvrđivanjem postojanja korelacije između stope rasta bakterija i osetljivosti na antibiotike.

Ćelijska smrt unutar biofilma takođe se smatra bitnom u razvoju rezistencije bakterija uklopljenih u biofilm. Mrtve ćelije mogu delovati kao izvor hranljivih materija, a osim toga mogu funkcionisati kao dilucioni gradijent antimikrobne supstance po ćeliji (Mai-Prochnow et al., 2004; Hall-Stoodley i Stoodley, 2009). Ćelijska smrt može dovesti i do povećanja stepena osipanja biofilma što doprinosi njegovom rasejavanju (Mai-Prochnow et al., 2006).

Biofilm mikroorganizama predstavlja perfektan milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastanak patogena sa novim faktorima virulencije, rezistencijom i povećanom sposobnošću preživljavanja u životnoj sredini. Horizontalan transfer gena može nastati putem: transformacije, transdukcije ili konjugacije (Milanov et al., 2010; Roberts i Mullany, 2010). Na ovaj način nastali rezistentni mikroorganizmi predstavljaju kumulativan ekološki problem. Naime, u kontaktu rezistentnih mikroorganizama sa drugim mikroorganizmima iz okruženja geni rezistentnosti se mogu preneti u genom ostalih mikroorganizama osetljivih na antimikrobne supstance putem horizontalnog genskog transfera. Na taj način, mikroorganizmi dobijaju tačkaste mutacije na određenim genima sopstvenog genoma, postaju rezistentni i brzo se adaptiraju na novi ekosistem. Osim toga, istraživanja su pokazala da izlaganjem mikroorganizama hemijskim biocidima koji se

primenjuju kao dezinficijensi u industriji hrane istovremeno dolazi do povećane otpornosti na antibiotike dovodeći do pojave unakrsnih rezistencija (Buffet-Bataillon et al., 2012).

I pored obimnih istraživanja sprovedenih tokom poslednje decenije još uvek se ne može precizno utvrditi koji od navedenih mehanizama je odgovoran za nastanak rezistencije bakterija unutar biofilma. Rezistencija bakterija u biofilmu je najverovatnije posledica dejstva ne jednog već više mehanizama, a kombinacija različitih mehanizama često može imati aditivan efekat dovodeći do nastanka multiplih i unakrsnih rezistencija.

2.2.9. Posledice formiranja biofilma u industriji

Činjenica da bakterije mogu formirati biofilm na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom, kao i na opremi u prehrambenoj industriji, otvara novu oblast istraživanja o ulozi biofilma kao potencijalnog izvora kontaminacije namirnica bakterijama.

Sposobnost adhezije i formiranja biofilma bakterija na različitim vrstama materijala koji se uobičajeno koriste u prehrambenoj industriji i industriji hrane za životinje kao što su nerđajući čelik, staklo, polistiren, polietilen, polipropilen, mermer i granit je dokumentovana u velikom broju istraživanja (Giaouris et al., 2005; Giaouris i Nychas, 2006; Oliveira et al., 2006; Kim i Wei, 2007; Kim i Wei, 2009; Møretro et al., 2009; Mafu et al., 2011; Castelijn et al., 2013).

Biofilmovi koje bakterije formiraju na različitim površinama u industrijskim pogonima predstavljaju dugotrajan izvor kontaminacije namirnica, ne samo bakterijama koje izazivaju njihovo kvarenje, već i vrstama koje se prenose hranom: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* (Cabarkapa et al., 2013; Giaouris et al., 2014; Habimana et al., 2014). Poznato je da pojedini sojevi patogenih vrsta bakterija u industrijskim pogonima mogu egzistirati tokom dužeg vremenskog perioda (Habimana et al., 2014). Ovakvi sojevi su poznati kao „house strains“, a pretpostavlja se da je egzistencija takvih sojeva omogućena upravo njihovom sposobnošću da formiraju biofilm. Jednom formirani biofilmovi u industrijskim pogonima se teško uklanjaju i dovode do pojave perzister populacija (Vestby et al., 2009b). Egzistencija sojeva sa sposobnošću produkcije biofilma je najčešći uzročnik unakrsnih i post-procesnih kontaminacija.

Ovom skrivenom biološkom opasnošću neizostavno može biti pogođena svaka grana industrije: mesa, mleka, voća i povrća, piva, vina,

vode, ali i industrije koje generalno karakteriše „suva proizvodnja“ kao što su mlinska industrija i industrija hrane za životinje.

Kontaminacija industrijskih pogona biofilm produkujućim sojevima najčešće nastaje preko kontaminirane ulazne sirovine čija se kontaminacija može dogoditi na bilo kojoj tački od farme/polja pa do finalnog proizvoda, aerosolom, ali i ljudskim faktorom. Kao potencijalna mesta razvoja biofilma najčešće su identifikovana mesta: prijema sirovina, podovi, zidovi, slivnici, cevi, ventilacioni sistemi, radne površine, pokretne trake, spoljašnja i unutrašnja površina procesne opreme, naročito u mrtvim uglovima, šupljinama, spojnica, pukotinama i mestima sklonim kondenzaciji.

Kao razlozi nastanka biofilma u okviru industrijskih postrojenja najčešće se navodi nepravilno očišćena i sanitizirana oprema (O'Leary et al., 2013; Srey et al., 2013). Neredovno i neadekvatno sprovođenje sanitarnih mera uzrokuje zaostajanje različitih organskih materija što u velikoj meri olakšava egzistenciju mikroorganizama, a takođe doprinosi smanjenju efikasnosti primenjenih dezinfekcionih sredstava.

Već je pomenuto da je jedna od industrija pogođenih ovom skrivenom biološkom opasnošću i industrija hrane za životinje. Iako se proizvodnja hrane za životinje uglavnom bazira na proizvodnji „suve hrane“, što u velikoj meri ograničava rast i razvoj mikroorganizama, na određenim površinama pojava kondenzacije uzrokovane varijacijama temperature do kojih neminovno dolazi tokom proizvodnog procesa može obezbediti vlažnost bakterijskih niša u kojima je omogućen opstanak mikroorganizma. Istraživanja su pokazala da mikroorganizmi, posebno *Salmonella* spp. prevazilazi prisustvo stalnih fluktuacija temperature i vlage u pogonima industrije hrane za životinje ulaskom u VBNC stadijum (Møretro et al., 2009; Habimana et al., 2010; 2014).

Biofilmovi formirani u industrijskim pogonima osim što mogu predstavljati opasnost za javno zdravlje, takođe mogu prouzrokovati velike ekonomske gubitke. Poznato je da prisustvo biofilma u sistemima za distribuciju tečnosti blokira cevovode smanjujući brzinu i kapacitet protoka tečnosti sa posledičnim povećanjem utroška energije (Chmielewski i Frank, 2003), na grejačima i rashladnim tornjevima smanjuje prenos toplote a samim tim i njihovu efikasnost, na membranskim filterima dovodi do redukcije pora sa posledičnim gubicima u kapacitetu i kontaminacijom finalnog proizvoda, dok njihovo prisustvo na metalnim površinama izaziva povećanu stopu korozije (Kumar i Anand, 1998).

Pored nepoželjnih efekata rast bakterija u biofilmu može imati i pozitivnih osobina. U tom kontekstu biofilmovi pojedinih mikroorganizama se mogu iskoristiti u svrhu bioremedijacije zemljišta i otpadnih voda, obnavljanje energetske resursa (proizvodnje bioetanol i biogasa), a takođe i kao katalizatori industrijskih fermentativnih procesa. Jedan od najstarijih primera primene biofilma u industrijskoj mikrobiologiji je primena biofilma bakterija *Acetobacter* spp. za oksidaciju etanola u sirćetnu kiselinu pri tradicionalnoj proizvodnji sirćeta (Qureshi et al., 2005; Duraković et al., 2009).

Egzopolisaharidi matriksa biofilma nekih vrsta bakterija kao što su ksantan guma (*Xanthomonas campestris*), gelan (*Sphingomonas elodea*), kurdlan (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*), velan (*Alcaligenes* spp.), dekstran (*Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* spp.), kefiran (*L. rhamnosus*, *L. kefir* i *L. kefiranofasciens*), celuloza (*Acetobacter xylinum*) i dr. se već komercijalno proizvode, a primenu su našli u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a takođe se nalaze na listi odobrenih aditiva za hranu (Vu et al., 2009; Badel et al., 2011).

2.2.10. Prevencija i kontrola biofilma

Spoznaja da biofilmovi bakterija u industrijskim pogonima predstavljaju skrivenu biološku opasnost, prevencija i kontrola biofilma na mestima prerade i proizvodnje namirnica postaje imperativ u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane.

Generalno je prihvaćeno i dokumentovano da su ćelije unutar biofilma otpornije na različite tretmane u odnosu na bujanske kulture istih ćelija (Møretrø et al., 2009; Bae et al., 2012).

Poslednjih decenija ubrzan tehnološki napredak uzrokovao je uvođenje novih tehnologija u proizvodnju hrane što dovodi do povećanja potreba za unapređenjem sanitarnih procedura i higijenskih uslova kako u prehrambenoj tako i u industriji hrane za životinje. Pored napretka u higijenskom dizajnu opreme, uspostavljanja sistema Dobre proizvođačke prakse (DPP) i Dobre higijenske prakse (DHP) u cilju prevencije i kontrole bakterijskog biofilma, često se primenjuju različiti fizički i hemijski tretmani sanitacije. Fizički tretmani sanitacije pored tradicionalnih tretmana primene mehaničkog čišćenja, uključuju primenu modernijih fizičkih tretmana kao što su: različite frekvence ultrazvuka, magnetna i električna polja kao i različite vrste zračenja. Iako pomenuti fizički tretmani imaju dobre rezultate, često su neprimenjivi iz ekonomskih razloga, odnosno iziskuju zahtevnost u pogledu troškova, tehničke i

prostorne opremljenosti, dok primena iradijacije nailazi i na dodatni problem, a to je neprihvatanje od strane potrošača.

Stoga, metode prevencije i eliminacije se uglavnom svode na upotrebu hemijskih tretmana. Poznato je da sprovođenje konvencionalnih hemijskih metoda sanitacije obično uključuje upotrebu agresivnih jedinjenja kao što su hlor, peroksidi i kvarterni amonijumova jedinjenja koja osim što mogu imati rezidualan efekat, potencijalno štetan po ljudsko zdravlje mogu izazvati i nepoželjne senzorne osobine krajnjih proizvoda. Takođe, sukcesivna primena dezinficijensa iste vrste može prouzrokovati redukciju osetljivosti pojedinih vrsta mikroorganizama koji ostaju na površinama uzrokujući konstantnu kontaminaciju. Osim toga, efikasnost dezinficijensa u preporučenim koncentracijama je rezultat ispitivanja na bujonskim kulturama bakterija. Dok je njihova primena na bujonske kulture efikasna i do 100%, primena istih koncentracija na bakterije u biofilmu pokazuje neefikasnost tako da je za njihovu eliminaciju često potrebna znatno veća koncentracija.

Trend proizvodnje i upotrebe zdravstveno bezbedne hrane bez sintetskih hemijskih jedinjenja, bilo da su ona dospela u hranu rezidualno kao posledica neadekvatne sanitacije tokom tehnološkog postupka proizvodnje ili u vidu konzervanasa i aditiva, postaje sve izraženiji. Potrošači u sve većoj meri zahtevaju upotrebu prirodnih proizvoda tzv. „zelenih hemikalija“ zbog čega se konstantno razvijaju nove kontrolne strategije u cilju iznalaženja potencijalnih bioloških rešenja koja pored različitih enzima, faga, antimikrobnih jedinjenja proizvedenih od strane mikroorganizama uključuju i antimikrobna jedinjenja biljnog porekla kao što su ekstrakti, etarska ulja i različiti začini (Simões et al., 2010).

2.3. Etarska ulja

2.3.1. Hemijski sastav etarskih ulja

Etarska ulja predstavljaju kompleksne smeše sekundarnog metabolizma biljaka, sačinjenih od različitih hemijskih jedinjenja koja se na osnovu hemijske strukture mogu podeliti u pet grupa: terpenoidi, alifatična jedinjenja manje molekulske mase, aromatične isparljive komponente, azotna i sumporna jedinjenja. Dominantne i najznačajnije komponente etarskih ulja su terpenoidi (mono-C10 i seskviterpeni-C15).

Javljaju se u obliku acikličnih, mono- i bicikličnih alifatičnih i aromatičnih struktura, a u zavisnosti od prisutnih funkcionalnih grupa mogu biti: ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, fenoli, estri, etri, peroksidi i epoksidi (Kovačević, 2004). Strukturne formule dominantnih komponenti etarskih ulja su prikazane na Slici 2.10.

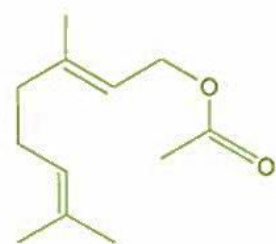
Etarsko ulje može sadržati više od šezdeset pojedinačnih sastojaka u različitim koncentracijama od kojih dominantne komponente mogu činiti i do 85% etarskog ulja, dok su ostale komponente prisutne samo u tragovima. U pogledu hemijskog sastava rodove *Origanum* i *Thymus* karakteriše prisustvo fenolnih jedinjenja karvakrola i/ili timola kao dominantnih komponenti etarskog ulja koje mogu činiti i više od 80% etarskog ulja.

Međutim, u pojedinim istraživanjima pored karvakrola i timola, kao glavne komponente etarskog ulja origana identifikovani su i α -terpineol, linalil-acetat, linalol, γ -terpinen, sabinen hidrat i trans sabinen hidrat. Pojava različitih dominantnih komponenti unutar jedne vrste uslovljena je prisustvom različitih biohemijskih varijeteta, odnosno hemotipova.

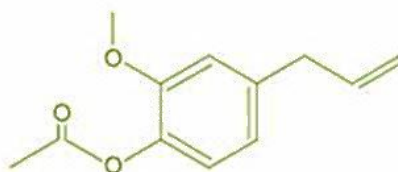
Hemotip ili „biohemijski varijetet“ biljnih vrsta ima genetski kodiran specifičan enzimski sistem. Postojanje ovakvog sistema omogućava preferiranje biosinteze određenih jedinjenja. U slučaju fenolnih komponenti metabolički put kroz autooksidativnu konverziju γ -terpinena u *p*-cimen praćen je hidroksilacijom *p*-cimena u timol ili karvakrol (De Martino et al., 2009).

U odnosu na prisustvo glavnih komponenti u okviru roda *Origanum* razlikuju se tri grupe: linalol, terpinen-4-ol i sabinen hidrat grupa (grupa A), karvakrol i/ili timol grupa (grupa B), i seskviterpenska grupa (grupa C) (Tuttolomondo et al., 2013; Mancini et al., 2014). Russo et al. (1998) na osnovu sadržaja fenolnih komponenti u okviru vrsta roda *Origanum* izdvajaju četiri hemotipa: timol, karvakrol, timol/karvakrol i karvakrol/timol. Prisustvo hemijskog polimorfizma karakteristično je i za rod *Thymus* u okviru koga se mogu razlikovati geraniolni, germakren-D, citralni, linaloolni, (E)-kariofilenski, α -terpinilacetatni, karvakrolni, timolni i mnogi drugi hemotipovi (Petrović et al., 2014). Određeni hemotip najčešće nosi naziv po dominantnom monoterpenu u etarskom ulju (Vernet et al., 1986).

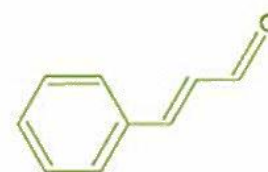
Hemijski sastav kao i sadržaj etarskog ulja u aromatičnim biljkama je podložan sezonskim varijacijama i zavisi od fenofaze u kojoj se biljka nalazi. Pored faze razvoja biljke na hemijski sastav kao i sadržaj etarskog ulja mogu imati uticaj i geografsko poreklo, klima, vreme sakupljanja biljnog materijala kao i primenjena tehnika destilacije.



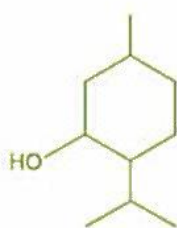
geranil acetat



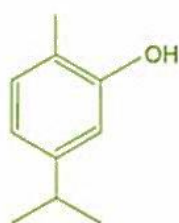
eugenil acetat



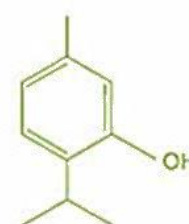
trans-cinamaldehyd



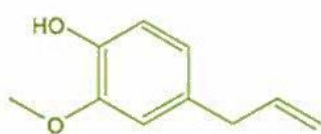
mentol



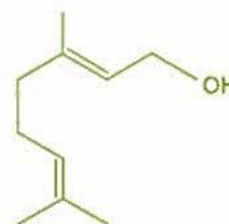
karvakrol



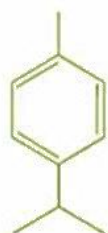
timol



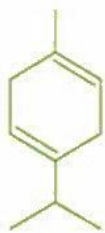
eugenol



geraniol



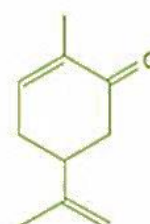
p - cimen



γ - terpinen



limonen



karvon

Slika 2.10. Strukturne formule dominantnih komponenti etarskih ulja

(Burt, 2004)

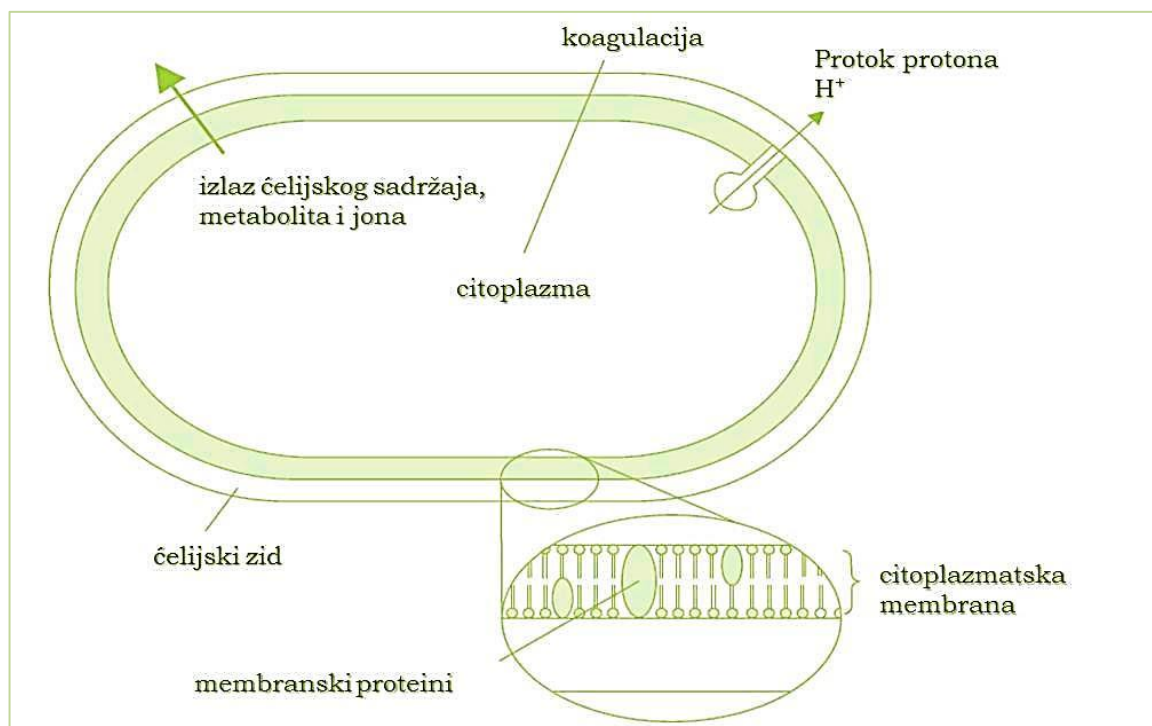
2.3.2. Mehanizam antimikrobnog delovanja

Najveći antimikrobni efekat ispoljavaju fenoli koji su uglavnom zastupljeni sa najvećim procentom u etarskom ulju, zatim slede alkoholi, aldehidi, ketoni, etri, dok je antibakterijski efekat ugljovodonika vrlo nizak (Dorman i Deans, 2000). Iako se antimikrobni efekat etarskih ulja uglavnom pripisuje fenolima koji su uglavnom zastupljeni sa najvećim procentom u etarskom ulju, ne sme se zanemariti uticaj komponenti prisutnih u tragovima zbog mogućih interakcija koje mogu uticati na antimikrobnost. U nizu studija pokazano je da etarsko ulje ili smeše komponenti etarskih ulja mogu imati veći antimikrobni efekat u poređenju sa pojedinačnim aktivnim komponentama etarskog ulja (Zhou et al., 2007; Pei et al., 2009; Bassolé et al., 2010). Ove studije sugerišu da je antimikrobna aktivnost etarskih ulja rezultat interakcija između različitih klasa jedinjenja prisutnih u etarskom ulju, iako je u nekim istraživanjima aktivnost etarskih ulja usko povezivana sa aktivnošću glavne komponente etarskog ulja (Burt, 2004).

Efekat interakcija između komponenti etarskog ulja na njegovu antimikrobnost se najčešće opisuje kao: aditivan (antimikrobni efekat etarskog ulja je jednak antimikrobnom efektu sume efekata pojedinačnih komponenti), antagonistički (antimikrobni efekat etarskog ulja je manji od antimikrobnog efekta pojedinačnih komponenti) i sinergistički (antimikrobni efekat etarskog ulja je veći od antimikrobnog efekta pojedinačnih komponenti) (Bassolé i Juliani, 2012).

Iako je tokom poslednjih decenija mehanizam antimikrobnog delovanja etarskih ulja bio predmet mnogobrojnih istraživanja još uvek nije u potpunosti razjašnjena veza između njihove antimikrobne aktivnosti i hemijske strukture. Imajući u vidu velik broj različitih hemijskih jedinjenja konstituenata etarskih ulja, može se pretpostaviti da se antimikrobna aktivnost etarskih ulja ne bazira na samo jednom specifičnom mehanizmu. Do sada je opisano nekoliko ciljnih mesta i mehanizama njihovog antimikrobnog delovanja: degradacija ćelijskog zida (Thoroski et al., 1989; Helander et al., 1998), oštećenje ili denaturacija membranskih proteina (Juven et al., 1994; Ultee et al., 1999), oštećenje citoplazmatske membrane (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Oosterhaven et al., 1995; Ultee et al., 2000; Ultee et al., 2002), izlazak ćelijskog sadržaja (Oosterhaven et al., 1995; Gustafson et al., 1998; Helander et al., 1998; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001), koagulacija citoplazme (Gustafson et al., 1998) i promena

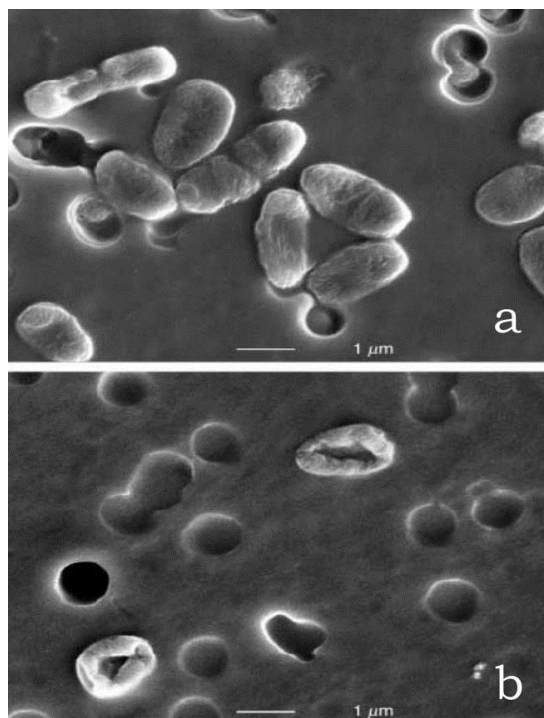
protoka protona (Ultee et al., 1999; Ultee i Smid, 2001; Ultee et al., 2002) (Slika 2.11.).



Slika 2.11. Mesta na bakterijskoj ćeliji i mehanizmi antimikrobnog delovanja etarskih ulja

(Burt, 2004)

Jedan od principa antimikrobnog delovanja etarskih ulja zasniva se na njihovoj hidrofobnoj osobini, zahvaljujući kojoj se lakše inkorporiraju unutar lipidnog dvosloja ćelijskih membrana bakterija uzrokujući poremećaje u njenoj strukturi, permeabilnosti i protoku protona pri čemu dolazi do pada membranskog potencijala, intracelularnog pH i sinteze ATP-a. Kao sekundarni efekat na ovaj način narušene osmotske ravnoteže ćelije nastupa ćelijska smrt (Sikkema et al., 1995). Ovakav način delovanja etarskih ulja je potvrđen elektronskom mikroskopijom kod *E. coli* (Slika 2.12.) (Burt i Reinders, 2003).



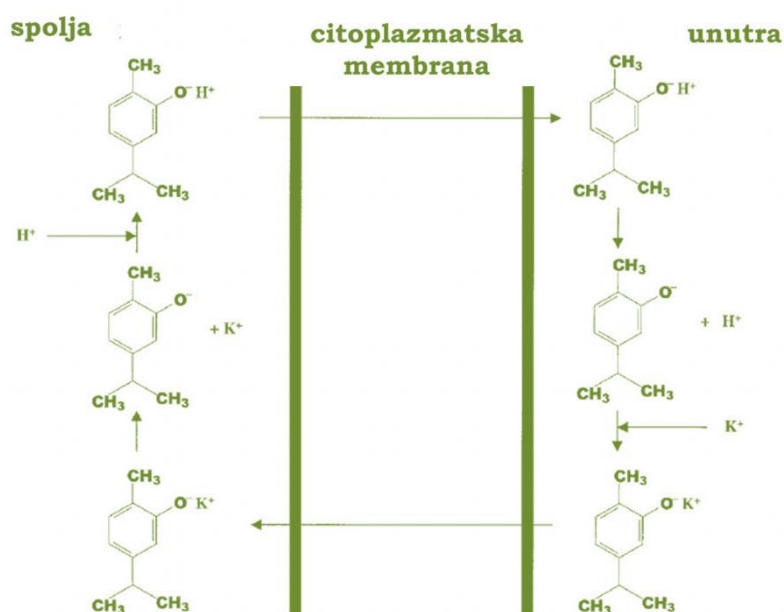
Slika 2.12. Efekat etarskog ulja origana na ćelije *E. coli* O157:H7; netretirane ćelije) (a), oštećenje ćelija nakon tretmana sa 625 µl etarskog ulja origana (b), SEM, uvećanje 12.000_x (Burt i Reinders, 2003)

S obzirom da najveći antimikrobni efekat ispoljavaju fenoli, veliki broj istraživanja je usmeren u pravcu ispitivanja njihove antimikrobne aktivnosti i mehanizama delovanja. Opšte je prihvaćen stav da je mehanizam delovanja fitofenola vrlo sličan mehanizmu dejstva ostalih fenola.

Antimikrobna aktivnost fenola zavisi od primenjene koncentracije. Pri nižim koncentracijama uzrokuju strukturne promene ćelijske membrane inhibirajući ćelijsko disanje, dok pri višim koncentracijama dovode do težih oštećenja membrane, potpunog narušavanja homeostaze i smrti ćelije (Carson et al., 2002).

Karvakrol je monoterpenski fenol sa hidroksilnom grupom u orto poziciji i sistemom delokalizovanih elektrona (dvostruke veze) što doprinosi njegovom antimikrobnom delovanju. Mehanizam antimikrobnog dejstva ovog fitofenola hipoteziran je od strane Ultee et al. (2002). Prema ovoj teoriji molekul karvakrola deluje kao transmembranski nosilac monovalentnih katjona. Naime, molekul karvakrola u nedisosovanom obliku prolazi kroz citoplazmatičnu membranu, unutar citoplazme disosuje otpuštajući proton, što za

posledicu ima privlačenje jona K^+ ili drugog jona, nakon vezivanja ovog jona, molekul karvakrola migrira u nedisosovanom obliku kroz citoplazmatsku membranu van ćelije. Efluks jona K^+ i influks jona H^+ narušava intracelularni pH, zbog čega dolazi do redukcije sinteze ATP-a. Kao rezultat na ovaj način poremećene homeostaze ćelije dolazi do ćelijske smrti (Slika 2.13.).



Slika 2.13. Šematski prikaz antimikrobnog dejstva karvakrola
(Ultee et al., 2002)

U slučaju fenolnih jedinjenja dokazano je da prisustvo hidroksilne grupe i sistema delokalizovanih elektrona u fenolnom prstenu utiče na njihovu antimikrobnu aktivnost, dok relativni položaj ove grupe nema veći značaj. Komparacijom antimikrobnog efekta karvakrola i njegovog izomera timola koji takođe poseduje hidroksilnu grupu sa sistemom delokalizovanih elektrona (dvostruke veze), ali na meta poziciji, nisu utvrđene razlike u njihovoj antimikrobnoj aktivnosti, dok u slučaju karvakrol metil estra koji sadrži metil estar umesto hidroksilne grupe i p-cimena kome nedostaje hidroksilna grupa nije utvrđen antimikrobni efekat.

Značaj hidroksilne grupe i sistema delokalizovanih elektrona se može videti po znatno nižoj aktivnosti mentola u odnosu na karvakrol. Mentol poseduje hidroksilnu grupu na svom prstenu, ali nije ustanovljeno njegovo antimikrobno dejstvo. Predpostavlja se da je odsustvo antimikrobne aktivnosti posledica nedostatka sistema

delokalizovanih elektrona (dvostruke veze) zbog čega njegova hidroksilna grupa nije u stanju da otpusti proton (Ultee et al., 2002).

Do sličnog zaključka su došli Veldhuizen et al. (2006) poređenjem aktivnosti karvakrola i 2-amino-p-cimena, analoga karvakrola u cilju utvrđivanja značaja hidroksilne grupe na aktivnost karvakrola. U ovom istraživanju konstatovana je trostruko veća aktivnost karvakrola u odnosu na 2-amino-p-cimen, a samim tim je i pokazano da hidroksilna grupa ima uticaja na antimikrobno dejstvo karvakrola.

Dokazano je da fitofenoli utiču na proteine citoplazmatske membrane i transport kroz proteinske kanale. Interakcija ovih jedinjenja sa membranskim proteinima dovodi do redukcije ili potpune inhibicije njihove aktivnosti. Predpostavljena su dva moguća mehanizma kojima fitofenoli deluju na proteine: 1. akumulacijom lipofilnih molekula u lipidnom dvosloju što prouzrokuje distorziju ovog sloja remeteći na taj način lipidno-proteinske interakcije; 2. direktnom interakcijom lipofilne komponente sa hidrofobnim delom proteina (Burt, 2004).

Biohemijski prekursori karvakrola i timola, ugljovodonični monoterpeni p-cimen i γ -terpinen ne pokazuju antimikrobnu aktivnost (Burt et al., 2005). Smatra se da ovi monoterpenski ugljovodonici pojačavaju antimikrobni efekat fitofenola. Molekul p-cimena je hidrofoban, tretman bakterija ovim monoterpenom dovodi do jačeg bubrenja ćelijske membrane u odnosu na tretman samo karvakrolom. Kako je antimikrobni efekat smeše veći od antimikrobnog efekta pojedinačnih komponenti evidentno je da između ova dva jedinjenja postoji sinergizam. Izgleda da se p-cimen inkorporira u citoplazmatsku membranu dovodeći do njenog bubrenja i povećanog transporta karvakrola. Kao rezultat zajedničke akcije ova dva jedinjenja dolazi do destabilizacije membrane, pada membranskog potencijala, sniženja intracelularnog pH i prestanka sinteze ATP-a što dovodi do smrti ćelije. p-cimen u odsustvu karvakrola osim bubrenja citoplazmatske membrane jedino uzrokuje blag pad membranskog potencijala (Ultee et al., 2000; Ultee et al., 2002).

Dosadašnjim istraživanjima na ovom polju uglavnom je pokazana efikasnost etarskih ulja i njihovih konstituenata u inhibiciji rasta vegetativnih bakterijskih ćelija, dok se mali broj istraživanja bazira na ispitivanju efekata ovih prirodnih supstanci na bakterije u biofilmu. Time postoji više nego opravdana potreba da se napravi realna, naučno zasnovana procena upotrebe supstanci biljnog porekla u cilju prevencije i eliminacije bakterijskih biofilmova sa površina.

2.3.3. Uticaj etarskih ulja na biofilm

Prva studija u kojoj je pokazan inhibitorni uticaj karvakrola na biofilm bakterija sprovedena je 2001. godine (Knowles i Roller, 2001). U pomenutoj studiji pokazana je efikasnost karvakrola na formirani biofilm *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* i *Saccharomyces cerevisiae*. Efikasnost primenjene koncentracije karvakrola je u nekim slučajevima bila ekvivalentna ili bolja od efikasnosti komercijalnih dezificijena na bazi vodonik peroksida i persirćetne kiseline.

Nakon objavljivanja ove studije započiju obimnija istraživanja uticaja etarskih ulja i njihovih konstituenata na bakterije u biofilmu. Pregled istraživanja uticaja etarskih ulja i njihovih konstituenata na bakterije u biofilmu je prikazan u Tabeli 2.4.

Prikazane studije su uglavnom bile bazirane na ispitivanjima uticaja etarskih ulja, njihovih konstituenata i hidrosolnih frakcija na inicijalnu adheziju i predhodno formirane biofilme bakterija u različitim fazama razvoja. U pojedinim istraživanjima ispitivan je uticaj različitih formulacija dezificijena na bazi etarskih ulja (Oliveira et al., 2010; Valeriano et al., 2012), dekokta i hidrosolnih frakcija etarskih ulja (Chorianopoulos et al., 2008).

Istraživanja Szczepanski i Lipski (2014) upućuju da primena subletalnih koncentracija etarskih ulja timijana, cimeta i origana redukuje sposobnost formiranja biofilma izolata *Acinetobacter* spp., *Sphingomonas* spp. i *Stenotrophomonas* spp. za 50%.

Većina pomenutih studija ukazuje na inhibitorni uticaj različitih koncentracija etarskih ulja, biljnih ekstrakata i njihovih konstituenata na inicijalnu adheziju bakterija, dok ekspozicija predhodno formiranih biofilмова istim koncentracijama etarskih ulja pokazuje značajno smanjenu efikasnost (Jadhav et al., 2013; Soni et al., 2013; Burt et al., 2014). Već je spomenuto da je proces formiranja biofilma vrlo kompleksan na koji utiču mnogobrojni faktori. Stoga, efekat primene etarskih ulja na inicijalnu adheziju i predhodno formirani biofilm će biti zavisen od velikog broja faktora koji uključuju: test mikroorganizam, njegove sposobnosti da sintetiše ECM, karakteristika ECM, hemijskog sastava i primenjene koncentracije etarskog ulja, vremena ekspozicije, faze razvoja biofilma, i temperature (Leonard et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Soni et al., 2013). Povećana rezistencija biofilma u kasnijim fazama razvoja je u velikoj meri posledica prisustva ECM koji okružuje biofilm, ali i drugih mehanizama rezistencije koji su pomenuti u okviru odeljka 2.2.8. rezistencija bakterija u biofilmu.

Tabela 2.4. Pregled istraživanja uticaja etarskih ulja i njihovih konstituenata na biofilm bakterija

Etarsko ulje/*ekstrakt/**komponenta/***dezinficijens na bazi etarskog ulja	Mikroorganizam	Metoda	Referenca
**karvakrol	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adherencija na nerđajući čelik, TBB	(Knowles i Roller, 2001)
Satureja thymbra etarsko ulje dekokt, hidrosolna frakcija etarskog ulja	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Adherencija na nerđajući čelik, TBB	(Chorianopoulos et al., 2008)
**α-pinen, **1,8 cineol, **linalool, **limonen i **geranil acetat	<i>Listeria monocytogenes</i>	CV, MA _{XTT} , SEM	(Sandasi et al., 2008)
<i>Syzygium aromaticum</i>, <i>Mentha spicata</i>, <i>Lippia rehmannii</i>, <i>Cymbopogon citratus</i>, **Nerol, **citral, **R(-)-carvon, **eugenol	<i>Listeria monocytogenes</i>	CV, CLSM	(Leonard et al., 2010)
*<i>Echinacea angustifolia</i>, <i>Mentha piperita</i>, <i>Rosmarinus officinalis</i>, <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Hypericum perforatum</i>, <i>Thymus vulgaris</i>, <i>Aspalathus linearis</i> i <i>Camelia sinensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	CV	(Sandasi et al., 2011)
***<i>Cymbopogon citratus</i>, ***<i>Cymbopogon nardus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Adherencija na nerđajući čelik, MBB	(Oliveira et al., 2010)
***<i>Mentha piperita</i>, ***<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	Adherencija na nerđajući čelik, MBB	(Valeriano et al., 2012)
<i>Origanum</i> spp., <i>Thymus</i> spp., **Karvakrol	<i>Salmonella Typhimurium</i>	CV, MBB	(Soni et al., 2013)
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i>	CV, MA _{MTT}	(Jadhav et al., 2013)
<i>Thymus</i> spp. <i>Cinnamon</i> spp., <i>Origanum</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp.	CV, LSM	(Szczepanski i Lipski, 2014)
**Karvakrol	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CV, MBB	(Burt et al., 2014)

CV - kristal violet test, MBB - metoda brojanja bakterija, MA - određivanje metaboličke aktivnosti, CLSM - konfokalna laserska skening mikroskopija, SEM - skening elektronska mikroskopija, LSM - laserska skening mikroskopija

Nasuprot, pomenutim istraživanjima Sandasi et al. (2008) su ustanovili da ekspozicija predhodno formiranih biofilмова *L. monocytogenes* konstituentima etarskih ulja (α -pinen, 1,8 cineol, linalool, limonen i geranil acetat) u koncentraciji 1mg/mL promoviše rast biofilma, što su ovi autori i potvrdili sa SEM. Ovakav nalaz može biti posledica primene neadekvatne koncentracije, ali i generalno slabog antimikrobnog efekta primenjenih komponenti.

U narednim istraživanjima istih autora šest od osam ispitanih biljnih ekstrakata je pokazalo antiadhezivnu sposobnost kod test mikroorganizama (*Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*). U okviru pomenute studije kod tri ekstrakta (*Echinacea angustifolia*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*) je evidentirana redukcija inicijalne adhezije u iznosu >50% (Sandasi et al., 2011).

Ispitivanja uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm su najčešće izvedena primenom kristal violet testa (CV) i metodom brojanja bakterija (MBB). Primenjene metode su sprovedene zasebno ili kuplovane sa metodama određivanja metaboličke aktivnosti ćelija (MA) ili nekom od mikroskopskih tehnika (SEM, CLSM, FSM).

Etarska ulja, komponente i biljni ekstrakti u ispitivanjima uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm su najčešće primenjivani u nekoliko vrednosti koncentracija ispod i iznad MIC koja je određivana zasebno za svako etarsko ulje i komponentu najčešće, mikrodilucionom metodom.

3. CILJ RADA

Imajući u vidu navedene činjenice kao i da je *Salmonella enterica* serotip Enteritidis epidemiološki najfrekventniji serotip, cilj ovoga istraživanja je bio da se ispita:

- ✓ sposobnost različitih sojeva *Salmonella* Enteritidis izolovanih iz kliničkog materijala, hrane za životinje i odabranog referentnog soja da formiraju biofilm na temperaturama od 25°C i 37°C
- ✓ sposobnost adherencije sojeva *Salmonella* Enteritidis na površine od stakla i nerđajućeg čelika
- ✓ sposobnost preživljavanja odabranih biofilm produkujućih sojeva
- ✓ mogućnost primene konfokalne laserske i skening elektronske mikroskopije u vizuelizaciji trodimenzionalne strukture biofilma
- ✓ hemijski sastav etarskih ulja
- ✓ antimikrobni efekat etarskih ulja i pojedinačnih komponenti etarskog ulja (karvakrola i timola) na bujonske kulture testiranih sojeva *Salmonella* Enteritidis i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) etarskih ulja na 14 izolata *Salmonella* Enteritidis i referentni soj ATCC 13076
- ✓ efekat odabranih koncentracija etarskih ulja na inicijalnu adheziju i već formirani biofilm odabranih sojeva *Salmonella* Enteritidis

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Kulture mikroorganizama

Ispitivanja su izvedena na izolatima vrste *Salmonella enterica* serotip Enteritidis (n=14). Devet izolata je primarno izolovano iz uzoraka fecesa i organa živine u Veterinarskom institutu u Kraljevu, dok je preostalih pet izolovano iz uzoraka hrane za životinje u Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu. Kao referentni soj korišćena je liofilizirana kultura *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (American Type Culture Collection) kwik-stick™ set (MicroBioLogics). Poreklo izolata *Salmonella* Enteritidis prikazano je u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Oznaka i poreklo izolata *Salmonella* Enteritidis korišćenih u ispitivanju

Oznaka	Poreklo	Oznaka	Poreklo
SE1	ATCC 13076	SE9	feces živine
SE2	feces živine	SE10	feces živine
SE3	jetra, slezina (živine)	SE11	smeša za tov pilića
SE4	feces živine	SE12	smeša za tov pilića
SE5	feces živine	SE13	smeša za koke nosilje
SE6	feces živine	SE14	smeša za koke nosilje
SE7	feces živine	SE15	smeša za koke nosilje
SE8	jetra, slezina (živine)		

4.1.1. Kulturelne, biohemijske i serološke karakteristike izolata *S. Enteritidis*

4.1.1.1. Kulturelne karakteristike

Kulturelne karakteristike izolata *S. Enteritidis* su ispitane njihovom kultivacijom na visoko selektivne i diferencijalne podloge:

Salmonella – Shigella agar (SS agar, LabM), Ksiloza lizin dezoksiholatni agar (XLD agar, LabM) i Harlequin-Salmonella ABC agar (HAL, LabM). Inokulisane podloge su inkubirane tokom 24h na temperaturi od 37°C.

4.1.1.2. Biohemijske karakteristike

Biohemijske karakteristike izolata *S. Enteritidis* su ispitane prema preporukama standarda SRPS EN ISO 6579 (2008) (deo: biohemijsko potvrđivanje *Salmonella* spp.)

U cilju ispitivanja biohemijskih osobina izolata svaki izolat je kultivisan na XLD agaru (LabM), tokom 24h na temperaturi od 37°C. Nakon završenog perioda inkubiranja, po pet pojedinačnih kolonija je inokulisano na površinu hranljivog agara (LabM) i inkubirano tokom 24h na temperaturi od 37°C. U cilju biohemijske potvrde, kolonije izrasle na hranljivom agaru su potom inokulisane na: trostruki kliglerov šećer (TSI, LabM), urea agar (Himedia), medijum za dekarboksilaciju L-lizina (Himedia), medijum za Voges-Proskauer (VP) reakciju (Himedia), medijum za reakciju indola (Himedia) i epruvetu sa ONPG diskom (orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) za otkrivanje β -galaktozidaze (Himedia). Svi testovi su inkubirani tokom 24h na temperaturi od 37°C.

Serotipizacija i verifikacija korišćenih izolata *S. Enteritidis* je izvedena u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigela*, *Vibrio Cholerae* i *Yersinia enterocolitica*, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu.

4.2. Ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma

Ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma su sprovedena primenom kvalitativnih i kvantitativnih skrining metoda. Kvalitativna ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma su izvedena određivanjem morfotipa kolonija na Kongo crvenom agaru i primenom pelikula testa, dok su kvantitativna ispitivanja izvedena primenom Kristal violet testa na mikrotitar pločama. U cilju ispitivanja mogućnosti vizuelizacije formiranih biofilmova vizuelizacija formiranih biofilmova odabranog izolata je izvedena primenom konfokalne laserske skening mikroskopije (CLSM) i skening elektronske mikroskopije (SEM).

4.2.1. Određivanje morfotipa

Morfotip kolonija testiranih izolata je određivan prema metodi koju su opisali Malcova et al. (2008). U cilju diferencijacije izolata na osnovu morfotipa svaki izolat je inokulisan na površinu Kongo crvenog agara [Luria-Bertani agar (LBA) bez dodatka NaCl, suplementiran sa dve indikatorske boje, kongo crveno (Congo red) (40 µg/mL) i briljant plavo (Coomassie brilliant blue) (20 µg/mL)]. Inkorporacija pomenutih indikatorskih boja u medijum omogućava detekciju produkcije dve glavne komponente matriksa biofilma salmonela, tankih agregativnih fimbrija i celuloze, koje imaju značajnu ulogu u formiranju biofilma.

Inokulisane ploče su inkubirane tokom 96h na temperaturama od 25°C i 37°C. Nakon završenog perioda inkubiranja morfotip kolonija je određivan prema fenotipskim karakteristikama prikazanim u Tabeli 4.2. Test određivanja morfotipa je ponovljen tri puta za svaki testirani izolat.

Tabela 4.2. Fenotipske karakteristike morfotipova

Oznaka morfotipa	Fenotipski izgled kolonije
RDAR	Crvena do violet, suva R-forma kolonija
BDAR	Braon, suva R-forma kolonija
PDAR	Roza, suva R-forma kolonija
SAW	Bela i S-forma kolonija
SBAM	Braon, mukoidna S-forma kolonija

4.2.2. Priprema i standardizacija bakterijskih suspenzija

Svaki izolat je kultivisan na Tripton soja agaru (TSA, LabM), tokom 24h na temperaturi od 37°C. Nakon inkubiranja, dve do tri pojedinačne kolonije su inokulisane u 5mL Tripton soja bujona (TSB, Oxoid). Suspenzije su inkubirane tokom 18h na temperaturi od 37°C. Finalne suspenzije korišćene u ispitivanjima su dobijene razređivanjem inicijalne suspenzije u odnosu 1:40 u medijumu korišćenom za ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma TSB.

Optička gustina (OD) suspenzija je podešena do gustine koja je odgovarala McFarland standardu 0,5 (~1 x 10⁸ CFU/mL) korišćenjem denzitometra DEN-1 (Biosan, Riga, Latvija) koja je ujedno predstavljala i finalnu koncentraciju bakterijskih suspenzija korišćenih u ispitivanjima sposobnosti formiranja biofilma.

4.2.3. Pelikula test

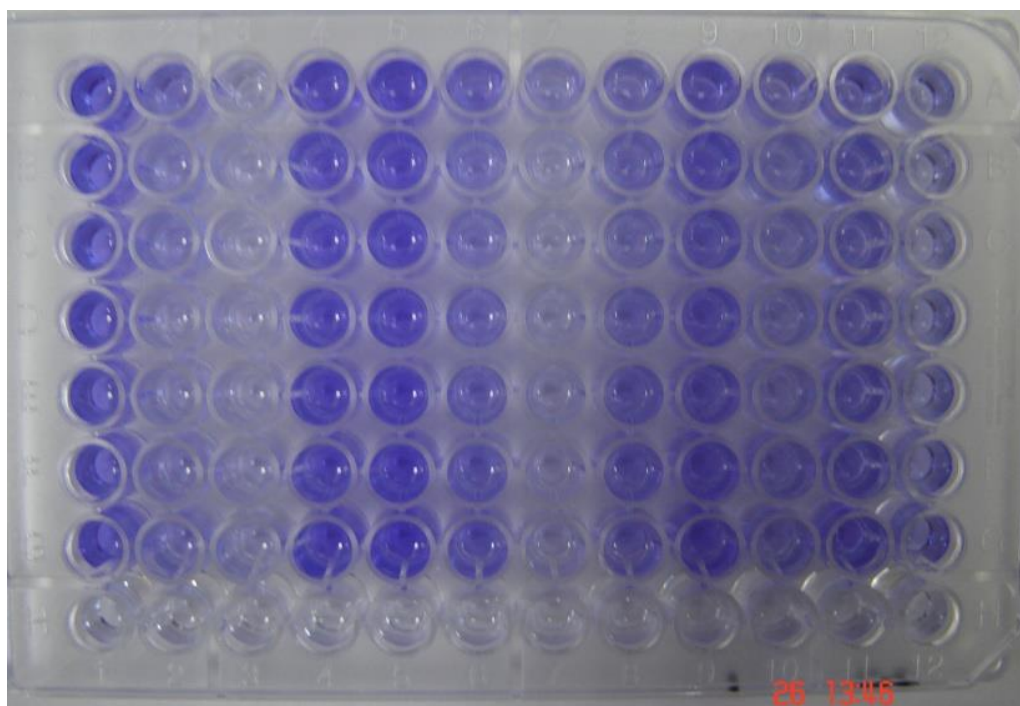
Sposobnost formiranja biofilm fenotipa, odnosno formacije pelikule na međufazi vazduh-tečnost je određivana primenom pelikula testa prema metodi koju su opisali Vestby et al. (2009b), uz modifikacije. TSB u količini od 1,8 mL je inokulisan sa 0,2 mL suspenzije od svakog izolata, a potom inkubiran tokom 96h na temperaturama od 25°C i 37°C.

Kategorizacija izolata odnosno njihova sposobnost da produkuju biofilm, izvođena je na osnovu produkcije pelikule na površini tečne faze prema sledećoj šemi: formirana čvrsta debela pelikula (+++) jak biofilm producer, formirana tanka pelikula (++) umeren biofilm producer, formirana vrlo tanka pelikula (+) slab biofilm producer, kompletno odsustvo pelikule (-) odsustvo sposobnosti produkcije biofilma. Pelikula test je ponovljen tri puta za svaki testirani izolat.

4.2.4. Kristal violet test na mikrotitar pločama

Za kvantitativna ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma izolata *S. Enteritidis* korišćen je kristal violet test na mikrotitar pločama prema metodi koju su opisali Lianou i Koutsoumanis (2012) uz modifikacije. Za izvođenje kristal violet testa korišćene su mikrotitar ploče sa 96 udubljenja Cellstar (Greiner Bio-One) sa ravnim dnom, za postavljanje kulture ćelija. Po 3 bunarića mikrotitar ploče je inokulisano sa 180 µL TSB, a zatim je dodato po 20 µL suspenzije test izolata. Negativna kontrola je sadržavala samo ispitivani bujon u količini od 200 µL. Ploče su inkubirane tokom 48h na temperaturi od 25°C. Nakon završenog inkubiranja neadherisane ćelije su uklonjene inverzijom mikrotitar ploča na apsorbujuću hartiju, a ostatak neadherisanih ćelija i podloge su uklonjeni ispiranjem tri puta sa po 250 µL sterilne vode. Zaostale adherisane bakterije su fiksirane sušenjem u invertnoj poziciji na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja u svaki bunarić je dodato po 250 µL 0,5% rastvora kristal violeta (Applichem), nakon čega su ploče inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nevezana boja je uklonjena postupkom višekratnog ispiranja sterilnom vodom dok se u potpunosti nisu uklonili ostaci boje. Mikrotitar ploče su osušene u invertnoj poziciji pri sobnoj temperaturi. Kristal violet koji je ostao vezan za adherisane bakterije rastvoren je dodavanjem dekolorizatora (etanol/acetone, 80:20%) u količini od 250 µL. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi 15 minuta kako bi se postigla potpuna razgradnja boje. Rezultati su očitani spektrofotometrijski upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm

(ChemWell, Awareness Technology). Vrednosti apsorbanci korišćenih za karakterizaciju biofilm produkcije testiranih izolata su dobijene umanjnjem svake dobijene apsorbance za srednju vrednost apsorbance negativne kontrole (čist bujon).



Slika 4.1. Mikrotitar ploča nakon dodavanja dekolorizatora (negativna kontrola H 1-12)

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci, izolati su klasifikovani u četiri kategorije prema Stepanović et al. (2003) (Tabela 4.3.) pri čemu je granična vrednost OD_c (Cut-off) definisana na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci za svaki ispitivani izolat i negativnu kontrolu (čist bujon) primenom interaktiv dot dijagrama (MedCalc, StatSoft).

Tabela 4.3. Prikaz kategorizacije izolata na osnovu apsorbanci

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

OD apsorbanca uzorka; OD_c (Cut-off) granična vrednost

Kristal violet test na temperaturi 37°C je izveden na identičan način kao i test na temperaturi 25°C. Testovi na mikrotitar pločama su izvedeni u triplicatu, tokom dve sesije ispitivanja sprovedenih pod istim uslovima tokom različitih dana ispitivanja (odnosno, 6 ponavljanja).

4.2.5. Određivanje sposobnosti adherencije izolata na staklo i čelik

Za određivanje sposobnosti adherencije, odnosno broja ćelija koje formiraju biofilm, korišćeni su kuponi dimenzija 1 x 1 x 0,2 cm izrađeni od stakla (S) i nerđajućeg čelika (AISI 304). Kuponi su predhodno oprani rastvorom deterdženta i isprani destilovanom vodom. Kuponi su pre početka rada sterilisani u autoklavu (Tutnauer, 3870 ELV) tokom 15 minuta na temperaturi od 121°C. Suspenzije testiranih izolata pripremljene su na isti način kao što je opisano u odeljku (4.2.2.). Svaki kupon je postavljen odvojeno u udubljenja sterilne polistirenske ploče sa 12 udubljenja (Greiner Bio-One). Suspenzija svakog od testiranih izolata je inokulisana u količini od 100 µL na površinu kupona. Adherencija bakterijskih ćelija na staklo/čelik je omogućena tokom 3h inkubiranja na temperaturi od 25°C. Nakon isteka perioda inkubiranja svi kuponi su isprani sa 3 mL sterilne vode kako bi se odstranile neadherirane ćelije i hranljiva podloga. Kuponi su zatim potopljeni u 2 mL TSB i inkubirani tokom 48h na temperaturi od 25°C. Nakon završenog inkubiranja svaki kupon je ispran tri puta sa sterilnim fiziološkim rastvorom radi uklanjanja zaostalih neadherisanih ćelija. Kuponi su zatim potopljeni u epruvete sa 1 mL slanog peptonskog rastvora (Himedia). Postupak deadherencije bakterija sa kupona je izveden izlaganjem epruveta sa kuponima niskoj energiji ultrazvuka tokom 3 minuta pri frekvenci od 40 kHz, primenom ultrazvučnog vodenog kupatila (Ultrasonic cleaner, VIMS Electric). Epruvete sa kuponima su potom vorteksovane 1 minut pri maksimalnoj brzini i resuspendovane u 9 mL slanog peptonskog rastvora. 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.

Test na temperaturi 37°C je izveden na identičan način kao i test na temperaturi 25°C. Postupak određivanja broja adheriranih ćelija za površinu staklenih, odnosno čeličnih kupona ponovljen je tri puta za svaki ispitivani izolat.

4.2.6. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja ćelija *S. Enteritidis* u okviru formiranih biofilmova je izvedeno prema metodi opisanoj od strane Vestby et al. (2009a) uz modifikacije. Testovi su sprovedeni na šest izolata podeljenih u dve grupe na osnovu morfotipa: BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15). Biofilmovi odabranih izolata formirani su kao što je opisano u odeljku (4.2.5.) na površini staklenih kupona tokom 48h. Nakon isteka perioda inkubiranja, svaki kupon je ispran sterilnim slanim peptonskim rastvorom i postavljen odvojeno u udubljenja nove sterilne polistirenske ploče sa 12 udubljenja (Greiner Bio-One). U cilju dobijanja približnih uslova koji vladaju u pogonima prehrambene industrije i industrije hrane za životinje ispitivanje sposobnosti preživljavanja ćelija u okviru formiranih biofilmova testiranih izolata sprovedena su u uslovima isušivanja i uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) i relativnoj vlažnosti vazduha (RH) $43 \pm 2\%$. Za ispitivanje preživljavanja u uslovima isušivanja i kompletnog odsustva hranljivih materija vijabilnost mikroorganizama je ispitivana nakon 7, 14 i 28 dana.

U slučaju ispitivanja preživljavanja u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija na svakih 168h kuponi su rehidrirani sa 100 μL TSB. Vijabilnost adheriranih mikroorganizama u uslovima u povremene dostupnosti hranljivih materija je određivana nakon vremenskih intervala u trajanju od 15, 30, 45, 60 i 90 dana. Vijabilnost ćelija *S. Enteritidis* u okviru formiranih biofilmova je određivana na isti način kao što je opisano u odeljku (4.2.5).

4.2.7. Vizuelizacija formiranog biofilma

Vizuelizacija formiranih biofilmova primenom konfokalne laserske skening mikroskopije (CLSM) i skening elektronske mikroskopije (SEM) je izvedena na odabranom izolatu *S. Enteritidis* (SE5) koji je predhodno okarakterisan kao RDAR morfotip (SE_{RDAR}). Za vizuelizaciju upotrebom CLSM biofilmovi su formirani tokom 24h, 48h i 96h na površini staklenih kupona, dok za vizuelizaciju upotrebom SEM pored staklenih korišćeni su i kuponi od nerđajućeg čelika.

4.2.7.1. Konfokalna laserska skening mikroskopija

Za ispitivanja biofilmova primenom CLSM korišćeni su kuponi od stakla dimenzija 1 x 1 x 0,2 cm. Postupak pripreme suspenzija i kupona sprovedeni su prema protokolima opisanim u odeljcima 4.2.2 i 4.2.5.

Suspenzije bakterija testiranih izolata su inokulisane u količini od 100 μ L na površinu svakog kupona. Adherencija bakterija je omogućena tokom 3h inkubiranja na temperaturi 25°C, nakon čega je suspenzija uklonjena aspiracijom. Kuponi su isprani sterilnim fiziološkim rastvorom, a zatim potopljeni u 2 mL TSB. U cilju vizuelizacije biofilmovi odabranih izolata su formirani tokom 24h, 48h i 96h inkubiranja na temperaturi od 25°C. Nakon isteka perioda inkubiranja kuponi su odstranjeni iz mikrotitar ploča i isprani sa 3 mL sterilnog fiziološkog rastvora, kako bi se uklonila podloga i neadherisane ćelije. Svaki kupon je postavljen u 2 mL slanog fosfatnog pufera odvojeno u udubljenja sterilne polistirenske ploče sa 12 udubljenja (Greiner Bio-One). Radi vizuelizacije biofilmova konfokalnom laserskom skening mikroskopijom bojenje adheriranih ćelija izvedeno je primenom fluorescein diacetata u koncentraciji 32 mikroM (FDA, Sigma, Aldrich) i propidium jodida u koncentraciji 7,5 mikroM (PI, Sigma, Aldrich). Nakon inkubiranja u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku kuponi su isprani sterilnim fiziološkim rastvorom, a potom izmešteni u udubljenja nove sterilne polistirenske ploče ispunjenih sa po 2 mL slanog fosfatnog pufera. Vizuelizacija adheriranih ćelija je izvedena primenom konfokalnog laserskog skening mikroskopa (LSM 510, Carl Zeiss, GmbH, Jena, Germany) snadbevenog sa Argonskim (Ar) laserom sa nekoliko spektralnih linija (457, 478, 488 i 514 nm) i helijum-neonskim (He-Ne) laserom (543 nm) uz primenu objektiva Archoplan 40x/0,8W, u vodnoj imerziji. Za obradu slika korišćen je programski paket ZEISS LSM Image Browser verzija 4.2. Rezultati vizuelizacije biofilma dobijeni primenom CLSM su sačinjeni od setova mikrografija koje predstavljaju dvodimenzionalne preseke u XY ravni zajedno sa Z osom. Svaka pojedinačna XY mikrografija odgovara poprečnom preseku kroz biofilm, dok visina Z projekcije tj. Z ose odgovara debljini formiranog biofilma. Serija dvodimenzionalnih XY preseka kroz Z osu predstavlja Z projekciju (eng. Z „stack“). Reprodukcijska 3D projekcija formiranih biofilmova je izvedena primenom programskog paketa BioImage XD (Kankaanpaa et al., 2012).

4.2.7.2. Skening elektronska mikroskopija

Za ispitivanja biofilmova primenom SEM korišćeni su kuponi od stakla i nerđajućeg čelika dimenzija 1 x 1 x 0,2 cm. Postupak pripreme suspenzija, kupona i postupak formiranja biofilma su sprovedeni prema protokolima opisanim u odeljcima 4.2.2., 4.2.5. i 4.2.7.1. Nakon isteka perioda inkubiranja kuponi su odstranjeni iz mikrotitar ploča i isprani sa 3 mL sterilnog fiziološkog rastvora, kako bi se uklonila podloga i neadherisane ćelije. Za vizuelizaciju biofilmova uz pomoć SEM, fiksiranje biofilmova je izvedeno u 4% rastvoru glutaraldehida (Roth) na temperaturi od 5°C tokom 18h. Nakon fiksacije, kuponi su isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim dehidrirani sukcesivnim potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih koncentracija (30%, 50%, 60%, 70% i 90%), po 5 minuta u svakom. Zatim je svaki kupon dva puta potopljen u 96% etanol tokom 10 minuta nakon čega su kuponi osušeni na vazduhu. Osušeni preparati napareni su zlatom na uređaju Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN (WD=50mm, za 90s, struja 30mA) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV, (napon ubrzanja 25 KV, na WD od 20 do 8 mm).

4.3. Biljni materijal

Kao biljni materijal korišćene su četiri biljne vrste: divlji origano *Origanum heracleoticum* (*O. vulgare* ssp. *hirtum*), origano (*Origanum vulgare* ssp. *vulgare*), timijan (*Thymus vulgaris*) i majčina dušica (*Thymus serpyllum*). Identifikacija biljnog materijala je izvedena od strane Instituta za proučavanje lekovitog bilja, „Dr Josif Pančić“, a herbarski primerci su deponovani u herbarijumu navedenog Instituta i zavedeni pod sledećim vaučer brojevima: divlji origano (IC1312), origano (IC1212), timijan (IC1112) i majčina dušica (IC1012).

4.3.1. Destilacija etarskog ulja

Ekstrakcija etarskog ulja je sprovedena iz osušениh i samlevenih nadzemnih delova biljnog materijala postupkom hidrodestilacije na aparatu tipa Clavenger tokom 2,5h prema standardnoj proceduri prikazanoj u Sedmoj Evropskoj farmakopeji (2011). Uzorci ulja su sušeni sa anhidrovanim natrijum sulfatom, rastvoreni u etanolu i analizirani na gasnom hromatografu sa plameno jonizujućim detektorom (GC-FID) i masenim spektrometrom (GC/MS). Prinos etarskog ulja je izražen preko

zapreminskih procenata (%) tj. v/w, obračunato u odnosu na 100 g suvog biljnog materijala.

4.4. Hemijska analiza etarskog ulja

4.4.1. Gasna hromatografija (GC- FID)

Gasna hromatografija je izvedena primenom Hewlett-Packard gasnog hromatografa model HP-5890 Series II (Waldbronn, Germany), opremljenim split-splitless injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (25m×0,32mm, debljine filma 0,52μm) i plameno jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je H₂, sa protokom od 1 mL/min. Etanolni rastvori uzorka etarskog ulja (1μL) su injektovani u split režimu (1:30). Temperatura injektora je iznosila 250°C, detektora 300°C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40 do 260°C (4°C/min) i zadržavanjem na finalnoj temperaturi 10 minuta. Procenti površine pikova dobijeni integracijom odgovarajućih hromatograma su korišćeni kao osnova za kvantifikaciju.

4.4.2. Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom (GC/MS)

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC/MS) je izvedena korišćenjem HP G 1800C Series II GCD sistemu [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)] opremljenog sa HP-5MS kolonom (30m × 0,25mm, debljina filma 0,25μm).

Kao gas nosač korišćen je helijum (1mL/min). Temperatura injektora iznosila je 260°C, transfer linije 250°C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40 do 260°C (4°C/min). Maseni spektri snimani su u EI režimu (70eV) u opsegu m/z 40-450. Injektovana količina uzorka prethodno rastvorenog u dihlormetanu ili etanolu je iznosila 0,2 μL.

4.4.3. Identifikacija komponenti etarskog ulja

Identifikacija pojedinačnih komponenti etarskog ulja je izvedena poređenjem dobijenih masenih spektara sa Wiley 275 i NIST/NBS spektralnim bibliotekama korišćenjem različitih algoritama pretrage. Pored spektroskopskih podataka, identifikacija nađenih jedinjenja je dodatno potvrđena upoređivanjem njihovih izračunatih retencionih

indeksa i masenih spektara sa poznatim literaturnim podacima (Adams, 2007), kao i pomoću ADMIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) softvera povezanog sa odgovarajućom GC-MS spektralnom bibliotekom. Eksperimentalne vrednosti retencionih indeksa su određene upotrebom kalibrisanog AMDIS softvera i upoređene sa poznatim literaturnim podacima (Adams, 2007). Nakon normalizacije površina pikova (pri čemu je uzeto da su relativni odzivi svih pikova iznosili jedan), relativni udeli pojedinačnih komponenti etarskog ulja su izraženi u procentima.

4.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, karvakrola i timola je izvedeno primenom bujon mikrodilucione metode prema preporukama CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2006), uz modifikacije. Radi lakše vizuelne determinacije MIC, bujon mikrodiluciona metoda je modifikovana u smislu dodatka resazurina kao indikatora bakterijskog rasta.

Resazurin je plava nefluorescentna boja, koja nakon redukcije nastale pod dejstvom oksidoreduktaza vijabilnih ćelija prelazi u fluorecentno jedinjenje roze boje resorufin.

4.5.1. Pojedinačne komponente etarskog ulja

Kao pojedinačne komponente etarskog ulja korišćene su glavne komponente ispitivanih etarskih ulja timol, minimum 99,5% (Sigma, Aldrich) i karvakrol >98% (Sigma, Aldrich).

4.5.2. Rastvor resazurina

Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide, Himedia) je rastvoren u sterilnoj vodi (0,01%). Dobijeni rastvor je zatim sterilisan postupkom filtracije uz primenu membranskog filtera 0,20 µm, za sterilnu filtraciju na špricu (Sartorius, Germany). Zbog fotosenzitivnosti resazurina za svako ispitivanje je pripremana nova količina rastvora.

4.5.3. Standardizacija inokuluma

Za pripremu inokuluma ispitivanih izolata korišćen je sterilni fiziološki rastvor. Priprema i standardizacija inokuluma je izvedena primenom 18h bakterijskih kultura. Svaki testirani izolat je kultivisan na krvnom agaru (bioMérieux) tokom 18h na temperaturi od 37°C. Nekoliko identičnih kolonija ispitivane bakterijske kulture resuspendovano je u 9 mL fiziološkog rastvora. Optička gustina (OD) inokuluma je podešena do gustine koja je odgovarala McFarland standardu 0,5 ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/mL) korišćenjem denzitometra DEN-1 (Biosan, Riga, Latvija). Finalna koncentracija inokuluma korišćena u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti iznosila je 10^6 CFU/mL.

4.5.4. Bujon mikro-diluciona metoda

Prilikom izvođenja ove metode od posebne važnosti je standardizacija inokuluma. Nakon pripreme inicijalne suspenzije bakterija optičke gustine ekvivalentne McFarland standardu 0,5 (1×10^8 CFU/mL), finalni inokulum se pripremao razblaženjem sa Mueller-Hinton bujonom (MHB, LabM) u odnosu 1:100 radi dobijanja koncentracije bakterija 1×10^6 CFU/mL. Koncentracija bakterija izražena u mililitru inokuluma zavisi od same zapremine tečnosti koja se unosi u medijum. Tokom ovog ispitivanja primenjen je inokulum zapremine 20 μ L koji je sadržavao 2×10^6 CFU/mL, kako bi finalna koncentracija bakterija po bunariću iznosila 2×10^5 CFU/mL.

Dilucioni antibiogram je izveden tako što je napravljena serija koncentracija etarskog ulja u propilen glikolu (Applichem) prema šemi prikazanoj u Tabeli 4.3.

MHB je inokulisan u količini od 160 μ L u test bunariće mikrotitar ploče, u koje je zatim dodato etarsko ulje od svake testirane koncentracije u količini od 20 μ L i bakterijski inokulum, takođe u količini od 20 μ L. Konačna zapremina bunarića u mikrotitar ploči je iznosila 200 μ L. Upporedno su postavljene sledeće kontrole:

- pozitivna kontrola I/kontrola rasta mikroorganizama: MHB (160 μ L), suspenzija bakterija (20 μ L) i rastvarač propilen glikol (20 μ L);
- negativna kontrola/kontrola sterilnosti: MHB (160 μ L), etarsko ulje (20 μ L) i rastvarač propilen glikol (20 μ L);
- pozitivna kontrola II: MHB (160 μ L), suspenzija bakterija (20 μ L), rastvor streptomocina (20 μ L).

Mikrotitar ploče su inkubirane tokom 24h na temperaturi od 37°C. Postupak je izveden u četiri ponavljanja.

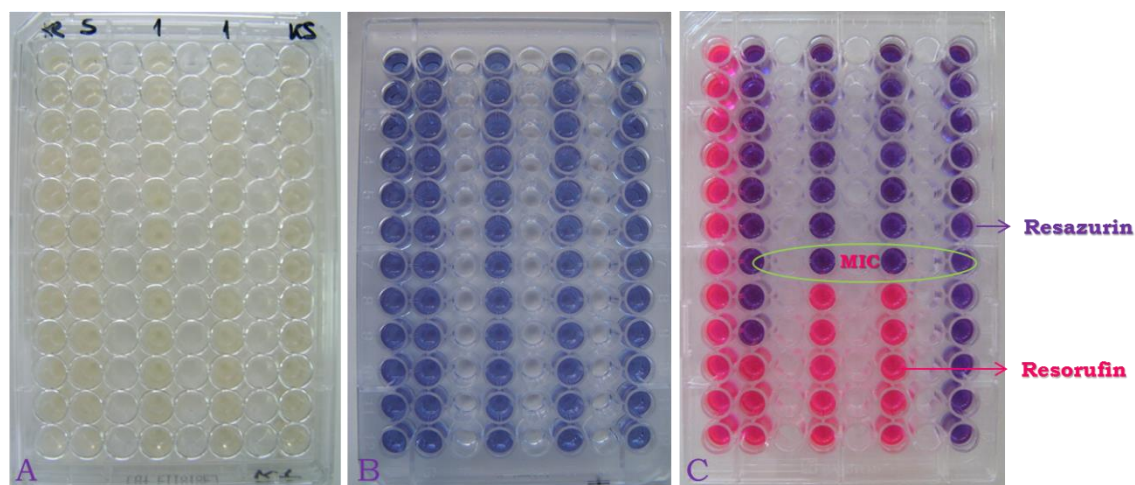
U cilju determinacije MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) 18 sata inkubiranja u svaki bunarić je dodato po 20 μL 0,01% resazurina kao indikatora bakterijskog rasta, mikrotitar ploče su obmotane aluminijumskom folijom, a zatim su reinkubirane tokom narednih 6h pri prethodno pomenutoj temperaturi.

MIC je definisana kao najniža koncentracija etarskog ulja koja je inhibirala vidljivi rast test mikroorganizama, a određena je na osnovu redukcije resazurina i predstavljena je onom koncentracijom etarskog ulja koja je sprečila redukciju resazurina (Slika 4.2.).

MBC je određena zasejavanjem po 100 μL iz svakog bunarića u kome nije došlo do promene boje indikatora (Slika 4.2.) na površinu agara za ukupan broj bakterija (PCA, LabM) i njihovim inkubiranjem 24h na prethodno spomenutim temperaturama. Najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj je zabeleženo potpuno odsustvo bakterijskog rasta se smatrala kao MBC.

Tabela 4.4. Način pripreme razblaženja etarskih ulja, čistih supstanci i antibiotika u Muller-Hinton bujonu

Koncentracije radnih rastvora ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Količina radnih rastvora (μL)	Količina inokulata (μL)	Muller Hinton bujon (μL)	Finalno razblaženje ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
50	20	20	160	5
25	20	20	160	2,5
12,5	20	20	160	1,25
6,25	20	20	160	0,625
3,125	20	20	160	0,3125
1,56	20	20	160	0,156
0,78	20	20	160	0,078
0,39	20	20	160	0,039
0,195	20	20	160	0,0195
0,0975	20	20	160	0,00975
0,04875	20	20	160	0,004875
0,024375	20	20	160	0,0024375



Slika 4.2. Inokulirana mikrotitar ploča (A), mikrotitar ploča nakon dodavanja resazurina (B), mikrotitar ploča nakon reinkubiranja (C)

Određivanje sinergističkog uticaja između komponenti etarskih ulja karvakrola i timola je izvedeno preko individualnog frakcionog inhibicionog koncentracijskog indeksa (FIC_{index}) prema Burt et al. (2005).

$$FIC\ index\ (a) = \frac{MIC_{a+b}}{MIC_a} \quad (1)$$

$$FIC\ index\ (b) = \frac{MIC_{b+a}}{MIC_b} \quad (2)$$

Gde je:

MIC_{a+b} , odnosno MIC_{b+a} - MIC smeše,

MIC_a - MIC komponente a i

MIC_b - MIC komponente b

Ukoliko je dobijena vrednost za:

→ $FIC \leq 0,5$ - smeša pokazuje sinergistički efekat (dobijeni efekat smeše je veći od efekata pojedinačnih koncentracija komponenti);

→ $0,5 < FIC \leq 1$ - smeša pokazuje aditivni efekat (dobijeni efekat smeše je jednak uticaju sume efekata pojedinačnih koncentracija komponenti);

→ $1 < FIC < 2$ - smeša pokazuje indiferentan efekat (dobijeni efekat smeše je jednak efektu aktivnije komponente u smeši);

→ $FIC \geq 2$ - smeša pokazuje antagonistički efekat (dobijeni efekat smeše je manji od efekta pojedinačnih komponenti)(EUCAST, 2000).

4.6. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm

Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i već formirane biofilme je izvedeno na odabranim test izolatima kvantifikacijom ukupne biomase formiranog biofilma primenom CV testa i određivanjem nivoa metaboličke aktivnosti adheriranih ćelija.

4.6.1. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju

Uticaj etarskih ulja na inicijalnu ćelijsku adheziju je određivan prema metodi (Jadhov et al., 2013; Sandasi et al., 2010) uz modifikacije. Testovi su sprovedeni na šest izolata podeljenih u dve grupe na osnovu morfotipa: BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15).

Prilikom izvođenja ove metode korišćeni su deset puta koncentrovaniji rastvori etarskih ulja kako bi konačna koncentracija etarskih ulja u punom bunariću odgovarala koncentracijama u iznosu od $0,25\text{MIC}$, $0,5\text{MIC}$, 1MIC i 2MIC . Vrednosti finalnih koncentracija etarskih ulja su prikazane u Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Vrednosti finalnih koncentracija etarskih ulja i pojedinačnih komponenti primenjenih u testovima ispitivanja njihovog uticaja na inicijalnu adheziju

	O1	O2	T1	T2	K	T
$0,25\text{MIC}$	0,0195	0,039	0,039	0,078	0,039	0,039
$0,5\text{MIC}$	0,039	0,078	0,078	0,156	0,078	0,078
1MIC	0,078	0,156	0,156	0,3125	0,156	0,156
2MIC	0,156	0,3125	0,3125	0,625	0,3125	0,3125

O. heracleoticum (O1), *O. vugare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrol (K) i timol (T)

Dvadeset μL od svake testirane koncentracije etarskog ulja je inokulisano u bunarić mikrotitar ploče (Greiner Bio-One) u tri ponavljanja. Zatim je u svaki test bunarić dodato po $160 \mu\text{L}$ TSB i $20 \mu\text{L}$ suspenzije bakterija (McF 0,5), kako bi finalna zapremina bunarića iznosila $200 \mu\text{L}$. Uporedno su postavljene sledeće kontrole:

- pozitivna kontrola: TSB ($160 \mu\text{L}$), bakterijska suspenzija ($20 \mu\text{L}$) i rastvarač propilen glikol ($20 \mu\text{L}$);
- negativna kontrola I: TSB ($200 \mu\text{L}$);

→ negativna kontrola II: TSB (160 μ L) i etarsko ulje odgovarajuće koncentracije u rastvaraču propilen glikol (20 μ L).

Ploče su inkubirane na temperaturi od 25°C tokom 48h. Nakon isteka predviđenog vremena inkubiranja, sadržaj bunarića je uklonjen inverzijom mikrotitar ploča na apsorbujuću hartiju, a ostatak neadherisanih ćelija i podloge su uklonjeni ispiranjem tri puta sa po 250 μ L sterilne vode nakon čega su ploče prosušene u laminarnoj komori.

Određivanje efekta etarskog ulja na inicijalnu adheziju izvedeno je kvantifikacijom ukupne biomase formiranog biofilma primenom kristal violet testa prema protokolu opisanom u odeljku 4.2.4., i nivoa metabolitičke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija prema protokolu opisanom u odeljku 4.6.1.1.

4.6.1.1. Određivanje nivoa metabolitičke aktivnosti ćelija

Postavka eksperimenta za određivanje nivoa metabolitičke aktivnosti ćelija primenom resazurina je izvedena prema protokolu opisanom u odeljku 4.6.1. Nakon završene inkubacije, ispiranja i sušenja, u svaki bunarić je inokulisano po 190 μ L slanog fosfatnog pufera i 10 μ L resazurina (0,01%). Zbog fotosenzitivnosti resazurina nakon njegovog dodavanja ploče su odmah obmotane aluminijumskom folijom. Ploče su zatim inkubirane 6h na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije merenje fluorescence je izvedeno upotrebom fluorescentnog čitača (Fluorocan, Ascent™ FL Thermo Labsystems) uz primenu filtera pri talasnim dužinama, ekscitacije (λ_{ex})/emisije (λ_{em}) 544/590 nm.

4.6.2. Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm

Ispitivanje uticaja etarskih ulja na formirani biofilm je izvedeno prema metodi koju su opisali Jadhov et al., (2013), uz modifikacije. Po 3 bunarića mikrotitar ploče je ispunjeno sa po 180 μ L TSB, a zatim je dodato po 20 μ L bujionske kulture test izolata (McF 0,5). Uporedo su postavljeni kontrolni bunarići:

- pozitivna kontrola: TSB (180 μ L) i bakterijska suspenzija (20 μ L),
- negativna kontrola I: TSB (200 μ L),
- negativna kontrola II: TSB (180 μ L) i etarsko ulje odgovarajuće koncentracije u rastvaraču propilen glikol (20 μ L).

Mikrotitar ploče su inkubirane na temperaturi od 25°C tokom 48 h kako bi se omogućila adhezija i formiranje biofilma. Nakon isteka predviđenog vremena inkubiranja, neadherisane ćelije su uklonjene inverzijom mikrotitar ploča na apsorbujuću hartiju, a ostatak neadherisanih ćelija i podloge su uklonjeni ispiranjem tri puta sa po 250 µL sterilne vode nakon čega su ploče prosušene u laminarnoj komori.

Zatim je u svaki bunarić inokulisano po 180 µL slanog fosfatnog pufera i po 20 µL deset puta koncentrovanih rastvora etarskih ulja kako bi konačna koncentracija etarskih ulja u svakom bunariću odgovarala 0,5MIC, 1MIC, 2MIC i 4MIC. Vrednosti primenjenih koncentracija su prikazane u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Vrednosti finalnih koncentracija etarskih ulja i pojedinačnih komponenti primenjenih u testovima ispitivanja njihovog uticaja na formirani biofilm

	O1	O2	T1	T2	K	T
0,5MIC	0,039	0,078	0,078	0,156	0,078	0,078
1MIC	0,078	0,156	0,156	0,3125	0,156	0,156
2MIC	0,156	0,3125	0,3125	0,625	0,3125	0,3125
4MIC	0,312	0,625	0,625	1,25	0,625	0,625

O. heracleoticum (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrol (K) i timol (T)

Nakon dodatka etarskih ulja ploče su inkubirane 15, 30 i 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon isteka perioda inkubiranja uticaj etarskog ulja na količinu formiranog biofilma je određivan kvantifikacijom ukupne biomase biofilma primenom kristal violet testa prema protokolu opisanom u odeljku (4.2.4.) i određivanjem metabolitičke aktivnosti ćelija prema protokolu opisanom u odeljku (4.6.1.1.).

Testovi su izvedeni u triplikatu, tokom dve sesije ispitivanja sprovedenih pod istim uslovima tokom različitih dana ispitivanja (odnosno, 6 ponavljanja).

Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm ocenjivan je na osnovu procenta redukcije apsorbanci, odnosno fluorescenci u odnosu na netretirane uzorke (pozitivna kontrola) prema formuli (3).

$$\% \text{ redukcije} = 100 - \left[\left\{ \frac{A_1 - A_2}{A_{pk} - A_{nk}} \right\} \times 100 \right] \quad (3)$$

Gde je:

A₁ – apsorbanca (OD₅₉₅)/fluorescenca (OD_{544ex/590em}) test bunarića,
A₂ - apsorbanca (OD₅₉₅)/fluorescenca (OD_{544ex/590em}) bunarića negativne kontrole II (čist bujon i etarsko ulje odgovarajuće koncentracije),
A_{pk} - apsorbanca (OD₅₉₅)/fluorescenca (OD_{544ex/590em}) pozitivne kontrole i
A_{nk} - apsorbanca (OD₅₉₅)/fluorescenca (OD_{544ex/590em}) negativne kontrole I (čist bujon).

U cilju lakše evaluacije efikasnosti primenjenih tretmana na inicijalnu adheziju i formirani biofilm definisane su:

→ MBIC₅₀/MBIC₉₀ (minimalna biofilm inhibitorna koncentracija) predstavlja najnižu koncentraciju primenjene supstance koja je sprečila inicijalnu adheziju i posledično formiranje biofilma u iznosu ≥50%, odnosno ≥90%.

→ MBEC₅₀/MBEC₉₀ (minimalna biofilm eradikaciona koncentracija) predstavlja najnižu koncentraciju primenjene supstance koja omogućila redukciju predhodno formiranog biofilma u iznosu ≥50%, odnosno ≥90%.

4.7. Statistička obrada podataka

Za prikazivanje rezultata istraživanja korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji: procenat, medijana, srednja vrednost, standardna devijacija itd., a prikaz rezultata istraživanja dat je u vidu grafika i tabela.

Zbog malog broja uzoraka ($n < 30$) procena statistički značajnih razlika između testiranih parametara je izvedena primenom različitih neparametrijskih testova (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis) i odgovarajućim post hoc testom (test višestrukih komparacija) (eng. multiple comparisons of mean ranks for all groups). U okviru svih merenja vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

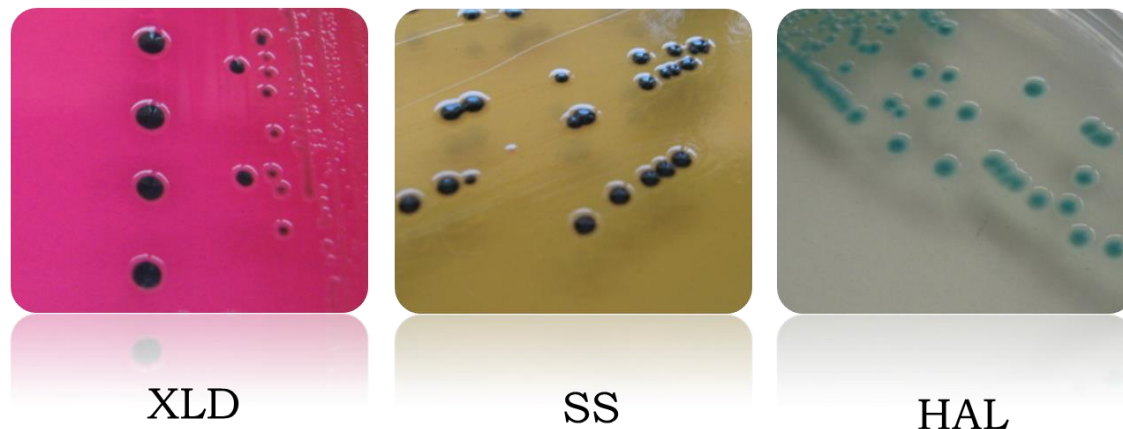
Za utvrđivanje korelacije između pojedinih varijabli primenjivan je Spirmanov koeficijent korelacije ranga.

Analize su izvedene korišćenjem statističkog softvera Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Potvrđivanje kulturelnih, biohemijskih i seroloških karakteristika korišćenih izolata

Na osnovu rezultata potvrđivanja kulturelnih i biohemijskih karakteristika korišćenih izolata potvrđeno je da ispitivani izolati pripadaju vrsti *Salmonella* spp. Rezultati kulturelnih karakteristika testiranih izolata na tri primenjena selektivna medijuma prikazani su na Slici 5.1.



Slika 5.1. Morfologija kolonija *S. Enteritidis*; XLD (Ksilozna lizin dezoksiholatni agar), SS (Salmonella–Shigella agar) i HAL (Harlequin-Salmonella ABC agar)

Porast crvenkastih kolonija sa crnim centrom na XLD agaru, odnosno bezbojnih kolonija sa crnim centrom na SS agaru, usled produkcije H_2S , kao i zeleno obojenih kolonija na HAL agaru, u potpunosti odgovara izgledu tipičnih kolonija karakterističnih za *Salmonella* spp. za svaki od primenjenih medijuma.

Takođe i rezultati biohemijskog potvrđivanja neosporno ukazuju da je reč o izolatima *Salmonella* spp. U Tabeli 5.1. dat je prikaz rezultata dobijenih biohemijskih karakteristika testiranih izolata. Serološkom tipizacijom je ustanovljeno da ispitivani izolati pripadaju serotipu Enteritidis sledeće antigenske formule: [somatski antigeni (9, 12); flagelarni antigeni-faze 1 (g,m) i flagelarni antigeni-faze 2 (-)]. Rezultati serotipizacije korišćenih izolata prikazani su u Tabeli 5.2.

Tabela 5.1. Rezultati biohemijskih karakteristika testiranih izolata *S. Enteritidis*

Oz. izolata	TSI	U	D.L	V.P	I	O	Oz. izolata	TSI	U	D.L	V.P	I	O
*SE 1.	1+,2+,3,4-	-	+	-	-	-	SE 9.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 2.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 10.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 3.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 11.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 4.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 12.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 5.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 13.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 6.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 14.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 7.	+,+,-,-	-	+	-	-	-	SE 15.	+,+,-,-	-	+	-	-	-
SE 8.	+,+,-,-	-	+	-	-	-							

* *Salmonella* Enteritidis, ATCC 13076, TSI (trostruki kliglerov šećer): ¹stvaranje kiseline od glukoze (ili fermentacija glukoze); ²H₂S produkcija; ³fermentacija laktoze i ⁴ fermentacija saharoze, U (urea agar), D.L (medijum za dekarboksilaciju L-lizina), V.P (medijum za Voges-Proskauer reakciju), I (medijum za reakciju indola), O (orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid za otkrivanje β-galaktosidaze) +: pozitivna reakcija; -: negativna reakcija

Tabela 5.2. Rezultati serološke tipizacije testiranih izolata

Oz. izolata	Serotip	Antigenska grada			Oz. izolata	Serotip	Antigenska grada		
		„O“	„H“ _{f1}	„H“ _{f2}			„O“	„H“ _{f1}	„H“ _{f2}
*SE 1.	Enteritidis	1,9,12	g,m	-	SE 9.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 2.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 10.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 3.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 11.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 4.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 12.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 5.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 13.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 6.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 14.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 7.	Enteritidis	9,12	g,m	-	SE 15.	Enteritidis	9,12	g,m	-
SE 8.	Enteritidis	9,12	g,m	-					

* *Salmonella* Enteritidis, ATCC 13076; „O“ somatski antigen; „H“_{f1} flagelarni antigen faze 1 i „H“_{f2} flagelarni antigen faze 2

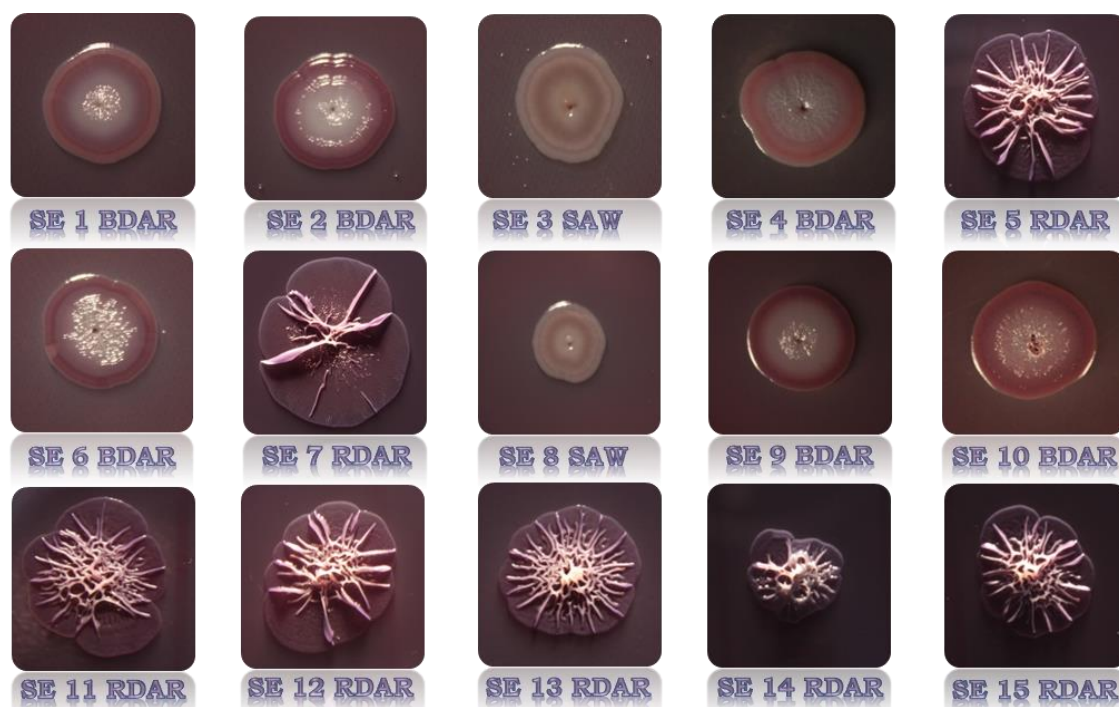
5.2. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

Ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma su sprovedena na temperaturi inkubiranja od 25°C, kao ambijentalnoj temperaturi, i 37°C, kao optimalnoj temperaturi za rast *S. Enteritidis*.

5.2.1. Određivanje morfotipa

Rezultati određivanja morfotipa ispitivanih izolata prikazani su na Slikama 5.2. i 5.3 Nakon 96h inkubiranja pri temperaturi od 25°C na osnovu fenotipskog izgleda kolonija ispitivanih izolata detektovana su tri morfotipa: RDAR, BDAR i SAW.

Morfologija kolonija sedam izolata (SE5, SE7, SE11 – SE15) je odgovarala R-formi kolonije, uglavnom violet boje, ovaj morfotip je označen kao RDAR (red, dry and rough) (Slika 5.2.).



Slika 5.2. Morfotip kolonija testiranih izolata na Kongo crvenom agaru nakon 96h inkubiranja pri temperaturi od 25°C

Kod pet izolata (SE2, SE4, SE6, SE9 i SE10) i referentnog soja (SE1) morfologija kolonija se odlikovala nepotpunom R-formom kolonije, crvenkasto-braon boje. Morfotipovi ovih kolonija su okarakterisani su kao BDAR morfotip (brown dry and rough).

Izolati SE3 i SE8 su na površini Kongo crvenog agara razvili S-formu kolonija, krem-bele boje. Morfotip ovih izolata je okarakterisan kao SAW (smooth and white) morfotip.

Inkubiranjem na 37°C morfologija kolonija svih 14 izolata (SE2 – SE15) i referentnog soja (SE1) je odgovarala S-formi kolonije, bez apsorbirane boje. Ovaj morfotip je okarakterisan kao SAW morfotip. Fenotipski izgled kolonija SAW morfotipa za pojedine izolate je prikazan na Slici 5.3.

U velikom broju istraživanja ovaj test je primenjivan u svrhu detekcije biofilm produkujućih izolata (Solano et al., 2002; Solomon et al., 2005; Malcova et al., 2008). RDAR morfotip koji je bio opisan samo kod *S. Typhimurium* je potvrđen i kod prirodnih izolata *S. Enteritidis* u istraživanju Zogaj et al. (2001). Zastupljenost detektovanih morfotipova RDAR, BDAR i SAW kod *S. Enteritidis* potvrđuju i istraživanja drugih autora (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Solano et al., 2002; Solomon et al., 2005; Karaca et al., 2013).



Slika 5.3. Morfotip kolonija testiranih izolata na Kongo crvenom agaru nakon 96h inkubiranja pri temperaturi od 37°C

Solano et al. (2002) su analizom morfotipa 204 izolata *S. Enteritidis* različitog porekla, ustanovili da nakon 96h inkubiranja na temperaturi od 28°C, 66% izolata serotipa *Enteritidis* ispoljava RDAR morfotip, 1,5% BDAR morfotip i 27,5% SAW morfotip, dok PDAR morfotip nije ustanovljen ni kod jednog izolata tokom ovog ispitivanja. Ostatak izolata (5%) u okviru pomenutog istraživanja je pokazivao neidentifikovan morfotip. Do sličnih rezultata došli su i Karaca et al. (2013) analizirajući morfotip 99 izolata *S. enterica* od kojih je 16 pripadalo serotipu *Enteritidis*. U okviru pomenutog istraživanja zastupljenost morfotipa RDAR je iznosila 75% (12) izolata, morfotipa BDAR 25% (4) izolata, dok morfotipovi SAW i PDAR nisu detektovani među izolatima koji pripadaju serotipu *Enteritidis*.

U istraživanju Solomon et al. (2005) koje je izvedeno na 71 izolatu *S. enterica* svrstanih u 28 različitih serotipova, iz tri izvora porekla među kojima su bili zastupljeni klinički izolati, izolati poreklom iz mesa i izolati iz različitih proizvoda (voće, povrće, semena) je ustanovljeno da kod svih kliničkih izolata dolazi do produkcije tankih agregativnih fimbrija, od kojih 73% produkuje i celulozu (RDAR 73%, BDAR 27%). Kod izolata poreklom iz različitih vrsta mesa produkcija tankih agregativnih fimbrija je takođe bila na nivou 100% od kojih je 84% izolata proizvelo i celulozu (RDAR 84%, BDAR 16%). Među izolatima poreklom iz različitih proizvoda 80% je pokazalo produkciju tankih agregativnih fimbrija, a samo 52% produkciju celuloze (RDAR 56%, BDAR 24%, SAW 20%). U okviru pomenutog istraživanja među izolatima *S. Enteritidis* (n=5) utvrđena je zastupljenost tri različita morfotipa RDAR (n=3), BDAR (n=1) i SAW (n=1).

Već je pomenuto da izolati koji u okviru matriksa biofilma produkuju obe komponente na Kongo crvenom agaru pokazuju karakterističan morfotip violet-crvenih suvih kolonija R-forme (Bokranz et al., 2005; Römling, 2005). Biofilm fenotip ovakvih izolata na vazduh-voda međufazi se ogleda u pojavi čvrste pelikule (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Römling et al., 2000).

Römling et al., isptujući genetsku pozadinu pojave različitih morfotipova na Kongo crvenom agaru, ustanovili su da blokada, odnosno nefunkcionalnost gena *csgA* i *csgBA* (curli subunit gene) odgovornih za sintezu tankih agregativnih fimbrija rezultira i u promeni na nivou fenotipa kolonije koja se ogleda u prelasku RDAR morfotipa u PDAR morfotip. Ovaj morfotip karakteriše produkcija celuloze, dok je biogeneza fimbrija inhibirana. Ova promena fenotipa je praćena i redukcijom gustine biofilma (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Römling et al., 2000), dok je za biofilm fenotip na vazduh-tečnost međufazi karakteristična formacija prstena adheriranih ćelija bez formacije pelikule (Römling et al., 2000).

Römling et al. su takođe pokazali da i nefunkcionalnost nekog od gena uključenih u sintezu celuloze *adrA* (agfD-dependent regulator-*csgD*) i/ili *bsc* - (bacterial cellulose synthase), takođe uzrokuje izmenu i na nivou morfotipa kolonije, koje su opisane kao suva R-forma kolonije, braon boje (BDAR) za koji je karakteristična biogeneza tankih agregativnih fimbrija, dok je sinteza celuloze inhibirana. Promena fenotipa u ovom slučaju rezultira formiranjem ćelijskih agregata sa oskudnijim prisustvom matriksa biofilma, dok se biofilm fenotip na

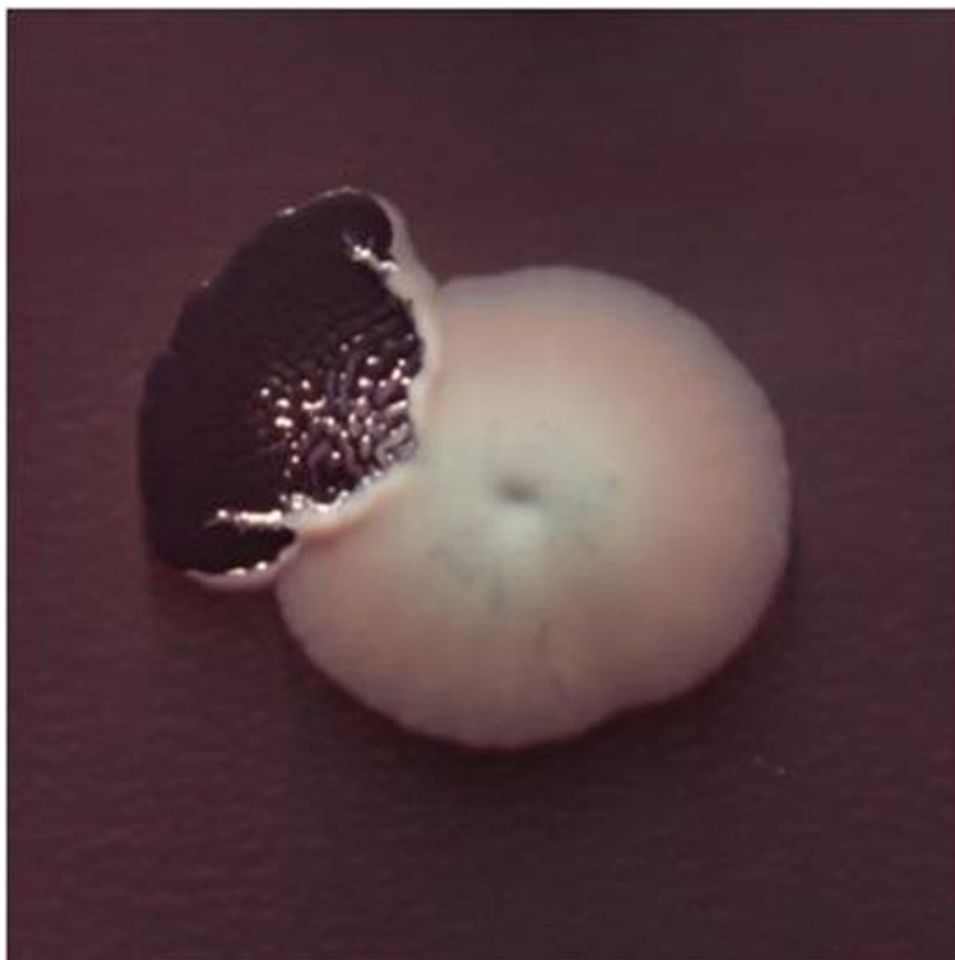
vazduh-voda međufazi ogleđa u formiranju manje čvrste pelikule u odnosu na RDAR morfortip (Römling et al., 2000; Römling, 2005).

U slučaju odsustva ekspresije ili nefunkcionalnosti *csgD*, morfortip kolonija na Kongo crvenom agaru se odlikuje S-formom kolonija bez apsorbirane boje. Kolonije sa ovakvim morfortipom ne proizvode ni jednu od pomenutih komponenti ekstracelularnog matriksa, a u literaturi ovakav tip morfortipa se označava kao SAW (smooth and white) (Römling et al., 1998a; Römling et al., 1998b; Römling et al., 2000).

Već je istaknuto da se sinteza komponenti matriksa biofilma (tankih agregativnih fimbrija i celuloze) nalazi pod kontrolom kompleksnog regulatornog sistema i zavisna je od ekspresije transkripcionog regulatora *csgD* koji reguliše produkciju obe komponente matriksa biofilma (Gerstel i Römling, 2003). Varijabilnost različitih spoljašnjih uticaja kao što su temperatura, pH, osmolalnost, dostupnost hranljivih materija i kiseonika mogu uticati na ekspresiju transkripcionog regulatora *csgD*, a samim tim i na produkciju obe komponente matriksa. Maksimum ekspresije transkripcionog regulatora *csgD*, a samim tim i biogeneza komponenti matriksa biofilma tankih agregativnih fimbrija i celuloze se odvija pri temperaturama ispod 30°C, niskoj osmolalnosti, ograničenoj dostupnosti hranljivih materija i aerobnim uslovima (Gerstel i Römling, 2003).

Koliko je pojava karakterističnog morfortipa, odnosno sinteza komponenti matriksa biofilma temperaturno zavisna može se videti na Slici 5.4. koja je zabeležena tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije, na kojoj je prikazana transformacija S-forme u R-formu kolonije nastala usled promene temperaturnog režima inkubiranja. Transformacija tj. „preobražaj“ S-forme u R-formu kolonije je nastala prekidom inkubiranja na temperaturi od 37°C i produžetkom inkubiranja na temperaturi od 25°C tokom narednih 24h. Ovakav nalaz ide u prilog činjenici da pri temperaturama nižim od 30°C dolazi do aktivacije različitih setova gena koji se nalaze pod kontrolom transkripcionog regulatora *csgD*.

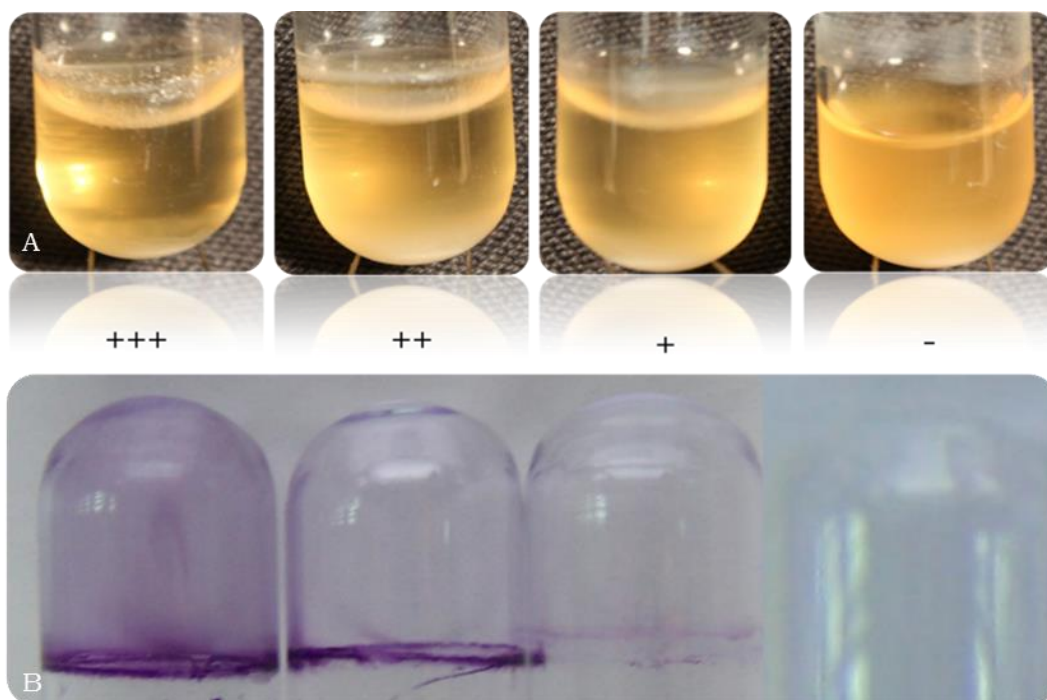
Iako je kod prirodnih izolata *Salmonella* spp. sinteza komponenti matriksa biofilma odnosno, pojava RDAR morfortipa ograničena na niže temperature, istraživanja pokazuju da se biogeneza tankih agregativnih fimbrija može odvijati i pri temperaturi od 37°C, ali u uslovima gladovanja (nedostatak gvožđa). Takođe je utvrđeno da prisustvo pojedinačnih tačkastih mutacija u okviru *csgD* regiona može dovesti do razvoja ovog morfortipa nezavisno od temperature (Römling et al., 1998b).



Slika 5.4. Transformacija S-forme u R-formu kolonije usled izmene temperaturnog režima inkubiranja

5.2.2. Pelikula test

Procena sposobnosti produkcije pelikule za svaki izolat je izvedena nakon 96h inkubiranja na temperaturama od 25°C i 37°C u tečnom medijumu (TSB), prema kategorizaciji prikazanoj na Slici 5.5.

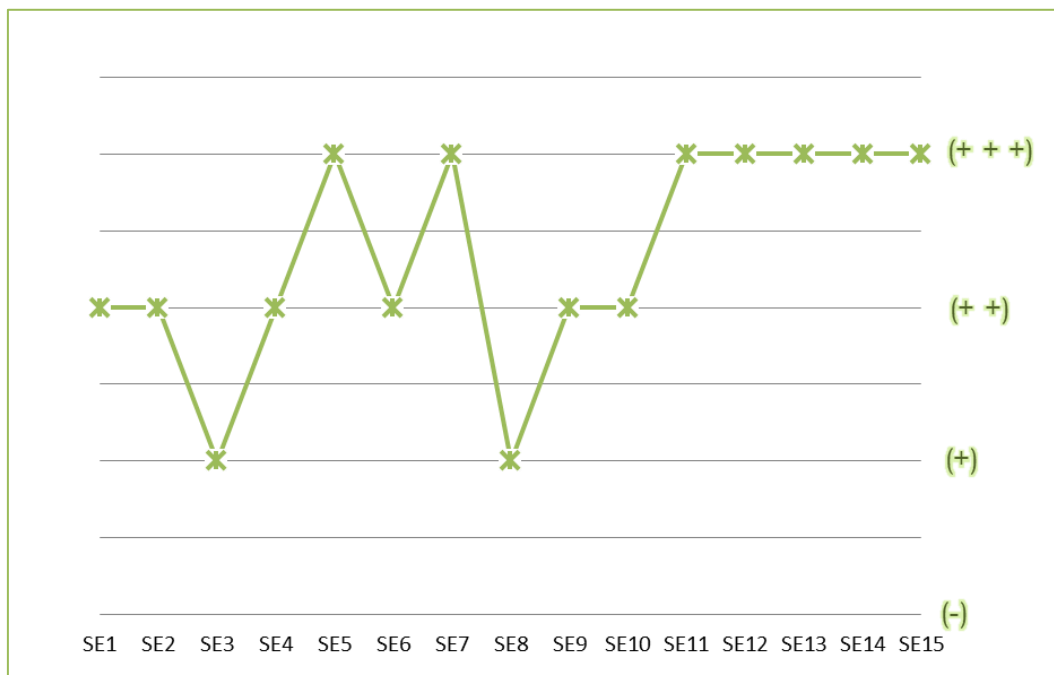


Slika 5.5. Kategorizacija sposobnosti formiranja biofilma testiranih izolata na osnovu produkcije pelikule; Izgled epruveta sa sadržajem (A); Izgled epruveta nakon eliminacije sadržaja i bojenja Kristal violet bojom (B); jak biofilm producer - formirana čvrsta debela pelikula (+++), umeren biofilm producer - formirana tanka pelikula (++), slab biofilm producer - formirana vrlo tanka pelikula (+), odsustvo sposobnosti produkcije biofilma - kompletno odsustvo pelikule (-)

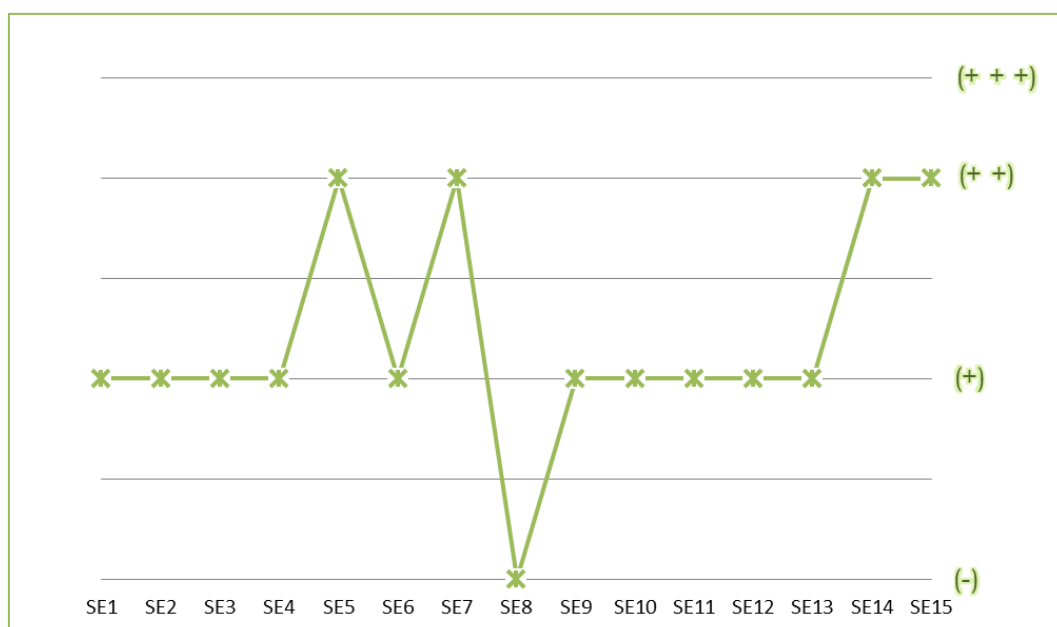
Rezultati sposobnosti formiranja pelikule su prikazani na Slikama 5.6. i 5.7. Na Slici 5.6. se može videti da je pri temperaturi inkubiranja od 25°C produkcija pelikule bila najintenzivnija kod izolata SE5, SE7, SE11 – SE15. Pelikula ovih izolata je postala vidljiva već nakon 24h inkubiranja, a nakon završenog perioda inkubiranja (96h) je zadobila formu vrlo čvrste kožaste strukture sa hrapavom površinom (+++). Izgled ove pelikule prikazan je na Slici 5.8A.

Pelikule izolata SE1, SE2, SE4, SE6, SE9 i SE10 su okarakterisane kao tanke stabilne pelikule (++). Prve formacije pelikule kod ovih izolata su bile vidljive nakon 48h inkubiranja.

Izolate SE3 i SE8 je karakterisalo kasno formiranje pelikule poslednjeg dana eksperimenta u vidu veoma tanke opne sklone dezintegraciji (+).



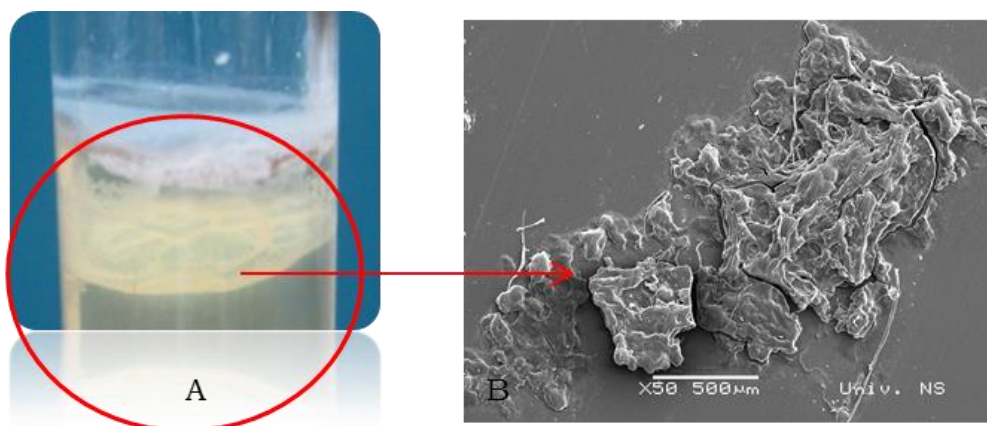
Slika 5.6. Prikaz stepena formiranja pelikule na temperaturi inkubiranja od 25°C; formirana čvrsta debela pelikula (+++), formirana tanka pelikula (++), formirana vrlo tanka pelikula (+), odsustvo pelikule (-)



Slika 5.7. Stepen formiranja pelikule na temperaturi inkubiranja od 37°C; formirana čvrsta debela pelikula (+++), formirana tanka pelikula (++), formirana vrlo tanka pelikula (+), odsustvo pelikule (-)

Na Slici 5.8 se može uočiti da je produkcija pelikula na temperaturi inkubiranja od 37°C bila uglavnom vrlo slaba (+) sa izuzetkom izolata SE 5, SE7, SE14 i SE15 kod kojih je formirana tanka, više mrvičasta pelikula, sklona brzom dezintegraciji (++). Pri ovoj temperaturi inkubiranja jedino kod izolata SE8 nije zapaženo formiranje pelikule.

Pelikule formirane pri temperaturi inkubiranja od 37°C su se karakterisale uglavnom brzom dezintegracijom i odvajanjem od zidova epruvete, pri čemu je na zidu epruvete zapažan vrlo oskudan prsten adheriranih ćelija.



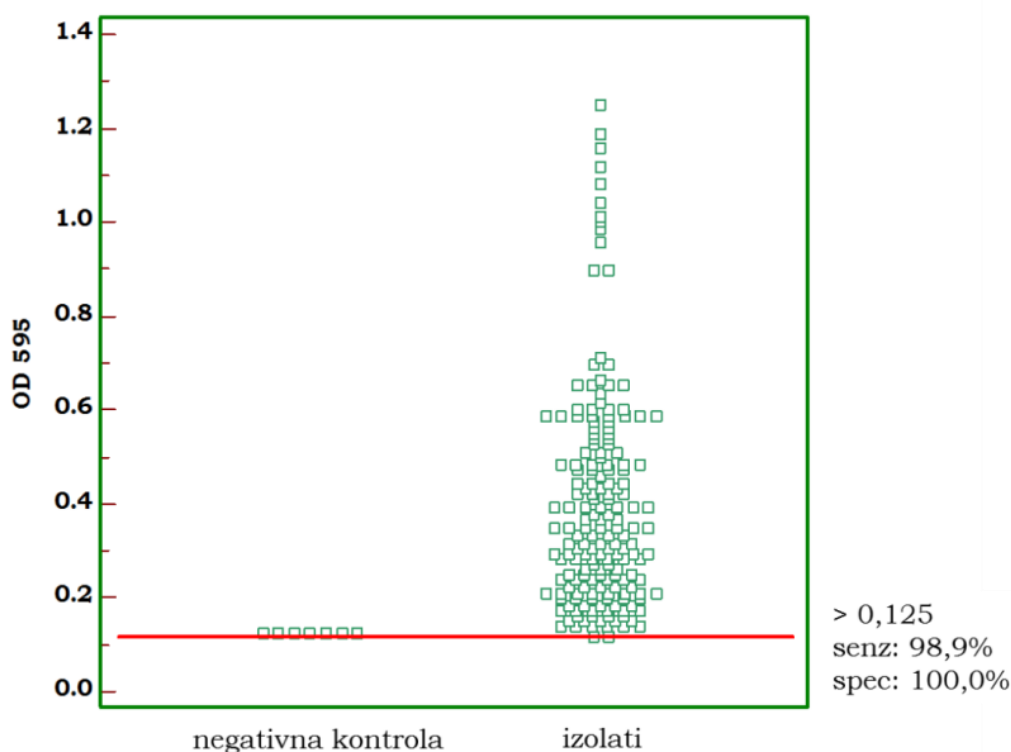
Slika 5.8. Izgled čvrste pelikule RDAR morfotipa. Tečni medijum (A), SEM (B)

Solano et al. (2002) su ispitivanjem sposobnosti formiranja biofilm fenotipa 204 izolata *S. Enteritidis* na međufazi vazduh-tečnost ustanovili da 71% izolata ima sposobnost da formira ovaj tip biofilm fenotip u Luria-Bertani bujonu (LB) nakon 96h inkubiranja na temperaturi od 28°C. Dodatno, Solano et al. (2002) su takođe sproveli i test sposobnosti formiranja biofilm fenotipa na međufazi vazduh-tečnost u medijumu za testiranje adhezije (ATM) koji predstavlja nutritivno siromašniji medijum. Od 204 testirana izolata *S. Enteritidis* nakon 4h inkubiranja na temperaturi od 37°C, 97% izolata je imalo sposobnost formiranja ovog biofilm fenotipa. Za razliku od biofilm fenotipa formiranog u LB medijumu na temperaturi inkubiranja od 28°C, biofilm fenotip u ATM medijumu je vizuelizovan samo u vidu prstena od adheriranih ćelija za zidove epruvete. Imajući u vidu postojanje razlika u makroskopskoj vizuelizaciji biofilm fenotipa kao i činjenicu da su pojedini izolati *S. Enteritidis* imali sposobnost da formiraju biofilm u uslovima ATM medijuma, ali ne i u uslovima LB medijuma, ovi autori predpostavljaju da

je svaki biofilm fenotip formiran pod skupom specifičnih uslova jedinstven za dato okruženje. Nasuprot, Vestby et al. (2009b) su mišljenja da sposobnost formiranja pomenutog biofilm fenotipa na međufazi vazduh-tečnost varira u zavisnosti od serotipa. Pretpostavlja se da pojava ovakvog biofilm fenotipa ima ulogu sprečavanja isparavanja vode stvarajući mikrookolinu sa visokom a_w vrednosti, štiteći na taj način bakterije od isušivanja i drugih uticaja iz spoljašnje sredine.

5.2.3. Kristal violet test

Granična vrednost OD_c (Cut-off) je definisana obradom dobijenih vrednosti apsorbanci za svaki ispitivani izolat i negativnu kontrolu (čist bujon) primenom interaktiv dot dijagrama (MedCalc, StatSoft). Dobijena granična vrednost OD_c (Cut-off) je iznosila 0,125 sa senzitivnošću 98,9% i specifičnošću od 100% (Slika 5.9.).



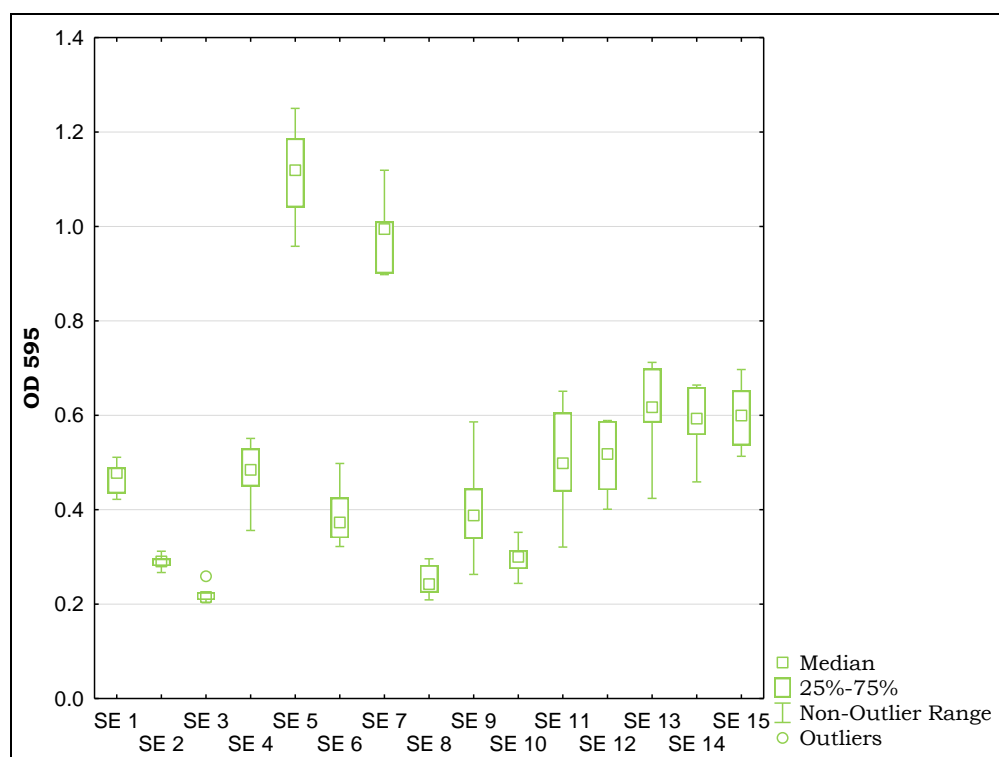
Slika 5.9. Interaktiv dot dijagram, prikaz granične vrednosti apsorbance OD_c (Cut-off), (MedCalc, StatSoft)

Na osnovu dobijene vrednosti OD_c (Cut-off) sposobnost testiranih izolata da formiraju biofilm je svrstavana u jednu od četiri kategorije

prema klasifikaciji prikazanoj u Tabeli 4.2 (Poglavlje 4. Materijal i metode).

5.2.3.1. Kristal violet test (25°C)

Rezultati dobijeni u Kristal violet testu na mikrotitar pločama nakon 48h inkubiranja pri temperaturi od 25°C su prikazani na Slici 5.10. Prikazane vrednosti apsorbanci (OD) predstavljene su kao vrednosti medijana apsorbanci dva ispitivanja izvedena u triplikatu, sprovedena pod istim uslovima tokom različitih dana ispitivanja (odnosno, 6 ponavljanja).



Slika 5.10. Prikaz vrednosti medijana apsorbanci za referentnu kulturu (SE1) i svaki testirani izolat (SE2 – SE15) u testu na mikrotitar pločama na temperaturi inkubiranja od 25°C*

* Na Slikama 5.10., 5.11., 5.12. i 5.13. boksplovi (□) predstavljaju interkvartilni rang (IQR) od prvog (Q1, 25%) do trećeg (Q3, 75%) kvartila. U okviru boksplova medijane su predstavljene sa individualnim obeležjem (◻). Plotovi ispod i iznad boksplova predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti

Nakon 48h inkubiranja na temperaturi od 25°C, od 14 ispitanih izolata sedam izolata (SE5, SE7, SE11 – SE15) je imalo vrednost apsorbance (OD) iznad vrednosti 4 OD_c (OD_c=0,125) i svrstano je u kategoriju jakih biofilm producera. Kod pet izolata (SE2, SE4, SE6, SE9 i SE10) i referentnog soja SE1 (ATCC 13076) vrednosti apsorbanci su se nalazile između vrednosti 2 OD_c i 4 OD_c na osnovu čega su svrstani u kategoriju umerenih biofilm producera, dok su apsorbance izolata SE3 i SE8 imale vrednost ispod vrednosti 2 OD_c na osnovu čega su kategorisani kao slabi biofilm produceri.

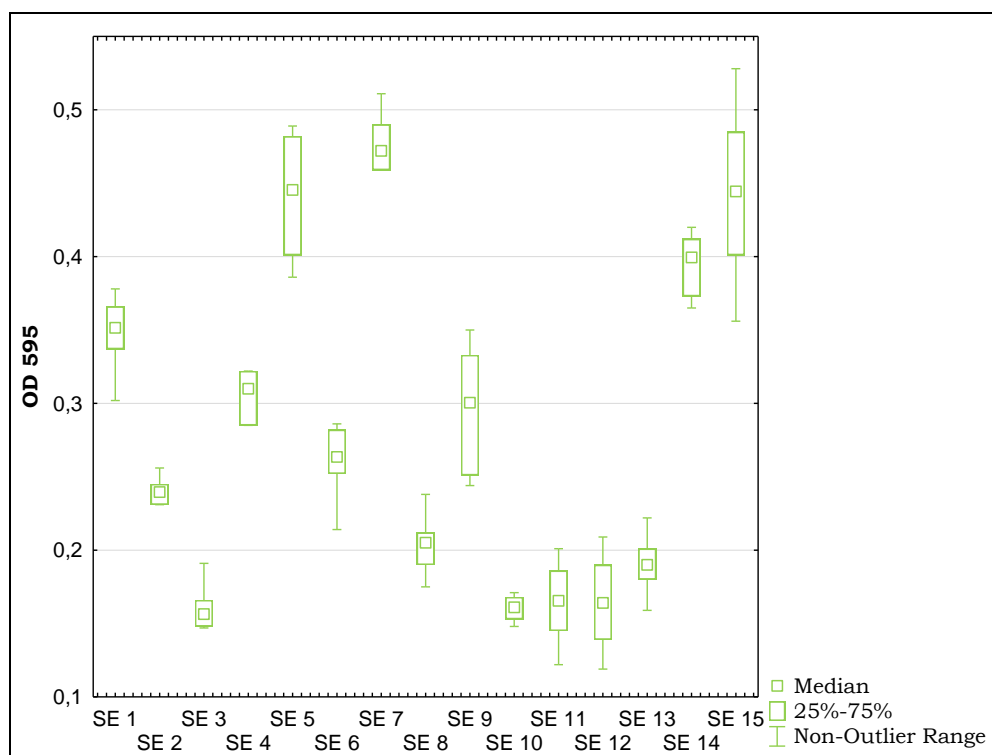
Iz grafičkog prikaza datog na Slici 5.10. može se videti da su se dobijene vrednosti apsorbanci na temperaturi od 25°C kod jakih biofilm producera (SE5, SE7, SE11 - SE15) kretale u rasponu od 0,502 (SE11) do 1,119 (SE5). Takođe se može zapaziti da se u okviru grupe definisane kao jaki biofilm produceri ističu vrednosti apsorbanci izolata SE5 (1,112) i SE7 (0,986) poreklom iz fecesa živine, dok su vrednosti apsorbanci ostalih izolata iz kategorije jakih biofilm producera poreklom iz hrane za životinje (SE11 - SE15) bile niže i kretale su se u rasponu od 0,502 (SE11) do 0,617 (SE13).

Kod umerenih biofilm producera (SE2, SE4, SE6, SE9 i SE10) poreklom iz fecesa živine vrednosti dobijenih apsorbanci su se kretale u rasponu od 0,290 (SE2) do 0,484 (SE4). Referentna kultura (SE1) je takođe na osnovu dobijenih vrednosti apsorbance kategorisana kao umereni biofilm producer. Najniže vrednosti apsorbanci pokazali su izolati poreklom iz organa živine (SE3 i SE8).

5.2.3.2. Kristal violet test (37°C)

Rezultati dobijeni u kristal violet testu na mikrotitar pločama nakon 48h inkubiranja pri temperaturi od 37°C prikazani su na Slici 5.11. Pri ovoj temperaturi inkubiranja nakon 48h, kod sedam izolata (SE4, SE5, SE6, SE7, SE9, SE14 i SE15) i referentnog soja (SE1) vrednosti dobijenih apsorbanci su se nalazile između vrednosti 2 OD_c i 4 OD_c na osnovu čega su svrstani u kategoriju umerenih biofilm producera. Vrednosti apsorbanci izolata kategorisanih kao umereni biofilm produceri su se kretale u rasponu od 0,263 (SE6) do 0,472 (SE7).

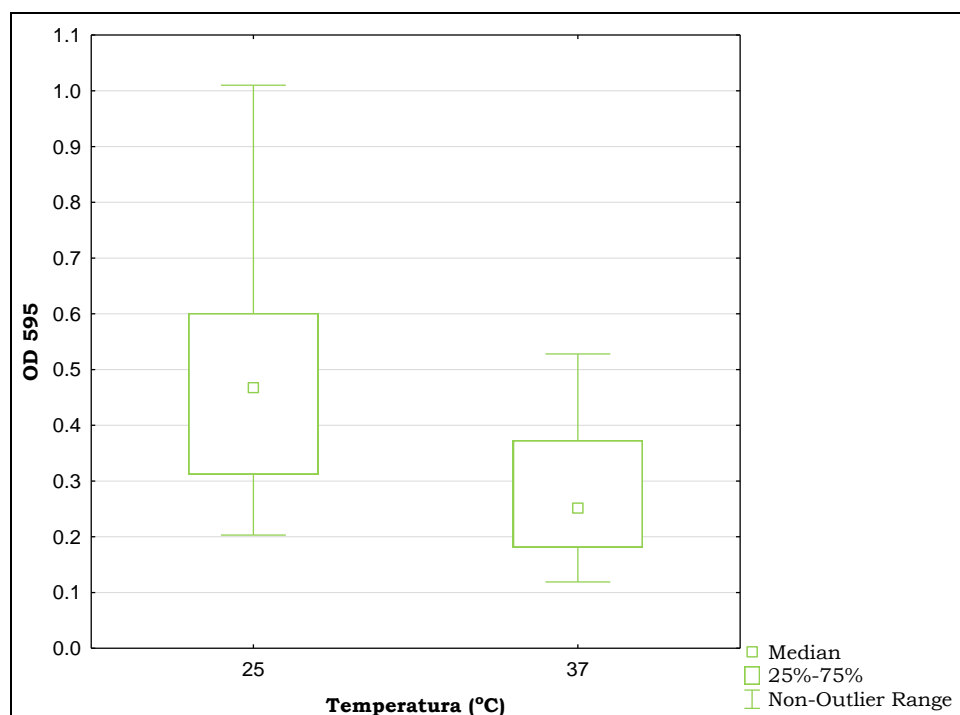
Na grafičkom prikazu datom na Slici 5.11. može se videti da kod preostalih sedam izolata (SE2, SE3, SE8, SE10, SE11, SE12 i SE13) dobijene vrednosti apsorbance se nalaze ispod vrednosti 2 OD_c na osnovu čega su kategorisani kao slabi biofilm produceri. Vrednosti apsorbanci kod ovih izolata su se kretale u rasponu 0,156 (SE3) do 0,239 (SE2).



Slika 5.11. Prikaz vrednosti medijana apsorbanci za referentnu kulturu (SE1) i svaki testirani izolat (SE2 – SE15) u testu na mikrotitar pločama na temperaturi inkubiranja od 37°C

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da se svi ispitivani izolati pri obe temperature inkubiranja odlikuju sposobnošću adherencije na mikrotitar ploče, ali u različitoj meri. Adherentnost različitih sojeva *S. Enteritidis* za mikrotitar ploče pri obe testirane temperature je potvrđena i u drugim istraživanjima (Stepanović et al., 2003; Solomon et al., 2005; Agarwal et al., 2011; Díez-García et al., 2012; Lianou i Koutsoumanis, 2012; Karaca et al., 2013).

Na osnovu dobijenih rezultata u kristal violet testu na mikrotitar pločama utvrđeno je da na sposobnost formiranja biofilma veliki uticaj ima temperatura inkubiranja. Testirani izolati *S. Enteritidis* formiraju statistički značajno veću količinu biofilma ($p < 0,001$) na temperaturi inkubiranja od 25°C u poređenju sa temperaturom inkubiranja od 37°C, što se može videti na Slici 5.12. na kojoj je dat uporedni prikaz zbirnih vrednosti medijana apsorbanci svih ispitivanih izolata na temperaturama inkubiranja 25°C i 37°C.



Slika 5.12. Prikaz zbirnih vrednosti medijana apsorbanci svih ispitanih izolata na temperaturama inkubiranja 25°C i 37°C ($p < 0,001$, Mann-Whitney test)

Dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije su u saglasnosti sa rezultatima Stepanović et al. (2003) koji su ispitivanjem uticaja tri različite temperature inkubiranja (~ 22°C, 30°C i 37 °C) na formiranje biofilma kod 30 izolata *S. enterica* (*S. Enteritidis* n=29 i *S. Typhimurium* n=1) uz primenu TSB konstatovali da se formiranje biofilma odvija pri sve tri temperature, ali da se najveća produkcija biofilma dobija nakon 48h inkubiranja na temperaturi od ~ 22°C.

Karaca et al. (2013) su ispitujući uticaj različitih temperatura inkubiranja (5°C, 20°C i 37°C), koncentracija NaCl (0,5, 1,5, 5,5 i 10,5%), i pH vrednosti LB bujona (4,5, 5,5, 6,5 i 7,4) na sposobnost formiranja biofilma 4 izolata *S. enterica* na mikrotitar pločama ustanovili da do maksimalne produkcije biofilma dolazi nakon 48h inkubiranja na temperaturi od 20°C, koncentraciji NaCl od 0,5% i neutralnoj pH vrednosti.

Do sličnih saznanja došli su i Lianou i Koutsoumanis (2012) koji su ispitivanjem uticaja pH vrednosti, koncentracije NaCl i temperature na sposobnost produkcije biofilma kod 60 izolata *S. enterica* [*S. Typhimurium* (n=18), *S. Enteritidis* (n=10), *S. Newport* (n=9), *S. Heidelberg* (n=8), *S. Montevideo* (n=4), *S. Seftenberg* (n=4), *S. Infantis* (n=3), *S. Agona*

(n=3) i *S. Derby* (n=1)] uz primenu TSB. U ovom istraživanju najveća varijabilnost je zabeležena pri vrednostima pH nižim od 5,5, koncentraciji NaCl višim od 4,5% i temperaturama nižim od 25°C. Vrednosti testiranih parametara pri kojima je dobijena maksimalna produkcija biofilma su se razlikovali za različite sojeve. Najveći broj ispitivanih izolata pokazao je maksimalnu produkciju biofilma pri pH 5,5 (58,3%), koncentraciji NaCl od 0,5% (48,3%) i temperaturi inkubiranja 25°C (53,3%) što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije. U okviru pomenutog istraživanja utvrđeno je postojanje varijabilnosti u sposobnosti produkcije biofilma kako između serotipova tako i između različitih sojeva u okviru jednog serotipa

Na osnovu vrednosti prikazanih apsorbanci pri obe testirane temperature inkubiranja (Slika 5.10. i 5.11.) može se reći da se ispitivani izolati međusobno razlikuju po sposobnosti formiranja biofilma. Sposobnost formiranja biofilma testiranih izolata *S. Enteritidis* u okviru ovog istraživanja diferencirana je u tri različite kategorije (jaki, umereni i slabi biofilm produceri) što može ukazivati da je sposobnost formiranja biofilma soj zavisna osobina. Postojanje varijabilnosti u sposobnosti formiranja biofilma u okviru serotipa *Enteritidis* potvrđeno je i u istraživanju Stepanović et al. (2003). U okviru pomenutog istraživanja od 30 testiranih izolata od kojih je 29 pripadalo serotipu *Enteritidis*, nakon 48h inkubiranja pri svim temperaturama (~ 22°C, 30°C i 37°C) ispitivani izolati su kategorisani kao jaki, umereni i slabi biofilm produceri i oni koji ne produkuju biofilm.

U odnosu na poreklo izolata najmanju produkciju biofilma su imali izolati poreklom iz organa živine koji su pri obe temperature inkubiranja okarakterisani kao slabi biofilm produceri.

Izolati poreklom iz fecesa pri obe testirane temperature su pokazali različitu sposobnost produkcije biofilma. Pri obe testirane temperature izolati iz ove grupe su kategorisani kao slabi, umereni i jaki biofilm produceri.

Izolati poreklom iz hrane za životinje su se na temperaturi inkubiranja od 25°C odlikovali jakom biofilm produkcijom, dok je njihova sposobnost formiranja biofilma na temperaturi inkubiranja od 37°C okarakterisana kao slaba i umerena. Kada je u pitanju uticaj porekla testiranih izolata ne može se izvesti egzaktna korelacija između porekla izolata i sposobnosti formiranja biofilma obzirom da je testiranje izvedeno na malom broju izolata za izvođenje ovakvih zaključaka.

U istraživanju Lianou i Koutsoumanis (2012) takođe nije ustanovljena zavisnost između sposobnosti produkcije biofilma i

određenog serotipa, kao ni između produkcije biofilma i porekla izolata. Do sličnih konstatacija došli su i Solomon et al. (2005) koji ispitivanjem 71 izolata vrste *S. enterica* svrstanih u 28 različitih serotipova, iz tri izvora porekla među kojima su bili zastupljeni klinički izolati, izolati poreklom iz mesa i izolati različitih proizvoda (voće, povrće, semena) nisu ustanovili korelaciju između sposobnosti produkcije biofilma i porekla izolata. Agarwal et al. (2011) analizom sposobnosti produkcije biofilma 151 izolata *S. enterica* izdvojenih u 69 različitih serotipova takođe nisu ustanovili postojanje korelacije između sposobnosti produkcije biofilma i određenog serotipa, kao ni između produkcije biofilma i porekla izolata.

Nasuprot tome, u istraživanjima sprovedenim od strane Vestby et al. (2009b) i Díez-García et al. (2012) je ukazano na postojanje korelacije između sposobnosti produkcije biofilma i određenog serotipa.

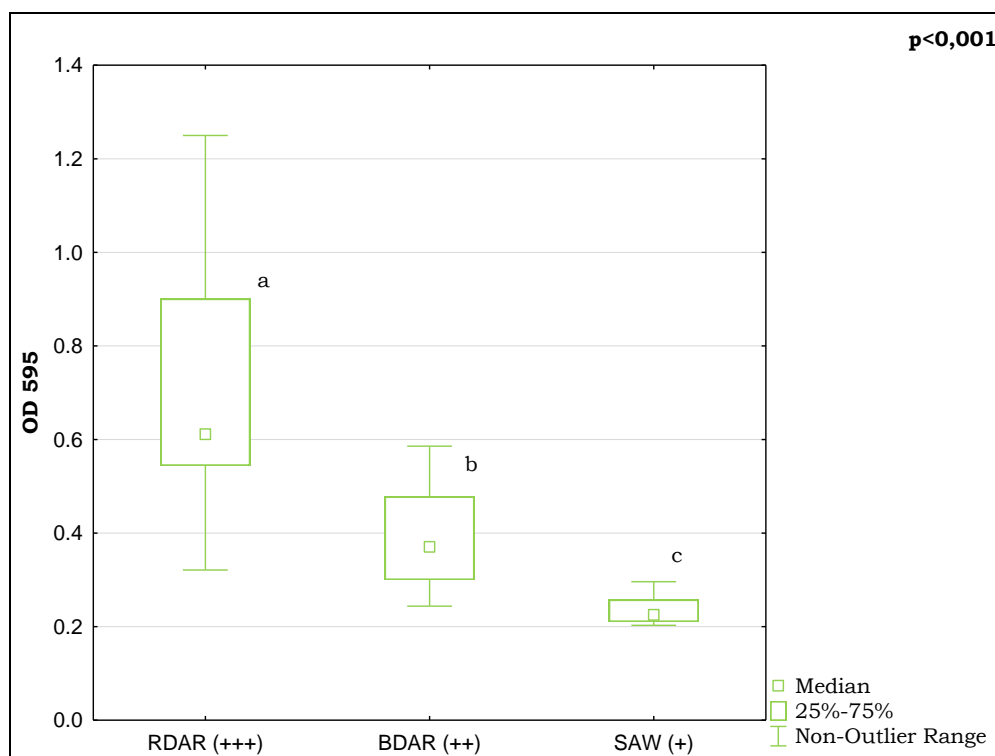
U Tabeli 5.3. je prikazan uporedni pregled rezultata primenjenih testova ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma.

Tabela 5.3. Uporedni pregled rezultata testova ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma

Oznaka izolata	Kristal violet test (25°C)	Morfotip (25°C)	Pelikula test (25°C)	Kristal violet test (37°C)	Morfotip (37°C)	Pelikula test (37°C)
*SE 1.	umeren	BDAR	++	umeren	SAW	+
SE 2.	umeren	BDAR	++	slab	SAW	+
SE 3.	slab	SAW	+	slab	SAW	+
SE 4.	umeren	BDAR	++	umeren	SAW	+
SE 5.	jak	RDAR	+++	umeren	SAW	++
SE 6.	umeren	BDAR	++	umeren	SAW	+
SE 7.	jak	RDAR	+++	umeren	SAW	++
SE 8.	slab	SAW	+	slab	SAW	-
SE 9.	umeren	BDAR	++	umeren	SAW	+
SE 10.	umeren	BDAR	++	slab	SAW	+
SE 11.	jak	RDAR	+++	slab	SAW	+
SE 12.	jak	RDAR	+++	slab	SAW	+
SE 13.	jak	RDAR	+++	slab	SAW	+
SE 14.	jak	RDAR	+++	umeren	SAW	++
SE 15.	jak	RDAR	+++	umeren	SAW	++

**Salmonella* Enteritidis ATCC 13076

Na grafičkom prikazu datom na Slici 5.13. može se videti postojanje korelacije između primenjenih testova sprovedenih pri temperaturi inkubiranja od 25°C.



Slika 5.13. Korelacija između morfološkog tipa kolonija, pelikula testa i apsorbanca ab, ac - ($p < 0,001$); bc - ($p < 0,01$) (Kruskal-Wallis test, post hoc test višestrukih komparacija)

Izolati koji su na Kongo crvenom agaru razvili određeni morfološki tip u pelikula testu su okarakterisani istim stepenom formiranja pelikule: RDAR morfološki tip sa (+++), BDAR morfološki tip sa (++) i SAW morfološki tip sa (+). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja (Solano et al., 2002) koji su ispitivanjem sposobnosti formiranja biofilm fenotipa 204 izolata *S. Enteritidis* na međufazi vazduh-tečnost ustanovili da 71% izolata formira ovaj biofilm fenotip nakon 96h inkubiranja na temperaturi od 28°C u Luria-Bertani bujonu (LB). Od 71% izolata koji su formirali biofilm fenotip u vidu pelikule većina je ispoljila RDAR morfološki tip (93%). Kod tri izolata u zoni vazduh-tečnost međufaze formirana je tanka nestabilna pelikula, sklona raspadanju, a ovaj tip pelikule je bio u vezi sa BDAR morfološkim tipom. Kod 27,5% izolata nije ustanovljeno formiranje pelikule, ovi izolati su na Kongo crvenom agaru formirali SAW morfološki tip.

Osim toga, upoređivanjem vrednosti apsorbanca dobijenih kristal violet testom između grupa izolata koji reprezentuju jedan od tri detektovana morfološka tipa (RDAR, BDAR i SAW) ustanovljeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima apsorbanca između ispitivanih grupa (Slika 5.13.).

Korelacija između određenog morfotipa i sposobnosti formiranja biofilma na mikrotitar pločama je potvrđena u istraživanjima Malcova et al. (2008) nakon 96h na temperaturi inkubiranja od 28°C. Nasuprot pomenutom istraživanju, Solomon et al. (2005) nisu ustanovili značajnu razliku između apsorbanci dobijenih u kristal violet testu uz primenu TSB, na temperaturi inkubiranja od 30°C, između izolata koji reprezentuju tri morfotipa RDAR, BDAR i SAW, dok su značajne razlike zabeležene prilikom njihovog rasta u nutritivno oslabljenom medijumu (TSB_{1/20}) pri čemu su razlike u apsorbancama bile statistički značajne između grupa koje predstavljaju RDAR i BDAR morfotip i grupe izolata koje predstavljaju SAW morfotip, dok između apsorbanci između izolata koji su okarakterisani kao RDAR i BDAR razlika nije bila statistički značajna. Neusaglašenost pomenutih rezultata sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije može biti uslovljena kratkim periodom (24h) i temperaturom inkubiranja od 30°C koja se u slučaju formiranja biofilma može smatrati kritičnom jer se sinteza glavnih komponenti matriksa biofilma odvija na temperaturama nižim od 30°C.

Kao i u slučaju morfotipa i u slučaju formiranja pelikule ustanovljena je povezanost između određenog stepena formiranja pelikule (+++, ++, +) i vrednosti apsorbanci dobijenih u CV testu na mikrotitar pločama. Upoređivanjem apsorbanci izolata kojima je pripisan jedan od tri definisana stepena formiranja pelikule (+++, ++ i +) ustanovljeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima apsorbanci između svih ispitivanih grupa.

Izolati kod kojih je detektovana sposobnost formiranja čvrste i debele pelikule (+++) su se odlikovali višim vrednostima apsorbanci u kristal violet testu u odnosu na izolate kod kojih je detektovana tanka mrvičasta (++) i vrlo tanka pelikula (+). Do ovakvih saznanja su takođe došli i Vestby et al. (2009b). U istraživanju Solano et al. (2002) je ustanovljena vrlo visoka korelacija između produkcije pelikule i sposobnosti formiranja biofilma na polivinil hloridu, nasuprot u istraživanju Karaca et al. (2013) je ustanovljena negativna korelacija između pomenutih osobina.

U slučaju testova sprovedenih na temperaturi inkubiranja od 37°C nije ustanovljena značajna povezanost, s obzirom da je pri temperaturi inkubiranja od 37°C na Kongo crvenom agaru detektovan samo jedan morfotip (SAW) koji karakteriše odsustvo sinteze matriksa biofilma, dok je u testovima izvedenim u tečnim medijumima pokazan stepen adhezije od slabe do umerene produkcije biofilma. Ovakav nalaz pri temperaturi inkubiranja od 37°C se može objasniti činjenicom da je oko 30% genoma

Salmonella spp. različito regulisano u agar i bujon sistemu (Steenackers et al., 2012). Pojava SAW morfotipa pri ovoj temperaturi inkubiranja je najverovatnije posledica deaktivacije csgD transkripcionog regulatora, dok se izvestan stepen adhezije dobijen primenom testova u tečnim medijumima može pripisati aktivaciji različitih setova gena koji omogućavaju sintezu fimbrija tip 1 čija sinteza je uslovljena temperaturom od 37°C. Osim toga, moguće je i da su većem stepenu adhezije u tečnim medijumima doprineli i kapsularni polisaharidi čija se sinteza odvija nezavisno od temperature.

Uporednom analizom rezultata primenjenih skrining testova za utvrđivanje sposobnosti produkcije biofilma (CV test, pelikula test i Kongo red test) pri temperaturi inkubiranja od 25°C ustanovljena je povezanost između pojave određenog morfotipa na Kongo crvenom agaru i sposobnosti produkcije biofilma u testovima u tečnim medijumima. RDAR morfotip se dovodi u vezu sa jakom biofilm produkcijom u kristal violet testu i pojavom čvrste debele pelikule (+++). BDAR morfotip se dovodi u vezu sa umerenom produkcijom biofilma u kristal violet testu i formiranjem tanke pelikule (++) , dok je za SAW morfotip u oba testa pokazana slaba biofilm produkcija.

U testovima sprovedenim na temperaturi inkubiranja od 37°C nije ustanovljena povezanost između pojave određenog morfotipa na Kongo crvenom agaru i sposobnosti produkcije biofilma u testovima sprovedenim na tečnim medijumima sa izuzetkom izolata SE8 (Tabela 5.3).

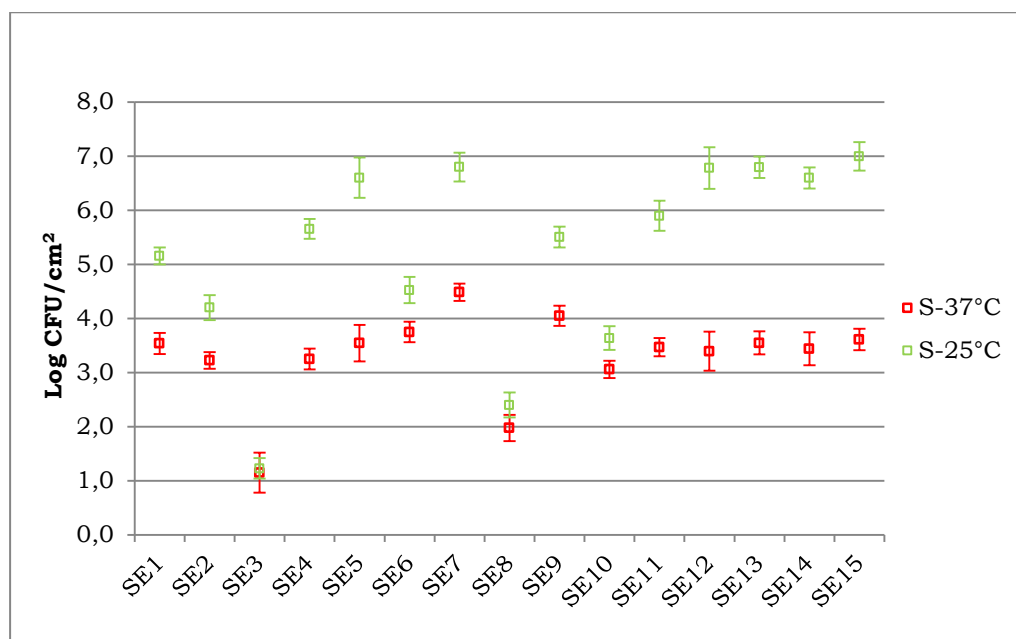
Ukoliko dobijene rezultate primenjenih skrining testova interpretiramo u kontekstu produkcije biofilma kod ispitivanih izolata *S. Enteritidis* na ovu osobinu pozitivan uticaj je imala niža temperatura inkubiranja. Ovakav nalaz se može objasniti činjenicom da je formiranje biofilma jedan od vidova opstanka razvijen od strane bakterija u cilju egzistencije u nepovoljnim uslovima sredine.

Činjenica da je formiranje biofilma bilo intenzivnije na temperaturi inkubiranja od 25°C (ambijentalnoj temperaturi) koja obično preovladava u objektima za proizvodnju i pripremu hrane, ukazuje na značajnost biofilma kao biološke opasnosti posebno u industrijskim pogonima i predstavlja ozbiljnu pretnju na polju bezbednosti hrane.

5.3. Sposobnost adherencije

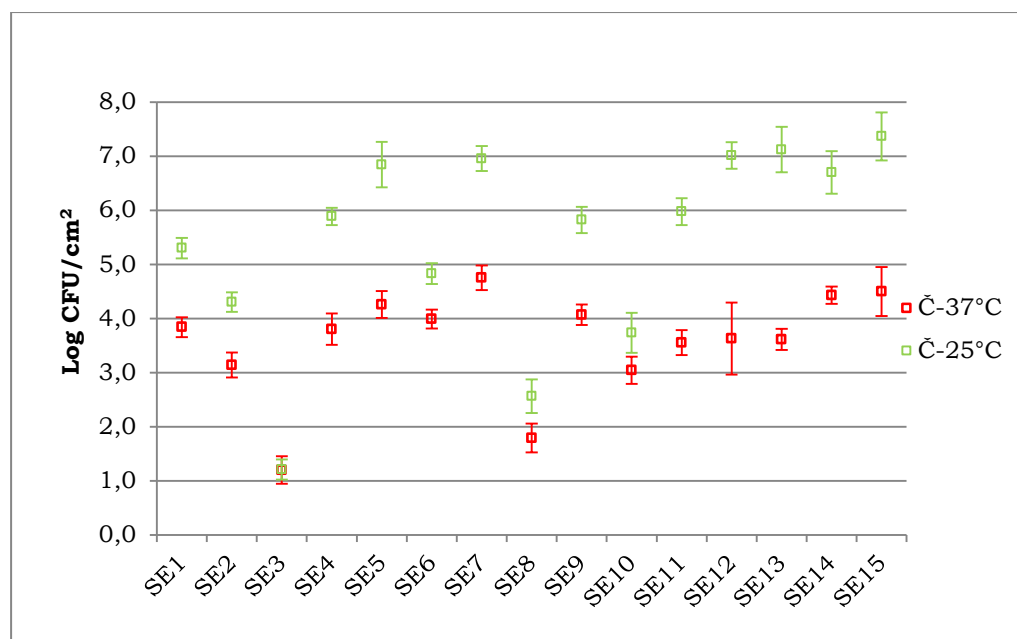
Rezultati sposobnosti adherencije na površine od stakla i nerđajućeg čelika testiranih izolata i referentnog soja su prikazani na Slikama 5.14. i 5.15. Nakon 48h inkubiranja testirani izolati su pokazali različit stepen adherencije na obe testirane površine. Najslabiju adherenciju na površine od stakla i nerđajućeg čelika pokazali su izolati SE3 i SE8. Prosečna adherentnost izolata SE3 je iznosila 1,22 log CFU/cm² na temperaturi inkubiranja od 25°C, odnosno 1,18 log CFU/cm² na temperaturi inkubiranja 37°C. Izolat SE8 je pokazao nešto veći stepen adherencije u poređenju sa izolatom SE3, 2,48 log CFU/cm² na temperaturi inkubiranja od 25°C, odnosno 1,88 log CFU/cm² na temperaturi inkubiranja 37°C.

Stepen adherencije preostalih testiranih izolata na površinu stakla se kretao u rasponu od 3,64 log CFU/cm² (SE10) do 7,0 log CFU/cm² (SE15) na temperaturi inkubiranja od 25°C, odnosno od 3,06 log CFU/cm² (SE10) do 4,48 log CFU/cm² (SE7) na temperaturi inkubiranja od 37°C (Slika 5.14.).



Slika 5.14. Stepen adherencije referentne kulture (SE1) i ispitivanih izolata (SE2-SE15) na staklo nakon 48h inkubiranja na temperaturama od 25 i 37°C (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)

Stepen adherencije testiranih izolata na površinu nerđajućeg čelika se kretao u rasponu od 3,74 log CFU/cm² (SE10) do 7,36 log CFU/cm² (SE15) na temperaturi inkubiranja od 25°C, odnosno od 3,04 log CFU/cm² (SE10) do 4,75 log CFU/cm² (SE7) na temperaturi inkubiranja od 37°C (Slika 5.14.).



Slika 5.15. Stepen adherencije referentne kulture (SE1) i ispitivanih izolata (SE2-SE15) na nerđajući čelik nakon 48h inkubiranja na temperaturama od 25 i 37°C (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)

Iz prikazanih rezultata adherentne sposobnosti izolata može se videti da je na ovu sposobnost povoljniji uticaj imala temperatura inkubiranja od 25°C ($p < 0,05$), sa izuzetkom izolata SE3 ($p > 0,05$). Za razliku od uticaja temperature inkubiranja, između stepena adherencije izolata na površine od stakla i nerđajućeg čelika ustanovljena je neznatno veća adherentnost na nerđajući čelik, ali nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Kao i u slučaju ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma na mikrotitar pločama i u slučaju ispitivanja adherencije na površine od stakla i čelika takođe je ustanovljena varijabilnost u stepenu adherencije testiranih izolata. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja Oliveira et al. (2007) u okviru koga je ispitivanjem adherentnosti 4 izolata serotipa Enteritidis za površinu čelika takođe ustanovljen različit stepen adherencije. Do sličnih konstatacija došli su i Castelijm et al. (2013) ispitivanjem adherentne

sposobnosti različitih izolata 4 serotipa vrste *S. enterica* (Typhimurium, Derby, Brandenburg i Infantis) na površine od nerđajućeg čelika i polistirena.

Upoređivanjem određenog morfotipa dobijenog na Kongo crvenom agaru sa stepenom adherencije na staklo i nerđajući čelik pri temperaturi inkubiranja od 25°C može se uočiti znatno viši stepen adherencije izolata koji su ispoljili RDAR (SE5, SE7, SE11-SE15) i BDAR (SE1, SE2, SE4, SE6, SE9, SE10) morfotip u odnosu na izolate koji su ispoljili SAW morfotip (SE3 i SE8).

Izolati RDAR morfotipa su se odlikovali visokim stepenom adherencije za obe testirane površine sa više od 6 log CFU/cm² sa izuzetkom izolata SE11 kod kojeg je ustanovljen neznatno niži broj adheriranih ćelija (5,90 log CFU/cm² na staklu i 5,97 log CFU/cm² na nerđajućem čeliku). Kod izolata okarakterisanih kao BDAR morfotip stepen adherencije se kretao u rasponu od 3,64 (SE10) do 5,56 (SE4) log CFU/cm² na površinama stakla i od 3,74 (SE10) do 5,89 (SE4) log CFU/cm² na površinama nerđajućeg čelika. Za razliku od stepena adherencije RDAR i BDAR morfotipa, izolate SAW morfotipa kojima nije svojstvena produkcija matriksa biofilma karakterisao je nizak stepen adherentnosti na obe površine.

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da na adherentnu sposobnost bakterija za površine pored temperature veliki uticaj ima i sposobnost sinteze matriksa biofilma. Pored toga, različita sposobnost izolata da sintetišu matriks biofilma može biti eventualni uzrok različitog stepena adherencije za površine.

Redukcija adherentne sposobnosti na temperaturi 37°C se može objasniti inhibicijom regulatornih mehanizama odgovornih za sintezu matriksa, dok je postignuta adherencija najverovatnije posledica prisustva različitih tipova fimbrija čija je sinteza uslovljena ovom temperaturom.

U okviru velikog broja istraživanja pokazana je sposobnost adherencije i formiranja biofilma *Salmonella* spp. na različitim abiotičkim površinama kao što su nerđajući čelik, staklo, polistiren, polietilen, polipropilen i granit (Giaouris et al., 2005; Giaouris i Nychas, 2006; Oliveira et al., 2006; Kim i Wei, 2007; Kim i Wei, 2009; Møretro et al., 2009; Mafu et al., 2011; Castelijn et al., 2013).

Međutim u većini ovih istraživanja adherentnost je povezivana sa fizičko hemijskim osobinama površina, bakterija i odabranim uslovima sredine izuzev studije Castelijn et al. (2013) u okviru koje je stepen adherentnosti povezivan sa sposobnošću produkcije matriksa biofilma.

Oliveira et al. (2006), ispitivanjem odnosa između fizičko hemijskih osobina bakterijskih ćelija i površina (granita, polipropilena i polietilena) i adherentnosti 4 izolata serotipa Enteritidis na površine, takođe nisu ustanovili postojanje korelacije. Chia et al. (2009), su ispitivanjem adherentnosti različitih izolata 4 serotipa (Sofia, Typhimurium, Infantis, Virchow) za čelik, staklo, teflon, gumu i poliuretan konstatovali da hidrofobnost i hrapavost površina nema uticaja na adherenciju. Nasuprot ovim istraživanjima, Sinde i Carballo (2000), upoređujući adherentnost između različitih izolata *Salmonella* spp. na nerđajući čelik, gumu i politetrafluoroetilen, utvrdili su znatno veću adherentnost ispitivanih izolata za hidrofobnije materijale. Do sličnih konstatacija došli su Joseph et al. (2001), ispitujući adherentnost izolata serotipa Weltevreden na površine od čelika, betona i plastike.

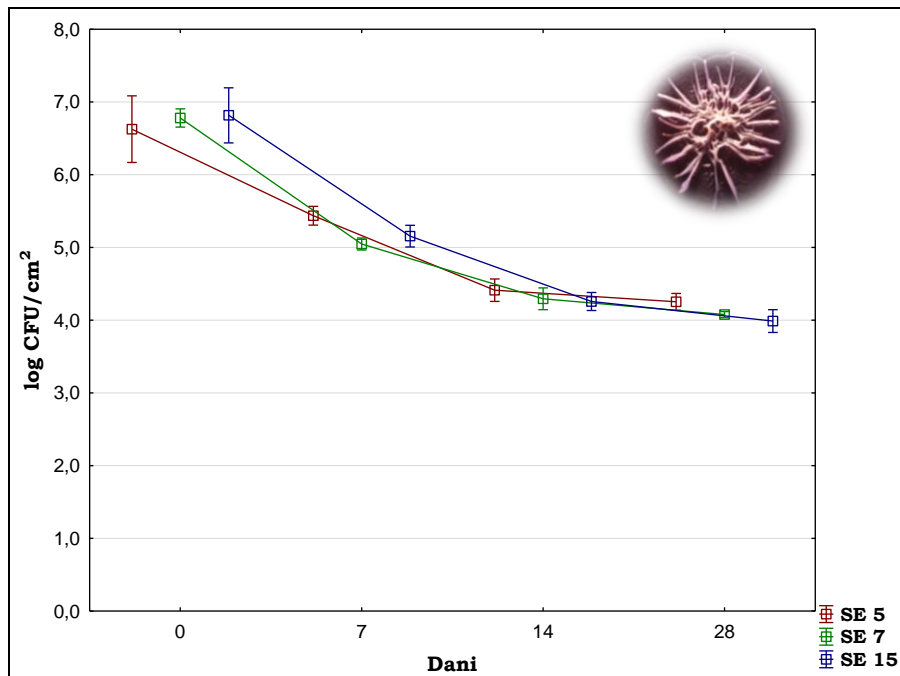
Kontradiktornost pojedinih nalaza dobijenih u okviru pomenutih istraživanja je najverovatnije posledica primene različitih izolata, kao i metodologije.

Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka može se reći da je adherentnost bakterija za abiotičke površine multifaktorijalan proces koji je, osim fizičko-hemijskim osobinama površine i temperaturom, uslovljen i drugim faktorima koji se odnose na fizičko-hemijske osobine površine bakterijskih ćelija, sposobnost izolata da produkuju ekstracelularni matriks, pH vrednost sredine, raspoloživost nutrijenata, koncentraciju elektrolita i hidrodinamičke uslove okruženja.

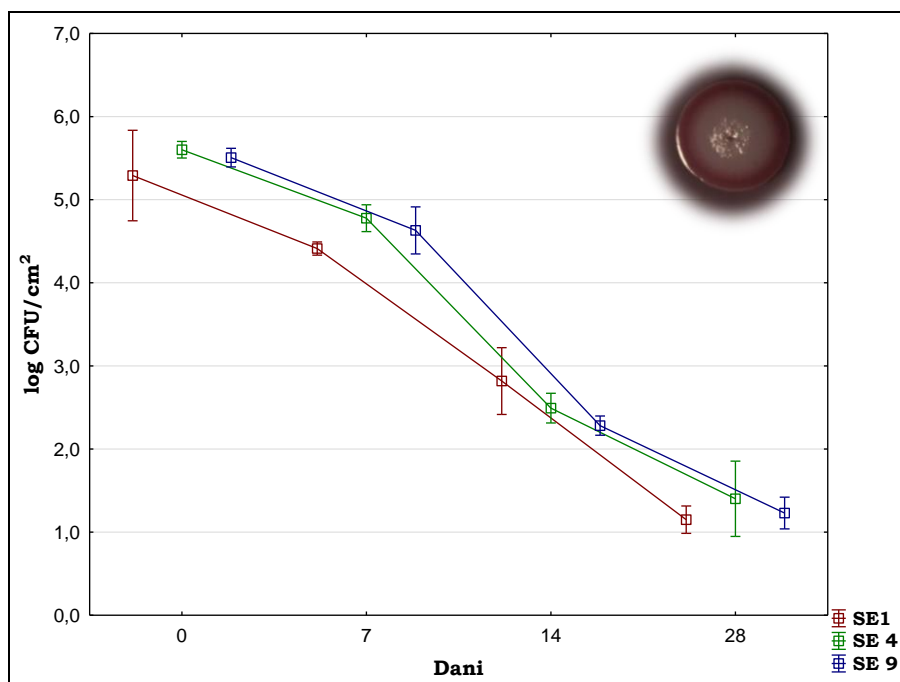
5.4. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja

Rezultati sposobnosti preživljavanja u uslovima isušivanja prikazani su na Slici 5.16. i 5.17. Tokom perioda isušivanja inicijalna redukcija broja vijabilnih ćelija (7. dan) u okviru biofilma izolata BDAR morfotipa je bila niža u odnosu na inicijalnu redukciju u okviru biofilma izolata RDAR morfotipa. Međutim, tokom ostatka perioda ispitivanja od 14 do 28 dana broj vijabilnih ćelija biofilma izolata BDAR morfotipa opada srazmerno vremenu isušivanja, dok u slučaju biofilma izolata RDAR morfotipa ovaj period je praćen uglavnom stagnacijom broja vijabilnih ćelija.

Nakon 28 dana u uslovima isušivanja procenat vijabilnih ćelija u okviru biofilma izolata SE5, SE7 i SE15 je iznosio 64,2%, 60,1% i 58,5% respektivno, dok je u slučaju izolata SE1, SE4 i SE9 koji pripadaju BDAR morfotipu zabeležen značajno niži procenat vijabilnih ćelija, 21,7%, 25,0%, i 22,3% respektivno ($p < 0,05$).



Slika 5.16. Preživljavanje izolata SE5, SE7 i SE15 (RDAR) u uslovima isušivanja (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)

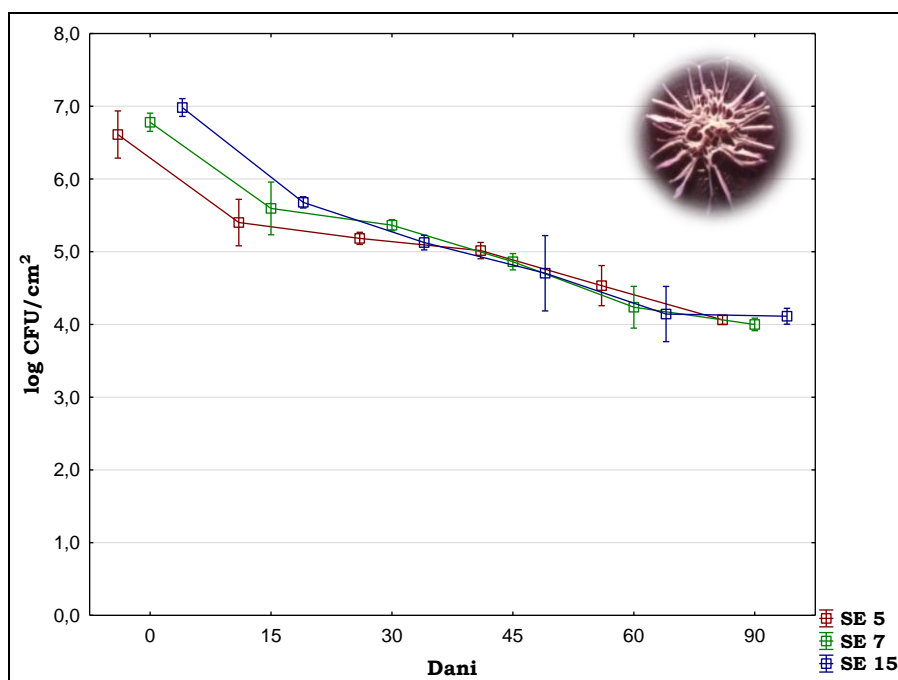


Slika 5.17. Preživljavanje izolata SE1, SE4 i SE9 (BDAR) u uslovima isušivanja (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)

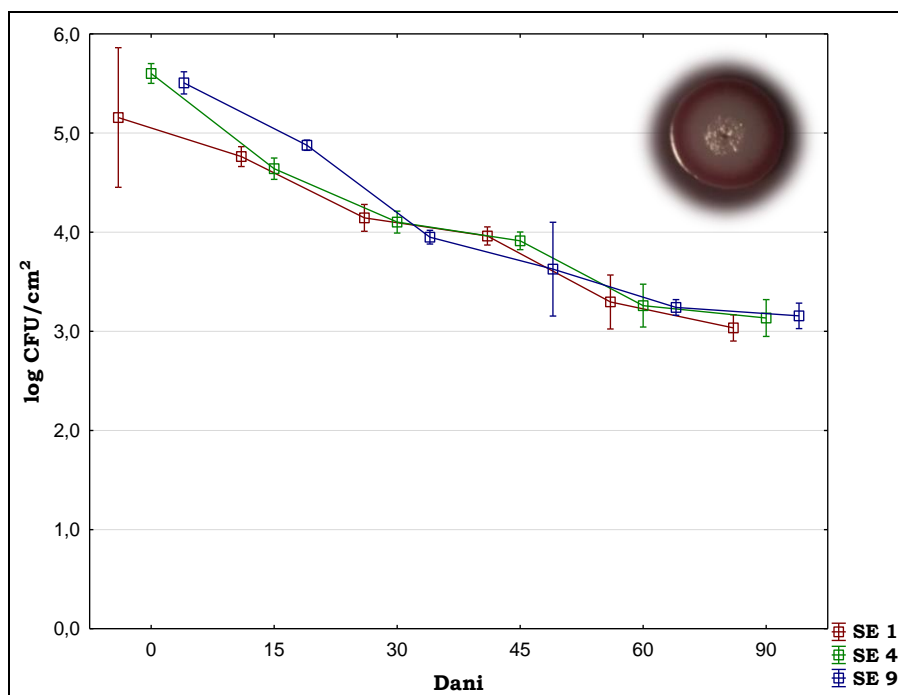
Praćenjem stope preživljavanja tokom 90 dana u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija zabeležena je veća stopa preživljavanja ćelija u okviru biofilma svih ispitivanih izolata (Slika 5.18. i 5.19.) u odnosu na stopu preživljavanja istih izolata u uslovima isušivanja.

Tridesetog dana procenat vijabilnih ćelija u okviru biofilma izolata SE1, SE4 i SE9 (BDAR) je iznosio 75,5%, 73,2% i 71,7% respektivno, dok je u slučaju izolata SE5, SE7 i SE15 (RDAR) procenat vijabilnih ćelija iznosio 78,4%, 79,1%, i 73,4% respektivno, što je značajno veći procenat u poređenju sa procentom vijabilnih ćelija detektovanih nakon približno istog vremena (28. dan) u uslovima isušivanja ($p < 0,05$).

U uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija i nakon devedesetog dana ispitivanja u obe ispitivane grupe izolata procenat vijabilnih ćelija je iznosio više od 50%. Procenat vijabilnih ćelija u okviru biofilma izolata SE5, SE7 i SE15 je iznosio 61,5%, 59,0%, i 58,9% respektivno, dok je u slučaju izolata SE1, SE4 i SE9 ovaj procenat bio neznatno niži i iznosio je 55,3%, 56,0%, i 57,3% respektivno (Slika 5.18. i 5.19.).



Slika 5.18. Preživljavanje izolata SE5, SE7 i SE15 (RDAR) u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)



Slika 5.19. Preživljavanje izolata SE1, SE4 i SE9 (BDAR) u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija (vrednosti predstavljaju $\bar{x} \pm SD$ tri merenja)

Očigledna prednost izolata koji pripadaju RDAR morfortipu u uslovima isušivanja sa jedne strane može biti posledica prisustva kompleksnijeg matriksa biofilma (celuloza i tafi) u odnosu na matriks biofilma izolata BDAR morfortipa (tafi), a sa druge strane efikasnijeg genetski determinisanog adaptivnog odgovora ćelija na primenjene stres faktore (isušivanje, odnosno gladovanje).

Do sličnih konstatacija su došli Vestby et al. (2009a) koji su ispitivanjem efekata isušivanja u trajanju od 4 meseca na vijabilnost ćelija u okviru biofilma formiranih od strane izolata *S. Agona* RDAR (71-3) i BDAR (1454-1) morfortipa ustanovili značajno veću stopu preživljavanja ćelija u okviru biofilma RDAR morfortipa u poređenju sa BDAR morfortipom. U okviru pomenutog istraživanja nakon 4 meseca broj ćelija u okviru biofilma RDAR morfortipa se redukovao za 2,3 Log₁₀ u odnosu na inicijalni broj 10,6 Log₁₀, dok se broj ćelija u okviru biofilma BDAR morfortipa redukovao za 7,2 Log₁₀ od inicijalnog broja 9,3 Log₁₀, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u okviru ovog istraživanja.

Bez obzira na statistički značajne razlike uočene između sposobnosti preživljavanja ćelija u okviru biofilma ispitivanih morfortipova u uslovima isušivanja, broj vijabilnih ćelija BDAR morfortipa, iako je

znatno redukovan, neosporno je značajan sa aspekta bezbednosti hrane s obzirom da je dokumentovano nekoliko epidemija salmoneloze čiji su izvor bili proizvodi sa niskom a_w vrednosti i vrlo niskim nivoima kontaminacije (Gill et al., 1983).

Osim toga, može se postaviti pitanje kako u slučaju pomenutih epidemija, tako i slučaju izvedenog eksperimenta u okviru ove disertacije da li je nizak nivo kontaminacije, odnosno redukovana vijabilnost ćelija, posledica stvarne ćelijske smrti nastale kao posledica dejstva isušivanja ili prelaska u VBNC stadijum? Sposobnost alimentarnih patogena da se indukuju u VBNC stadijum može predstavljati ozbiljnu pretnju na polju bezbednosti hrane. Ulazak ćelija salmonela u ovaj stadijum potvrđen je u velikom broju istraživanja (Oliver, 2010; Gruzdev et al., 2012; Aviles et al., 2013), dok stepen patogenosti ovakvih ćelija tek treba dokazati.

Povećanje vijabilnosti ćelija u uslovima povremene dostupnosti hranljivih materija RDAR (>70%) i BDAR (>50%) morfotipa ukazuje da je sukcesivni priliv malih količina hranljivih materija značajno uticao na sposobnost preživljavanja ćelija biofilma izolata oba ispitivana morfotipa. Ovaj nalaz je od posebnog značaja, s obzirom da u proizvodnim pogonima često usled neadekvatnog sprovođenja sistema sanitacije dolazi do zaostajanja rezidua hrane koji sa jedne strane mogu poslužiti kao izvor hranljivih materija, dok sa druge strane neki od njih kao što su lipidi mogu pružiti i protektivnu ulogu (Hiramatsu et al., 2005). Posledični efekat neadekvatne sanitacije obično rezultira razvojem biofilma i posledično pojavom perzistencije ovakvih sojeva.

U okviru prikazanih rezultata već je pokazana sposobnost izolata RDAR i BDAR morfotipa da formiraju biofilm. Rezultati dobijeni u okviru ovog dela istraživanja potvrđuju da pojava RDAR morfotipa i u neznatno manjoj meri BDAR morfotipa predstavlja vrstu fiziološke adaptacije povezane sa dugoročnim preživljavanjem što je u saglasnosti sa rezultatima predhodnih studija u okviru kojih je potvrđeno da komponente matriksa biofilma salmonela kao što su tanke agregativne fimbrije i celuloza imaju uticaj na sposobnost preživljavanja u uslovima isušivanja i gladovanja (White et al., 2006; Apel et al., 2009; Vestby et al., 2009a). Nasuprot pomenutim istraživanjima, Stocki et al. (2007) su mišljenja da pojava RDAR morfotipa nema suštinskog značaja za perzistentnost.

Već je istaknuto da je tolerantnost ćelija u okviru biofilma na isušivanje u velikoj meri omogućena prisustvom matriksa biofilma. Matriks biofilma je visokohidrirana supstanca koja pored brojnih ustanovljenih funkcija ima funkciju retencije vode čime se održava

hidratisanost mikrookoline, i na taj način omogućava toleranciju biofilma na isušivanje (Flemming i Wingender, 2010). Međutim sinteza komponenti matriksa biofilma nije jedini mehanizam adaptacije na uslove stresa kao što su isušivanje i gladovanje.

Sposobnost formiranja matriksa biofilma je samo jedan od mnogobrojnih adaptivnih odgovora razvijen od strane konzorcijuma bakterija u biofilmu koji im omogućava preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine. Naime, tranzicija planktonske populacije u sesilnu pokreće ekspresiju različitih setova gena što za posledicu ima pojavu različitih fizioloških i fenotipskih karakteristika koje ne uočavamo kod ćelija planktonske populacije (smanjena stopa rasta, izmena metaboličke aktivnosti, sinteza osmoprotektanata).

Istraživanja su pokazala da se različita ekspresija gena u okviru biofilm fenotipa u poređenju sa populacijama istih ćelija koje nemaju sposobnost razvoja ovog fenotipa odnosi uglavnom na gene uključene u procese regulacije formiranja biofilma, metabolizma aminokiselina, glukoneogeneze, pokretljivosti i globalne regulacije odgovora na stres (Hamilton et al., 2009; White et al., 2010; Deng et al., 2012; Giaouris et al., 2013).

Uporednom analizom glavnih metabolita RDAR morfotipa i populacije ćelija koja nije sposobna da razvije ovaj fenotip, primenom ¹H NMR i GC-MS, White et al. (2010) su pokazali da ćelije RDAR morfotipa sa početkom agregacije doživljavaju promenu u centralnom metabolizmu koja se ogleda u pojačanoj glukoneogenezi i sintezi molekula koji doprinose u odgovoru na osmotski stres. Ovi autori su ustanovili da se početak promena ovog tipa vremenski poklapa sa inicijacijom agregacije (25h) za koju je prisustvo polisaharida esencijalno i da sa inicijacijom agregacije dolazi i do pojačane sinteze osmoprotektanata.

Ovakva konstatacija je potvrđena i u istraživanju Aviles et al. (2013) koji su ustanovili da se ekspresija različitih setova gena odgovornih za sintezu osmoprotektanata, kao što je disaharid trehaloza, odvija u uslovima isušivanja. Naime, ovaj šećer formira gel u vidu ćelijskog dehidrata koji sprečava oštećenja ćelijskih struktura. U uslovima ekstremnog isušivanja trehaloza u stvari može suštinski zameniti vodu sprečavajući denaturaciju proteina i druga oštećenja ćelijskih struktura (Spector i Kenyon, 2012). Osim toga, ovaj disaharid ima značaj i u nutritivnom pogledu s obzirom da kao produkt njegovog katabolizma nastaje glukoza koja predstavlja iskoristljiviji izvor energije. Produkcija trehaloze i drugih osmoprotektanata, kao što su betain i

glutamat je dokazana u odgovoru ćelija salmonela na isušivanje (White et al., 2010; Finn et al., 2013).

Slično kao u slučaju izlaganja ćelija biofilma isušivanju, i u slučaju izlaganja ovih ćelija gladovanju primarni cilj ćelija je da izbegne stres (u ovom slučaju gladovanje). U uslovima gladovanja pored sinteze matriksa i smanjenja metaboličke aktivnosti ćelija, dolazi do globalnog reprogramiranja ćelijskog metabolizma u smislu sinteze enzima za razgradnju nepotrebnih ćelijskih komponenti, enzima za efikasniji i kompletniji metabolizam esencijalnih hranljivih materija C, P, i N iz neuobičajenih izvora, enzima za razgradnju matriksa biofilma kao i različitih enzima koji sprečavaju ili repariraju oštećenja ćelija nastalih kao posledica stresa.

Dobijeni rezultati i dostupni literaturni podaci ukazuju da se pod okriljem adaptacije biofilm fenotipa kriju brojni mehanizmi adaptivnog odgovora kojima bakterije u okviru biofilma reagovanjem na signale iz svoje mikrookoline dovode do reprogramiranja ćelijskog metabolizma i ekspresije gena u smeru zavisnom od signala dobijenih iz spoljašnje sredine.

Istraživanja su pokazala da je za ovako koordinisane adaptivne ćelijske odgovore na stresne faktore odgovoran gen *rpoS* (RNA polimeraza, σ) (Hamilton et al., 2009). Naime, prisustvo ovog gena je potvrđeno kod velikog broja gramnegativnih bakterija, ali nije u potpunosti razjašnjeno na koji način informacija o stresu kontroliše njegovu ekspresiju. Testiranja u laboratorijskim uslovima su pokazala da opadanjem stope rasta bakterija dolazi do povećanja transkripcije *rpoS* gena. Pokazano je da *rpoS* gen kodira i gene odgovorne za sintezu sigma faktora (σ^s RpoS). Sigma faktor predstavlja glavni regulator ekspresije gena, osim što je funkcionalno uključen u kontrolu gena odgovornog za formiranje matriksa biofilma (*csgD*) (White et al., 2010) igra vrlo važnu ulogu u ćelijskom odgovoru na stres (Aviles et al., 2013; Abdallah et al., 2014). Većina do sad poznatih gena enterobakterija, koji se nalaze pod kontrolom ove subjedinice, njih više od 240 su upravo geni povezani sa rezistencijom na gladovanje, oksidativni stres, UV-zračenje, visoku temperaturu, visoki osmotski pritisak i druge stresne uslove (Abdallah et al., 2014).

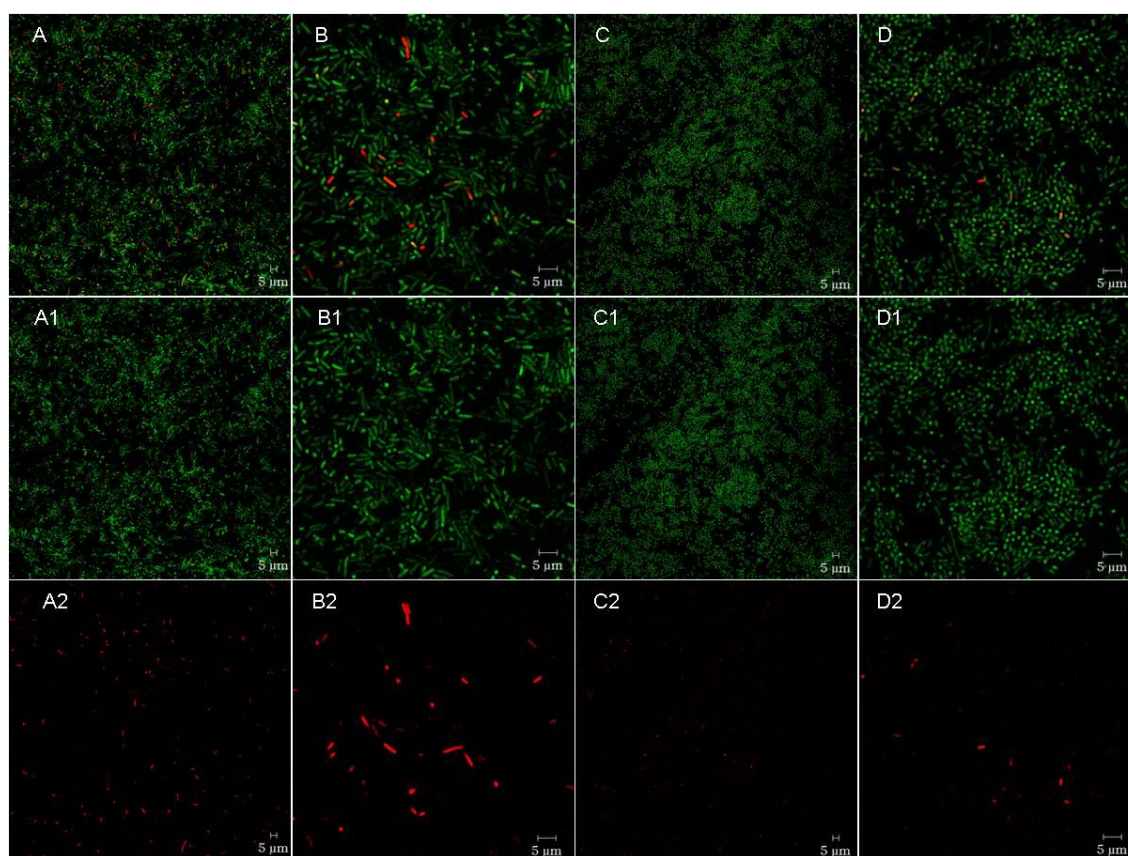
Uprkos brojnim istraživanjima na ovom polju, adaptivni mehanizmi bakterija u biofilmu nisu još uvek razjašnjeni u potpunosti. Gotovo je sigurno da pored ustanovljenih mehanizama adaptacije bakterija u biofilmu postoji i znatan broj do sada nerazjašnjenih mehanizama koji,

prkoseći zakonima logike, omogućavaju preživljavanje na ovaj način organizovanih bakterija u naizgled nemogućim uslovima.

5.5. Vizuelizacija strukture biofilma

5.5.1. CLSM

Reprezentativni CLSM snimci formiranih biofilмова izolata SERDAR na površinama od stakla su prikazani na Slikama 5.20.-5.31. u formi setova mikrografija.



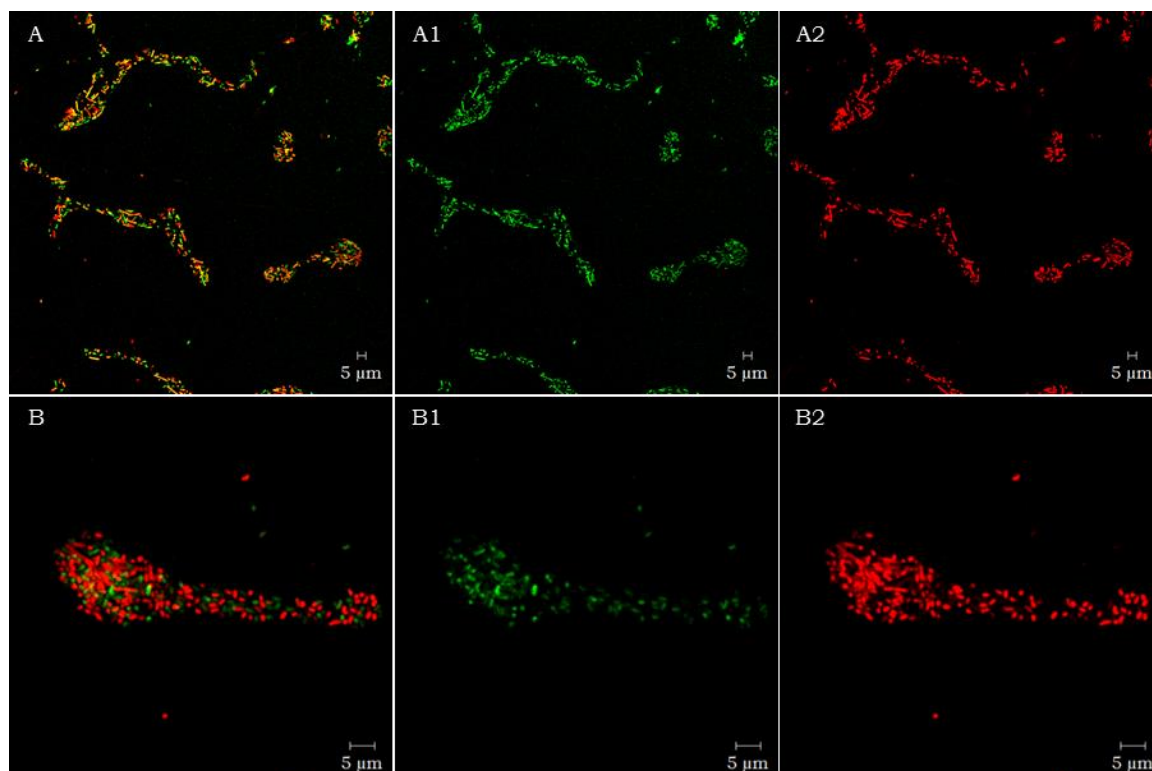
Slika 5.20. CLSM mikrografije formiranih biofilмова SERDAR morfortipa na staklenim kuponima nakon 24h (paneli A i B) i nakon 48h (paneli C i D)²

² Mikrografije na panelima A i C predstavljaju polja dimenzija 230,3 µm × 230,3 µm (scan zoom 1); na panelima B i D 76,8 µm × 76,8 µm, (scan zoom 3) alokacija boja: zelena boja = žive ćelije (FDA); crvena boja = mrtve ćelije (PI); integracija crvenog i zelenog kanala (ABCD), zeleni kanal (A₁B₁C₁D₁), crveni kanal (A₂B₂C₂D₂). Skala predstavlja 5 µm

Analizom CLSM mikrografija formiranih biofilmova SE_{RDAR} morfotipa nakon 24h inkubiranja evidentiran je veliki broj adheriranih ćelija uglavnom difuznog rasporeda sa prisustvom manjih ćelijskih agregata (Slika 5.20. paneli A i B).

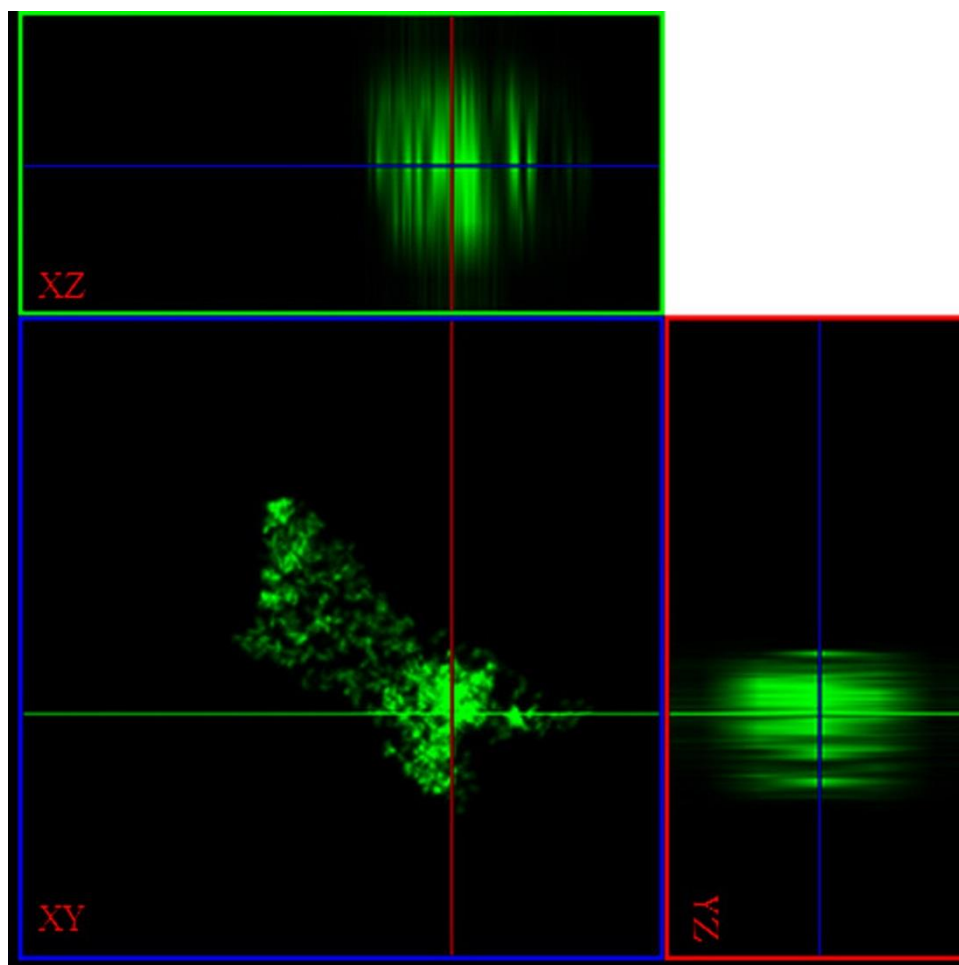
Veći deo adheriranih ćelija je vijabilan (zelena boja, FDA), ali takođe se evidentira i prisustvo ćelija sa kompromitovanom membranom (crvena boja, PI). Primenom opcija merenja ustanovljeno je da su ćelije nakon inicijalne faze (24h) formiranja biofilma bile izduženije dimenzija 3–6 μm , u odnosu na ćelije u okviru 48h biofilma čija je izmerena dužina iznosila 2,0-2,5 μm . Nakon 48h (Slika 5.20. paneli C i D) ćelije pokazuju nešto veću kolonizaciju površina uz formiranje većih ćelijskih agregata koje odgovaraju formama mikrokolonija. Mikrografije ćelijske agregacije su prikazane na Slikama 5.21. i 5.22.

Do sličnih saznanja su došli Bridier et al. (2010) ispitujući arhitekturu biofilmova uz primenu CLSM devet različitih sojeva *S. enterica* među kojima je jedan pripadao serotipu Enteritidis. U okviru pomenutog istraživanja, nakon 24h inkubiranja u TSB izuzev serotipa Agona, kod kojeg je vizuelizovano prisustvo većih mikrokolonija, preostali ispitivani sojevi, uključujući i serotip Enteritidis, formirali su samo nekoliko razbacanih ćelijskih agregata (klastera), što je u saglasnosti sa prikazanim rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. White et al. (2010) su ispitivanjem metaboličkog profila RDAR morfotipa na osnovu povećanja aktivnosti sigma faktora (σ^S) i aktivacije esencijalnih gena za RDAR morfotip, uključujući i *csgDEFG*, *csgBAC* and *adrA* konstatovali da početak agregacije ćelija započinje u 25 času.



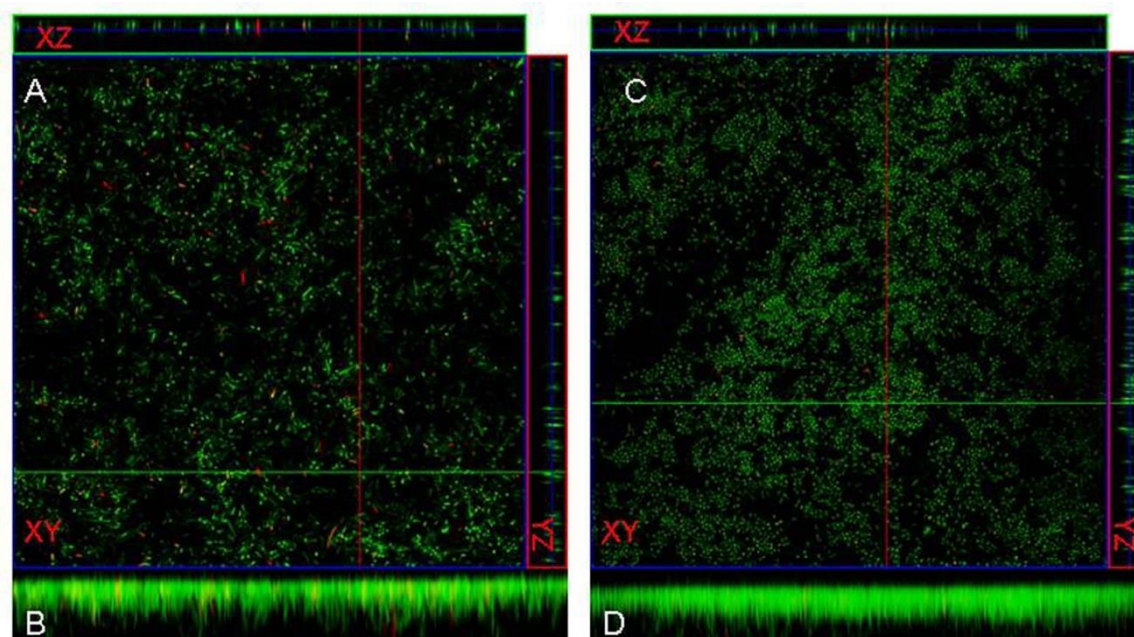
Slika 5.21. CLSM mikrografije ćelijske agregacije izolata SE_{RDAR} nakon 48h³

³ Mikrografije na panelu A predstavljaju polja dimenzija 230,3 µm × 230,3 µm (scan zoom1); na panelu B 76,8 µm × 76,8 µm, (scan zoom 3); alokacija boja: zelena boja = žive ćelije (FDA); crvena boja = mrtve ćelije (PI); integracija crvenog i zelenog kanala (AB), zeleni kanal (A₁B₁), crveni kanal- (A₂B₂). Skala predstavlja 5 µm



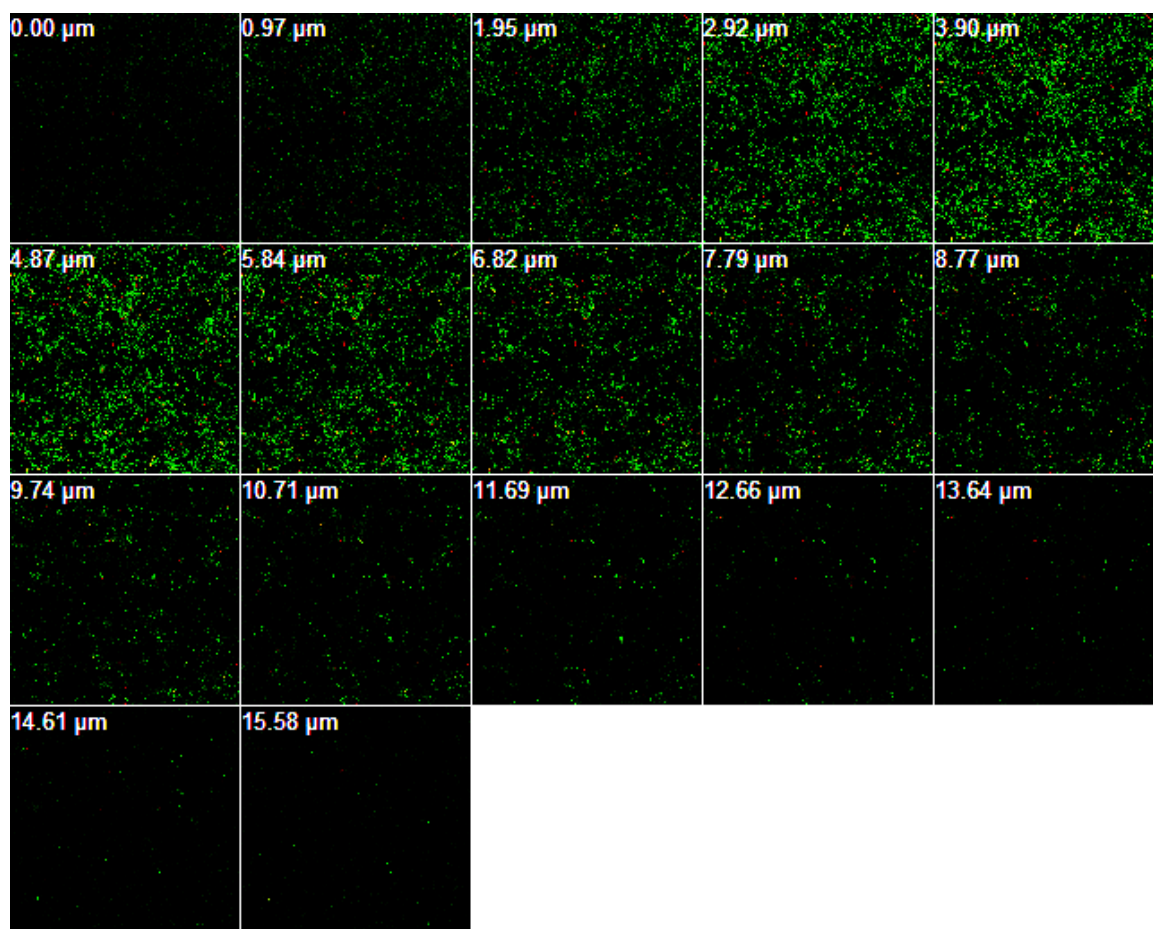
Slika 5.22. Ortogonalni prikaz XY, XZ, i YZ preseka agregacije ćelija⁴

⁴ Mikrografija predstavlja polje dimenzija $80,08 \mu\text{m} \times 80,08 \mu\text{m}$ (scan zoom 3); alokacija boja: zelena boja = žive ćelije (FDA); Skala predstavlja $5 \mu\text{m}$. Zelena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje XZ prikaza, crvena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje YZ prikaza, plava linija na XZ i YZ prikazima pokazuje mesta preseka na XY prikazu



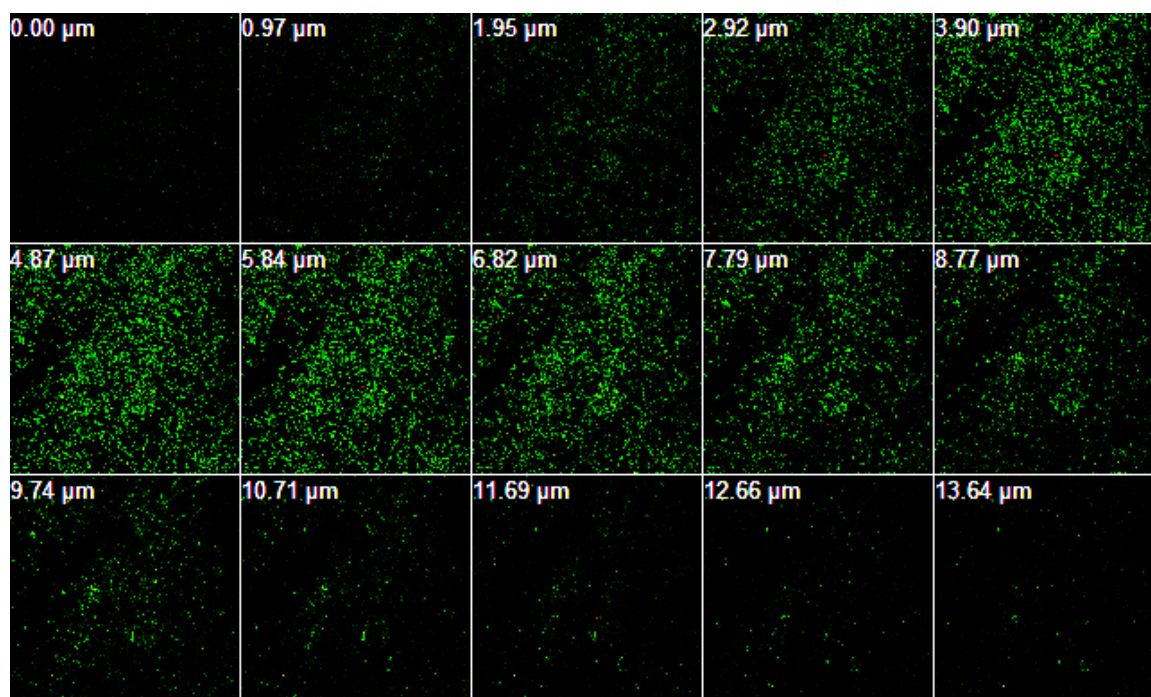
Slika 5.23. Ortogonalni prikaz XY, XZ, i YZ preseka (AC) i Z presek (BD) izolata SE_{RDAR} na površinama staklenih kupona nakon 24h (AB) i 48h (CD)⁵

⁵ Zelena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje XZ prikaza, crvena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje YZ prikaza, plava linija na XZ i YZ prikazima pokazuje mesta preseka na XY prikazu.



Slika 5.24. Prikaz poprečnih preseka (XY) biofilma kroz Z-osu sa njihovom debljinom (μm) izolata SE_{RDAR} na površinama staklenih kupona nakon 24h⁶

⁶ Mikrografije prikazane na Slikama 5.24., 5.25. i 5.29. su dobijene pri Z-koraku od 0,97 μm koji predstavlja distancu između svake mikrografije, počev od baze biofilma koja je u kontaktu sa staklenom površinom do samog vrha biofilma.

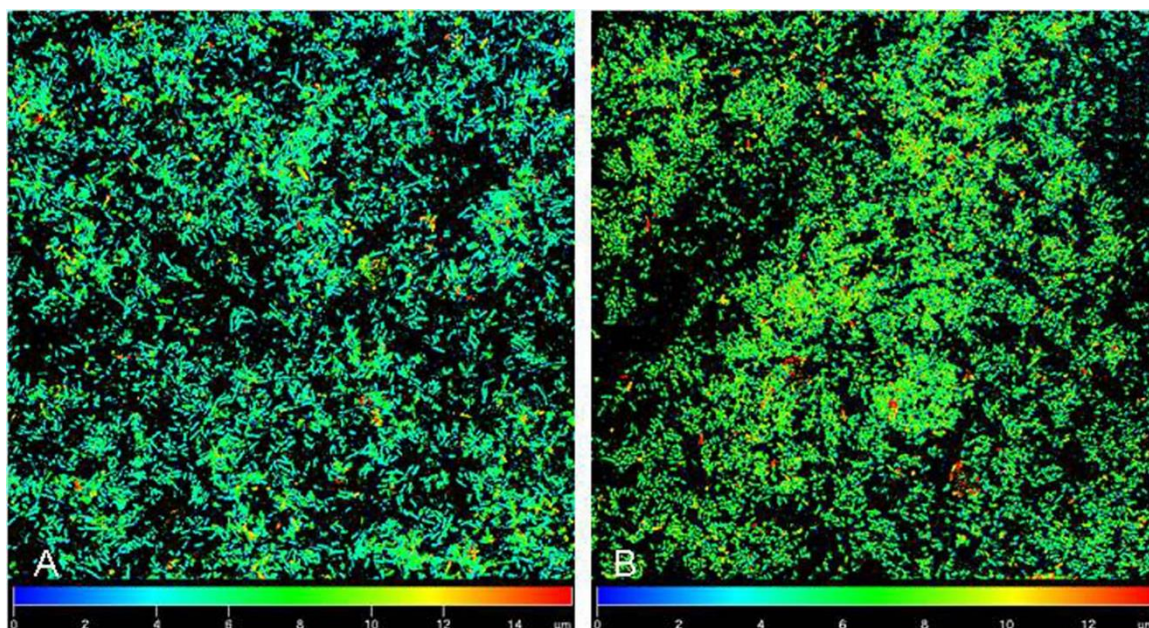


Slika 5.25. Prikaz poprečnih preseka (XY) biofilma kroz Z-osu sa prikazanom debljinom (μm) izolata SE_{RDAR} na površinama staklenih kupona nakon 48h

Ortogonalne projekcije formiranih biofilmova prikazane na Slici 5.23. ukazuju na neravnomernu kolonizaciju površina i nehomogenost debljine formiranih biofilmova koja je naročito uočljiva kod 24h biofilma. Debljina formiranog biofilma je varirala u zavisnosti od lokacije.

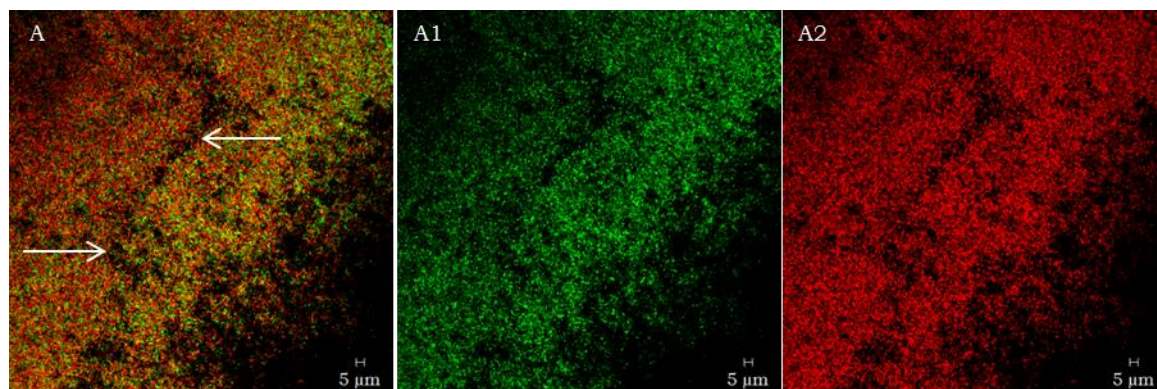
Iz prikazanih poprečnih preseka biofilmova kroz Z-osu dobijenih pri Z-koraku od 0,97 μm počevši od baze biofilma do samog vrha biofilma može se videti da je maksimalno izmerena debljina formiranih 24h i 48h biofilmova (Slika 5.24. i 5.25.) iznosila 15,58 μm , odnosno 13,64 μm . Međutim, na osnovu bojom kodiranih mapa (DepthCod) prikazanim na Slici 5.26. na kojoj je dat prikaz debljine formiranih biofilmova, može se konstatovati da oblasti sa maksimalnom debljinom (crvena boja) predstavljaju vrlo mala područja. Osim toga, mapama se jasno potvrđuje nehomogenost u debljini 24h biofilma koja varira u rasponu od 4 μm do 12 μm . Veći deo površine na mapi 24h biofilma predstavljen je svetlije plavo i zeleno obojenim područjima što odgovara debljini od 4 μm do 10 μm , dok su zonama koje reprezentuju debljinu < 4 μm (plava) i > 10 μm (žuto crvena) obuhvaćena manja područja.

Na mapi 48h biofilma najveći deo površine je predstavljen zeleno do žuto obojenim područjima koja reprezentuju debljinu od 6 do 10 μm , a takođe se evidentira i prisustvo debljih slojeva (crvena boja), ali u manjoj meri. Na osnovu prikazanih mapa može se zaključiti da osim u homogenosti generalno nema većih razlika u debljini 24h i 48h biofilmova. Da nema značajnih razlika u debljini formiranih biofilmova potvrđuje i trodimenzionalna rekonstrukcija formiranih biofilmova prikazana na Slici 5.31.

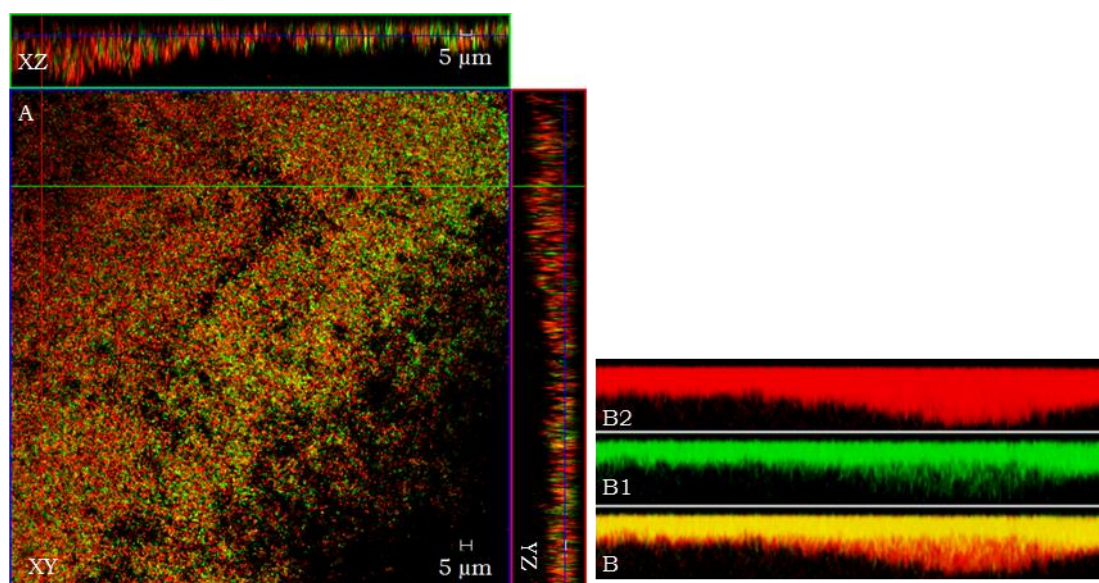


Slika 5.26. Bojom kodirane mape debljine (DepthCod) formiranih biofilmova SE_{RDAR} morfotipa na staklenim kuponima nakon 24h (A) i nakon 48h (B) sa skalom u μm

Izgled četvorodnevno (96h) biofilma izolata SE_{RDAR} prikazan je na Slikama od 5.27. do 5.30.



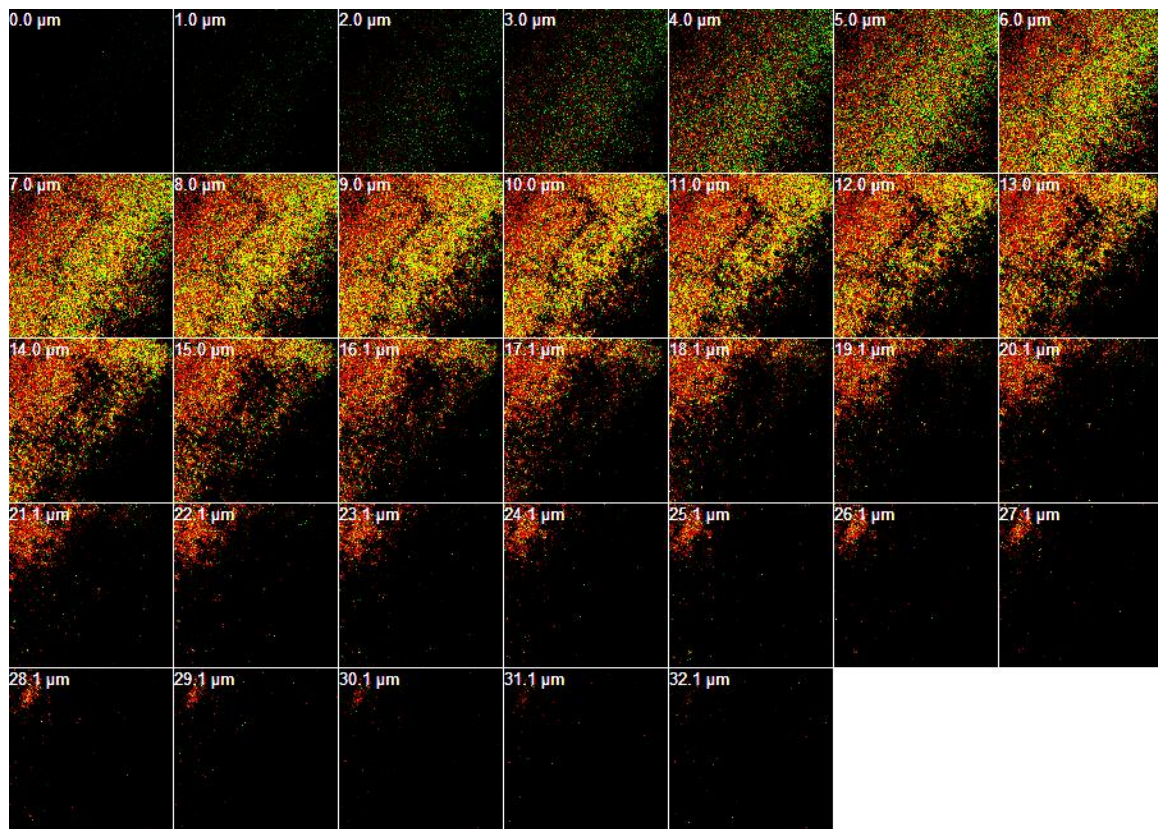
Slika 5.27. CLSM mikrografije formiranog biofilma SE_{RDAR} morfotipa na staklenim kuponima nakon 96h⁷



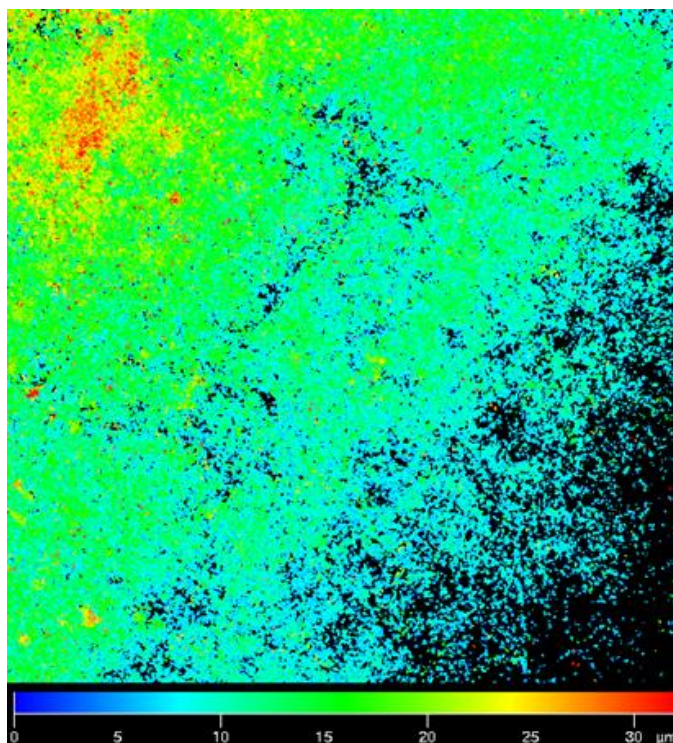
Slika 5.28. Ortogonalni prikaz XY, XZ, i YZ preseka (A) i Z presek (B) izolata SE_{RDAR} na površinama staklenih kupona nakon 96h⁸

⁷ Mikrografije predstavljene na panelima A i C predstavljaju polje dimenzija 230,3 µm × 230,3 µm (scan zoom 1); alokacija boja: zelena boja = žive ćelije (FDA); crvena boja = mrtve ćelije (PI); integracija crvenog i zelenog kanala (A), zeleni kanal (A₁), crveni kanal (A₂). Skala predstavlja 5 µm.

⁸ Integracija crvenog i zelenog kanala (B), zeleni kanal (B₁), crveni kanal (B₂). Skala predstavlja 5 µm. Zelena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje XZ prikaza, crvena linija na XY prikazu pokazuje mesto isečka uzetog za formiranje YZ prikaza, plava linija na XZ i YZ prikazima pokazuje mesta preseka na XY prikazu.



Slika 5.29. Prikaz poprečnih preseka (XY) biofilma kroz Z-osu sa njihovom debljinom (μm) izolata SE_{RDAR} na površinama staklenih kupona nakon 96h



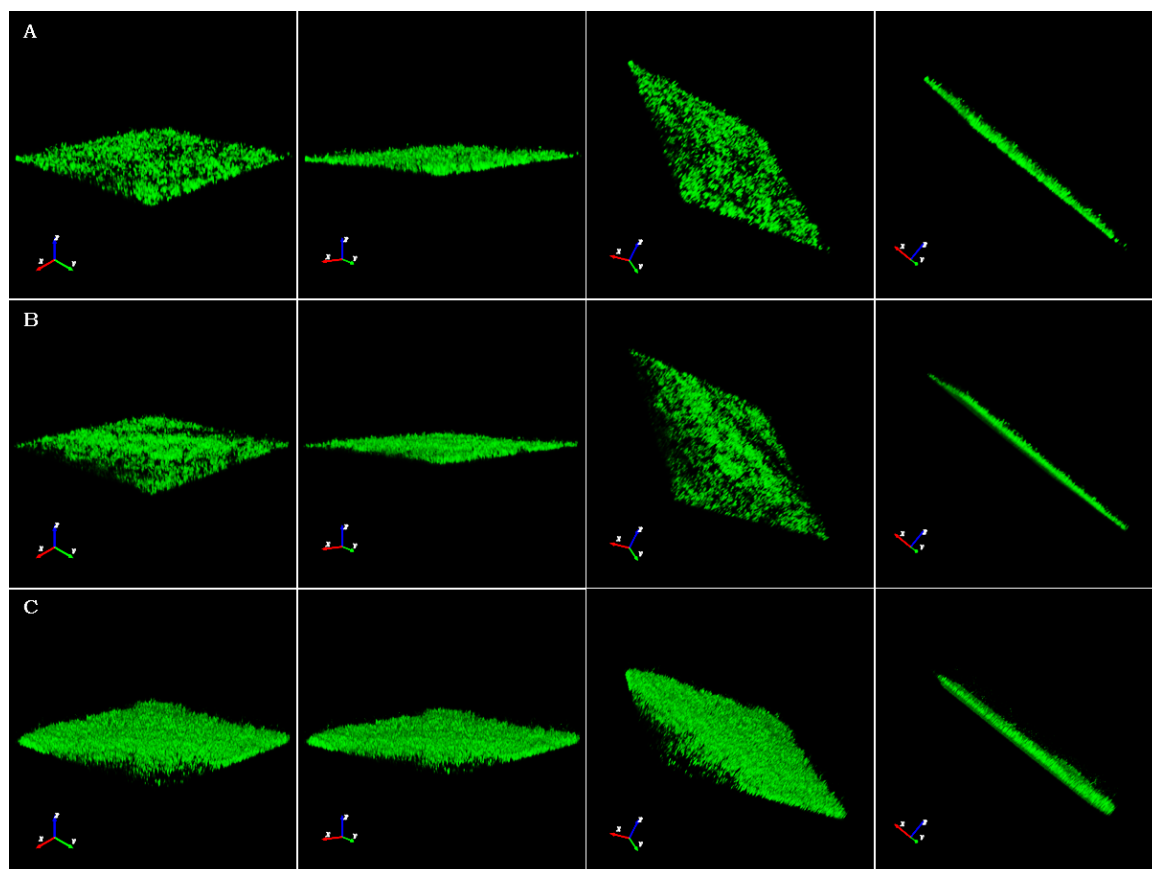
Slika 5.30. Bojom kodirana mapa debljine (DepthCod) formiranih biofilmova SE_{RDAR} morfotipa na staklenim kuponima nakon 96h sa skalom u µm

Na prikazanim mikrografijama se može videti da za razliku od 24h i 48h biofilmova, 96h biofilm gradi više slojeva ćelija koje pokrivaju veliki deo površine. Takođe se uočava da strukturu 96h biofilma pored velikog broja vijabilnih ćelija (zeleno boja, FDA) gradi i veliki broj ćelija sa kompromitovanom membranom koje su sastavni deo svakog biofilma (crvena boja PI) (Slika 5.27. A2). Postojanje praznih prostora koji se evidentiraju na mikrografijama 96h biofilma upućuje na prisustvo intersticijalnih kanala.

Na Slici 5.28. dat je ortogonalni prikaz 96h biofilma na kome se, kao i u slučaju 24h i 48h biofilma, evidentira neravnomerna kolonizacija površine i nehomogenost debljine formiranog biofilma što je naročito evidentno na prikazima XZ, XY i Z preseka.

Na osnovu prikaza poprečnih preseka (XY) biofilma kroz Z-osu (Slika 5.29.) maksimalna izmerena debljina 96h biofilma je iznosila 32,1 µm. Međutim, na bojom kodiranoj mapi debljine biofilma, prikazanoj na Slici 5.30., može se videti da je u najvećem delu snimljene površine debljina biofilma iznosila 15-20 µm što je na mapu predstavljeno zeleno obojenim regionima. Značajan deo biofilma je imao nešto manju debljinu

10-15 μm (plavo obojena područja), dok su delovi biofilma debljine preko 25 μm zauzimali mali ograničen region (žuto do crveno obojena područja). Na osnovu prikazanih mikrografija može se zaključiti da prikazane strukture 96h biofilma odgovaraju strukturnim karakteristikama zrelog biofilma.

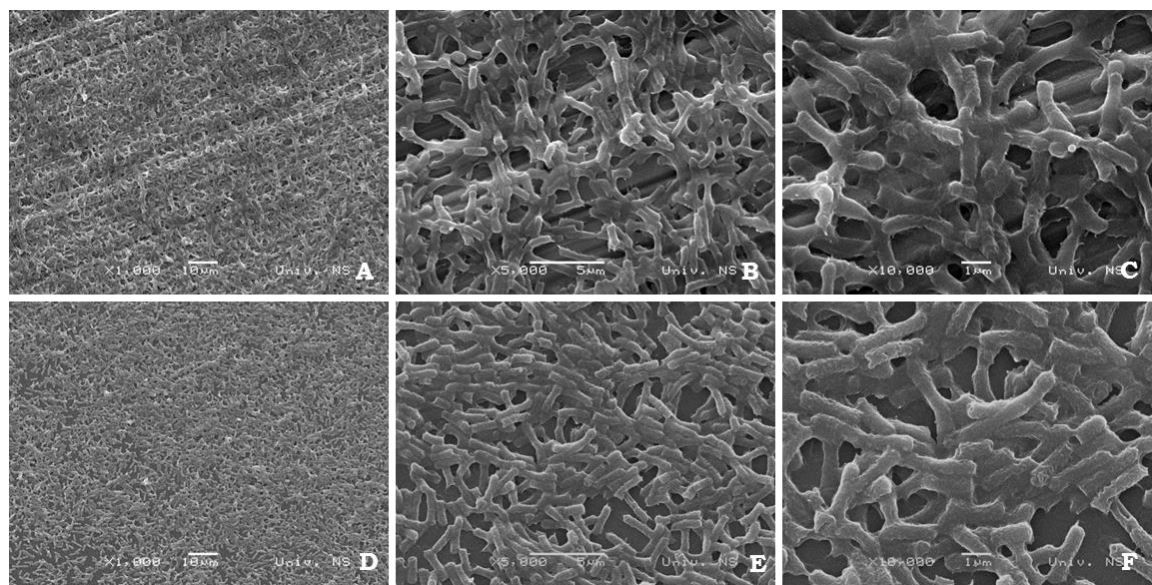


Slika 5.31. Trodimenzionalna (3D) rekonstrukcija živih delova biofilma SE_{RDAR} na površini staklenih kupona nakon 24h (panel A), 48h (panel B) i 96h (panel C). Položaj osa je prikazan u donjem levom uglu

5.5.2. SEM

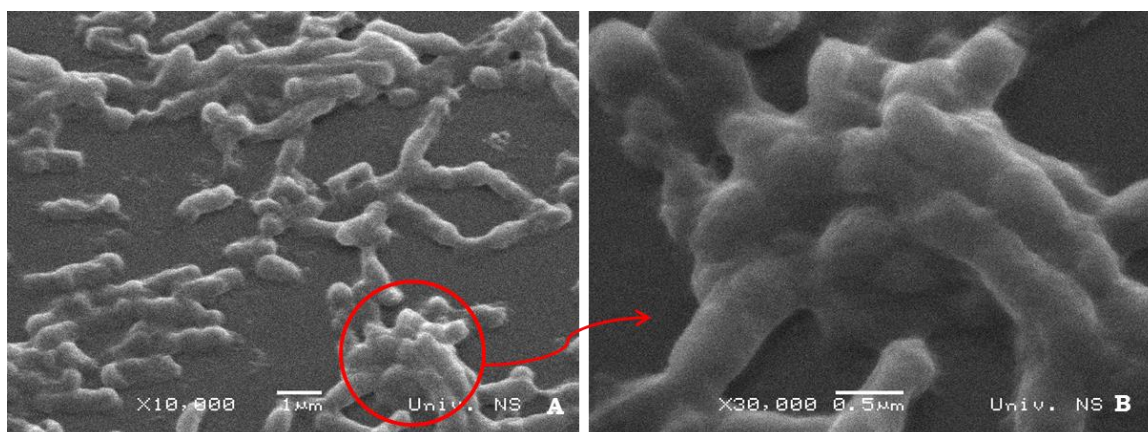
Rezultati vizuelizacije formiranih biofilmova uz primenu SEM prikazani su u formi setova mikrografija na uvećanjima od 1.000, 5.000 i 10.000 \times . Radi boljeg uvida za pojedine detalje dat je prikaz mikrografija na uvećanjima od 10.000 do 50.000 \times . Prikazom manjih uvećanja omogućava se uvid u stepen adherentnosti, dok prikazi na većim uvećanjima omogućavaju uvid u organizaciju i interkonekciju između ćelija kao i evidentiranje prisustva matriksa biofilma.

Formirani biofilmovi SE_{RDAR} morfotipa na površinama od nerđajućeg čelika i stakla nakon 24h su prikazani na Slici 5.32. Analizom SEM mikrografija formiranih biofilmova SE_{RDAR} morfotipa nakon 24h inkubiranja evidentira se visok stepen adherencije na obe testirane površine (Slika 5.32. A, B).



Slika 5.32. SEM mikrografije formiranih biofilmova izolata SE_{RDAR} nakon 24h. nerđajući čelik (ABC), staklo (DEF). Uvećanja 1.000 (AD), 5.000 (BE) i 10.000_x (CF)

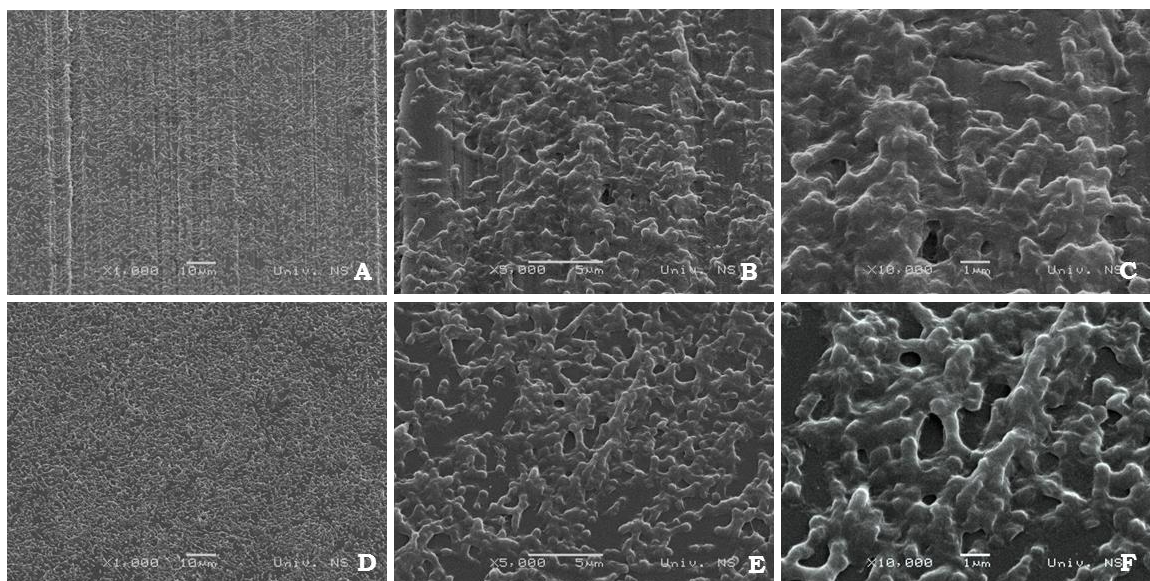
Na većim uvećanjima (Slika 5.32. B, C, E i F) u pozadini bakterijskih ćelija evidentiraju se strukture karakteristične za stepen obrade testiranih materijala što ukazuje da kolonizacija površina nije potpuna. Takođe se na uvećanjima od 5.000 i 10.000_x (Slika 5.32. C i F) evidentira blizak kontakt između ćelija uz obrazovanje manjih ćelijskih agregata, što se poklapa sa nalazima dobijenim uz primenu CLSM za navedenu starost biofilma. Ćelijska agregacija sa formacijom mikrokolonije prikazana je na Slici 5.33.



Slika 5.33. SEM mikrografije agregacije ćelija sa formacijom mikrokolonije izolata SE_{RDAR} na površinama od stakla nakon 24h uvećanja 10.000 (A) i 30.000x (B)

Poređenje SEM mikrografija biofilma sa CLSM mikrografijama biofilma starosti 24h odaje utisak prisustva veće kolonizacije površina na mikrografijama dobijenim upotrebom SEM. Ovakav nalaz je sa jedne strane posledica faze formiranja biofilma, ali i razlika u načinu pripreme preparata za mikroskopiranje. Naime, u inicijalnim fazama razvoja biofilma siteza matriksa biofilma koji je neophodan za interkonekciju između ćelija i učvršćivanje za površinu je na minimalnom nivou što za posledicu može imati abraziju ćelija naročito kod biofilmova koji se posmatraju *in situ* bez predhodnog fiksiranja kao što je slučaj kod preparata pripremanih za vizuelizaciju sa CLSM. Kao što je već spomenuto u poglavlju 4. Materijal i metode, nakon završetka predviđenog vremena za formiranje biofilma, preparati se ispiraju u cilju odstranjivanja neadherisanih ćelija i zaostalog medijuma nakon čega je u cilju vizuelizacije preparata za snimanje SEM-om neophodno sprovesti postupak fiksiranja. Nasuprot, za vizuelizaciju uz primenu CLSM izostaje korak fiksiranja, a biofilmovi do snimanja i tokom snimanja ostaju u tečnoj sredini što za posledicu može da ima delimičnu abraziju strukture biofilma usled prisustva sila trenja izazvanih zapljuskivanjem tečnosti koja ih okružuje do koje neminovno dolazi zbog manipulacije sa preparatima.

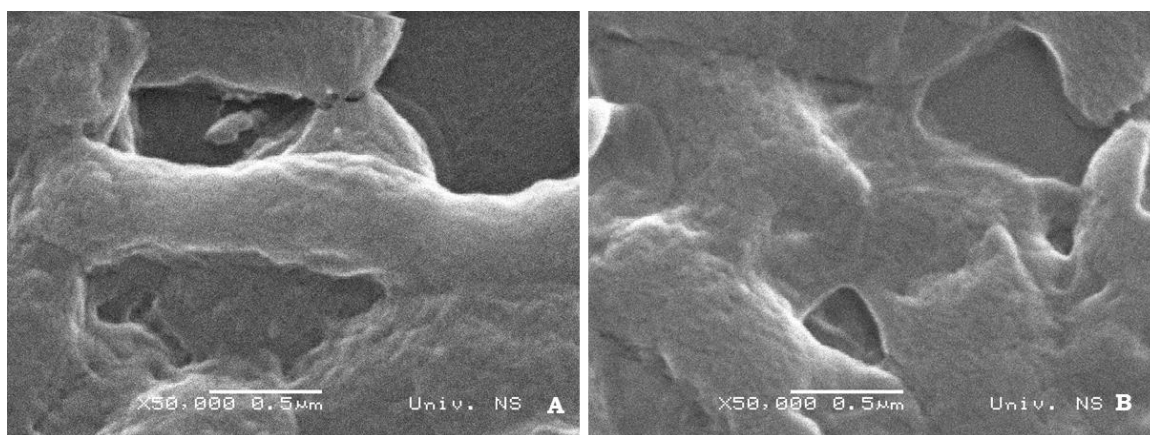
Na Slici 5.34. su prikazani formirani biofilmovi izolata SE_{RDAR} na površinama od nerđajućeg čelika i stakla nakon 48h. Na prikazanim mikrografijama 48h biofilma se takođe evidentira veliki broj adheriranih ćelija na obe testirane površine (Slika 5.35. A, B, D i E). Dužina ćelija je manja u poređenju sa adheriranim ćelijama nakon 24h, što je u saglasnosti sa snimcima dobijenim primenom CLSM.



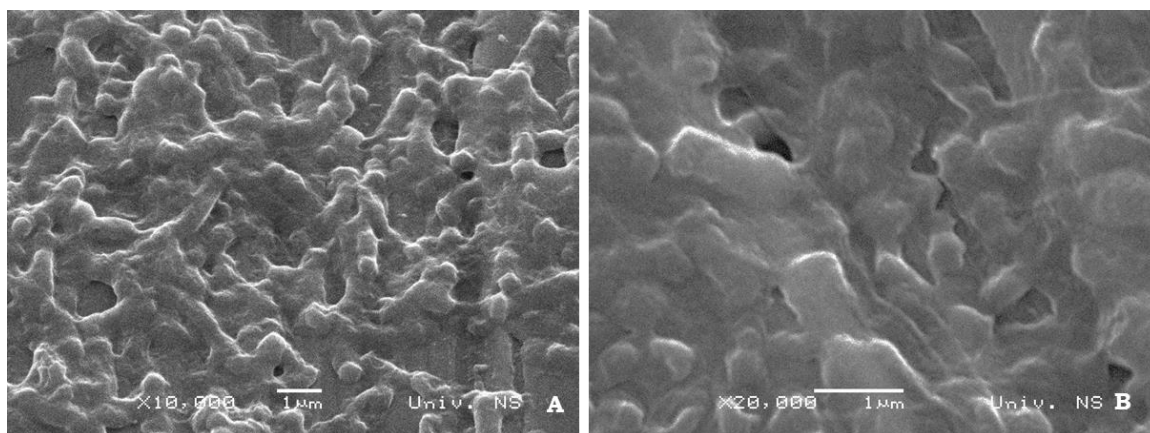
Slika 5.34. SEM mikrografije formiranih biofilmova izolata SE_{RDAR} nakon 48h. nerđajući čelik (ABC), staklo (DEF). Uvećanja 1.000 (AD), 5.000 (BE) i 10.000_x (CF)

Na većim uvećanjima (Slika 5.34. C i F) zapaža se intenzivnija ćelijska agregacija uz formiranje većih ćelijskih agregata, koji odgovaraju formi mikrokolonija vidno prekrivenih difuznom sasušenom masom koja bi mogla odgovarati matriksu biofilma. Kako je matriks biofilma visoko hidrirana struktura, sukcesivna dehidratacija prilikom pripreme preparata za SEM dovodi do njegove dehidratacije, zbog čega se njegovo prisustvo na mikrografijama evidentira u vidu sasušene mase.

Mikrografije prikazane na Slikama 5.35. i 5.36. daju uvid u interkonekciju između ćelija i potvrđuju prisustvo ekstracelularne supstance kojom su ćelije pokrivene i interkonektovane.

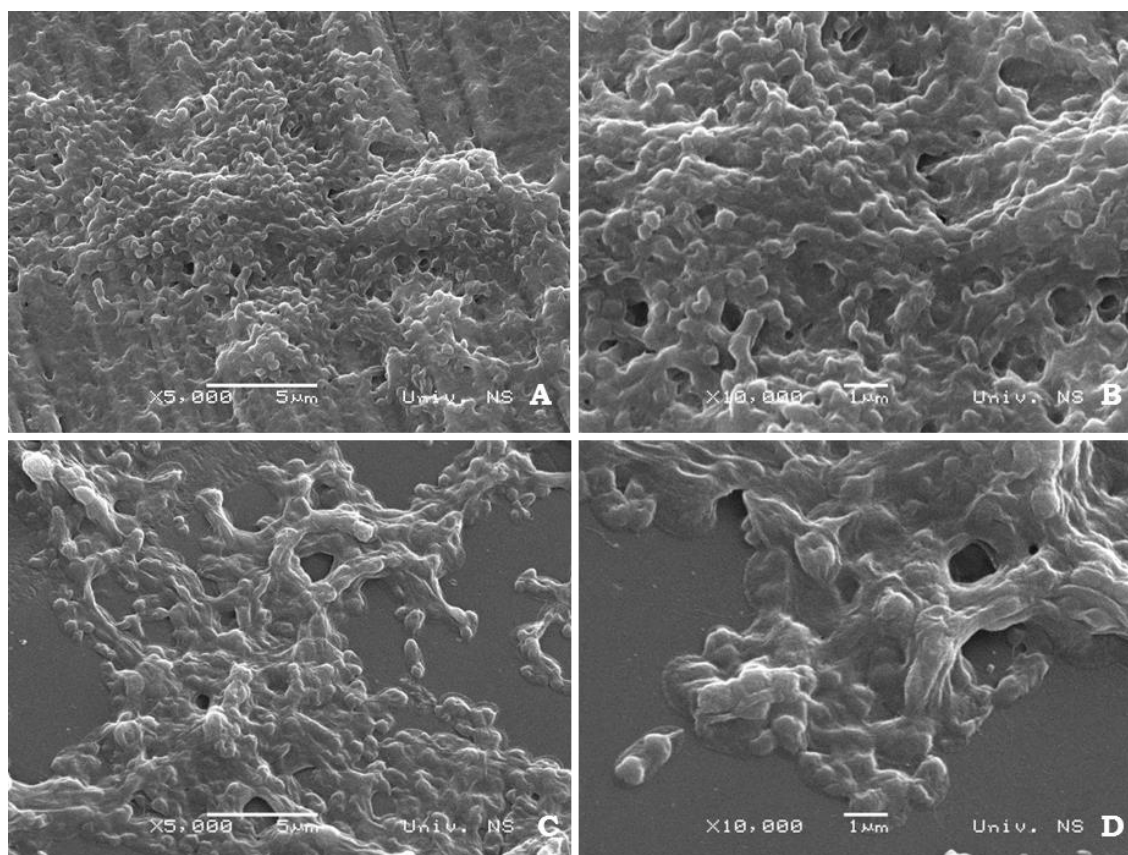


Slika 5.35. SEM mikrografije interkonekcija između ćelija formiranih biofilmova SE_{RDAR} morfotipa na površinama od stakla nakon 48h, Uvećanje 50.000_x (AB)



Slika 5.36. SEM mikrografije interkonekcije između ćelija formiranih biofilмова SE_{RDAR} morfolitpa na površinama od nerđajućeg čelika nakon 48h. Uvećanja 10.000_x (A) i 20.000_x (B)

Biofilmovi formirani na površinama od nerđajućeg čelika i stakla tokom 96h su prikazani na Slici 5.37. Na prikazanim mikrografijama jasno se evidentira prisustvo trodimenzionalnih struktura izgrađenih od više slojeva ćelija sa prisustvom intersticijalnih vodenih kanala i ekstracelularne supstance koje su naročito izražene na površinama od čelika (Slika 5.37. A i B). Evidentirane trodimenzionalne strukture u potpunosti odgovaraju strukturi zrelog biofilma. Prisustvo trodimenzionalnih struktura biofilma kod izolata RDAR morfolitpa nakon 96h inkubiranja potvrđeno je i u istraživanjuma Malcova et al. (2008).



Slika 5.37. SEM mikrografije formiranih biofilмова SE_{RDAR} morfotipa na površinama nakon 96h. čelik (AB), staklo (CD). Uvećanja 5.000 (AC) i 10.000_x (BD)

Studije transmisiona elektronske mikroskopije su potvrdile da se fina celulozna vlakna produkuju peritrihijalno, dok se tanke agregativne fimbrije pojavljuju u vidu uvijenih nastavaka širine 2-3 nm. (White et al., 2003). U slučaju koekspresije ove dve komponente matriksa biofilma slobodni glukanski lanci celuloze su tesno obmotani oko ćelija. Ovakva interkonekcija između ćelija omogućava čvrsto povezivanje između ćelija, a površina postaje visoko hidrofobna (Zogaj et al., 2001; Römling, 2007), dok se u odsustvu produkcije celuloze, prisustvo tankih agregativnih fimbrija može jasno vizuelizovati u vidu tankih fibrilarnih struktura (White et al., 2003). Na dobijenim SEM mikrografijama testiranih izolata ovakve strukture nisu vizuelizovane što je najverovatnije posledica oštećenja finih površinskih struktura prilikom pripreme preparata za SEM zbog čega se matriks biofilma vizuelizuje u vidu sasušene mase koja pokriva i interkonektuje ćelije.

Uzimajući u obzir prikazane rezultate formiranje biofilma ispitivanog izolata SE_{RDAR} morfotipa pod datim eksperimentalnim

uslovima se odvija u tri faze: 1) inicijalna adhezija za površinu i formiranje manjih ćelijskih agregata (24h); 2) formiranje većih ćelijskih agregata uz produkciju EPS koja predstavlja obeležje biofilma (48h); 3) sazrevanje biofilma uz značajnu produkciju EPS što omogućava formiranje stabilne trodimenzionalne strukture biofilma (96h).

Do sličnih saznanja došli su Wang et al. (2013a), tokom sedmodnevnog praćenja razvoja biofilma na površinama čelika, mešavine kulture sačinjene od šest različitih sojeva vrste *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Indiana*, i *S. Infantis*) u TSB na temperaturi inkubiranja od 20°C i uz primenu CLSM i SEM. Naime, u okviru pomenutog istraživanja nakon prvog dana inkubiranja konstatovano je prisustvo uglavnom pojedinačnih ćelija neravnomerno distribuiranih po površini čelika uz formiranje manjih mikrokolonija. Trećeg dana su vizuelizovane strukture koje odgovaraju formacijama manjih ćelijskih agregata (klastera), dok se petog dana evidentirani viši strukturni kompleksi u vidu velikih mikrokolonija nepravilnog oblika koji pokrivaju više od 80% površine čelika.

U okviru pomenutog istraživanja, prisustvo struktura potpuno zrelog biofilma sačinjenog od velikih nepravilno raspoređenih ćelijskih agregata (klastera) je vizuelizovana sedmog dana ispitivanja. Na osnovu analiza formiranih biofilmova uz primenu Ramanove spektroskopije ovi autori su zaključili da disperzija biofilma i redukcija EPS nastupa oko sedmog dana (168h). U pomenutoj studiji sposobnost formiranja biofilma nije dovođena u vezu sa morfotipovima.

U oblasti proučavanja biofilma od tehnika mikroskopiranja pored konvencionalne SEM, CLSM zauzima vodeće mesto. Upotreba CLSM u cilju vizuelizacije struktura biofilma, osim što omogućava nedestruktivno *in situ* proučavanje ovih višćelijskih struktura, takođe daje i mogućnost primene različitih fluorescentnih markera. U zavisnosti od vrste primenjenog markera je moguća diferencijacija vijabilnih/nevijabilnih ćelija, detekcija polisaharidnih/proteinskih i drugih komponenti matriksa biofilma.

Ključna prednost ove tehnike, pored neinvazivnosti, je u mogućnosti sekcioniranja slojeva biofilma pri čemu se formira kolekcija podataka sačinjenih od mikrografija koje predstavljaju dvodimenzionalne preseke u XY ravni zajedno sa Z osom. Na osnovu ovakvih kolekcija podataka moguća je rekonstrukcija dobijenih mikrografija u tri dimenzije. Osim toga, analiza mikrografija uz primenu različitih specijalizovanih softverskih paketa kao što su ImageJ, COMSTAT,

BioimageL, IMARIS omogućava karakterizaciju formiranih biofilma na višem nivou.

Jedno od glavnih nedostataka primene CLSM jeste ograničenje uveličanja (maksimum 2000_x). Ovaj nedostatak se može nadomestiti kombinovanjem sa tehnikama koje imaju veće skale uveličanja kao što je SEM (100.000_x). Naime, SEM daje snimke visoke rezolucije sa velikom dubinskom oštrinom snimka zbog čega je pogodna za ispitivanje topografije bioloških uzoraka. Međutim, zbog neprovodnih karakteristika bioloških uzoraka fiksacija, dehidratacija i prekrivanje provodnim materijalom su neizostavni deo pripreme ovakvih uzoraka za vizuelizaciju ovom tehnikom (Priester et al., 2007; Hannig et al., 2010). Ovakav način pripreme uzoraka za posledicu ima narušavanje strukture, posebno strukture matriksa biofilma koja sama po sebi predstavlja izuzetno hidriranu strukturu, što ujedno predstavlja i glavni nedostatak ove tehnike.

Na osnovu dobijenih rezultata i dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da primenjene tehnike mikroskopiranja (CLSM) u kombinaciji sa skening elektronskom mikroskopijom (SEM) predstavljaju mikroskopske tehnike izbora za vizuelizaciju i određivanje karakteristika strukture biofilma.

5.6. Ispitivanja sadržaja i hemijskog sastava etarskih ulja

5.6.1. Sadržaj etarskih ulja

Etarska ulja su dobijena metodom hidrodestilacije u aparaturi po Clevenger-u. Postupkom hidrodestilacije iz ispitivanog biljnog materijala vrste *O. heracleoticum* izolovano je 2,0% (v/w) ulja, žuto crvenkaste boje, karakterističnog mirisa. Sadržaj etarskog ulja u biljnom materijalu vrste *O. vulgare* je bio nešto niži i iznosio je 1,8% (v/w). Etarsko ulje izolovano iz biljnog materijala *O. vulgare* je takođe posedovalo karakterističan miris, dok je boja ulja bila intenzivno žuta.

Iz ispitivanog biljnog materijala dve vrste timijana *Th. vulgaris* i *Th. serpyllum* izolovana je identična količina etarskog ulja u iznosu od 0,8% (v/w), svetlo žute boje i karakterističnog mirisa.

Vrstu *O. heracleoticum* karakteriše visok prinos etarskog ulja. Vokou et al. (1993) su ispitujući prinos etarskog ulja vrste *O. heracleoticum* sa dvadeset tri lokaliteta u Grčkoj, utvrdili da sadržaj ulja varira u opsegu od 1,76 do 7,0%, dok se prinos sa tri lokaliteta u Italiji

kretao u rasponu od 1,0 do 2,7% etarskog ulja (Mancini et al., 2014). Vrsta *O. vulgare* spada u vrste umereno bogate etarskim uljima. Sadržaj etarskih ulja ove vrste se kreće od 0,20 do 1,30% (Verma et al., 2010).

Određivanjem sadržaja etarskog ulja vrste *Th. vulgaris* poreklom iz Kolumbije ostvaren je prinos ulja u iznosu od 0,48%, (Roldán et al., 2010) što je u okviru granica tipičnih za ovaj rod. U ispitivanju sadržaja etarskog ulja iste vrste, poreklom iz Srbije, prinos etarskog ulja je bio znatno veći i iznosio je 2,8% (Stanković et al., 2011). Literaturni podaci pokazuju da je i prinos etarskog ulja vrste *Th. serpyllum* varijabilan i kreće se u rasponu od 0,1% kod uzorka poreklom iz Srbije (Petrović et al., 2014) do 2,9% kod uzorka poreklom iz Pakistana (Hussain et al., 2013).

Iako je sadržaj etarskog ulja u aromatičnim biljkama genetski determinisan, takođe je poznato da mnogi endogeni i egzogeni faktori mogu imati veliki uticaj na njegovu produkciju.

Generalno, sadržaj etarskog ulja je podložan sezonskim varijacijama i zavisi od fenofaze u kojoj se biljka nalazi, pri čemu se najveći prinos ulja dostiže u vreme faze punog cveta (Verma et al., 2010).

5.6.2. Hemijski sastav etarskih ulja

Ispitivanje hemijskog sastava sekundarnih metabolita izolovanih iz *Origanum* i *Thymus* vrsta je sprovedeno metodom gasne hromatografije kuplovane sa maseno spektrometrijskom detekcijom. Kvalitativni i kvantitativni sastav ispitivanih etarskih ulja je dat u Tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Kvalitativni i kvantitativni hemijski sastav etarskih ulja *Origanum* spp. i *Thymus* spp: *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1) i *Th. serpyllum* (T2)

Br.	Biljna vrsta		<i>Origanum</i> spp.		<i>Thymus</i> spp.	
	Komponenta	K.I. ^a	O1	O2	T1	T2
1.	triciklen	917,3	-	0,06	0,13	0,14
2.	α-tujen	923,0	0,63	0,25	0,19	0,36
3.	α-pinen	928,5	0,73	1,35	0,76	1,22
4.	kamfen	942,5	0,24	0,39	0,27	0,66
5.	sabinen	971,0	0,21	-	-	-
6.	β-pinen	971,2	0,16	0,55	0,03	0,04
7.	1-okten-3-ol	982,0	0,73	0,14	0,16	0,24
8.	mircen	989,1	1,38	0,87	0,79	1,02
9.	α-felandren	1001,2	0,16	0,13	0,92	0,95
10.	Δ-3-karen	1006,5	0,08	0,1	0,13	0,11
11.	α-terpinen	1013,0	1,33	1,05	1,25	1,1
12.	p-cimen	1023,1	7,7	19,9	18,71	34,84
13.	β-felandren	1025,5	0,39	0,51	0,48	0,67
14.	1,8-cineol	1027,2	0,08	0,16	0,61	0,05
15.	(Z)-β-ocimen	1037,6	0,26	0,04	-	-
16.	(E)-β-ocimen	1047,4	0,02	0,02	-	-
17.	trans-dekahidro-naftalen	1047,4	-	-	0,04	0,02
18.	γ-terpinen	1055,5	6,85	3,11	4,34	4,38
19.	cis-sabinen hidrat	1067,3	-	-	0,14	0,25
20.	terpinolen cineol	1084,9	0,16	-	0,06	0,04
21.	p-ment-2,4(8)-dien	1085,5	-	0,02	-	-
22.	cis-dekahidro-naftalen	1091,5	-	0,03	0,21	0,02
23.	undecan	1096,9	0,07	0,18	0,05	0,21
24.	linalol	1100,7	0,23	0,26	2,52	2,95
25.	kamfor	1141,2	-	0,1	0,08	0,35
26.	menton	1152,8	-	-	0,17	0,21
27.	borneol	1165,0	0,58	0,58	0,74	1,21
28.	terpinen-4-ol	1176,3	0,71	0,78	1,27	1,12
29.	α-terpineol	1192,7	-	-	0,24	0,22
30.	trans-dihidrokarvon	1199,4	0,07	0,12	0,17	0,45
31.	dodekan	1200,1	0,26	0,39	0,12	0,12
32.	dihidro citronelol	1215,2	-	-	0,11	0,08
33.	metil etar timola	1233,7	0,04	-	0,2	0,41
34.	metil etar karvakrola	1242,5	0,32	0,54	0,49	0,51
35.	karvon	1252,7	-	-	0,05	0,05
36.	tetrahidro citronelen	1269,2	0,05	0,04	0,03	0,07
37.	karvenon	1272,0	-	-	0,18	0,23
38.	1-tridekan	1283,8	-	-	t	0,04
39.	bornil acetat	1289,3	-	-	0,1	0,12
40.	izobornil acetat	1289,3	0,05	0,14	-	-
41.	tridekan	1296,3	0,06	0,1	0,07	0,28
42.	timol	1309,1	1,62	4,76	43,2	34,48

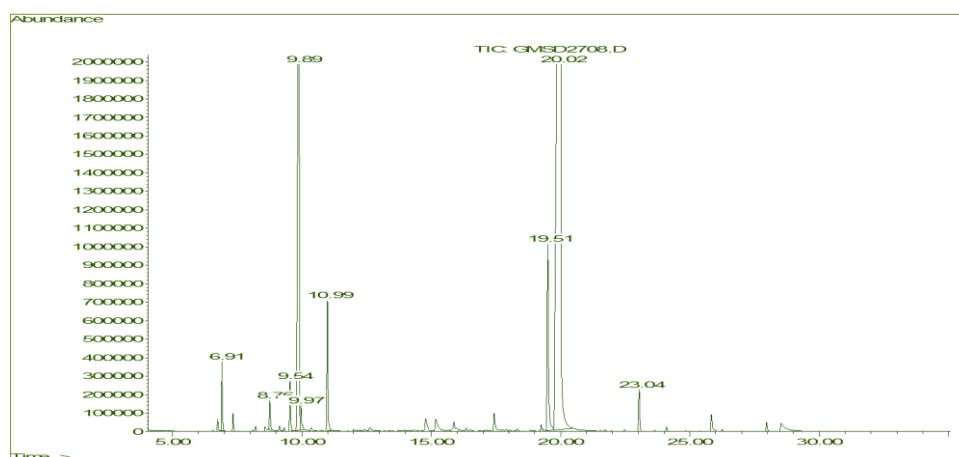
Tabela 5.4. (Nastavak)

Br.	Biljna vrsta		Origanum spp.		Thymus spp.	
	Komponenta	K.I. ^a	O1	O2	T1	T2
43.	karvakrol	1317,1	69,98	58,84	16,57	5,56
44.	timol acetat	1355,4	-	-	0,03	0,03
45.	karvakrol acetat	1355,6	-	-	0,06	0,07
46.	α-ylangene	1367,0	-	-	0,04	0,03
47.	α-kopaen	1371,6	-	-	0,05	0,08
48.	α-kubeben	1371,6	0,08	0,08	-	-
49.	β-bourbonen	1380,7	0,04	0,05	0,04	0,07
50.	tetradekan	1396,5	0,05	0,05	0,05	0,01
51.	trans-β-kariofilen	1414,6	1,29	1,04	1,01	0,88
52.	aromadendren	1439,0	0,06	0,05	-	-
53.	α-humulen	1449,1	0,14	0,14	0,08	0,12
54.	γ-muurolen	1472,8	0,02	-	0,06	0,09
55.	germakren-D	1484,0	0,04	0,04	-	-
56.	γ-amorfen	1490,9	-	-	0,06	0,04
57.	viridifloren	1496,0	0,08	0,05	-	-
58.	α- muurolen	1496,7	0,08	-	0,05	0,07
59.	β-bisabolen	1506,0	0,66	0,63	0,21	0,08
60.	γ-kadinen	1510,0	0,04	0,04	0,12	0,17
61.	δ-kadinen	1519,9	0,14	0,1	0,16	0,21
62.	spatulenol	1577,0	0,08	-	-	-
63.	kariofilen oksid	1579,2	0,3	0,3	0,53	0,26
64.	1,10-di epi kubenol	1612,4	-	-	0,02	0,03
65.	10-epi-γ-eudesmol	1616,9	-	-	0,02	0,05
66.	τ-kadinol (epi-α-kadinol)	1639,2	-	-	0,05	0,11
67.	epi-α-muurolen	1653,0	-	-	-	0,06
68.	kadalen	1674,2	0,07	-	0,04	0,02
Ukupno			98,32	98,08	98,26	97,26
Ugljovodonični monoterpeni			20,38	28,49	28,67	45,58
Oksidovani monoterpeni			73,65	66,18	66,35	48,37
Ugljovodonični seskviterpeni			2,67	2,22	1,88	1,84
Oksidovani seskviterpeni			0,45	0,3	0,66	0,53
Ugljovodonici			0,44	0,75	0,54	0,7
Ostalo			0,73	0,14	0,16	0,24

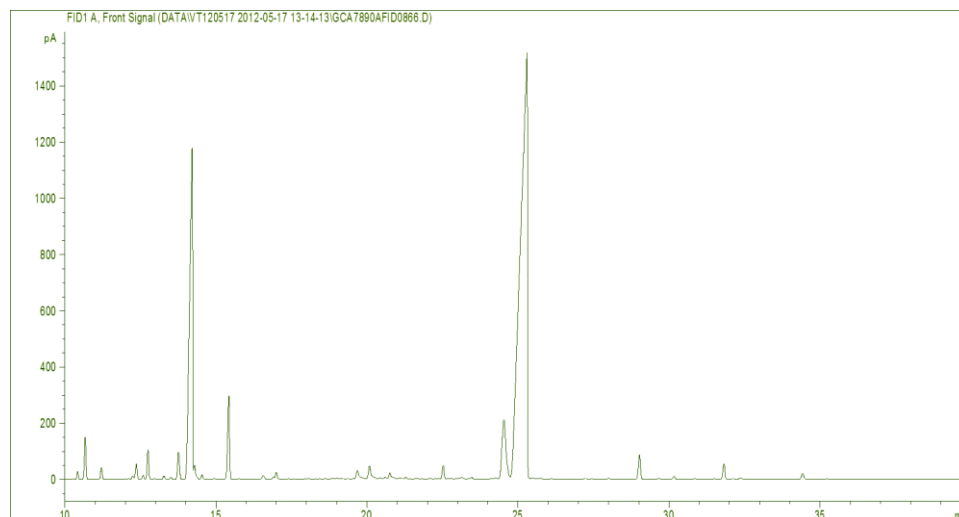
KI^a: literaturne vrednosti (Adams, 2007)

5.6.2.1. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja *Origanum heracleoticum*

Primenjenim GC i GC/MS analizama u etarskom ulju *O. heracleoticum* identifikovano je 46 jedinjenja, što predstavlja 98,32% etarskog ulja, a dobijeni hromatogrami su prikazani na Slikama 5.38 i 5.39.



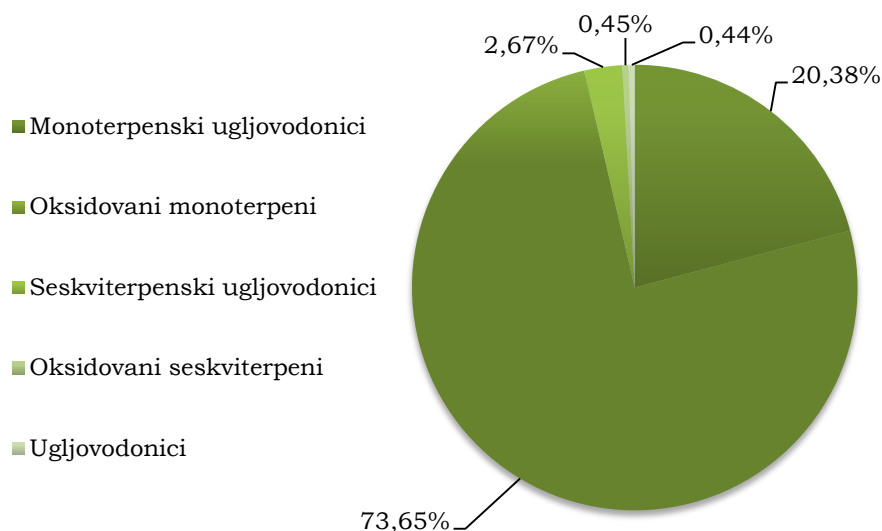
Slika 5.38. GC/MS hromatogram etarskog ulja biljne vrste *O. heracleoticum*



Slika 5.39. GC/FID hromatogram etarskog ulja biljne vrste *O. heracleoticum*

U analiziranom ulju *O. heracleoticum* dominantnu grupu jedinjenja su predstavljali monoterpeni (94,03%), među kojima je utvrđeno znatno više oksidovanih jedinjenja (73,65%) nego ugljovodonika (20,38%).

Zastupljenost seskviterpenskih jedinjenja je bila niska (3,12%) (Slika 5.40).



Slika 5.40. Procenat dominantnih grupa jedinjenja u etarskom ulju *O. heracleoticum*

Kao najzastupljenije jedinjenje u etarskom ulju *O. heracleoticum* je identifikovano fenolno jedinjenje, aromatični monoterpeni alkohol karvakrol (69,98%). Druga fenolna komponenta karakteristična za etarska ulja ove vrste, timol, je zabeležena u nižem procentu (1,62%). U značajnijem udelu je utvrđeno prisustvo ugljovodonika *p*-cimena (7,7%) i γ -terpinena (6,85%). Izuzev mircena (1,38%), α -terpinena (1,33%) i trans β -kariofilena (1,29%), sva ostala jedinjenja su bila prisutna u količini manjoj od 1%.

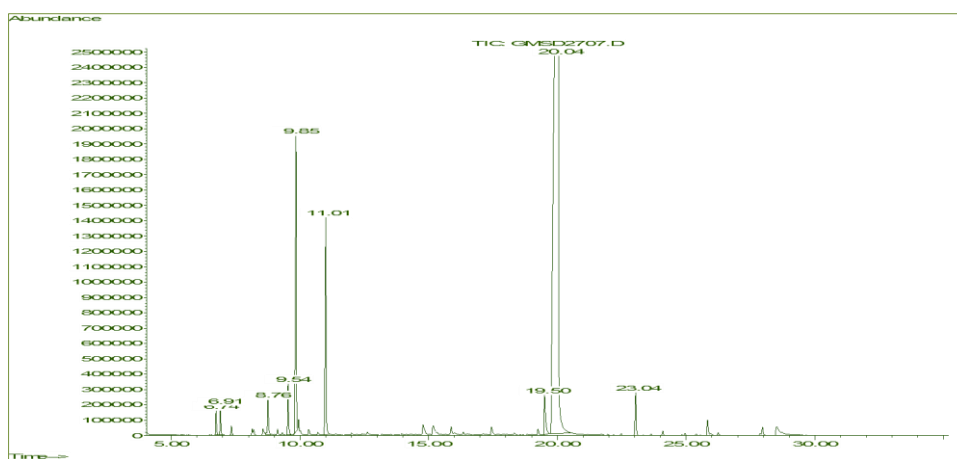
Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima hemijskog sastava etarskog ulja *O. heracleoticum* poreklom iz Grčke (Govaris et al., 2010), u okviru kojeg su kao najzastupljenije komponente ovog etarskog ulja identifikovani karvakrol (80,15%), *p*-cimen (5,18%), timol (4,82%) i γ -terpinen (2,80%). U istraživanju Azizi et al. (2009) kao najzastupljenije komponente etarskog ulja *O. heracleoticum* poreklom iz Nemačke su takođe identifikovani karvakrol (77,4%), *p*-cimen (5,3%) i γ -terpinen (8,1%), dok je udeo timola bio nešto niži i iznosio je 0,3%. U velikom broju studija koje su se bavile ispitivanjem hemijskog sastava etarskog ulja *O. heracleoticum* konstatovana je dominacija fenolnih komponenti karvakrola i/ili timola (Džamić et al., 2008; Roldán et al., 2010; Mancini et al., 2014). Kokkini et al. (1997) su ispitujući hemijski sastav etarskog

ulja *O. heracleoticum* sakupljenih sa šest lokaliteta iz tri geografski razdvojene oblasti Grčke, utvrdili da ulja dobijena iz biljnog materijala prikupljenog sa lokaliteta smeštenih u severnom delu zemlje bogatija timolom, dok su ulja dobijena iz biljnog materijala prikupljenog sa južnijih lokaliteta bogatija karvakrolom.

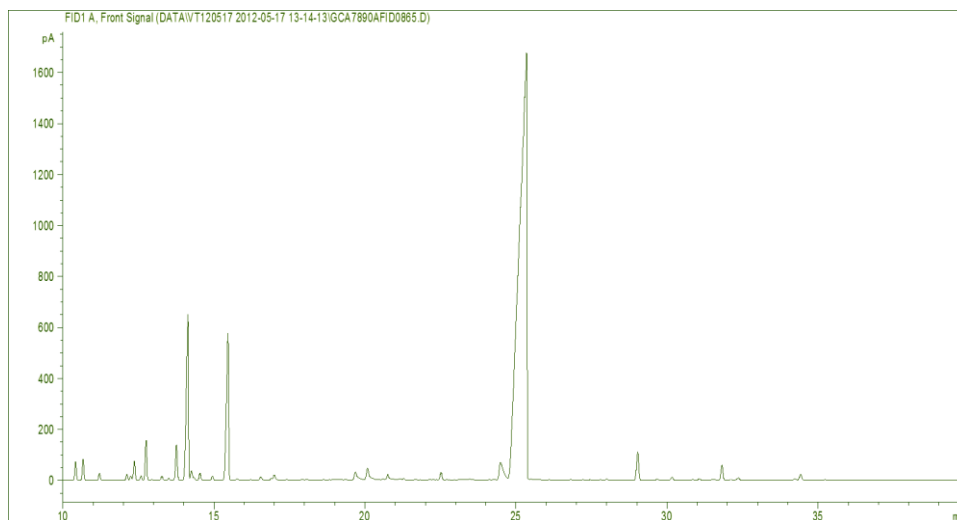
Nasuprot ovim istraživanjima, u etarskim uljima dobijenih od biljne vrste *O. heracleoticum* prikupljenih sa tri različita lokaliteta na jugu Italije, De Martino et al. (2009) su identifikovali različite dominantne komponente ulja u sva tri uzorka: karvakrol/timol, timol/ α -terpineol i linalil-acetat/linalol. Linalol je u našem uzorku bio zastupljen sa svega 0,23%, dok prisustvo linalil-acetata i α -terpineola nije registrovano ni u tragovima.

5.6.2.2. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja *Origanum vulgare*

Primenjenim analizama u etarskom ulju *O. vulgare* identifikovano je ukupno 43 jedinjenja, što predstavlja 98,08% etarskog ulja, a dobijeni hromatogrami su prikazani na Slikama 5.41. i 5.42.

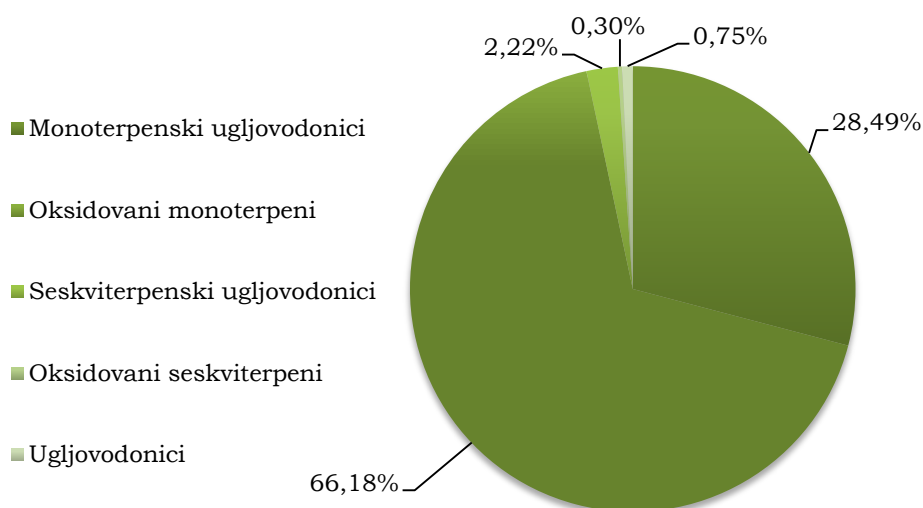


Slika 5.41. GC/MS hromatogram etarskog ulja biljne vrste *O. vulgare*



Slika 5.42. GC/FID hromatogram etarskog ulja biljne vrste *O. vulgare*

Upoređivanjem osnovnih grupa identifikovanih jedinjenja u etarskom ulju *O. vulgare* može se uočiti da je, kao i u slučaju etarskog ulja *O. heracleoticum*, udeo monoterpena (94,67%), daleko veći nego udeo seskviterpenskih jedinjenja (2,52%) (Slika 5.43.). U grupi monoterpena su dominantni oksidovani monoterpeni (66,18%) zahvaljujući visokim kvantitativnim vrednostima fenolnih jedinjenja, pre svega karvakrola (58,84%). Kvantitativna vrednost drugog značajnog fenolnog jedinjenja, timola je bila niska (4,76%).



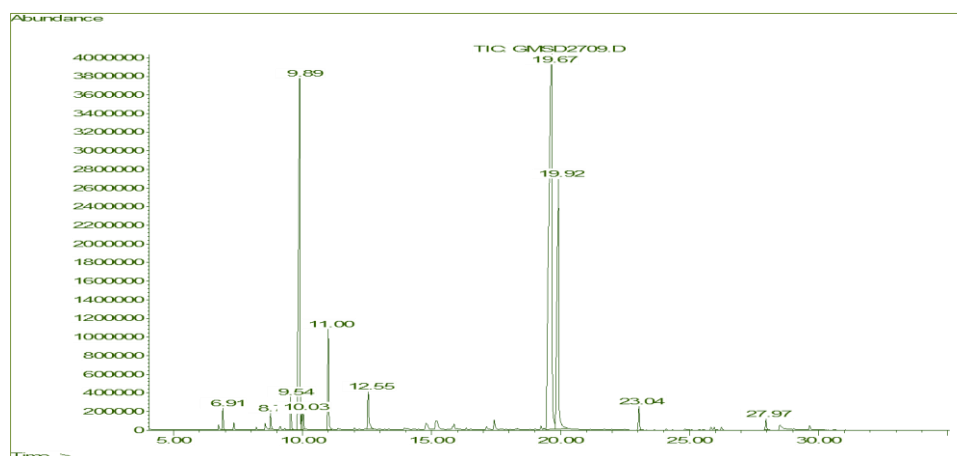
Slika 5.43. Procenat dominantnih grupa jedinjenja u etarskom ulju *O. vulgare*

Među monoterpenskim ugljovodonicima (28,49%) u većoj količini utvrđeno je prisustvo *p*-cimena (19,9%) i γ -terpinena (3,11%). Od ostalih jedinjenja u značajnom procentu je zabeleženo prisustvo α -pinena (1,35%), α -terpinena (1,05%) i trans β -kariofilena (1,04%). Ispitivanjem sezonskih varijacija u hemijskom sastavu etarskog ulja *O. vulgare* poreklom iz Indije, Verma et al. (2010) su identifikovali karvakrol kao najdominantniju komponentu etarskog ulja. Udeo ove fenolne komponente je iznosio 35,02% za vreme zimskog perioda, a najveći udeo je zabeležen u prolećnoj sezoni i iznosio je 62,81%. Udeo timola je bio konstantno nizak i kretao se u opsegu od 0,37-0,70% u zavisnosti od sezone. Najveća količina ugljovodonika *p*-cimena je zabeležena u zimskom periodu (46,59%), a najniža tokom prolećnog perioda (8,60%). Za razliku od *p*-cimena, udeo γ -terpinena je bio najniži tokom zime (2,49%), a najviši tokom leta (19,11%).

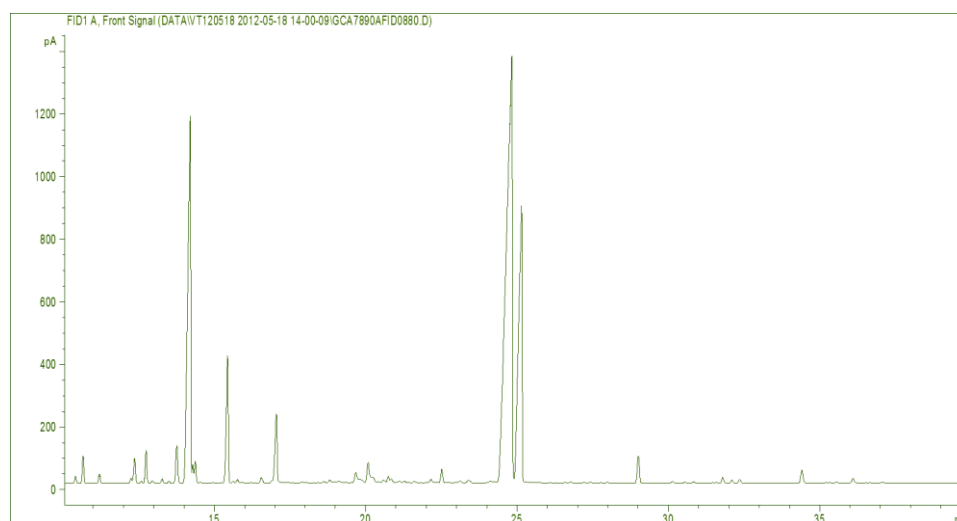
Do sličnih rezultata su došli Stojković et al. (2013) ispitivanjem hemijskog sastava etarskog ulja *O. vulgare* poreklom iz Srbije. U okviru navedenog istraživanja kao najdominantnija komponenta etarskog ulja *O. vulgare* je identifikovan karvakrol (64,50%), sadržaj ugljovodonika *p*-cimena (10,90%) i γ -terpinena (10,80%) je bio ujednačen, dok je sadržaj timola iznosio 3,50%. Nasuprot ovim istraživanjima Quiroga et al. (2013) su u etarskom ulju *O. vulgare* poreklom iz Argentine kao glavne komponente identifikovali γ -terpinen (32,10%), α -terpinen (15,10%), *p*-cimen (8,00%), timol (8,00%) i β -felandren (7,10%). U istraživanju hemijskog sastava etarskog ulja *O. vulgare* poreklom iz Jordana (Al-Kalaldehy et al., 2010) kao dominantna komponenta etarskog ulja identifikovan je sabinen hidrat (27,19%). Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima hemijskog sastava etarskog ulja *O. vulgare* dobijenog u okviru ove doktorske disertacije, s obzirom da sabinen hidrat nije detektovan čak ni u tragovima u našem uzorku etarskog ulja ove biljne vrste.

5.6.2.3. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja *Thymus vulgaris*

Primenjenim GC i GC/MS analizama u etarskom ulju *Th. vulgaris* identifikovano je 57 jedinjenja, što predstavlja 98,26% etarskog ulja, a dobijeni hromatogrami su prikazani na Slikama 5.44. i 5.45.



Slika 5.44. GC/MS hromatogram etarskog ulja biljne vrste *Th. vulgaris*

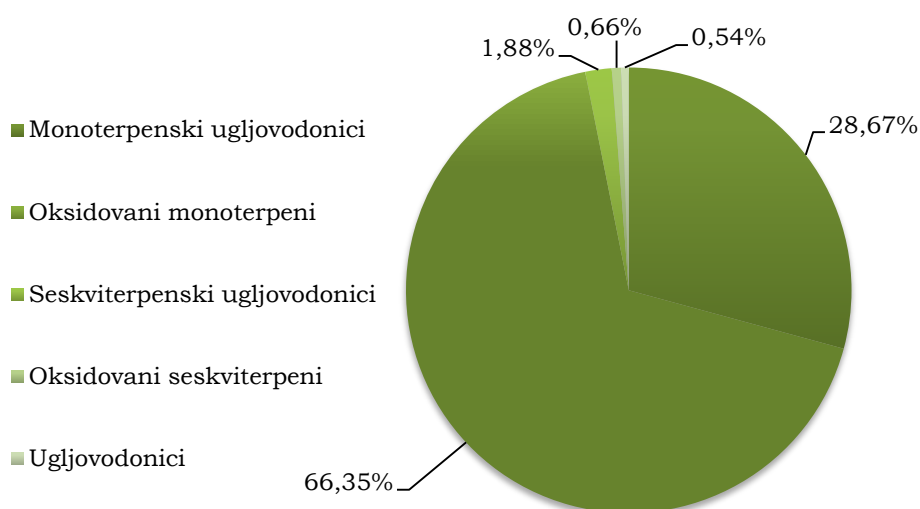


Slika 5.45. GC/FID hromatogram etarskog ulja biljne vrste *Th. vulgaris*

U analiziranom ulju *Th. vulgaris* dominantnu grupu jedinjenja su predstavljali monoterpeni (95,02%). U okviru monoterpenskih jedinjenja je bilo znatno više oksidovanih jedinjenja (66,35%) nego ugljovodonika (28,67%). U malom procentu u ulju su bili prisutni i seskviterpeni (2,54%) (Slika 5.46.).

Kao najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju *Th. vulgaris* su identifikovani aromatični monoterpenski alkohol timol (43,2%), zatim ugljovodonik p-cimen (18,71%), karvakrol (16,57%) i γ -terpinen (4,34%). Osim linalola (2,52%), terpinen-4-ola (1,27%), α -terpinena (1,25%), i trans β -kariofilena (1,01%), sva ostala jedinjenja su bila prisutna u količini manjoj od 1%.

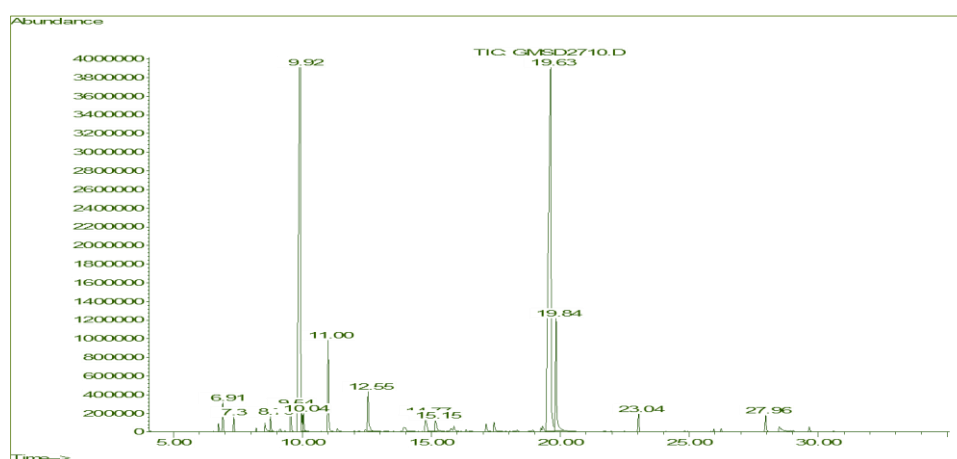
Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Govaris et al. (2011) u okviru kojeg su kao glavne komponente etarskog ulja *Th. vulgaris* poreklom iz Grčke identifikovani timol (44,30%), karvakrol (14,20%), p-cimen (19,80%) i γ -terpinen (4,20%). Nikolić et al. (2014) su ispitivanjem kvalitativnog i kvantitativnog hemijskog sastava etarskog ulja *Th. vulgaris* poreklom iz Srbije kao glavne komponente pomenutog etarskog ulja takođe identifikovali timol (49,1%), karvakrol (3,5%), p-cimen (20,0%) i γ -terpinen (4,2%). Prisustvo timola kao glavne komponente etarskog ulja *Th. vulgaris* potvrđeno je i u nizu ispitivanja hemijskog sastava etarskog ulja *Th. vulgaris* poreklom sa različitih geografskih lokaliteta: Španija (Rota et al., 2008), Kolumbija (Roldán et al., 2010), Srbija (Stojković et al., 2013) i Iran (Pirbalouti et al., 2013).



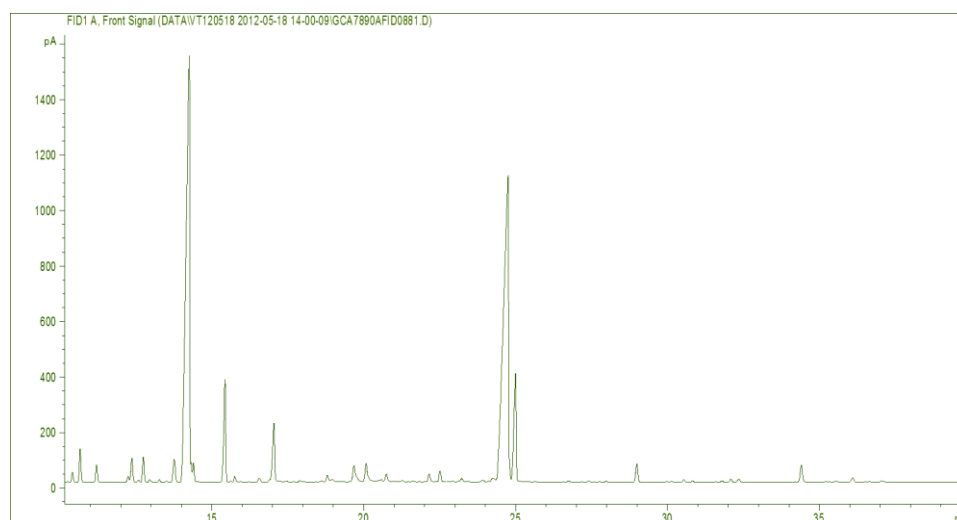
Slika 5.46. Procenat dominantnih grupa jedinjenja u etarskom ulju *Th. vulgaris*

5.6.2.4. Analiza hemijskog sastava etarskog ulja *Thymus serpyllum*

Primenjenim analizama u etarskom ulju *Th. serpyllum* identifikovano je 58 jedinjenja, što predstavlja 97,26% etarskog ulja, a dobijeni hromatogrami su prikazani na Slikama 5.47. i 5.48.



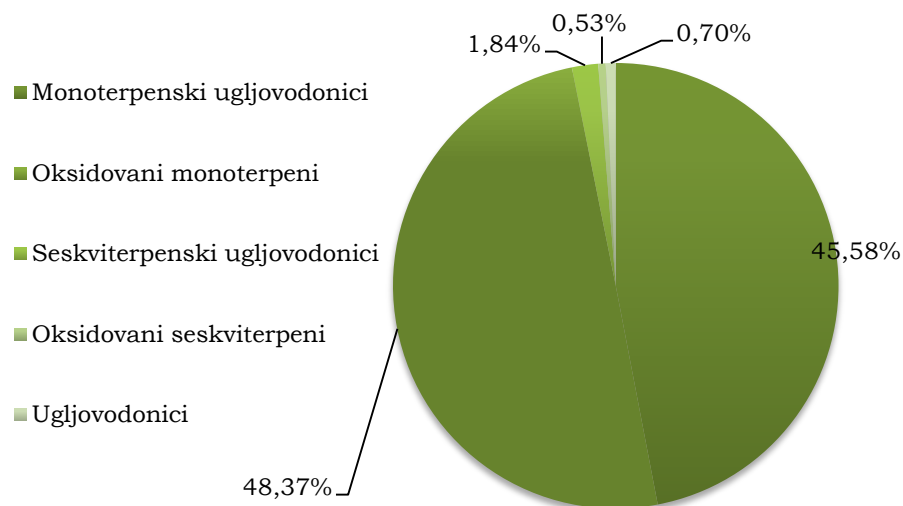
Slika 5.47. GC/MS hromatogram etarskog ulja biljne vrste *Th. serpyllum*



Slika 5.48. GC/FID hromatogram etarskog ulja biljne vrste *Th. serpyllum*

Upoređivanjem osnovnih grupa identifikovanih jedinjenja u analiziranom ulju *Th. serpyllum* najzastupljeniju grupu jedinjenja su činili monoterpeni (93,95%) sa približno istim udelom ugljovodonika

(45,58%) i oksidovanih jedinjenja (48,37%). U malom procentu u ulju su bili prisutni i seskviterpeni (2,37%) (Slika 5.49.).



Slika 5.49. Procenat dominantnih grupa jedinjenja u etarskom ulju *Th. serpyllum*

Kao najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju *Th. serpyllum* identifikovani su aromatični monoterpeni timol (34,48%), zatim ugljovodonik p-cimen (34,84%), karvakrol (5,56%) i γ -terpinen (4,38%). Osim linalola (2,95%), α -pinena (1,22%), terpinen-4-ola (1,12%), α -terpinena (1,1%) i mircena (1,02%), sva ostala jedinjenja su bila prisutna u količini manjoj od 1%.

Dobijeni rezultati ove studije su u saglasnosti sa istraživanjima Nikolić et al. (2014) u okviru kojih su kao glavne komponente etarskog ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Grčke identifikovani timol (38,5%), karvakrol (4,7%), p-cimen (8,9%) i γ -terpinen (7,2%). Ispitujući kvalitativni i kvantitativni hemijski sastav ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Pakistana Ahmad et al. (2006) su takođe identifikovali timol (53,3%), karvakrol (10,4%), p-cimen (8,8%) i γ -terpinen (1,9%) kao glavne komponente ovog etarskog ulja. U ispitivanjima etarskih ulja vrste *Th. serpyllum* poreklom iz Hrvatske (Kulisic et al., 2005) i Pakistana (Hussain et al., 2013) identifikovane su iste glavne komponente, ali sa dominacijom karvakrola nad timolom. U istraživanju Eweis et al. (2012) kao dominantne komponente etarskog ulja *Th. serpyllum* identifikovani

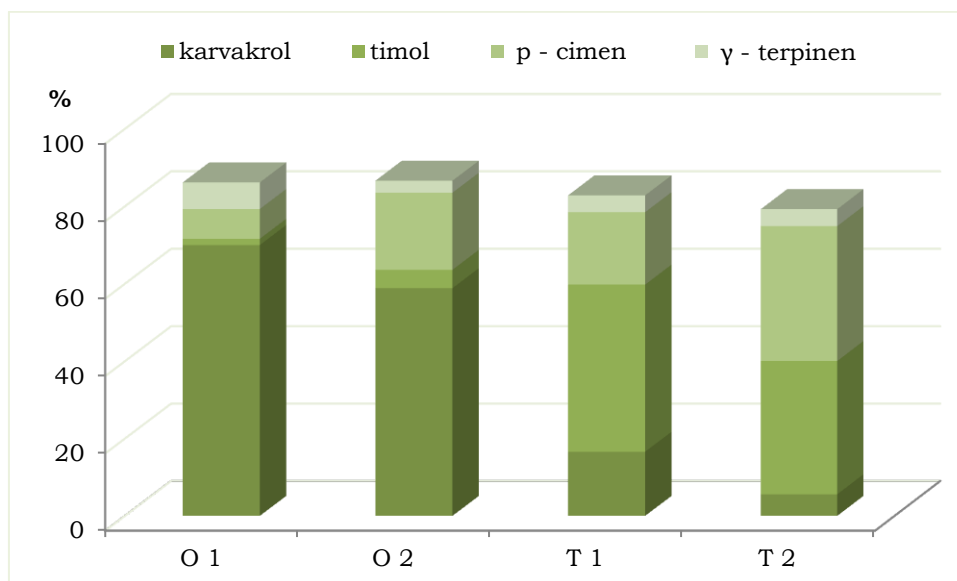
su timol (64,2%), β -felandren (13,5%), cis-sabinen hidrat (8,09%), 1,8-cineol (1,9%) i β -pinen (1,3%).

Sa druge strane određivanje sadržaja etarskog ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Srbije pokazalo je da etarsko ulje sadrži visok nivo seskviterpenskih jedinjenja, čak 69,84% sa dominacijom trans-nerolidola (24,20%) i seskviterpenskog ugljovodonika germakrena-D (16,02%), dok je sadržaj monoterpenskih komponenti iznosio 29,21% u okviru kojih je dominantno jedinjenje bio timol (7,26%) (Petrović et al., 2014).

Visok procenat seskviterpena (60,5%), je pokazan i ispitivanjem samonikle vrste *Th. serpyllum* sa područja Kopaonika. Dominantna komponenta iz klase seskviterpena je bio trans-kariofilen (27,7%). U značajnom procentu zabeleženo je i prisustvo γ -murolena (10,5%), α -humulena (7,5%), β -bisabolola (2,6%) i trans-nerolidola (2,4%). Sadržaj monoterpenskih komponenti je iznosio (37,9%) sa α -pinenom kao dominantnom komponentom (6,9%). Timol (5,6%), predstavnik fenolnih jedinjenja, je bio šesto jedinjenje po zastupljenosti, dok prisustvo karvakrola nije evidentirano (Stanisavljević et al., 2012).

Ispitivana etarska ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Srbije karakteriše visok procenat seskviterpena, kao i prisustvo trans-nerolidola, odnosno trans-kariofilena kao dominantnih komponenti pomenutih etarskih ulja. Navedeni rezultati istraživanja hemijskog sastava etarskih ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Srbije nisu u saglasnosti sa rezultatima hemijskog sastava etarskog ulja *Th. serpyllum* dobijenog u okviru ove disertacije. S obzirom da je u uzorku etarskog ulja *Th. serpyllum* ispitanog u okviru ove disertacije udeo seskviterpenske frakcije iznosio svega 2,37%, a od pomenutih dominantnih komponenti detektovano je samo prisustvo trans-kariofilena i to u vrlo niskom procentu (0,88%). Neusaglašenost između rezultata hemijskog sastava pomenutih uzoraka etarskih ulja *Th. serpyllum* poreklom iz Srbije kako međusobno tako i sa uzorkom analiziranim u okviru ove disertacije ukazuje na očigledno postojanje i drugih hemijskih varijeteta, odnosno hemotipova u okviru ove vrste na teritoriji Srbije.

Zbirni udeo glavnih fenolnih komponenti karvakrola i timola kao i njihovih prekursora p-cimena i γ -terpinena u ispitivanim etarskim uljima biljnih vrsta roda *Origanum* je bio visok i iznosio je 86,15% za etarsko ulje *O. heracleoticum*, odnosno 86,61% za etarsko ulje *O. vulgare* (Slika 5.50.).



Slika 5.50. Procenat dominantnih komponenti etarskih ulja *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1) i *Th. serpyllum* (T2)

Do sličnih saznanja su došli Vokou et al. (1993) ispitivanjem etarskih ulja *O. heracleoticum* sa dvadeset tri lokaliteta u Grčkoj. Naime, pomenuti autori su zaključili da uprkos varijabilnosti pojedinačnih komponenti u etarskim uljima biljne vrste *O. heracleoticum*, zbirni udeo glavnih komponenti karvakrola, timola, *p*-cimen i γ -terpinena je stabilan i iznosi više od 80%. Takođe je u velikom broju studija potvrđeno da dominantne komponente mogu činiti više od 80% etarskog ulja (Jerković et al., 2001; Džamić et al., 2008). U ispitivanim uzorcima etarskih ulja biljnih vrsta roda *Thymus* udeo ova četiri jedinjenja je bio nešto niži, u odnosu na rod *Origanum*, i iznosio je 82,82% za etarsko ulje *Th. vulgaris*, odnosno 79,26% za etarsko ulje *Th. serpyllum* (Slika 5.50.).

Etarska ulja izolovana iz ispitivanih uzoraka biljnog materijala poreklom od vrsta *O. heracleoticum* i *O. vulgare* se odlikuju veoma visokim sadržajem karvakrola 69,98%, odnosno 58,84%, i može se zaključiti da pripadaju karvakrol tipu.

Etarska ulja izolovana iz ispitivanih uzoraka biljnog materijala poreklom od vrsta *Th. vulgaris* i *Th. serpyllum* se odlikuju visokim sadržajem timola 43,2%, odnosno 34,48% i može se zaključiti da pripadaju timol tipu. Druga dva dominantna jedinjenja ispitivanih uzoraka etarskih ulja su biohemijski prekursori karvakrola i timola monoterpenski ugljovodonici *p*-cimen i γ -terpinen. Ovi monoterpenski ugljovodonici su neizostavne komponente etarskih ulja koja pripadaju

karvakrol i/ili timol hemotipu, s obzirom da je u slučaju ovih fenolnih komponenti metabolički put kroz autooksidativnu konverziju γ -terpinena u p-cimen praćen hidroksilacijom p-cimena u timol ili karvakrol.

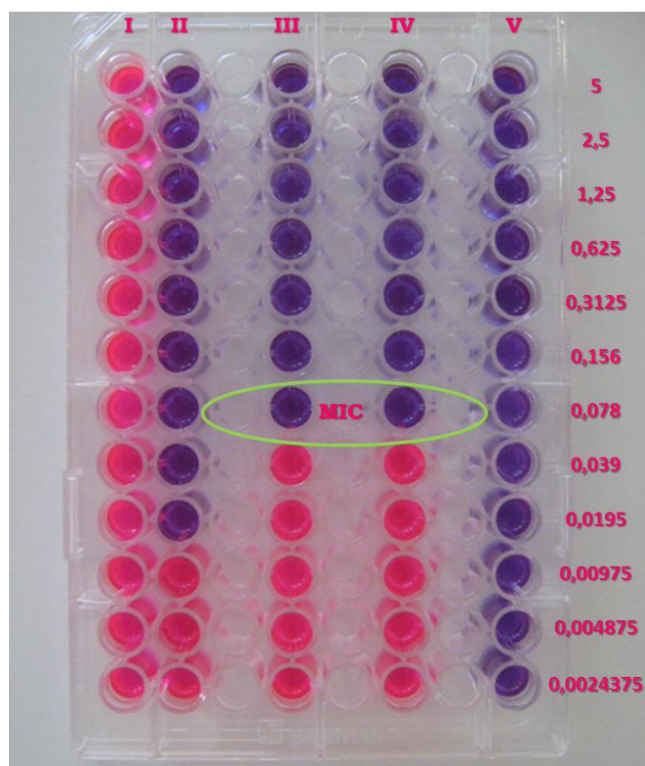
Uparedna analiza rezultata hemijskog sastava etarskih ulja dobijenih u okviru ove disertacije sa rezultatima iz literaturnih podataka ukazuje na postojanje sličnosti, ali i razlika u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog hemijskog sastava ispitivanih etarskih ulja. Hemijski polimorfizam je izražen naročito kada su u pitanju različiti hemotipovi iste vrste.

Pomenute razlike u hemijskom sastavu etarskih ulja iste vrste se mogu objasniti ukoliko se uzmu u obzir svi faktori koji imaju uticaja na biosintezu i hemijski sastav etarskih ulja kao što su klimatski, sezonski i geografski uslovi, fenofaza u kojoj se biljke nalaze prilikom sakupljanja biljnog materijala kao i sama tehnika destilacije.

Tokom proteklih decenija kvalitativni i kvantitativni sastav većine etarskih ulja je intenzivno ispitivan i dokumentovan u literaturi. Dobijeni rezultati hemijskog sastava etarskih ulja su značajni u smislu evaluacije kvaliteta etarskih ulja, s obzirom da je utvrđivanje hemijskog sastava etarskih ulja vrlo značajano u kontekstu njihove primene u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji kao i industriji hrane za životinje.

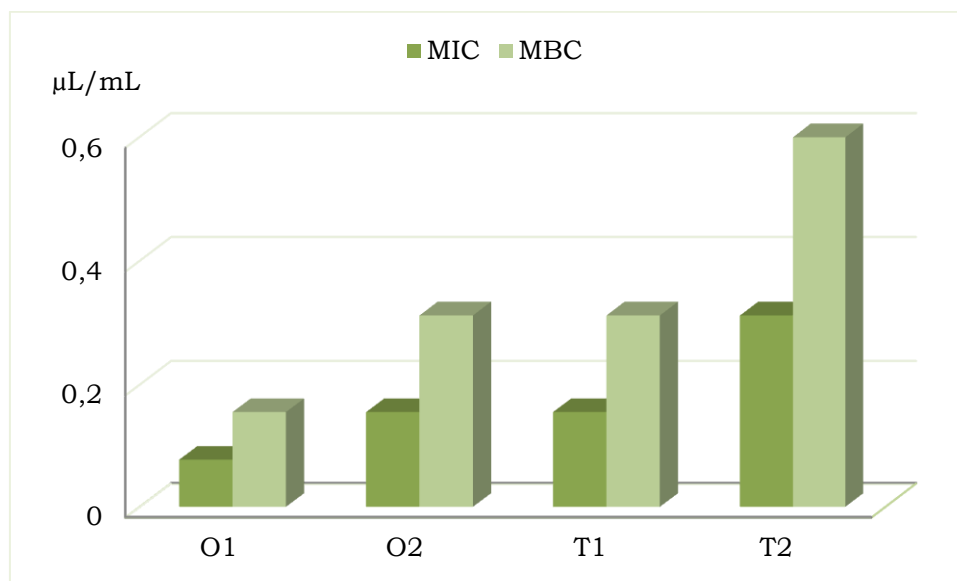
5.7. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

U testovima ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja karvakrola i timola MIC je definisana kao najniža koncentracija etarskog ulja koja je inhibirala vidljivi rast test mikroorganizama, a određena je na osnovu redukcije resazurina i predstavljena je onom koncentracijom etarskog ulja koja je sprečila redukciju resazurina (Slika 5.51.). MBC je određena kao najniža koncentracija pri kojoj je zabeleženo kompletno odsustvo bakterijskog rasta.



Slika 5.51. Izgled mikrotitar ploče nakon reinkubiranja: pozitivna kontrola I/kontrola rasta mikroorganizama (I), pozitivna kontrola II (II), test bunarići sa etarskim uljem (III i IV) i kontrola sterilnosti (V)

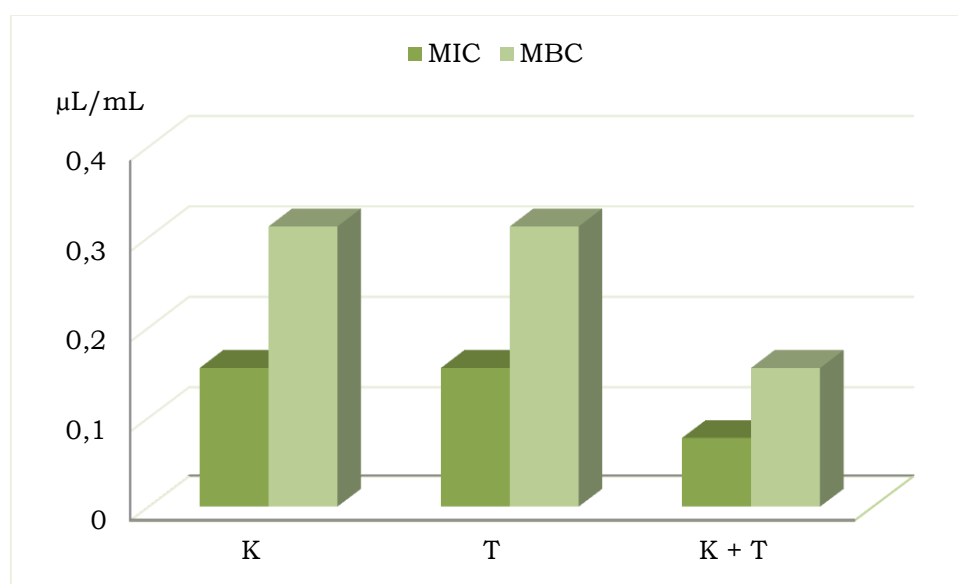
U odgovoru na tretman etarskim uljima i streptomycinom nije utvrđena razlika između ispitivanih izolata *S. Enteritidis* (SE2-SE15) uključujući i referentni soj *S. Enteritidis* ATCC 13076 (SE1). Vrednosti MIC i MBC za svako etarsko ulje i dominantne komponente su prikazane na Slikama 5.52. i 5.53.



Slika 5.52. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ispitivanih etarskih ulja: *O. heracleoticum* (O1), *O. vugare* (O2), *Th. vulgaris* (T1) i *Th. serpyllum* (T2) na testirane izolate *S. Enteritidis*

Vrednosti MIC i MBC za primenjeni antibiotik su bile niže u poređenju sa testiranim etarskim uljima MIC/MBC=0,0195/0,039 µL/mL. Najveći antimikrobni efekat na testirane izolate pokazalo je etarsko ulje *O. heracleoticum* MIC/MBC=0,078/0,156 µL/mL. Nešto manji efekat pokazala su etarska ulja poreklom od vrsta *O. vugare* i *Th. vulgaris* MIC/MBC=0,156/0,3125 µL/mL, dok je etarsko ulje *Th. serpyllum* u poređenju sa ostalim etarskim uljima pokazalo najmanji efekat na testirane izolate MIC/MBC=0,3125/0,625 µL/mL (Slika 5.52).

Pojedinačne komponente etarskih ulja karvakrol i timol su imale ujednačen efekat prema testiranim izolatima MIC/MBC=0,156/0,3125 µL/mL, dok je smeša karvakrola i timola u odnosu 1:1 pokazala intenzivniji efekat u odnosu na pojedinačno testirane aktivne komponente MIC/MBC=0,078/0,156 µL/mL (Slika 5.53.).



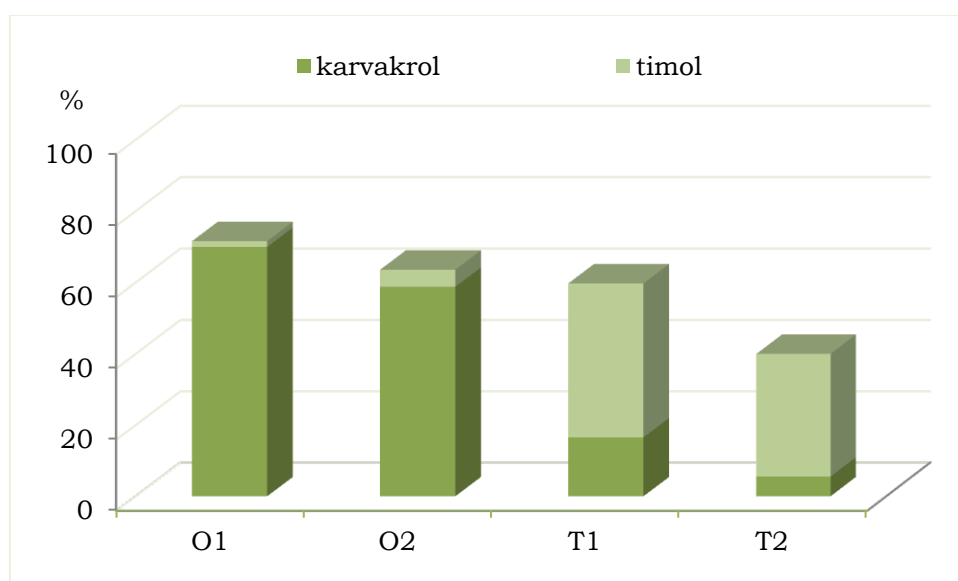
Slika 5.53. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) karvakrola (K), timola (T) i njihove kombinacije (K+T) na testirane izolate *S. Enteritidis*

Veoma intenzivan antimikrobni efekat etarskog ulja *O. heracleoticum* MIC/MBC=0,078/0,156 µL/mL je najverovatnije posledica prvenstveno visoke zastupljenosti fenolnih jedinjenja 71,6% (karvakrol + timol) (Slika 5.53.), ali i njihovog sinergističkog efekta sa ostalim komponentama prisutnih u etarskom ulju. U istraživanju Roldán et al. (2010) MIC etarskog ulja *O. heracleoticum* sa 85,28% karvakrola na test mikroorganizam *S. Enteritidis* je takođe iznosio 0,078 µL/mL, dok je MIC istog ulja za test mikroorganizam *S. Typhimurium* iznosila 0,312 µL/mL.

Antimikrobnu potentnost ovog etarskog ulja bakterijske vrste iz roda *Salmonella* potvrdile su i predhodne studije u okviru kojih je MIC za serotip Typhimurium iznosila 0,5 µL/mL (Oussalah et al., 2007), a za serotip Typhi 0,1->0,1 µL/mL (De Martino et al., 2009).

U vrlo niskim koncentracijama na testirane izolate su delovala etarska ulja *O. vulgare* i *Th. vulgaris* MIC/MBC=0,156/0,3125 µL/mL. Ujednačen antimikrobni efekat ovih etarskih ulja se može objasniti skoro identičnim udelima fenolnih jedinjenja karvakrola i timola u ukupnom ulju 63,6% za *O. vulgare* i 59,77% za *Th. vulgaris* (Slika 5.54.).

Najniža procentualna zastupljenost fenolnih jedinjenja evidentirana je u etarskom ulju *Th. serpyllum* (40,04%) što je za posledicu imalo i niži antimikrobni efekat u poređenju sa ostalim ispitivanim etarskim uljima.



Slika 5.54 Zastupljenost karvakrola i timola u etarskim uljima *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1) i *Th. serpyllum* (T2)

U okviru predhodnih studija MIC etarskog ulja *O. vulgare* za serotip Typhimurium su se kretale u rasponu od 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Hammer et al., 1999) do 3,12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Derwich et al., 2010), dok u ispitivanjima (Şahin et al., 2004) nije ustanovljen antimikrobni efekat etarskog ulja *O. vulgare* na serotip Enteritidis. Odsustvo antimikrobnog efekta u pomenutom istraživanju najverovatnije je posledica hemijskog sastava testiranog etarskog ulja u kome su procentualno bila najzastupljenija jedinjenja iz seskviterpenske frakcije, dok je procentualna zastupljenost fenolnih jedinjenja (karvakrol 0,6%, timol 0,8%) bila vrlo niska.

Antimikrobni efekat etarskog ulja *Th. vulgaris* na vrstu *Salmonella* spp. potvrđen je u mnogobrojnim istraživanjima (Al-Bayati, 2008; Rota et al., 2008; Roldán et al., 2010; Stojković et al., 2013). MIC za serotip Enteritidis se kretala u rasponu od 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Stanković et al., 2011) do 0,625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Roldán et al., 2010), dok se MBC za ovaj serotip kretala u rasponu od 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Stanković et al., 2011) do 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Rota et al., 2008). U istraživanju (Oussalah et al., 2007) potvrđen je takođe i antimikrobni efekat etarskog ulja *Th. serpyllum* na serotip Typhimurium MIC=1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

U okviru ove doktorske disertacije nije ustanovljena razlika u odgovoru na tretman etarskim uljima između testiranih izolata *S. Enteritidis* (SE2-SE15) uključujući i referentni soj *S. Enteritidis* ATCC

13076 (SE1). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Lu i Wu (2010) u okviru kojeg ispitivanjem antimikrobnog dejstva etarskog ulja *Th. vulgaris*, karvakrola i timola na četiri različita serotipa vrste *Salmonella enterica*: Kentucky, Senftenberg, Enteritidis i Typhimurium nije utvrđena razlika u odgovoru na tretman etarskim uljima.

Sa druge strane u istraživanju Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn (2010) etarska ulja *O. vulgare* i *Th. vulgaris* su pokazala različitu antimikrobnu aktivnost na 2 od 5 ispitivanih kliničkih izolata *S. Enteritidis*, MIC su se kretale u rasponu od 0,08 - 0,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ za etarsko ulje *O. vulgare* i 0,1- 0,32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ za etarsko ulje *Th. vulgaris*.

Antimikrobni efekat karvakrola i timola na serotip *Enteritidis* potvrđen je i u drugim istraživanjima. U istraživanju Lu i Wu (2010) karvakrol je delovao u koncentracijama MIC/MBC=0,2/0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, dok je MIC timola bila jednaka MBC i iznosila je 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$. U istraživanju Ratajac (2006) MIC za obe aktivne komponente je iznosila 0,156 $\mu\text{L}/\text{mL}$ što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije.

S obzirom da je antimikrobni efekat etarskog ulja *O. heracleoticum* bio veći od efekta samog karvakrola, ali jednak antimikrobnom efektu smeše karvakrola i timola, za obe aktivne komponente je izračunat frakcioni inhibicioni koncentracijski indeks ($\text{FIC}_{\text{index}}$). Izračunata vrednost $\text{FIC}_{\text{index}}$ za obe aktivne komponente je iznosila 0,5 što potvrđuje sinergističko delovanje između ove dve komponente, odnosno dobijeni efekat smeše je veći od efekata pojedinačnih aktivnih komponenti.

Sinergistički efekat između različitih jedinjenja prisutnih u etarskim uljima pokazan je brojnim studijama. Intenzivniji antimikrobni efekat u odnosu na antimikrobni efekat pojedinačnih komponenti pokazan je za smeše timola i karvakrola, timola i cinamaldehida, karvakrola i cinamaldehida (Zhou et al., 2007); timola i eugenola, karvakrola i eugenola, (Pei et al., 2009); karvakrola i p-cimena (Ultee et al., 2000); karvakrola i linalola (Bassolé et al., 2010); limonena i 1,8-cineola (Vuuren i Viljoen, 2007); α -pinena i limonena, linalola i terpinen-4-ola (Tserennadmid et al., 2011).

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije ukazuju na negativnu korelaciju između zbirnih udela fenolnih jedinjenja u ukupnom ulju i MIC etarskih ulja (Spearman-ov koeficijent korelacije $r_s=-0,95$, $p<0,001$), tj. što je sadržaj fenolnih jedinjenja u etarskom ulju veći, MIC je manja. Stoga se može reći da je antimikrobna aktivnost ispitivanih etarskih ulja direktno proporcionalna zbirnom sadržaju fenolnih komponenti (Slika 5.54.).

Imajući u vidu da je sinergizam između različitih jedinjenja konstituenata etarskih ulja već evidentiran u okviru mnogobrojnih studija, antimikrobna aktivnost testiranih etarskih ulja se nemože pripisati isključivo samo fenolnim jedinjenjima zbog mogućih interakcija između ostalih komponenti etarskih ulja.

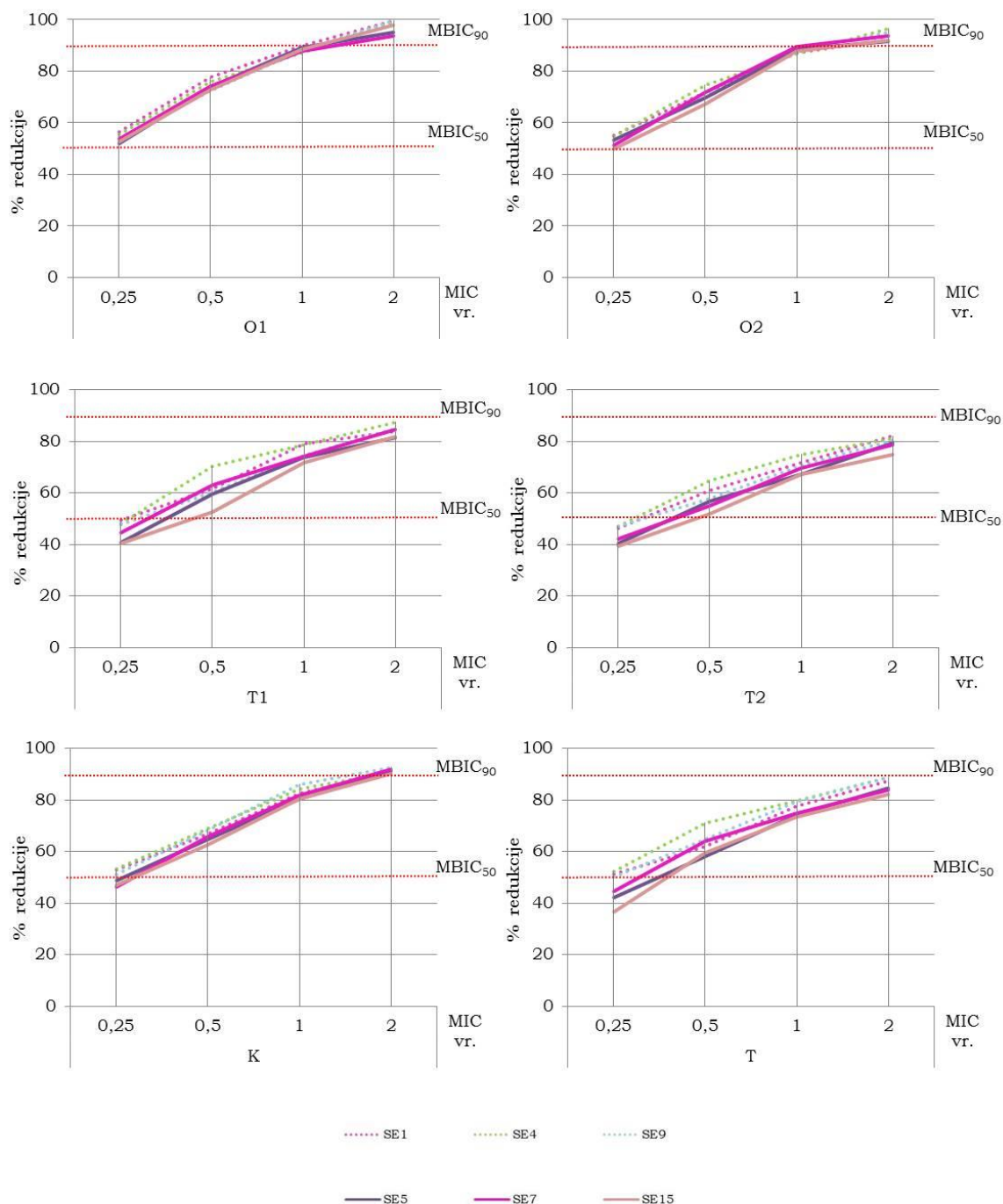
5.8. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm

5.8.1. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju

Na osnovu rezultata antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, karvakrola i timola prikazanih u odeljku 5.7.1. u cilju ispitivanja njihovog uticaja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm odabrane su vrednosti koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola koje odgovaraju vrednostima $0,25\text{MIC}$, $0,5\text{MIC}$, 1MIC i 2MIC (Tabela 4.4., poglavlje 4.0. Materijal i metode).

Rezultati uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na inicijalnu adheziju i metabolitičku aktivnost inicijalno adheriranih ćelija su prikazani na Slikama 5.55. i 5.56.

Iz rezultata prikazanih na Slici 5.55. može se videti da su ispitivana etarska ulja, karvakrol i timol pokazali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i posledično na formiranje biofilma testiranih izolata na dozno zavisani način. Vrednosti koncentracija pri kojima je postignuta redukcija formiranja biofilma i metabolitičke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija u iznosu $\geq 50\%$ (MBIC_{50}), odnosno $\geq 90\%$ (MBIC_{90}) su izdvojene u Tabeli 5.5.



Slika 5.55. Uticaj različitih koncentracija etarskih ulja *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrola (K) i timola (T) na inicijalnu adheziju izolata BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15) morfotipa

Tabela 5.5. Minimalne vrednosti koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola pri kojima je postignuta redukcija inicijalne adhezije (IA) i metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija (MAI) u iznosu $\geq 50\%$ (MBIC₅₀), odnosno $\geq 90\%$ (MBIC₉₀)

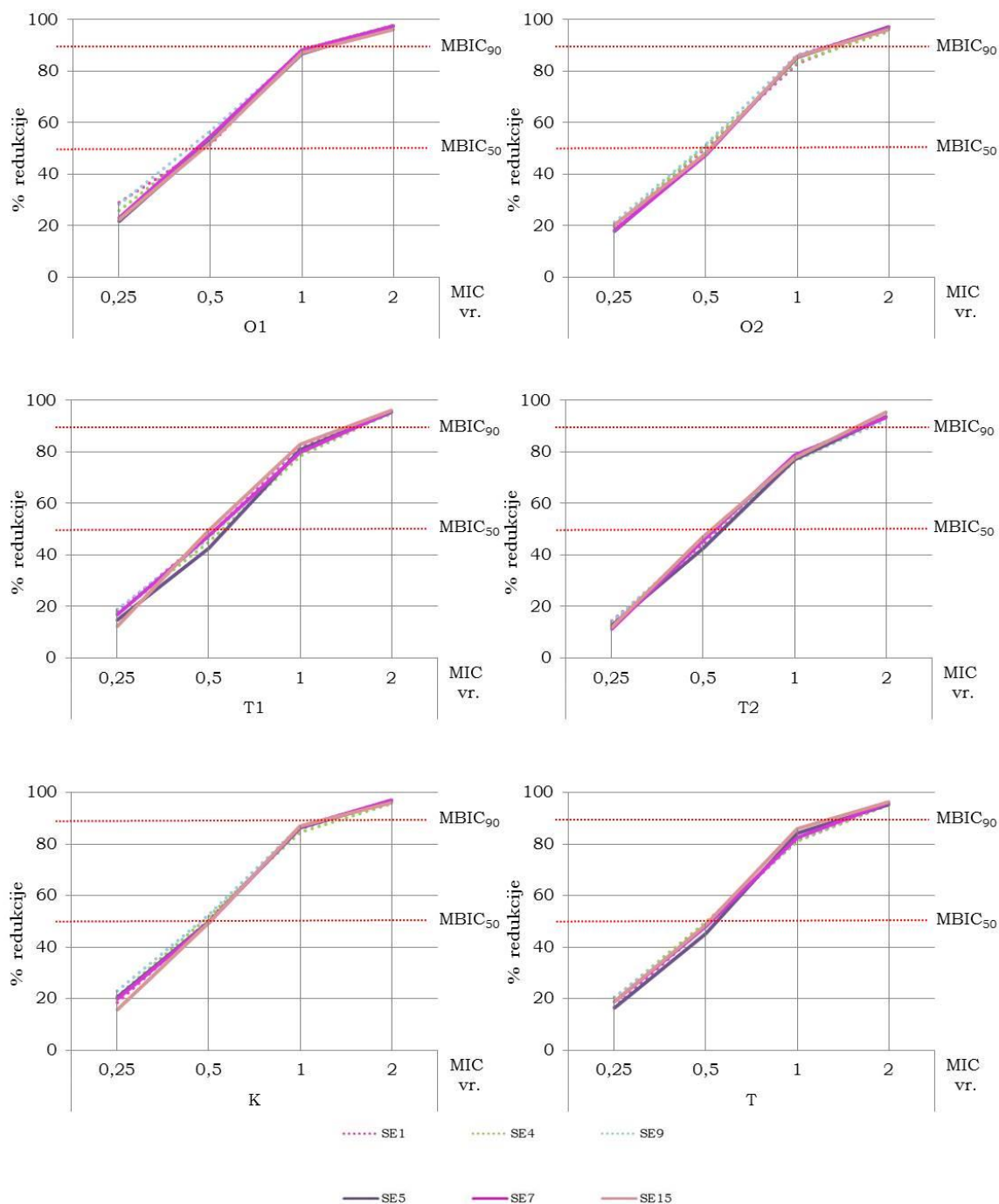
	RDAR				BDAR			
	MBIC _{50(IA)}	MBIC _{50(MAI)}	MBIC _{90(IA)}	MBIC _{90(MAI)}	MBIC _{50(IA)}	MBIC _{50(MAI)}	MBIC _{90(IA)}	MBIC _{90(MAI)}
O1	0,25MIC	0,5MIC	2MIC	2MIC	0,25MIC	0,5MIC	2MIC	2MIC
O2	0,25MIC	1MIC	2MIC	2MIC	0,25MIC	0,5MIC	2MIC	2MIC
T1	0,5MIC	1MIC	-	2MIC	0,5MIC	1MIC	-	2MIC
T2	0,5MIC	1MIC	-	2MIC	0,5MIC	1MIC	-	2MIC
K	0,5MIC	1MIC	2MIC	2MIC	0,25MIC	0,5MIC	2MIC	2MIC
T	0,5MIC	1MIC	-	2MIC	0,25MIC	1MIC	-	2MIC

Redukcija formiranja biofilma u iznosu $\geq 50\%$ (MBIC_{50(IA)}) je postignuta pri tretmanu etarskim uljima O1 i O2 u koncentraciji 0,25MIC za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR). MBIC_{50(IA)} za etarska ulja T1 i T2 je evidentirana pri koncentraciji 0,5MIC za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR), dok je u slučaju pojedinačnih komponenti etarskih ulja karvakrola (K) i timola (T) MBIC_{50(IA)} evidentirana pri koncentraciji 0,25MIC za izolate BDAR morfotipa i 0,5MIC za izolate RDAR morfotipa (Tabela 5.5.).

MBIC_{90(IA)} je evidentirana pri tretmanima etarskim uljima O1, O2, i karvakrolom (K) u koncentraciji 2MIC kod obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR). Tretman etarskim uljima T1, T2 i timolom (T) ni u slučaju primene najviše koncentracije nije uzrokovao redukciju inicijalne adhezije u iznosu $\geq 90\%$.

Primenjeni tretmani etarskim uljem T1 i timolom u koncentraciji 2MIC su uzrokovali redukciju inicijalne adhezije za $>80\%$ kod obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR), dok u slučaju tretmana etarskim uljem T2, redukcija u iznosu $>80\%$ je evidentirana samo kod BDAR morfotipa.

Kako se primenjenim kristal violet testom detektuje ukupna masa biofilma što podrazumeva vijabilne/nevijabilne ćelije kao i komponente matriksa biofilma dodatno je ispitan uticaj etarskih ulja na metaboličku aktivnost inicijalno adheriranih ćelija. Rezultati uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na metaboličku aktivnost inicijalno adheriranih ćelija su prikazani na Slici 5.56.



Slika 5.56. Uticaj različitih koncentracija etarskih ulja *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrola (K) i timola (T) na metaboličku aktivnost inicijalno adheriranih ćelija izolata BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15) morfotipa

Iz rezultata prikazanih na Slici 5.56. i Tabeli 5.5. može se videti da je redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija BDAR morfotipa u iznosu $\geq 50\%$ ($MBIC_{50(MAI)}$) postignuta primenom tretmana etarskim uljima O1, O2, i karvakrola (K) u koncentraciji $0,5MIC$ i etarskim uljima T1, T2 i timolom (T) u koncentraciji $1MIC$.

Pri koncentraciji $0,5MIC$ redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija izolata RDAR morfotipa je postignuta samo pri tretmanu etarskim uljem O1, dok je ovaj granični limit prilikom primene ostalih ulja i pojedinačnih komponenti postignut pri koncentracijama od $1MIC$ (Tabela 5.5.).

Redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija u iznosu $\geq 90\%$ ($MBIC_{90(MAI)}$) je evidentirana pri koncentraciji od $2MIC$ za svako testirano ulje i pojedinačnu komponentu za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR).

Na osnovu rezultata uticaja etarskih ulja i pojedinačnih komponenti na inicijalnu adheziju prikazanih na Slici 5.55. može se reći da su primenjeni tretmani etarskim uljima, karvakrolom i timolom u koncentracijama ispod MIC uzrokovali slabljenje sposobnosti adhezije i posledično uzrokovale smanjenje formiranja biofilma kod svih izolata. Primena istih koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola je takođe uticala na redukciju metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija, ali u manjem procentu (Slika 5.56.).

Ovakav nalaz može upućivati na supresorski uticaj primenjenih subletalnih koncentracija etarskih ulja na adhezivne mehanizme bakterija i sintezu matriksa biofilma.

Prikazani rezultati uticaja većih koncentracija etarskih ulja ($1MIC$ i $2MIC$) ukazuju da se primenom većih koncentracija postiže znatno veći procenat redukcije inicijalne adhezije i metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija. Pri tretmanu koncentracijama $1MIC$ i $2MIC$ postignuta je redukcija inicijalne adhezije u intervalima od $67,2\%$ do $89,9\%$ ($1MIC$), odnosno od $75,0\%$ do $98,9\%$ ($2MIC$). Primena ovih koncentracija je takođe uzrokovala i visok stepen redukcije metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija.

S obzirom na visok učinak koncentracija $1MIC$ i $2MIC$, može se reći da je redukcija adhezije i metaboličke aktivnosti ćelija pri pomenutim koncentracijama posledica inhibicije ćelijskog rasta i ćelijske smrti.

Upoređivanjem uticaja etarskih ulja na inhibiciju inicijalne adhezije i metaboličke aktivnosti ćelija između izolata RDAR i BDAR morfotipa ustanovljene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Rezultati istraživanja drugih autora takođe upućuju na postojanje inhibitornog uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i posledično na formiranje biofilma (Jadhav et al., 2013; Soni et al., 2013; Burt et al., 2014).

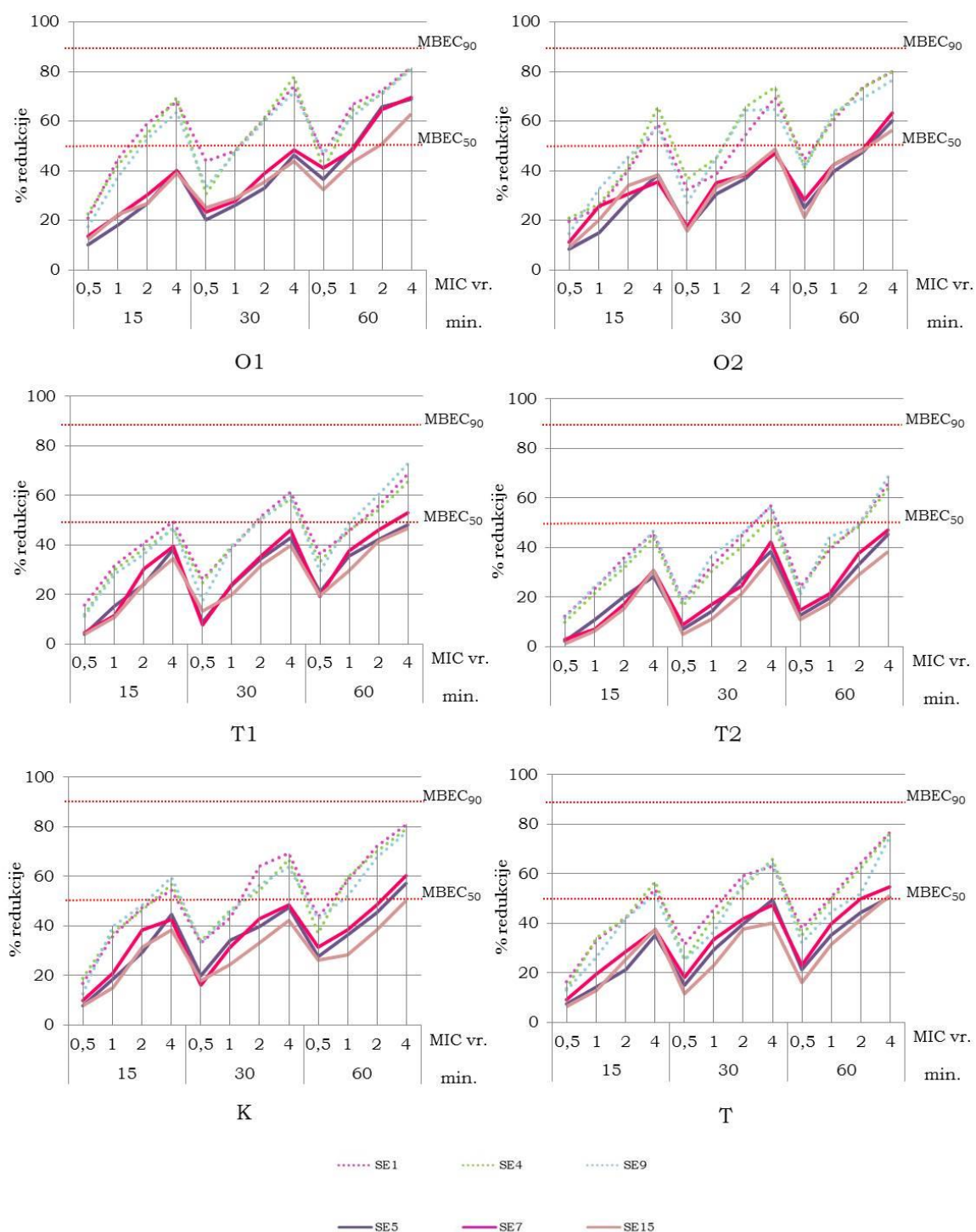
Soni et al., (2013) su utvrdili da primena subletalnih koncentracija etarskih ulja origana, timijana i konstituenta ovih etarskih ulja karvakrola u rasponu od 0,006 do 0,012% (~0,06-0,12 $\mu\text{L}/\text{mL}$) redukuje sposobnost formiranja biofilma tri soja *S. Typhimurium* za 2 do 4 puta. Osim toga, i u istraživanju Burt et al., (2014) je takođe ustanovljena značajna redukcija formiranja biofilma *S. Typhimurium* primenom karvakrola u koncentracijama u rasponu od 0,75 mM do 1,25 mM (~0,11 – 0,19 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Kako pri tretmanu subletalnim koncentracijama karvakrola nije zabeležena značajna redukcija broja bakterija ovi autori pretpostavljaju da u ovom slučaju inhibitorni efekat karvakrola na razvoj biofilma uključuje mehanizme drugačije od inhibicije rasta i ćelijske smrti. Sličan uticaj na inicijalnu adheziju pokazan je u slučaju primene etarskog ulja hajdučke trave na inicijalnu adheziju *L. monocytogenes* i *L. innocua* (Jadhav et al., 2013).

Studije novijeg datuma upućuju da pri subletalnim koncentracijama karvakrol redukuje pokretljivost bakterija zahvaljujući sposobnosti interferencije sa „quorum sensing“ mehanizmima između bakterijskih ćelija čime redukuje sposobnost formiranja biofilma (Inamuco et al., 2012; Burt et al., 2014). Precizan mehanizam kojim karvakrol inhibira formiranje biofilma još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

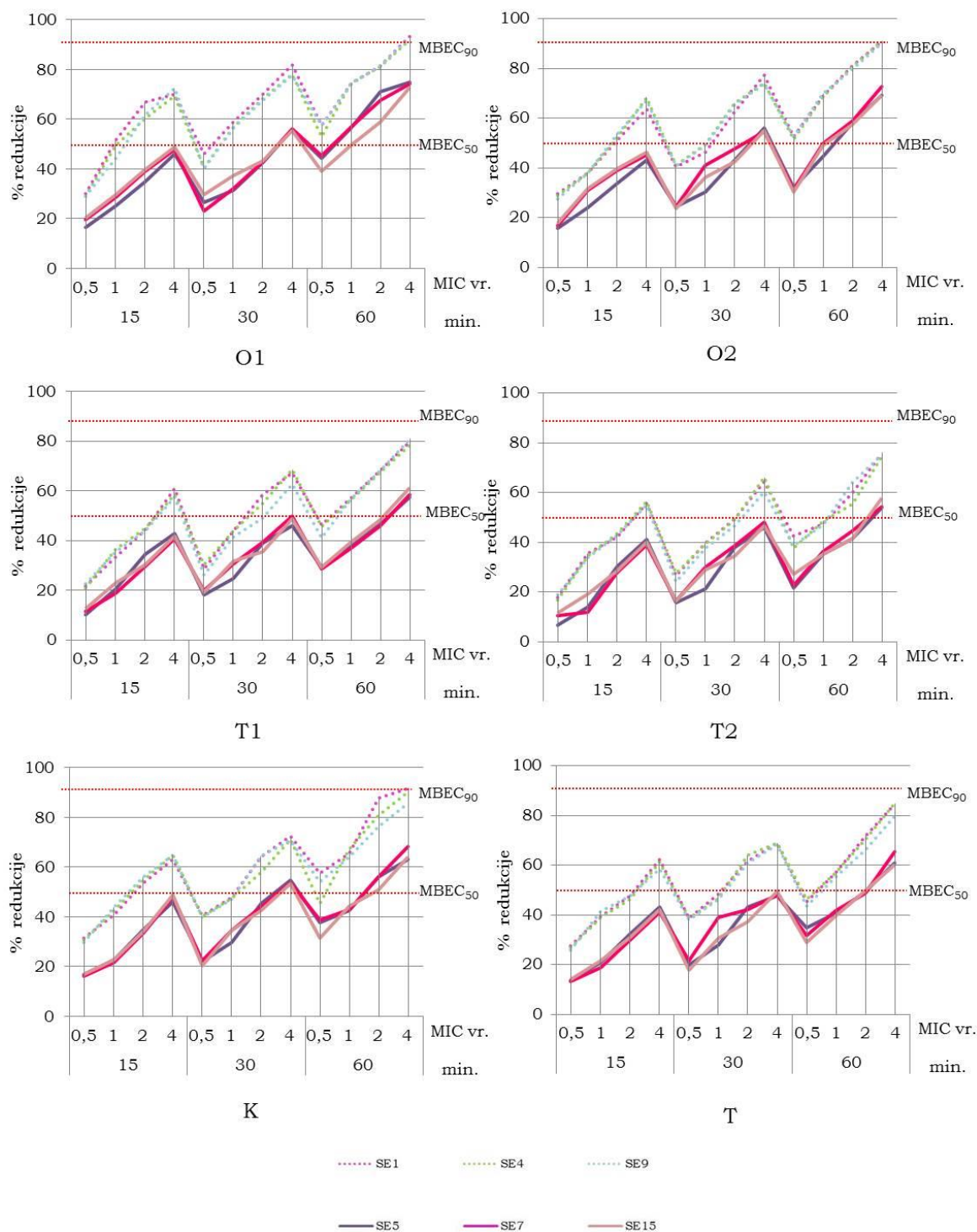
5.8.2. Uticaj etarskih ulja na formirani biofilm

Vrednosti koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola primenjenih u ispitivanjima uticaja etarskih ulja na formirani (48h) biofilm ($_{0,5}\text{MIC}$, $_{1}\text{MIC}$, $_{2}\text{MIC}$ i $_{4}\text{MIC}$) prikazane su u Tabeli 4.5. (Poglavlje 4.0. Materijal i metode).

Rezultati ispitivanja uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na formirani (48h) biofilm i metaboličku aktivnost ćelija u biofilmu izolata BDAR i RDAR su prikazani na Slikama 5.57. i 5.58.



Slika 5.57. Uticaj različitih koncentracija etarskih ulja *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrola (K) i timola (T) na formirane biofilme izolata BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15) morfotipa



Slika 5.58. Uticaj različitih koncentracija etarskih ulja *O. heracleoticum* (O1), *O. vulgare* (O2), *Th. vulgaris* (T1), *Th. serpyllum* (T2), karvakrola (K) i timola (T) na metaboličku aktivnost ćelija u biofilmu izolata BDAR (SE1, SE4 i SE9) i RDAR (SE5, SE7 i SE15) morfotipa

Tabela 5.6. Minimalne vrednosti koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola pri kojima je postignuta redukcija ukupne mase formiranog biofilma (FB) i metaboličke aktivnosti ćelija u biofilmu (MA) u iznosu $\geq 50\%$ (MBIC₅₀), odnosno $\geq 90\%$ (MBIC₉₀)

	RDAR				BDAR			
	MBEC _{50(FB)}	MBEC _{50(MA)}	MBEC _{90(FB)}	MBEC _{90(MA)}	MBEC _{50(FB)}	MBEC _{50(MA)}	MBEC _{90(FB)}	MBEC _{90(MA)}
O1	₂ MIC ⁶⁰	₄ MIC ³⁰	-	-	₁ MIC ¹⁵	₂ MIC ¹⁵	-	₄ MIC ⁶⁰
O2	₂ MIC ⁶⁰	₄ MIC ³⁰	-	-	₁ MIC ¹⁵	₂ MIC ¹⁵	-	₄ MIC ⁶⁰
T1	-	₄ MIC ⁶⁰	-	-	₂ MIC ³⁰	₄ MIC ¹⁵	-	-
T2	-	₄ MIC ⁶⁰	-	-	₄ MIC ³⁰	₄ MIC ¹⁵	-	-
K	₂ MIC ⁶⁰	₄ MIC ³⁰	-	-	₁ MIC ¹⁵	₂ MIC ¹⁵	-	₄ MIC ⁶⁰
T	₄ MIC ⁶⁰	₄ MIC ⁶⁰	-	-	₂ MIC ¹⁵	₄ MIC ¹⁵	-	-

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 5.57. i u Tabeli 5.6. se može videti da je za eradikaciju biofilmova (u iznosu $\geq 50\%$) formiranih od strane izolata RDAR morfotipa bila potrebna veća koncentracija supstanci i duže vreme ekspozicije u odnosu na biofilme formirane od strane BDAR morfotipa.

MBEC_{50(FB)} za izolate RDAR morfotipa je postignuta nakon 60 minuta ekspozicije formiranih biofilmova etarskim uljima O1, O2 i karvakrola u koncentraciji ₂MIC i timolu u koncentraciji ₄MIC.

Pri tretmanu formiranih biofilmova RDAR morfotipa etarskim uljima T1 i T2 nije evidentirana redukcija ukupne mase formiranih biofilmova u iznosu $\geq 50\%$ ni nakon 60 minuta ekspozicije biofilmova najvišim koncentracijama etarskih ulja.

Znatno veća efikasnost primenjenih tretmana je pokazana u slučaju njihove primene na biofilme formirane od strane izolata BDAR morfotipa.

Iz grafika prikazanih na Slici 5.57. se može videti da je MBEC_{50(FB)} za izolate BDAR morfotipa postignuta već nakon 15 minuta ekspozicije etarskim uljima O1 (₂MIC), O2 (₄MIC), karvakrolu (₄MIC) i timolu (₄MIC).

Redukcija ukupne mase formiranih biofilmova BDAR morfotipa u iznosu $\geq 50\%$ pri tretmanu etarskim uljima T1 i T2 je evidentirana nakon 30 minuta ekspozicije koncentracijama ₂MIC i ₄MIC.

Nakon 60 minuta ekspozicije formiranih biofilmova ni pri jednoj od primenjenih koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola nije postignuta redukcija ukupne mase formiranih biofilmova u iznosu $\geq 90\%$ za obe ispitivane grupe.

Redukcija metabolitičke aktivnosti ćelija formiranog biofilma RDAR morfotipa (u iznosu $\geq 50\%$) je postignuta pri tretmanu etarskim uljima, karvakrolom i timolom u koncentraciji 4MIC nakon 30 minuta ekspozicije za etarska ulja O1, O2 i K, odnosno 60 minuta za etarska ulja T1, T2 i T. Redukcija metabolitičke aktivnosti u iznosu $\geq 90\%$ ($\text{MBEC}_{90(\text{MA})}$) nije postignuta kod biofilмова RDAR morfotipa.

Veći efekat primenjenih tretmana na redukciju metabolitičke aktivnosti ćelija je evidentiran kod biofilмова izolata BDAR morfotipa.

$\text{MBEC}_{50(\text{MA})}$ za izolate BDAR morfotipa je postignuta nakon 15 minuta ekspozicije formiranih biofilмова etarskim uljima O1, O2 i karvakrolu u koncentraciji 2MIC i 30 minuta ekspozicije etarskim uljima T1, T2 i timolu u koncentraciji 4MIC .

$\text{MBEC}_{90(\text{MA})}$ za izolate BDAR morfotipa je evidentirana nakon 60 minuta ekspozicije etarskim uljima O1, O2 i karvakrolu u koncentraciji 4MIC .

Na osnovu prikazanih rezultata uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na ukupnu biomasu biofilma i metabolitičku aktivnost ćelija prikazanih na Slikama 5.57. i 5.58. može se zaključiti da etarska ulja u primenjenim koncentracijama uzrokuju redukciju ukupne mase formiranog biofilma / metabolitičke aktivnosti ćelija u biofilmu na dozno zavisen način u funkciji vremena.

Već je pomenuto da antimikrobni efekat etarskih ulja zavisi od nivoa primenjene koncentracije. Primena etarskih ulja u nižim koncentracijama pretežno inicira povećanje propustljivosti ćelijske membrane, rezultujući u poremećajima njene strukture bez posledica po vijabilnost, dok primena većih koncentracija dovodi do težih oštećenja membrane, potpunog narušavanja homeostaze i smrti ćelije. Shodno tome, produženo kontaktno vreme delovanja između etarskog ulja i mikroorganizama može prouzrokovati teža oštećenja koja neminovno dovode do smrti bakterijske ćelije. Ovakvim načinom delovanja etarskih ulja može se objasniti veća efikasnost etarskih ulja nakon dužeg vremena ekspozicije (60 minuta) u odnosu na tretman sa kraćim vremenom ekspozicije (15 minuta) ($< 0,05$). Kako je ovde reč o bakterijama u biofilmu vrlo je verovatno da većoj efikasnosti etarskih ulja pri produženom vremenu delovanja svakako doprinosi i činjenica da se produžavanjem vremena delovanja povećava i mogućnost postizanja veće difuzije primenjenih supstanci kroz matriks biofilma.

Ovakav način delovanja etarskih ulja pokazan je i u istraživanjima sprovedenim od strane drugih autora (Oliveira et al., 2010; Valeriano et al., 2012; Soni et al., 2013).

U istraživanju Burt et al. (2014) tretman predhodno formiranih 24h biofilмова karvakrolom u koncentracijama 2, 4, 6 i 8 mM (~0,3, 0,6, 0,9 i 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) je pokazao umanjen efekat na redukciju ukupne biomase biofilma u poređenju sa efektima istih koncentracija na inicijalnu adheziju. Istraživanja sprovedena od strane drugih autora takođe upućuju na slabiji efekat etarskih ulja na predhodno formirane biofilmove (Jadhav et al., 2013; Szczepanski i Lipski, 2014).

Slabiji uticaj primenjenih etarskih ulja, karvakrola i timola na predhodno formirane biofilmove se može objasniti prisustvom ECM koji u različitom stepenu može delovati kao difuziona barijera. Naime, već je pomenuto da je u inicijalnim fazama razvoja biofilma vezivanje ćelija za supstrat rezultat primarne adhezije koja je označena i kao faza reverzibilnog vezivanja. Stoga, primenjeni tretman u ovoj inicijalnoj fazi će biti efikasniji u odnosu na isti tretman primenjen na predhodno formirani biofilm u okviru koga su ćelije već produkovale ECM i ireverzibilno vezale za supstrat.

U prilog tvrdnji da prisustvo ECM može uticati na smanjenje inhibitornog efekta etarskog ulja idu i ustanovljene razlike u odgovoru na tretman etarskim uljima između izolata koji pripadaju RDAR i BDAR morfotipu.

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje manje efikasnosti primenjenih tretmana etarskim uljima kod izolata koji pripadaju RDAR morfotipu u odnosu na izolate BDAR morfotipa ($p < 0,05$). Ovo je najverovatnije posledica prisustva kompleksnijeg matriksa biofilma (celuloza+tafi) u odnosu na matriks biofilma izolata BDAR morfotipa (tafi). Poznato je da celuloza bakterija u okviru biofilma ima strukturnu ulogu pružajući mehaničku, hemijsku i biološku zaštitu u okviru prirodnog staništa. Istraživanja sprovedena od strane drugih autora takođe ukazuju da prisustvo celuloze u okviru matriksa biofilma, osim što doprinosi većoj sposobnosti preživljavanja, je direktno odgovorno za rezistenciju na tretman različitim antimikrobnim agensima (Solano et al., 2002; White et al., 2006).

Ovakva konstatacija je i potvrđena u ispitivanjima uticaja dezinfekcionih sredstava na bakterije u biofilmu sprovedenim od strane Solano et al., 2002. Naime, ovi autori su ispitivanjem efekta hlora NaOCl u koncentraciji 100-200 puta većoj od koncentracije hlora koja se primenjuje u svrhu sanitacije vode na biofilmove soja koji produkuje celulozu i tanke agregativne fimbrije (RDAR) i celuloza deficijentnog soja (BDAR) ustanovili znatno veću otpornost soja koji produkuje celulozu. Ovim je potvrđeno da je bakterijska celuloza direktno odgovorna za

rezistenciju na hlor kod soja koji produkuje celulozu i fimbrije. Nasuprot tome, u istraživanjima Vestby et al., (2009) ispitivanjem efekta hipohlorita i benzalkonium-hlorida na suspenzije ćelija poreklom od pomenutih morfotipova nisu ustanovljene značajne razlike u osetljivosti na primenjena dezinfekciona sredstva.

Na osnovu prikazanih rezultata i literaturnih podataka može se reći da na veću otpornost formiranih biofilmova od strane izolata RDAR morfotipa u velikoj meri ima prisustvo matriksa biofilma, pre svega celuloze, ali se ne može isključiti i eventualni uticaj drugih komponenti matriksa biofilma kao i prisustvo drugih mehanizama rezistencije bakterija u biofilmu.

Nešto viši i vremenski brži inhibitorni efekat primenjenih tretmana na metaboličku aktivnost ćelija u poređenju sa učinkom istih koncentracija na ukupnu masu biofilma može se objasniti manjim uticajem etarskih ulja na destrukciju mehaničke strukture biofilma. Već je pomenuto da se primenjenim kristal violet testom detektuje ukupna masa biofilma, odnosno primenom ovog testa se stižu saznanja o uticaju primenjenih tretmana na ukupnu masu biofilma, što takođe može biti razlog prisustva pomenutih razlika.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

6.1. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

→ Ekspresija karakterističnog morfotipa i biofilm fenotipa u vidu pelikule formirane na vazduh voda međufazi je bila uslovljena nižom temperaturom inkubiranja (25°C).

→ Na temperaturi inkubiranja od 25°C kod ispitivanih izolata su evidentirana tri morfotipa RDAR (SE5, SE7, SE11 – SE15), BDAR (SE1, SE2, SE4, SE6, SE9 i SE10) i SAW (SE3 i SE8), dok je inkubiranjem na temperaturi od 37°C kod svih 14 ispitivanih izolata i referentnog soja ustanovljen jedan morfotip (SAW).

→ Najintenzivnija ekspresija biofilm fenotipa u vidu pelikule formirane na voda vazduh međufazi je evidentirana na temperaturi inkubiranja od 25°. Na temperaturi inkubiranja od 37°C produkcija pelikula je bila uglavnom vrlo slaba (+) sa izuzetkom izolata SE5, SE7, SE14 i SE15 kod kojih je formirana tanka više mrvičasta pelikula, sklona brzom dezintegraciji (++) . Pri ovoj temperaturi inkubiranja jedino kod izolata SE8 nije zapaženo formiranje pelikule.

→ Na osnovu rezultata kvantifikacije formiranih biofilmova ustanovljeno je da su se ispitivani izolati međusobno razlikovali po sposobnosti formiranja biofilma, pri čemu je sposobnost formiranja biofilma testiranih izolata *S. Enteritidis* diferencirana u tri različite kategorije (jaki, umereni i slabi biofilm produceri).

→ Na sposobnost formiranja biofilma veliki uticaj je imala temperatura inkubiranja. Testirani izolati *S. Enteritidis* su formirali statistički značajno veću količinu biofilma ($p < 0,001$) na temperaturi inkubiranja od 25°C u poređenju sa temperaturom inkubiranja od 37°C.

○ U poređnom analizom rezultata primenjenih skrining testova za utvrđivanje sposobnosti produkcije biofilma na temperaturi inkubiranja od 25°C ustanovljena je povezanost između pojave određenog morfotipa na Kongo crvenom agaru i sposobnosti produkcije biofilma u testovima u tečnim medijumima. RDAR morfotip je bio povezan sa jakim biofilm

produkcijom u kristal violet testu i pojavom čvrste debele pelikule (+++). BDAR morfotip je bio povezan sa umerenom produkcijom biofilma u kristal violet testu i formiranjem tanke pelikule (++) , dok je za SAW morfotip u oba testa pokazana slaba biofilm produkcija.

◉ U testovima sprovedenim na temperaturi inkubiranja od 37°C nije ustanovljena povezanost između pojave određenog morfotipa na Kongo crvenom agaru i sposobnosti produkcije biofilma u testovima sprovedenim na tečnim medijumima sa izuzetkom izolata SE8.

◉ U odnosu na poreklo izolata najmanju produkciju biofilma su imali izolati poreklom iz organa živine koji su na obe temperature inkubiranja okarakterisani kao slabi biofilm produceri. Izolati poreklom iz fecesa su na obe testirane temperature pokazali različitu sposobnost produkcije biofilma, koja je u zavisnosti od izolata okarakterisana kao slaba, umerena i jaka biofilm produkcija. Izolati poreklom iz hrane za životinje na temperaturi inkubiranja od 25°C je odlikovala jaka biofilm produkcija, dok je njihova sposobnost formiranja biofilma na temperaturi inkubiranja od 37°C okarakterisana kao slaba i umerena.

6.2. Sposobnost adherencije

◉ Svi testirani izolati su pokazali sposobnost adherencije na površinu stakla i nerđajućeg čelika, ali u različitoj meri.

◉ Na sposobnost adherencije povoljniji uticaj je imala temperatura inkubiranja od 25°C ($p < 0,05$), sa izuzetkom izolata SE3 ($p > 0,05$).

◉ Između stepena adherencije izolata na površine stakla i nerđajućeg čelika ustanovljena je neznatno veća adherentnost za površine od nerđajućeg čelika, ali nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Sposobnost adherencije bakterija na površine od stakla i nerđajućeg čelika pored temperature je bila uslovljena i sposobnošću izolata da sintetiše matriks biofilma.

◉ Upoređivanjem određenog morfotipa sa stepenom adherencije na površine od stakla i nerđajućeg čelika pri temperaturi inkubiranja od 25°C uočen je znatno viši stepen adherencije izolata koji su ispoljili RDAR (SE5, SE7, SE11-SE15) i BDAR (SE1, SE2, SE4, SE6, SE9, SE10) morfotip u odnosu na izolate koji su ispoljili SAW morfotip (SE3 i SE8).

6.3. Sposobnost preživljavanja

◉ Praćenjem stope preživljavanja tokom 28 dana u uslovima isušivanja evidentirana je znatno veća stopa preživljavanja ćelija izolata

RDAR morfotipa u odnosu na stopu preživljavanja ćelija BDAR morfotipa ($p < 0,05$).

- ◉ Procenat vijabilnih ćelija u okviru biofilma izolata RDAR morfotipa se kretao u rasponu od 58,5%, do 64,2%, dok je u slučaju izolata BDAR morfotipa zabeležen značajno niži procenat vijabilnih ćelija 21,7% do 25,0%.
- ◉ Praćenjem stope preživljavanja tokom 90 dana u uslovima povremene dostupnosti nutritijenata zabeležena je veća stopa preživljavanja ćelija u odnosu na stopu preživljavanja u uslovima isušivanja.
- ◉ U uslovima povremene dostupnosti nutritijenata nakon devedesetog dana ispitivanja kod obe grupe izolata procenat vijabilnih ćelija je iznosio više od 50%.

6.4. Vizualizacija biofilma

- ◉ Primenjenim mikroskopskim tehnikama (CLSM i SEM) omogućena je detaljna vizualizacija formiranih biofilmova.
- ◉ Praćenjem četvorodnevno razvoja biofilma ispitivanog izolata SE_{RDAR} morfotipa utvrđeno je da se pod datim eksperimentalnim uslovima proces formiranja biofilma odvija u tri faze: 1) inicijalna adhezija za površinu i formiranje manjih ćelijskih agregata (24h); 2) formiranje većih ćelijskih agregata uz produkciju EPS (48h); 3) sazrevanje biofilma uz značajnu produkciju EPS što omogućava formiranje stabilne trodimenzionalne strukture biofilma (96h).
- ◉ Primenjene tehnike mikroskopiranja CLSM i SEM su se pokazale kao mikroskopske tehnike izbora za vizualizaciju i određivanje karakteristika strukture biofilma.

6.5. Hemijski sastav etarskih ulja

- ◉ Ispitana etarska ulja je karakterisao visok zbirni udeo glavnih fenolnih komponenti karvakrola i timola: *O. heracleoticum* (71,6%), *O. vulgare* (63,6%), *Th. vulgaris* (59,77%), *Th. serpyllum* (40,04%).
- ◉ Na osnovu visoke procentualne zastupljenosti karvakrola u etarskim uljima *O. heracleoticum* (69,98%) i *O. vulgare* (58,84%) zaključeno je da pripadaju karvakrol tipu.
- ◉ Na osnovu visoke procentualne zastupljenosti timola u etarskim uljima *Th. vulgaris* (43,2%) i *Th. serpyllum* (34,48%) zaključeno je da pripadaju timol tipu.

6.6. Antimikrobna aktivnost

- ⊙ Etarska ulja su prema izolatima *S. Enteritidis* pokazala ujednačen antimikrobni efekat sledećim redosledom: *O. heracleoticum* > *O. vulgare* = *Th. vulgaris* > *Th. serpyllum*.
- ⊙ Antimikrobni efekat etarskih ulja je bio direktno srazmeran zbiru fenolnih komponenti (karvakrola i timola) u etarskom ulju.
- ⊙ Pojedinačne komponente etarskih ulja karvakrol i timol su pokazale ujednačen antimikrobni efekat prema izolatima *S. Enteritidis*.
- ⊙ Smeša karvakrola i timola u odnosu 1:1 je pokazala intenzivniji antimikrobni efekat u odnosu na pojedinačno testirane komponente.
- ⊙ Za obe aktivne komponente vrednost FIC_{index} je iznosila 0,5 čime je potvrđeno sinergističko delovanje između ove dve komponente.

6.7. Uticaj etarskih ulja na inicijalnu adheziju

- ⊙ Ispitivana etarska ulja, karvakrol i timol su pokazali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i posledično na formiranje biofilma testiranih izolata na dozno zavisnan način.
- ⊙ Redukcija formiranja biofilma u iznosu $\geq 50\%$ ($MBIC_{50(IA)}$) je postignuta pri tretmanu etarskim uljima O1 i O2 u koncentraciji $0,25MIC$ za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR). $MBIC_{50(IA)}$ za etarska ulja T1 i T2 je evidentirana pri tretmanu koncentracijom $0,5MIC$ za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR).
- ⊙ $MBIC_{50(IA)}$ u slučaju primene pojedinačnih komponenti etarskih ulja karvakrola (K) i timola (T) $MBIC_{50(IA)}$ je postignuta pri tretmanu koncentracijom $0,25MIC$ za izolate BDAR morfotipa i pri tretmanu koncentracijom $0,5MIC$ za izolate RDAR morfotipa.
- ⊙ $MBIC_{90(IA)}$ je evidentirana pri tretmanima etarskim uljima O1, O2, i karvakrolom (K) u koncentraciji $2MIC$ kod obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR). Tretman etarskim uljima T1, T2 i timolom (T) ni u slučaju primene najviše koncentracije nije uzrokovao redukciju inicijalne adhezije u iznosu $\geq 90\%$.
- ⊙ Redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija BDAR morfotipa u iznosu $\geq 50\%$ ($MBIC_{50(MAI)}$) je postignuta primenom tretmana etarskim uljima O1, O2, i karvakrola (K) u koncentraciji $0,5MIC$ i etarskim uljima T1, T2 i timolom (T) u koncentraciji $1MIC$.
- ⊙ Pri koncentraciji $0,5MIC$ redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija izolata RDAR morfotipa je postignuta samo pri tretmanu etarskim uljem O1, dok je ovaj granični limit prilikom primene

ostalih ulja i pojedinačnih komponenti postignut pri koncentracijama od $_1$ MIC.

⊙ Redukcija metaboličke aktivnosti inicijalno adheriranih ćelija u iznosu $\geq 90\%$ ($MBIC_{90(MAI)}$) je evidentirana pri koncentraciji od $_2$ MIC za svako testirano ulje i pojedinačnu komponentu za obe grupe ispitivanih izolata (RDAR i BDAR).

⊙ Upoređivanjem uticaja etarskih ulja na inhibiciju inicijalne adhezije i metaboličke aktivnosti ćelija između izolata RDAR i BDAR morfotipa ustanovljene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

6.8. Uticaj etarskih ulja na formirani biofilm

⊙ Ispitivanjem uticaja etarskih ulja, karvakrola i timola na ukupnu biomasu biofilma i metaboličku aktivnost ćelija pokazano je da etarska ulja u primenjenim koncentracijama uzrokuju redukciju ukupne mase formiranog biofilma/metaboličke aktivnosti ćelija u biofilmu na dozno zavisani način u funkciji vremena.

⊙ Za eradikaciju biofilмова (u iznosu $\geq 50\%$) formiranih od strane izolata RDAR morfotipa je bila potrebna veća koncentracija supstanci i duže vreme ekspozicije u odnosu na biofilmove formirane od strane BDAR morfotipa. $MBEC_{50(FB)}$ za izolate RDAR morfotipa je postignuta nakon 60 minuta ekspozicije formiranih biofilмова etarskim uljima O1, O2 i karvakrola u koncentraciji $_2$ MIC i timolu u koncentraciji $_4$ MIC.

⊙ Pri tretmanu formiranih biofilмова RDAR morfotipa etarskim uljima T1 i T2 nije evidentirana redukcija ukupne mase formiranih biofilмова u iznosu $\geq 50\%$ ni nakon 60 minuta ekspozicije biofilмова najvišim koncentracijama etarskih ulja.

⊙ Znatno veća efikasnost primenjenih tretmana je pokazana u slučaju njihove primene na biofilmove formirane od strane izolata BDAR morfotipa. $MBEC_{50(FB)}$ za izolate BDAR morfotipa je postignuta već nakon 15 minuta ekspozicije etarskim uljima O1 ($_2$ MIC), O2 ($_4$ MIC), karvakrolu ($_4$ MIC) i timolu ($_4$ MIC). Redukcija ukupne mase formiranih biofilмова BDAR morfotipa u iznosu $\geq 50\%$ pri tretmanu etarskim uljima T1 i T2 je evidentirana nakon 30 minuta ekspozicije koncentracijama $_2$ MIC i $_4$ MIC.

⊙ Nakon 60 minuta ekspozicije formiranih biofilмова ni pri jednoj od primenjenih koncentracija etarskih ulja, karvakrola i timola nije postignuta redukcija ukupne mase formiranih biofilмова u iznosu $\geq 90\%$ za obe ispitivane grupe.

⊙ Redukcija metaboličke aktivnosti ćelija formiranog biofilma RDAR morfotipa (u iznosu $\geq 50\%$) je postignuta pri tretmanu etarskim uljima,

karvakrolom i timolom u koncentraciji 4MIC nakon 30 minuta ekspozicije za etarska ulja O1, O2 i K, odnosno 60 minuta za etarska ulja T1, T2 i T.

⦿ Redukcija metaboličke aktivnosti u iznosu $\geq 90\%$ (MBEC_{90(MA)}) nije postignuta kod biofilmova RDAR morfotipa.

⦿ Veći efekat primenjenih tretmana na redukciju metaboličke aktivnosti ćelija je evidentiran kod biofilmova izolata BDAR morfotipa. MBEC_{50(MA)} za izolate BDAR morfotipa je postignuta nakon 15 minuta ekspozicije formiranih biofilmova etarskim uljima O1, O2 i karvakrolu u koncentraciji 2MIC i 30 minuta ekspozicije etarskim uljima T1, T2 i timolu u koncentraciji 4MIC.

⦿ MBEC_{90(MA)} za izolate BDAR morfotipa je evidentirana nakon 60 minuta ekspozicije etarskim uljima O1, O2 i karvakrolu u koncentraciji 4MIC.

⦿ Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje manje efikasnosti primenjenih tretmana etarskim uljima kod izolata koji pripadaju RDAR morfotipu u odnosu na izolate BDAR morfotipa ($p < 0,05$). Razlog umanjene efikasnosti primenjenih tretmana etarskim uljima kod biofilmova izolata RDAR morfotipa je posledica prisustva kompleksnijeg matriksa biofilma pre svega celuloze.

6.9. Značaj rezultata i buduća istraživanja

Poznavanje i razumevanje adhezivne sposobnosti i formiranja biofilma alimentarnih patogena, kao i njihovog odnosa prema faktorima koji mogu stimulisati ili inhibirati razvoj biofilma, ima veliki značaj sa aspekta prevencije stvaranja biofilma, kao i njegove eliminacije.

Stoga, rezultati ovog istraživanja predstavljaju relevantnu naučnu informaciju o sposobnosti formiranja biofilma, uslovima pod kojim se biofilm formira, stepenu adhezije za površine, izgledu trodimenzionalne strukture biofilma i sposobnosti preživljavanja ćelija unutar biofilma različitih izolata epidemiološki najfrekventnijeg patogena, *S. Enteritidis*.

Rezultati sposobnosti preživljavanja biofilm produkujućih izolata doprinose spoznaji koliko pojava ovakvih sojeva u industrijskim pogonima može predstavljati ozbiljnu pretnju na polju bezbednosti hrane.

Dobijeni rezultati hemijskog sastava etarskih ulja značajni su u kontekstu evaluacije kvaliteta etarskih ulja, a takođe doprinose upotpunjavanju baza podataka o hemijskom sastavu etarskih ulja biljnih vrsta sa teritorije Republike Srbije.

Rezultati predstavljeni u okviru istraživanja antimikrobnog efekta i uticaja etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm ukazuju da

primena etarskih ulja u cilju sprečavanja formiranja biofilma predstavlja izuzetno koristan pristup u kontekstu prevencije bakterijske adhezije na mestima proizvodnje namirnica.

Stoga, prikazani rezultati predstavljaju naučnu osnovu za praktični razvoj i implementaciju od strane industrije, preventivne strategije za osiguranje bezbednosti hrane.

Primena etarskih ulja u cilju prevencije stvaranja biofilma ima prednosti u odnosu na postojeće tretmane dezinficijensima s obzirom da se karvakrol, timol, p-cimen, γ -terpinen kao i mnogobrojne komponente ispitivanih etarskih ulja već nalaze Evropskoj listi bezbednih aditiva za hranu (EU872/2012), a takođe su i od strane FDA okarakterisane kao supstance bezbedne za upotrebu (GRAS, *generally recognized as safe*) i ne postoji zabrinutost u vezi zaostajanja rezidua.

Iako ispitivanje praktične upotrebe etarskih ulja u realnim industrijskim pogonima nije bilo uključeno u primarne ciljeve ove doktorske disertacije, na osnovu dosadašnjih iskustava očekuje se da će praktična upotreba etarskih ulja u industriji biti izvodljiva, na čemu će biti zasnovana neka od budućih istraživanja. Buduća istraživanja su svakako neophodna i radi ispitivanja uticaja drugih prirodnih jedinjenja, njihovog sinergističkog delovanja sa komponentama etarskog ulja na predhodno formirane biofilmove sa posebnim akcentom na ispitivanje njihovog uticaja na matriks biofilma.

Istraživanja je neophodno dopuniti i u smislu tehničkog razvoja, optimizacije i evaluacije tretmana etarskim uljima u praktičnim uslovima kao i analize troškova primenjenog tretmana.

Činjenica da se sve učestalija transmisija alimentarnih patogena vrši preko namirnica neanimalnog porekla najčešće povrća, koje se uglavnom konzumira u svežem stanju, otvara i mogućnost nastavka istraživanja u smislu evaluacije upotrebe etarskih ulja kao dodatka vodi za industrijsko pranje povrća i recepturama za salatne prelive u cilju smanjenja frekventnosti transmisije alimentarnih infekcija izazvanih svežim povrćem.

7. LITERATURA

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.-E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, (196) 7, 453-472.

Adams, R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4 ed. Allured Publishing Corporation.

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) 5, 1493 -1498.

Ahmad, A.M., Khokhar, I., Ahmad, I., Kashmiri, M.A., Adnan, A., Ahmad, M. (2006). Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, (5) 56-60.

Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, (116) 3, 403-406.

Al-Kalaldeh, J.Z., Abu-Dahab, R., Afifi, F.U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, (30) 4, 271-278.

Alipour, M., Suntres, Z.E., Omri, A. (2009). Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (64) 317-325.

Annous, A.B., Fratamico, P.M., Smith, J.L. (2009). Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *Journal of Food Science*, (74) 1, 24-37.

Anriany, Y., Sahu, S.N., Wessels, K.R., McCann, L.M., Joseph, S.W. (2006). Alteration of the Rugose Phenotype in waaG and ddhC Mutants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Is

Associated with Inverse Production of Curli and Cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, (72) 7, 5002-5012.

Anriany, Y.A., Weiner, R.M., Johnson, J.A., De Rezende, C.E., Joseph, S.W. (2001). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Displays a Rugose Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, (67) 9, 4048-4056.

Antunes, M.L.C., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.C.M., Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, (156) 2271-2282.

Apel, D., White, A.P., Grassl, G.A., Finlay, B.B., Surette, M.G. (2009). Long-Term Survival of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveals an Infectious State That Is Underrepresented on Laboratory Media Containing Bile Salts. *Applied and Environmental Microbiology*, (75) 14, 4923-4925.

Aridesi, J.N., Zahller, E., Roe, F., Stewart, P.S. (2003). Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (47) 1251-1256.

Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C. (2014). Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental Microbiology Reports*, (6) 6, 534-544.

Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., Ponder, M. (2013). Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology*, (162) 3, 252-259.

Azizi, A., Yan, F., Honermeier, B. (2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, (29) 2-3, 554-561.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, (29) 1, 54-66.

Bae, Y.-M., Baek, S.-Y., Lee, S.-Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, (153) 3, 465-473.

Barnhart, M.M., Chapman, M.R. (2006). Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, (60) 131-147.

Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, (17) 4, 3989-4006.

Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, 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) 11, 7825-7839.

Bigger, J.W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* (ii) 497-500.

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) 12, 1171-1182.

Borriello, G., Richards, L., Ehrlich, G.D., Stewart, P.S. (2006). Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (50) 382-384.

Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, (13) 1, 20-26.

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, (38) 7, 2465-2467.

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, (82) 1, 64-70.

Brodi, C., Bentzmann, S. (2011). Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive Care*, (1) 1, 19.

Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-David, S., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. (2012). Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (67) 12, 2837-2842.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, (94) 3, 223-253.

Burt, S.A., Ojo-Fakunle, V.T., Woertman, J., Veldhuizen, E.J. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, (9) 4, e93414.

Burt, S.A., Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, (36) 3, 162-167.

Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A. (2005). Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers. *Journal of Food Protection*, (68) 5, 919-926.

Cabarkapa, I., Levic, J., Djuragic, O. (2013). Biofilm, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex Research Center, Badajoz, Spain 42-51.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (46) 6, 1914-1920.

Castelij, G.A.A., Parabirsing, J.-A., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Veterinary Microbiology*, (161) 3-4, 305-314.

Chia, T.W.R., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, (26) 8, 853-859.

Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, (2) 1, 22-32.

Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A., Nychas, G.J.E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, (104) 6, 1586-1596.

CLSI 2006. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard, Seventh Edition, document M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

Collinson, S.K., Emödy, L., Müller, K.H., Trust, T.J., Kay, W.W. (1991). Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, (173) 15, 4773-4781.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, (238) 86–95.

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.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, (88) 1, 170-175.

De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E., Senatore, F. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, (14) 8, 2735-2746.

de Rezende, C.E., Anriany, Y., Carr, L.E., Joseph, S.W., Weiner, R.M. (2005). Capsular Polysaccharide Surrounds Smooth and Rugose Types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, (71) 11, 7345-7351.

Deng, X., Li, Z., Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, (30) 1, 311-315.

Derwich, E., Zineb Benziane, Abdellatif Manar, Boukir, A., Taouil, R. (2010). Phytochemical Analysis and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, (5) 2, 120-129.

Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, (31) 2, 173-180.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, (15) 2, 167-193.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, (88) 2, 308-316.

Duraković, L., Duraković, Z., Blažinkov, M., Bošnjak, M., Sikora, S., Delaš, F., Markov, K., Skelin, A., Čvek, D. (2009). Microbial Communities and Biofilms. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, (4) 3-4, 92-97.

Džamić, A., Soković, M., Ristić, M.S., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P.D. (2008). Chemical composition and antifungal

activity of *Origanum heracleoticum* essential oil. Chemistry of Natural Compounds, (44) 5, 659-660.

EFSA (2013a). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, pp. 250.

EFSA (2013b). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel; Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, pp. 1-138

Ellermeier, C., Schlauch, J. (2006). The Genus *Salmonella*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes, Springer New York, 123-158.

EUCAST (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (6) 503-508.

Eur, P. (2011). European Pharmacopoeia 7th ed. European Council, Strasbourg, France.

Eweis, M., Imhemmed, A.A.-A., Gad, A.S. (2012). Influence of *Thymus serpyllum* essential oil on *Aspergillus parasiticus* morphology and aflatoxins production. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, (3) 2, 322-332.

Finn, S., Händler, K., Condell, O., Colgan, A., Cooney, S., McClure, P., Amézquita, A., Hinton, J.C.D., Fanning, S. (2013). ProP Is Required for the Survival of Desiccated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells on a Stainless Steel Surface. Applied and Environmental Microbiology, (79) 14, 4376-4384.

Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. (2007a). The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". Journal of Bacteriology, (189) 22, 7945-7947.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2002). Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance, in: Bitton, G. (Ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, Wiley, New York, 1223-1231.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, (8) 9, 623-633.

Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., Stoodley, P. (2005). Survival Strategies of Infectious Biofilms. *Trends in Microbiology*, (13) 34–40.

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.

García, B., Latasa, C., Solano, C., Portillo, F.G.-d., Gamazo, C., Lasa, I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, (54) 1, 264-277.

Gerstel, U., Römling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, (154) 10, 659-667.

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.

Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., Nychas, G.-J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, (97) 3, 298-309.

Giaouris, E., Samoilis, G., Chorianopoulos, N., Ercolini, D., Nychas, G.-J. (2013). Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. *International Journal of Food Microbiology*, (162) 1, 105-113.

Giaouris, E.D., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E. (2005). Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *Journal of Food Protection*, (68) 10, 2149-2154.

Giaouris, E.D., Nychas, G.-J.E. (2006). The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, (23) 8, 747-752.

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) 22, 7722-7730.

Gill, O.N., Bartlett, C.L.R., Sockett, P.N., Vaile, M.S.B., Rowe, B., Gilbert, R.J., Dulake, C., Murrell, H.C., Salmaso, S. (1983). Outbreak of *Salmonella napoli* infection caused by contaminated chocolate bars. *The Lancet*, (321) 8324, 574-577.

Ginn, T.R., Wood, B.D., Nelson, K.E., Scheibe, T.D., Murphy, E.M., Clement, T.P. (2002). Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Advances in Water Resources*, (25) 8–12, 1017-1042.

Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., Chatzopoulou, P.S. (2011). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, (44) 4, 1240-1244.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, (137) 2-3, 175-180.

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.

Gruzdev, N., Pinto, R., Sela, S. (2012). Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food Microbiology*, (32) 2, 415-422.

Gupte, A.R., de Rezende, C.L.E., Joseph, S.W. (2003). Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104†. *Applied and Environmental Microbiology*, (69) 11, 6669-6675.

Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, (26) 3, 194-198.

Habimana, O., Møretrø, T., Langsrud, S., Vestby, L., Nesse, L., Heir, E. (2010). Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC veterinary research*, (6) 1, 1-10.

Habimana, O., Nesse, L.L., Møretrø, T., Berg, K., Heir, E., Vestby, L.K., Langsrud, S. (2014). The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: a subject of relevance. *Letters in Applied Microbiology*, (59) 5, 464-470.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, (11) 7, 1034-1043.

Hamilton, S., Bongaerts, R., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., Lappin-Scott, H., Hinton, J. (2009). The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, (10) 1, 599.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, (86) 6, 985-990.

Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, (59) 1, 1-7.

Helander, I.K., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, (46) 3590-3595.

Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Sakae, K., Miyazaki, Y. (2005). Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To Survive in a Desiccation Model System and in Dry Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, (71) 11, 6657-6663.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, (35) 4, 322-332.

Hussain, A.I., Anwar, F., Chatha, S.A.S., Latif, S., Sherazi, S.T.H., Ahmad, A., Worthington, J., Sarker, S.D. (2013). Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. *LWT - Food Science and Technology*, (50) 1, 185-192.

Inamuco, J., Veenendaal, A.K.J., Burt, S.A., Post, J.A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A. (2012). Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella* Typhimurium motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, (157) 1-2, 200-207.

SRPS EN ISO 6579 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E.A. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, (29) 1, 125-130.

Jain, S., Chen, J. (2007). Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production

and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *Journal of Food Protection*, (70) 11, 2473-2479.

Jefferson, K.K., Goldmann, D.A., Pier, G.B. (2005). Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (49) 2467-2473.

Jerković, I., Mastelić, J., Miloš, M. (2001). The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science & Technology*, (36) 6, 649-654.

Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Romling, U., Belova, L.M., Melefors, O. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol*, (7) 70.

Jones, H.C., Roth, I.L., Sanders, W.M. (1969). Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, (99) 1, 316-325.

Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, (64) 3, 367-372.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, (76) 6, 626-631.

Kankaanpaa, P., Paavolainen, L., Tiitta, S., Karjalainen, M., Paivarinne, J., Nieminen, J., Marjomaki, V., Heino, J., White, D.J. (2012). BioImageXD: an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nature Methods*, (9) 7, 683-689.

Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, (89) 3, 205-218.

Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Fine, D.H., Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (48) 2633-2636.

Karabasil, N. (2006). Putevi kontaminacije trupova svinja u klanici salmonele i njihovo ponašanje u mesu. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Karaca, B., Buzrul, S., Tato, V., Akçelik, N., Akçelik, M. (2013). Modeling and Predicting the Biofilm Formation of Different *Salmonella* Strains. *Journal of Food Safety*, (33) 4, 503-508.

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) 1, 22-29.

Kim, S.H., Wei, C.I. (2009). Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, (72) 9, 1841-1847.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research*, (1) 3, 119-128.

Knowles, J., Roller, S. (2001). Efficacy of Chitosan, Carvacrol, and a Hydrogen Peroxide-Based Biocide against Foodborne Microorganisms in Suspension and Adhered to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, (64) 10, 1542-1548.

Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, (44) 5, 883-886.

Kolter, R., Greenberg, E.P. (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* (441) 300-302.

Kovačević, N. (2004). *Osnovi farmakognozije*. Srpska školska knjiga, Beograd.

Kulisic, T., Radonic, A., Milos, M. (2005). Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils. *Grasas y Aceites*, (56) 4, 284-291.

Kumar, C.G., Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, (42) 1-2, 9-27.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, (91) 3, 453-462.

Lappin-Scott, H.M. (1999). Claude E. Zobell – his life and contributions to biofilm microbiology, *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, pp. 1-6.

Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., García-del Portillo, F., Solano, C., Lasa, I. (2012). *Salmonella* Biofilm Development Depends on the Phosphorylation Status of RcsB. *Journal of Bacteriology*, (194) 14, 3708-3722.

Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Penadés, J.R., Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for

biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, (58) 5, 1322-1339.

Leonard, C.M., Virijevec, S., Regnier, T., Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany*, (76) 4, 676-680.

Lianou, A., Koutsoumanis, K.P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, (160) 2, 171-178.

Liu, Y., Tay, J.H. (2001). Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilm. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (17) 111 -117.

Lu, Y., Wu, C. (2010). Reduction of *Salmonella enterica* Contamination on Grape Tomatoes by Washing with Thyme Oil, Thymol, and Carvacrol as Compared with Chlorine Treatment. *Journal of Food Protection*, (73) 12, 2270-2275.

Mafu, A.A., Plumety, C., Deschenes, L., Goulet, J. (2011). Adhesion of Pathogenic Bacteria to Food Contact Surfaces: Influence of pH of Culture. *International Journal of Microbiology*, (2011) 972494.

Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, (9) 1, 34-39.

Mai-Prochnow, A.F., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb J. S., Kjelleberg, S. (2004). Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*, (70) 6, 3232-3238.

Mai-Prochnow, A.F., Webb J. S., Ferrari, B.C., Kjelleberg, S. (2006). Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, (72) 8.

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 SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, (129) 3-4, 360-366.

Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H.S., De Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., De Feo, V. (2014). Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from Different Areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity*, (11) 4, 639-651.

Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J. (2008). Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Arhiv veterinarske medicine (1) 2, 5-15.

Milanov, D., Čubrak, N., Petrović, J., Lazić, S. (2010). Mehanizmi povećane otpornosti bakterija u biofilmu na antibiotike. Arhiv veterinarske medicine, (3) 2, 3-11.

Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. Journal of Applied Microbiology, (106) 3, 1005-1012.

Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Industrial Crops and Products, (52) 183-190.

O'Leary, D., Cabe, E.M.M., McCusker, M.P., Martins, M., Fanning, S., Duffy, G. (2013). Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. International Journal of Food Microbiology, (161) 1, 36-43.

Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Henriques, M., Oliveira, R. (2006). Comparison of the Adhesion Ability of Different *Salmonella* Enteritidis Serotypes to Materials Used in Kitchens. Journal of Food Protection, (69) 10, 2352-2356.

Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Oliveira, R. (2007). Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. Brazilian Journal of Microbiology, (38) 318-323.

Oliveira, M.M.M., Brugnera, D.F., Cardoso, M.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) 4, 549-553.

Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, (34) 4, 415-425.

Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J. (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. Industrial Crops and Products, (4) 1, 23-31.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic

bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, (18) 5, 414-420.

Pei, R.-S., Zhou, F., Ji, B.-p., Xu, J. (2009). Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. *Journal of Food Science*, (74) 7, M379-M383.

Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., Williams, D.W. (2011). Introduction to Biofilms, in: Percival, S.L. (Ed.), *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer, London, New York.

Petrović, S., Ristić, M., Babović, N., Lazić, M., Francisković, M. (2014). Chemical composition and antioxidative activity of essential oil of *Thymus serpyllum* L. *Hemijska Industrija* 51-51.

Pirbalouti, G., Abdollah, Hashemi, M., Ghahfarokhi, F.T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, (48) 43-48.

Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K., Holden, P.A. (2007). Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, (68) 3, 577-587.

Quiroga, P.R., Grosso, N.R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J.A., Nepote, V. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*, (48) 3, 642-649.

Qureshi, N., Annous, B., Ezeji, T., Karcher, P., Maddox, I. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories*, (4) 1, 24.

Ratajac, R. (2006). Efikasnost etarskih ulja u lečenju infekcija brojlera izazvanih sa *Salmonella* Enteritidis. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010). Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil against *Salmonella* Enteritidis in Vitro and in Food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, (74) 6, 1200-1204.

Roberts, A.P., Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Reviews of Anti-Infective Therapy*, (8) 12, 1441-1450.

Roberts, M.E., Stewart, P.S. (2004). Modelling antibiotic tolerance in biofilms accounting for nutrient limitation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (48) 48-52.

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) 4, 451-461.

Römling, U. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (62) 11, 1234-1246.

Römling, U. (2007). Cellulose Biosynthesis in *Enterobacteriaceae*, in: Brown, R.M., Jr. Saxena, InderM (Ed.), *Cellulose: Molecular and Structural Biology*, Springer Netherlands, 107-122.

Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., Normark, S. (1998a). Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation. *Journal of Bacteriology*, (180) 3, 722-731.

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) 4, 273-285.

Römling, U., Gomelsky, M., Galperin, M.Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, (57) 3, 629-639.

Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, (36) 1, 10-23.

Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., Normark, S. (1998b). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Molecular Microbiology*, (28) 2, 249-264.

Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, (55) 1, 35-58.

Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, (19) 7, 681-687.

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) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster

Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46) 9, 3741-3746.

Sabo, A., Tomić, Z., Stanulović, M. (2001). Antibakterijski lekovi. *Kultura*.

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, (15) 7, 549-557.

Sandasi, M., Leonard, C.M., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany*, (77) 1, 80-85.

Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, (19) 11, 1070-1075.

Scheie, A.A., Petersen, F.C. (2004). The biofilm concept: Consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, (15) 1, 4-12.

Scher, K., Kesselman, E., Shimoni, E., Yaron, S. (2007). Morphological analysis of young and old pellicles of *Salmonella* Typhimurium. *Biofouling*, (23) 6, 385-394.

Scher, K., Romling, U., Yaron, S. (2005). Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Applied and Environmental Microbiology*, (71) 3, 1163-1168.

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*, (5) 8, e12406.

Seixas, R., Machado, J., Bernardo, F., Vilela, C., Oliveira, M. (2014). Biofilm Formation by *Salmonella* Enterica Serovar 1,4,[5],12:i:-Portuguese Isolates: A Phenotypic, Genotypic, and Socio-geographic Analysis. *Current Microbiology*, (68) 5, 670-677.

Serra, D.O., Richter, A.M., Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology*.

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.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, (269) 11, 8022-8028.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, (59) 2, 201-222.

Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, (43) 4, 573-583.

Sinde, E., Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, (17) 4, 439-447.

Škrinjar, M. (2001). Mikrobiološka kontrola životnih namirnica. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Solano, C., Garcia, 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) 3, 793-808.

Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M., Annous, B.A. (2005). Biofilm Formation, Cellulose Production, and Curli Biosynthesis by *Salmonella* Originating from Produce, Animal, and Clinical Sources. *Journal of Food Protection*, (68) 5, 906-912.

Soni, K.A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Silva, J.L., Mikel, B., Bailey, R.H. (2013). Inhibition and Inactivation of *Salmonella* Typhimurium Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol. *Journal of Food Protection*, (76) 2, 205-212.

Spector, M.P., Kenyon, W.J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, (45) 2, 455-481.

Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, (31) 2, 572-585.

Stanisavljević, D., Zlatković, B., Ristić, M., Veličković, D., Đorđević, S., Lazić, M. (2012). Hemijski sastav etarskog ulja (*Thymus serpyllum* L.) sa područja Kopaonika. *Savremene Tehnologije*, (1) 1, 25-29.

Stanković, N., Comić, L., Kocić, B., Nikolić, D., Mihajilov-Krstev, T., Ilić, B., Miladinović, D. (2011). Antibacterial activity chemical composition relationship of the essential oils from cultivated plants from Serbia. *Hemijska Industrija*, (65) 5, 583-589.

Statistica, 12.0, 2012. Data Analysis Software System, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA.

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) 2, 502-531.

Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology* 20, 339-343.

Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, (292) 2, 107-113.

Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, (358) 135-138.

Stocki, S.L., Annett, C.B., Sibley, C.D., McLaws, M., Checkley, S.L., Singh, N., Surette, M.G., White, A.P. (2007). Persistence of *Salmonella* on Egg Conveyor Belts Is Dependent on the Belt Type but Not on the rdar Morphotype. *Poultry Science*, (86) 11, 2375-2383.

Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., Soković, M. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, (65) 2, 639-643.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, (56) 187-209.

Szczepanski, S., Lipski, A. (2014). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, (36) 1, 224-229.

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) 7, 2681-2691.

Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, (52) 6, 399-403.

Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, (144) 3, 480-486.

Tuttolomondo, T., La Bella, S., Licata, M., Virga, G., Leto, C., Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., Speciale, A., Napoli, E.M., Siracusa, L., Pasquale, A., Curcuruto, G., Ruberto, G. (2013). Biomolecular Characterization of Wild Sicilian Oregano: Phytochemical Screening of Essential Oils and Extracts, and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *Chemistry & Biodiversity*, (10) 3, 411-433.

Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, (68) 4, 1561-1568.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, (65) 10, 4606-4610.

Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, (63) 5, 620-624.

Ultee, A., Smid, E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, (64) 3, 373-378.

Valeriano, C., de Oliveira, T.L.C., de Carvalho, S.M., Cardoso, M.d.G., Alves, E., Piccoli, R.H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, (25) 2, 673-677.

Veldhuizen, E.J.A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M., Zweijtzer, C., Burt, S.A., Haagsman, H.P. (2006). Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54) 5, 1874-1879.

Verma, R.S., Rahman, L., Verma, R.K., Chanotiya, C.S., Chauhan, A., Yadav, A., Yadav, A.K., Singh, A. (2010). Changes in the essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. *Current Science*, (98) 8, 1110-1112.

Vernet, P., Gouyon, R.H., Valdeyron, G. (1986). Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica*, (69) 3, 227-231.

Vestby, L., Møretrø, T., Ballance, S., Langsrud, S., Nesse, L. (2009a). Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. *BMC veterinary research*, (5) 43.

Vestby, L., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. (2009b). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC veterinary research, (5) 20.

Vokou, D., Kokkini, S., Bessiere, J.-M. (1993). Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. Biochemical Systematics and Ecology, (21) 2, 287-295.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R., Ivanova, E. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. Molecules, (14) 7, 2535-2554.

Vuuren, S.F.v., Viljoen, A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. Flavour and Fragrance Journal, (22) 6, 540-544.

Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G. (2013a). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. International Journal of Food Microbiology, (167) 3, 293-302.

Wang, S., Shi, H., Li, Y., Shi, Z., Zhang, X., Baek, C.-H., Mothershead, T., Curtiss, R. (2013b). A Colanic Acid Operon Deletion Mutation Enhances Induction of Early Antibody Responses by Live Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains. Infection and Immunity, (81) 9, 3148-3162.

White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A., Kay, W.W. (2003). Extracellular Polysaccharides Associated with Thin Aggregative Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. Journal of Bacteriology, (185) 18, 5398-5407.

White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W., Surette, M.G. (2006). Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. Journal of Bacteriology, (188) 9, 3219-3227.

White, A.P., Surette, M.G. (2006). Comparative Genetics of the *rdar* Morphotype in *Salmonella*. Journal of Bacteriology, (188) 24, 8395-8406.

White, A.P., Weljie, A.M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H.J., Surette, M.G. (2010). A Global Metabolic Shift Is Linked to *Salmonella* Multicellular Development. PLoS One, (5) 7, e11814.

Xu, T. (2007). *Salmonella* Host Specificity and Role of Macrophages in Vivo. University of California, San Diego and San Diego State University, San Diego.

Zhang, L., Hinz, A.J., Nadeau, J.P., Mah, T.F. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* tssC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, (193) 19, 5510-5513.

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H.U.I., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W. (2007). The Antibacterial Effect of Cinnamaldehyde, Thymol, Carvacrol and Their Combinations against the Foodborne Pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety*, (27) 2, 124-133.

Zobell, C.E., Allen, E.C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, (29) 3, 239-251.

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) 6, 1452-1463.

Zottola, E.A., Sasahara, K.C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, (23) 125 -148.