

# Inhibicija rasta patogenih bakterija ekstraktima ružmarina i origana

---

**Elblinger, Karlo**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:190834>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**INHIBICIJA RASTA PATOGENIH BAKTERIJA  
EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA**

DIPLOMSKI RAD

Karlo Elblinger

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**INHIBICIJA RASTA PATOGENIH BAKTERIJA**  
**EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA**

DIPLOMSKI RAD

Karlo Elblinger

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**  
**O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Karlo Elblinger**, JMBAG 0068226154, rođen 17.07.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

**INHIBICIJA RASTA PATOGENIH BAKTERIJA EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I  
ORIGANA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Potpis studenta*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**  
**O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta **Karla Elblingera**, JMBAG 0068226154, naslova

**INHIBICIJA RASTA PATOGENIH BAKTERIJA EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I  
ORIGANA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana  
\_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |                                   |        |       |
|----|-----------------------------------|--------|-------|
| 1. | Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka | mentor | _____ |
| 2. | Izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša | član   | _____ |
| 3. | Doc. dr. sc. Nenad Jalšenjak      | član   | _____ |

## Zahvala

Ovim putem želim zahvaliti svojoj mentorici, prof.dr.sc. Mirni Mrkonjić Fuka na svim savjetima, pomoći, strpljenju i razumijevanju tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Želim zahvaliti i mag.ing.agr. Irini Tanuwidjaja na svim savjetima i pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela ovog rada koji su mi uvelike pomogli.

Zahvaljujem i svojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška tijekom studiranja.

# Sažetak

Diplomskog rada studenta **Karla Elblingera**, naslova

## INHIBICIJA RASTA PATOGENIH BAKTERIJA EKSTRAKTIMA RUŽMARINA I ORIGANA

Patogeni mikroorganizmi predstavljaju ozbiljnu prijetnju zdravlju ljudi, životinja i biljaka. Stoga postoji i velik interes za kontrolu i inhibiciju njihova rasta. Jedna od mogućih opcija je primjena ekstrakata različitih biljaka. U ovom radu korišteni su vodeni ekstrakti ružmarina i origana dobiveni ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje, te je ispitano njihovo inhibitorno djelovanje na različite sojeve fitopatogenih mikroorganizama, patogena koji uzrokuju bolesti kod ljudi i prenose se hranom te na višestruko rezistentne patogene bakterije. Inhibitorni utjecaj ekstrakata je ispitan metodom difuzije bunara u agaru i dvojnih kultura, te su određene minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija. Ekstrakt ružmarina nije pokazao inhibitorno djelovanje u odnosu na sve tretirane mikroorganizme, dok je ekstrakt origana pokazao inhibitorno djelovanje na dva soja *Staphylococcus aureus*, SA\_6 i SA\_7. MIK vrijednost ekstrakta origana za soj SA\_6 iznosila je 12,5 %, dok je MBK vrijednost iznosila 25 %. MIK i MBK vrijednosti za soj SA\_7 iznosile su 12,5 %.

**Ključne riječi:** vodeni ekstrakti ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.) i origana (*Origanum vulgare* L.), patogene bakterije i gljive, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

# Summary

Of the master's thesis – student **Karlo Elblinger**, entitled

## **INHIBITION OF THE GROWTH OF PATHOGENIC BACTERIA BY ROSEMARY AND OREGAN EXTRACTS**

Pathogenic microorganisms pose a serious threat to human, animal and plant health. Therefore, there is a great interest in controlling and inhibiting their growth. One of the possible options is the application of extracts of different plants. In this work, aqueous extracts of rosemary and oregano obtained by extraction with high-voltage discharge were used, and their inhibitory effect on phytopathogenic microorganisms, pathogens that cause diseases in humans and are transmitted through food, as well as on multi-resistant bacteria, was estimated. The inhibitory effect of the extracts was tested using the agar well diffusion as dual culture method, and the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations were determined. Rosemary extract did not show an inhibitory effect on all treated microbes, while oregano extract showed an inhibitory effect on two strains of *Staphylococcus aureus* bacteria, SA\_6 and SA\_7. The MIC value of the oregano extract for strain SA\_6 was 12.5%, while the MBC value was 25%. MIC and MBC values for strain SA\_7 were 12.5%.

**Keywords:** water extracts of rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.) and oregano (*Origanum vulgare* L.), pathogenic bacteria and fungi, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)



# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Hipoteza i ciljevi rada .....	3
2.1. Hipoteza .....	3
2.2. Cilj rada .....	3
2.2.1. Specifični ciljevi rada .....	3
3. Pregled literature.....	4
3.1. Biljni patogeni.....	4
3.1.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	5
3.1.2. <i>Pseudomonas syringae</i> .....	7
3.1.3. <i>Erwinia amylovora</i> .....	9
3.2. Patogeni koji izazivaju bolesti kod ljudi .....	11
3.2.1. Otpornost bakterija na antibiotike .....	11
3.2.2. Patogeni koji se prenose hranom .....	13
3.2.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	15
3.2.4. <i>Salmonella</i> spp. ....	16
3.2.5. <i>Listeria innocua</i> .....	17
3.2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.2.7. <i>Enterococcus faecium</i> .....	19
3.2.8. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	21
3.2.9. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
3.3. Karakteristike ružmarina ( <i>Salvia rosmarinus</i> Spenn.) .....	23
3.4. Karakteristike origana ( <i>Origanum vulgare</i> L.).....	26
3.5. Metode ekstrakcije biljnog materijala.....	28
3.5.1. Ekstrakcija uz visokonaponsko pražnjenje ( high voltage electric discharge extraction – HVED) .....	30
3.6. Antimikrobno djelovanje ekstrakata ružmarina.....	31
3.7. Antimikrobno djelovanje ekstrakata origana .....	32
4. Materijali i metode.....	34
4.1. Laboratorijski uređaji.....	34
4.2. Kemikalije .....	34
4.3. Puferi i indikatorske otopine.....	35
4.3.1. Fiziološka otopina (0,85 %).....	35
4.3.2. Otopina resazurina (0,02%).....	35

4.4. Hranjive podloge.....	35
4.4.1. Brain heart infusion agar (BHI).....	35
4.4.2. Muller-Hinton agar (MHA).....	35
4.4.3. Müller-Hinton Broth (MHB).....	36
4.4.4. Krumpir dekstrozni agar (PDA).....	36
4.5. Ekstrakti .....	36
4.6. Mikrobne kulture.....	36
4.7. Određivanje antibakterijskog djelovanja vodenih ekstrakata ružmarina i origana .....	38
4.8. Određivanje antifungalnog djelovanja vodenih ekstrakata ružmarina i origana prema gljivi <i>Botrytis cinerea</i> .....	40
4.9. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije vodenih ekstrakata ružmarina i origana .....	41
4.10. Provjera MIK i MBK subkultivacijom.....	44
4.11. Statistička obrada podataka.....	44
5. Rezultati.....	45
5.1. Antimikrobno djelovanje vodenog ekstrakta ružmarina ( <i>Salvia rosmarinus</i> Spenn.) .....	45
5.2. Antimikrobno djelovanje vodenog ekstrakta origana ( <i>Origanum vulgare</i> L.) .....	48
5.3. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije vodenog ekstrakta origana .....	52
6. Rasprava .....	54
7. Zaključak .....	56
8. Literatura .....	57
9. Životopis.....	67

# 1. Uvod

Patogeni mikroorganizmi koji uzrokuju bolesti biljaka, ljudi i životinja, značajno utječu na poljoprivrednu proizvodnju, zdravstveni sustav i gospodarstvo. Najveću zabrinutost izazivaju patogeni mikroorganizmi koji su višestruko rezistentni na antibiotike zbog otežane mogućnosti liječenja infekcija koje uzrokuju. Zbog toga je potrebno pronaći učinkovita sredstva kako bi se prevenirala pojavnost patogenih mikroorganizama i kontrolirao njihov rast. Patogeni mikroorganizmi korišteni u ovom radu podijeljeni su u tri značajne skupine.

Prva skupina su biljni patogeni u koje spadaju *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* i *Botrytis cinerea*. Biljni patogeni predstavljaju veliki problem za poljoprivrednu proizvodnju uzrokujući velike gubitke i prijetnja su sigurnosti hrane (Cerda i sur., 2017). Procjene pokazuju da godišnji gubitci svjetske biljne proizvodnje koji su uzrokovani biljnim patogenima iznose do 40 % što godišnje donosi gubitke veće od 220 milijardi dolara (FAO, 2022).

Druga značajna skupina patogena su bakterije koje izazivaju bolesti kod ljudi, a prenose se hranom. Patogeni koji spadaju u ovu skupinu su *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecium*. Do bolesti povezanih s hranom dolazi uslijed konzumacije hrane koja sadrži patogenu bakteriju ili kao posljedica konzumiranja hrane koja sadrži toksine koji su nastali kao posljedica kontaminacije hrane bakterijama (Bintsis, 2017). U svijetu svaka deseta osoba oboli od bolesti koje se povezuju s hranom što godišnje uzrokuje do 420 000 smrtnih slučajeva (Bintsis, 2017). Procjenjuje se da se svega 20 % slučajeva bolesti povezanih s hranom može povezati s određenim patogenom, a tih 20 % slučajeva gospodarstvo mogu koštati preko 15,5 milijardi dolara godišnje (Hoffmann i sur., 2015).

U treću skupinu značajnih patogena spadaju karbapenem rezistentne *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* koje su dio ESKAPE skupine mikroorganizama (Pendleton i sur., 2013). Ova skupina patogena trenutno najviše zabrinjava zbog rezistencije na više klasa antibiotika i otežanu mogućnost liječenja oboljelih pacijenata (Tacconelli i sur., 2018).

Zbog velikog utjecaja ove tri skupine patogenih bakterija na poljoprivredu, gospodarstvo i ljudsko zdravlje, postoji velik interes za pronalaženjem alternativnih sredstava pomoću kojih se može inhibirati njihov rast. Kao učinkovito sredstvo za inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama pokazali su se biljni ekstrakti. Međutim, učinkovitost biljnih ekstrakata ovisi o brojnim čimbenicima poput načina ekstrakcije, korištenog otapala, vrsti biljnog materijala i vrsti samih testnih mikroorganizama. Iz tog razloga u ovom radu su korišteni vodeni ekstrakti ružmarina i origana kako bi se ispitalo

njihovo inhibitorno i letalno djelovanje na različite bakterije iz tri skupine značajnih patogenih mikroorganizama.

## 2. Hipoteza i ciljevi rada

### 2.1. Hipoteza

Vodeni ekstrakti ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.) i origana (*Origanum vulgare* L.) dobiveni ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje pokazati će antimikrobna svojstva na rast patogenih bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* te plijesan *Botrytis cinerea*. Utjecaj će ovisiti o koncentraciji i tipu ekstrakta te bakterijskoj vrsti i soju.

### 2.2. Cilj rada

Cilj ovog rada je ispitati *in vitro* antimikrobno djelovanje vodenih ekstrakata ružmarina i origana na biljne patogene (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* i *Botrytis cinerea*), patogene koji izazivaju bolesti kod ljudi i prenose se hranom (*Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus*), te patogene višestruko rezistentne na antibiotike (*Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*).

#### 2.2.1. Specifični ciljevi rada

1. Utvrditi inhibitorni učinak ekstrakata ružmarina i origana u 100 % - tnoj koncentraciji na rast patogenih bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* te plijesan *Botrytis cinerea* metodom difuzije bunara u agaru i dvojnih kultura.
2. Utvrditi minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ekstrakata ružmarina i origana koja odgovara bakteriostatskom učinku.
3. Utvrditi minimalne bakteriocidne koncentracije (MBK) ekstrakata ružmarina i origana koje odgovara baktericidnom učinku.

## 3. Pregled literature

### 3.1. Biljni patogeni

Gubitci usjeva uzrokovani biljnim štetnicima i bolestima velika su prijetnja svjetskoj ekonomiji i sigurnosti hrane. Informacije o gubitcima prinosa i razumijevanje njihovih pokretača ključni su za procjenu učinkovitosti prakse zaštite usjeva, procjenu održivosti sustava proizvodnje, donošenje odluka za upravljanje štetočinama i procjenu učinkovitosti regulacije štetnika i bolesti. Gubitci prinosa mogu se definirati smanjenjem prinosa u smislu količine i kvalitete koje se može dogoditi prije žetve tj. na polju ili nakon same žetve tijekom skladištenja. Biljni štetnici i bolesti mogu uzrokovati primarne i sekundarne gubitke. Primarni gubitci su oni koji se pojave u određenim godinama kada se javi štetnik ili bolest, dok su sekundarni uzrokovani pojavljivanjem štetnika i bolesti tijekom prethodnih godina (Cerda i sur., 2017). Kod jednogodišnjih usjeva sekundarne gubitke uzrokuju patogeni u tlu ili na sjemenu koji se često javljaju kod monokulture te je važno koristiti plodored. Kod višegodišnjih usjeva sekundarni gubitci su uzrokovani preranom defolijacijom ili odumiranjem stabljika i grana što u narednim godinama dovodi do gubitka snage i smanjenom proizvodnjom te se takvi gubitci ne mogu spriječiti na već oštećenim biljkama (Cerda i sur., 2017). FAO procjenjuje da godišnji gubitci svjetske proizvodnje usjeva iznose 40 % kao posljedica biljnih patogena (grafikon 1) što godišnje svjetsko gospodarstvo košta više od 220 milijardi dolara (FAO, 2022). Procjene gubitaka za ekonomski najvažnije kulture kao npr. pšenice kreću se oko 21,5 % (10,1% – 28,1 %), riže 30 % (24,6% – 40,9 %), kukuruza 22,5 % (19,5% - 41,1%), krumpira 17,2 % (8,1% - 21%) te soje 21,4 % (11% - 32,4%) (Savary i sur., 2019).

U ovom istraživanju korištene su fitopatogene bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* i *Erwinia amylovora*, te će navedeni patogeni u nastavku biti opisani.

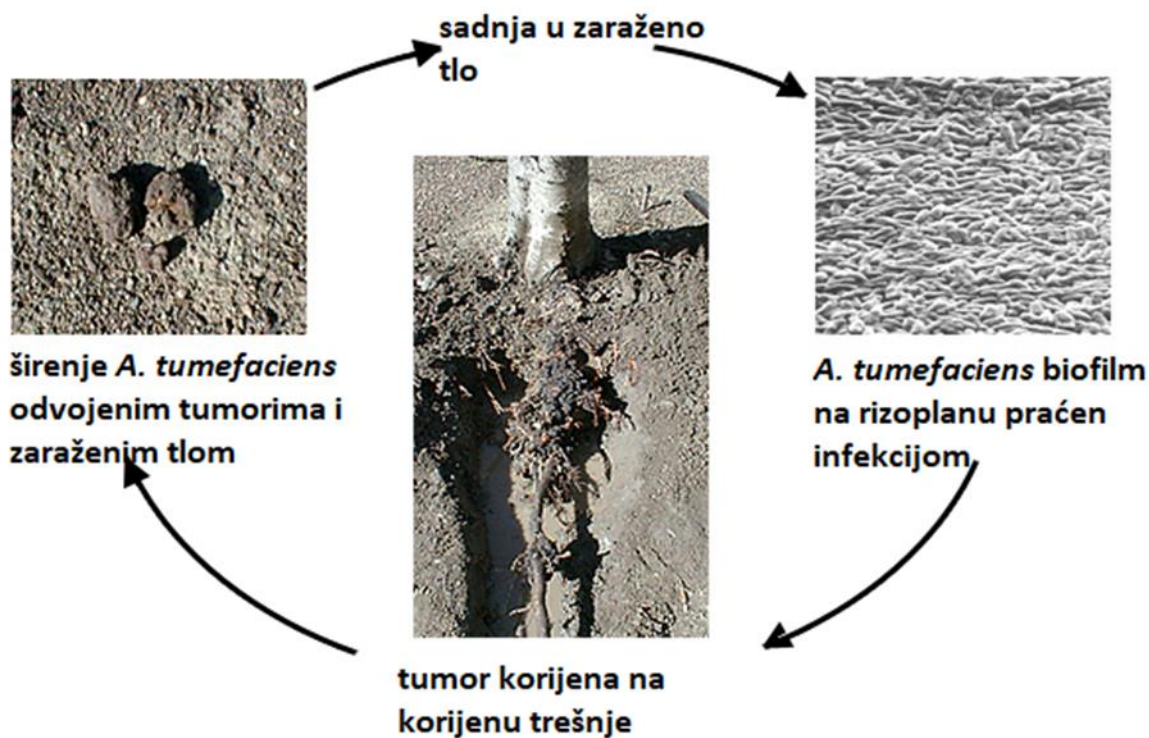


Grafikon 1. FAO procjena gubitaka usjeva uzrokovana biljnim patogenima (Izvor: Modificirano prema Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/home/en/>)

### 3.1.1. *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je bakterija koja spada u porodicu *Rhizobiaceae*. To je Gram negativna, aerobna bakterija koja ne stvara endospore. Stanice su joj štapićastog oblika i pokreću su pomoću flagela.

*Agrobacterium tumefaciens* uzročnik je ekonomski važne bolesti raka vrata korijena. Kozmopolitski je rasprostranjena bakterija koja napada dikotiledone, a od poljoprivrednih kultura je najčešća na koštičavom voću poput jabuke, trešnje, šljive i marelice. Ova bolest se prvenstveno širi preko zaraženih životinja, a sekundarni način širenja joj je kroz uzgoj (Escobar i Dandekar, 2003). Tlo oko oboljele biljke postaje rezervoar bakterija koje u korijen biljka ulaze kroz rane koje mogu nastati tijekom sadnje, cijepjenja ili kao posljedica hranjenja kukaca u tlu. Nakon ulaska u biljke *A. tumefaciens* ugrađuje dijelove vlastitog DNK u genom biljke domaćina što rezultira nekontroliranom diobom stanica i razvojem izraslina nalik na tumore na korijenu i stabljici biljke (slika 1) (Escobar i Dandekar, 2003). Bolest se u početku manifestira kao male otekline na korijenu ili na prizemnim dijelovima stabljike koje nalikuju na kalusno tkivo koje je posljedica ranjavanja. Tumorske izrasline se s vremenom kvare i počinju propadati te se bakterije vraćaju u tlo gdje mogu preživjeti više godina što im omogućava daljnje širenje (Arigos, 2005).



Slika 1. Ciklus širenja *A. tumefaciens* (Izvor : Apsnet.org, <httpswww.apsnet.orgedcenterdisandpathprokaryotepdlessonsPagesCrownGall.aspx>)

Bolest najteže pogađa mlada stabla jer izrasline na njihovom korijenju smanjuju protok vode i hranjiva što rezultira slabljenjem i usporenim rastom (Lacroix i Citovsky, 2013).

Najbolja metoda kontrole ove bolesti je prevencija jer kada se jednom pojavi na nekom području vrlo teško ju je eliminirati. Prije sadnje je potrebno temeljito provjeriti sadnice i ukoliko se primijete bilo kakve izrasline ne saditi takvu biljku u tlo. Ukoliko se tumorske izrasline otkriju dovoljno rano moguće ih je mehanički ukloniti. *A. tumefaciens* može se i biološki kontrolirati uz pomoć *A. radiobacter* K – 84 koja korijen biljke štiti proizvodnjom antibiotika Agrocin 84 (Penalver i sur., 1994). Ukoliko se bolest primijeti na nedavno posađenoj biljci potrebno ju je iskopati uz uklanjanje sloja zemlje oko nje i spaliti (Grabowski, 2019.).



### 3.1.2. *Pseudomonas syringae*

*Pseudomonas syringae* je bakterija koja spada u porodicu *Pseudomonadaceae*. To je Gram negativna, aerobna bakterija. Stanice su joj štapićastog oblika i kreće se pomoću flagela. Uz flagele posjeduje i pile koje joj uz kretanje služe i za lakše prianjanje i stvaranje biofilмова. Najčešće ju nalazimo na površini različitih vrsta biljka. Zahvaljujući širokom rasponu biljaka domaćina široko je rasprostranjena bakterijska vrsta. Osim na biljnim površinama može se pronaći i u ekološkim nišama poput jezera i potoka (Cameron i Sarojini, 2014).

U biljku ulazi kroz rane ili prirodne otvore poput puči pomoću flagela i pila, gdje prelaskom iz epifitne u endofitnu fazu uzrokuje bolesti pomoću fitotoksina koje proizvodi. Fitotoksini koje proizvodi ova bakterija mogu se podijeliti u dvije skupine. U prvu skupinu spadaju toksini koji uzrokuju klorozu (fazeolotoksin, tabtoksin i koronatin) dok drugu skupinu čine toksini koji uzrokuju nekrozu (siringopeptin i siringomicin). Fitotoksini koji uzrokuju klorozu inhibiraju enzime uključene u sintezu aminokiselina u ciklusu uree, dok siringopeptin i siringomicin stvaraju citotoksične pore na plazmatskoj membrani uzrokujući nekroze (slika 2). Uz fitotoksine koje proizvodi, *P. syringae* proizvodi i enzime koji razgrađuju biljno tkivo poput glikozid hidrolaze koja razgrađuje celulozu pektinske matrice te tako oštećuju biljku i uzrokuju trulež na krajevima cvatova (Arrebola i sur., 2011).



Slika 2. Izgled lista nakon infekcije *P. syringae* (Izvor: Microscope master, <https://www.microscopemaster.com/pseudomonas-syringae.html> )

Metode suzbijanja bolesti uzrokovanih bakterijom *P. syringae* najčešće se temelje na upotrebi baktericida na bazi bakrenih spojeva i drugih teških metal. U rijetkim slučajevima koriste se i antibiotici poput streptomicina. Ove metode nikada nisu bile zadovoljavajuće jer su uz suzbijanje bolesti i smanjivale prinose (Bashan, 1997). Posljednjih godina otkriveni su sojevi otporni na bakrene spojeve što dodatno smanjuje učinkovitost ovih metoda. Neke od strategija koje se koriste u kontroli bolesti su dezinfekcija sjemena toplinom, biološka kontrola antagonističkim mikroorganizmima i solarizacija tla. Uz ove strategije u manjoj mjeri se koristi i prskanje biljaka prirodnim antibakterijskim spojevima i razne tehnike održive poljoprivrede bez korištenja kemijskih spojeva (Bashan, 1997).

Izbijanje epidemije *P. syringae* pv. *actinidiae* 2010. godine u Novom Zelandu dovelo je do velikih ekonomskih gubitaka u proizvodnji kivija. Gubitci su već nakon 4 godine od izbijanja epidemije uz troškove izgubljenog izvoza iznosili preko 930 milijuna NZ dolara. Uz smanjenje vrijednosti zaraženih voćnjaka i nezaraženi voćnjaci su pretrpjeli smanjenje vrijednosti pa su u konačnici ukupni gubitci za gospodarstvo bili procijenjeni na čak 2 milijarde NZ dolara (Vanneste, 2017). U Italiji štete na lješnjacima koje izazva *P. syringae* godišnje iznose 1,5 milijuna dolara. Južna Afrika ima godišnje štete na koštunjicavom voću procijenjene na 10 milijuna dolara. U Njemačkoj bolesti uzrokovane *P. syringae* dovode do 30 % smrtnosti stabala šljive (Lamichhane i sur., 2014).

### 3.1.3. *Erwinia amylovora*

*Erwinia amylovora* je Gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija, štapićastog oblika. Raste u temperaturnom rasponu od 4 do 37°C, a optimalna temperatura rasta joj je 28°C. Uzročnik je plamenjače, biljne bolesti koja pogađa gospodarski važne voćne vrste poput jabuke i kruške, te ukrasno bilje iz porodice *Rosaceae*. Za širenje plamenjače najkritičnija je temperatura, a u poljskim uvjetima su potrebne temperature od 18°C za širenje epidemije (Santander i Biosca, 2017).

U biljke bakterija ulazi kroz prirodne otvore, a posebno kroz cvijet i rane u proljeće. Kada uđe u biljku brzo prodire kroz novi rast do starijeg dijela biljke. Pojavom bolesti zaraženi dijelovi biljke izgledaju kao da su opečeni vatrom. Ulaskom bakterije u biljku zaraženi dijelovi poprimaju smeđu boju, a listovi i peteljke crnu boju. Zaraženi listovi nekrotiziraju i suše se, ali ne padaju u jesen već ostaju na biljci do kasne zime (slika 3) (Zahao i sur., 2005). Tijekom zime prelazi u stanje mirovanja u oštećenim granama, a u proljeće postaje aktivna. Rast bakterija stvara mulj na granama i ranama koji privlači muhe, mrave, pčele i druge insekte koji onda prenose bolest. Osim insektima bolest se može širiti vjetrom iz rana ili kišom, te kontaminiranim alatom za rezidbu (Zahao i sur., 2005).



Slika 3. Posljedice plamenjače na stablu kruške (Izvor: Ministarstvo poljoprivrede, <https://www.savjetodavna.hr/2017/08/18/erwinia-amylovora-bakterijska-palez/>)

U slučajevima jake pojave bolesti poduzimaju se radikalne fitosanitarne mjere koje uključuju krčenje nasada u cilju sprječavanja širenja bolesti. U ranim fazama bolesti u svrhu sprječavanja širenja režu se zaražene grane, a mjesto reza se premazuje bakrenim spojevima kako bi se spriječio sekundarni ulazak bakterija u biljku. Orezane dijelove biljke je potrebno spaliti. Alati koji se koriste u orezivanju moraju biti sterilizirani prije svakog rezanja kako bi se spriječilo širenje bolesti na zdrave biljke. U preventivne mjere se također koriste i bakreni spojevi u vrijeme kretanja vegetacije pa sve do cvatnje (Norelli i sur., 2003).

Širenje vrste *Erwinia amylovora* u Kraljevskim botaničkim vrtovima u Melburnu uzrokovalo je štete australskoj industriji jabučastog voća u iznosu većem od 20 milijuna australskih dolara zbog izgubljenih prihoda (Rodoni i sur., 2006). Trošak istraživanja voćnjaka, program iskorjenjivanja i kontrole je iznosio dodatnih 2,2 milijuna australskih dolara. Uslijed prodora zaraze nametnuta su ograničenja za međunarodnu trgovinu koja su industriju koštala preko 7 milijuna australskih dolara zbog izgubljene prodaje i nižih cijena. Naknadno su rađene procjene za buduća potencijalna širenja bolesti. Prvi scenarij je uključivao gubitke prinosa od 30 % i iskorjenjivanje bolesti u roku pet godina što bi rezultiralo gubitcima od 260 milijuna australskih dolara (Rodoni i sur., 2006). Drugi scenarij je rađen na pretpostavci da bolest nije iskorijenjena što uzrokuje pad proizvodnje krušaka od 50 % i jabuka od 20 % što rezultira sa gubitcima od 870 milijuna australskih dolara (Rodoni i sur., 2006).

## 3.2. Patogeni koji izazivaju bolesti kod ljudi

U nastavku rada biti će opisani problemi vezani uz bakterije koje izazivaju bolesti kod ljudi, a koje su otporne na jednu ili više klasa antibiotika, i/ili koje se prenose hranom (eng. *food born bacteria*).

### 3.2.1. Otpornost bakterija na antibiotike

Rezistencija na antimikrobna sredstva koja se razvila kod patogenih bakterija predstavlja značajnu prijetnju javnom zdravlju jer za infekcije koje uzrokuju takvi patogeni postoji vrlo malo dostupnih antibiotika te ponekad ne postoje učinkovita sredstva za liječenje. Otkrićem penicilina 1928. godine započela je i komercijalna proizvodnja i otkrivanje mnogih drugih antibiotika. Procjenjuje se da godišnja proizvodnja antibiotika u svijetu iznosi preko 100 000 tona (Nikaido, 2009). Posljedica takve široke proizvodnje i primjene dovela je do pojave otpornosti patogena na antibiotike, a neki su razvili i otpornost na antibiotike i kemoterapijske agense (Nikaido, 2009).

Antimikrobne tvari mogu se podijeliti prema mehanizmu djelovanja. Glavne skupine antimikrobnih tvari prema takvoj podjeli su tvari koje inhibiraju sintezu stanične stijenke (beta laktami), inhibiraju sintezu proteina (aminoglikozidi), inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina (fluorokinoloni) i tvari koje inhibiraju metaboličke puteve u bakterijama (sulfonamidi) (Reygaert, 2018).

Pojava antibiotičke rezistencije se može objasniti pomoću dva mehanizma, prvi je, mutacija, a drugi horizontalni transfer gena. Mutacije koje dovode do rezistencije na antibiotike najčešće se javljaju kod gena koji kodiraju njihove transportere ili regulatore koji potiskuju ekspresiju prijenosnika (Martinez, 2014). Te mutacije nisu same po sebi geni otpornosti, ali dovode do stjecanja otpornosti na antibiotike. Tako mutacija gena koji kodira prijenosnik antibiotika i čini bakteriju otpornom na antibiotik ne čini taj gen genom rezistencije (Martinez, 2014).

Kod horizontalnog transfera gena, kao drugog način stjecanja otpornosti na antimikrobne tvari, geni otpornosti moraju potjecati od komenzalne bakterije ili bakterije iz okoliša. Horizontalni prijenos gena moguć je pomoću mobilnih genetskih elemenata kao što su plazmidi ili pomoću bakteriofaga koji inficiraju bakterije. Mobilni genetski elementi se prenose pomoću tri mehanizma, transformacije, konjugacije i transdukcije. Kod transformacije bakterija preuzima slobodne fragmente DNA u obliku plazmida koji se nalaze u njihovoj okolini. Konjugacijom se genetski materijal izmjenjuje tijekom privremenog spajanja dviju stanica što dovodi do prijenosa

plazmida. Kod transdukcije se DNA prenosi iz jedne stanice u drugu pomoću bakteriofaga (Reygaert, 2018).

Trenutno najveću zabrinutost izazivaju ESKAPE patogeni, grupa bakterija koju tvore šest bolničkih patogena koji pokazuju otpornost na više lijekova i virulentnost. Otpornost na više lijekova definira se kao nedostatak osjetljivosti na barem jedan agens u tri ili više klasa antibiotika kao npr. beta – laktam (penicilin, cefalosporin), aminoglikozid (gentamicin, streptomycin) i makrolid (eritromicin, azitromicin) (Kumar i Khan, 2015). U grupu ESKAPE patogena spadaju *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. (Pendleton i sur., 2013). Ova grupa patogena odgovorna je za većinu bolničkih infekcija, te su povezani sa najvećim rizikom smrtnosti. Svjetska zdravstvena organizacija uvrstila je ESKAPE patogene na popis bakterija za koje su hitno potrebni novi antibiotici. Na listu kritičnih prioriteta stavljeni su *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* otporni na karbapene i beta laktame proširenog spektra, te *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter* spp. otporni na karbapene. Na listu visokih prioriteta uvršteni su *Enterococcus faecium* otporan na vankomicin i *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (MRSA) i vankomicin (VRSA) (Tacconelli i sur., 2018). U borbi protiv ovih patogena koriste se alternativne terapije koje uključuju korištenje antibiotika u kombinaciji sa spojevima koji pospješuju imunosni odgovor, terapija sa bakteriofagima, antibakterijskih protutijela, fitokemikalija i nanočestica kao antibakterijskih sredstava (Kaur, 2016).

Liječenje pacijenata zaraženih bakterijama rezistentnim na antibiotike bolnice može koštati dodatnih 40 tisuća dolara zbog povećane smrtnosti, produljenja bolesti i smanjenja učinkovitosti rada (Cecchini i sur., 2015). Procjene rađene na usporedbi svijeta bez rezistencije na antibiotike pokazuju da bi zemlje OECD -a mogle imati gubitke od 2,9 trilijuna dolara kao posljedica rezistencije na antibiotike do 2050. godine (Cecchini i sur., 2015).

### 3.2.2. Patogeni koji se prenose hranom

Bolesti uzrokovane hranom tj. trovanje hranom vezano je uz konzumiranje hrane koja je kontaminirana bakterijama i/ili njihovim toksinima. Bolesti koje se prenose hranom se stoga mogu klasificirati kao infekcije i intoksikacije. Kod infekcija je zbog vremena potrebnog za inkubaciju potreban dulji period do pojavljivanja prvih simptoma, dok je kod intoksikacija taj period puno kraći (Bintsis, 2017). Danas je identificirano više od 200 bolesti koje se prenose hranom. Najteži slučajevi trovanja najčešće se javljaju kod starijih ili vrlo mladih ljudi, te kod imunokompromitiranih. Kod zdravih ljudi su teži slučajevi mogući ukoliko su izloženi vrlo visokim koncentracijama mikroorganizama i/ili toksina (Bintsis, 2017).

U svijetu svaka deseta osoba oboli od bolesti povezane sa hranom, što dovodi do 420 000 smrtnih slučajeva godišnje. Najviše su pogođena djeca mlađa od 5 godina kod koje je zabilježeno 125 000 smrtnih slučajeva (Bintsis, 2017). Većina smrtnih slučajeva povezana je sa bolestima probavnog sustava. Osim bolesti probavnog sustava sa hranom je povezano zatajenje bubrega i jetre, poremećaji mozga i živčanog sustava, artritis i neke vrste karcinoma. Najviše slučajeva zaraze i smrti je povezano sa siromaštvom u zemljama s niskim i srednjim prihodima, ali je rastući javnozdravstveni problem diljem svijeta. Na širenje zaraze i patogena povezanih sa hranom najveći utjecaj ima sve veća međunarodna trgovina, dugi i složeni prehrambeni lanci te klimatske promijene i migracije (WHO, World health organization, 2022). Procjene Američke agencije za hranu i lijekove pokazuju da se u SAD godišnje zabilježi preko 48 milijuna slučajeva bolesti povezanih sa hranom što rezultira sa 128 000 hospitalizacija i 3000 smrtnih slučajeva (FDA, US. Food and Drug administration, 2022). Najčešći patogeni koji uzrokuju bolesti povezane sa hranom u SAD – u su *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. i *Staphylococcus aureus*. U 2020. godini u EU je zabilježeno 20017 slučajeva bolesti povezanih s hranom što je rezultiralo sa 1675 hospitalizacija i 34 smrtna slučaja (EFSA, European food safety authority, 2021). Brojke za 2020. godinu pokazuju smanjenje broja slučajeva zaraze, hospitalizacije i smrti što je povezano sa izbijanjem epidemije COVID – 19. U 2019. godini prije izbijanja epidemije COVID – 19 u EU su zabilježena 49463 slučaja zaraze što je rezultiralo sa 3859 hospitalizacija i 60 smrtnih slučajeva (EFSA, European food safety authority, 2019). Procjene govore da samo tih 20 % slučajeva koji se mogu povezati sa određenim patogenom gospodarstvo koštaju preko 15,5 milijardi dolara godišnje (Hoffmann i sur., 2015).

Patogeni koji se mogu prenositi hranom najčešće na nju dopijevaju na polju, pomoću prijenosnika kao što su muhe ili tekućinama. Uz ove načine prijenosa patogeni na hranu mogu doći i preko osoblja ili kontaminiranih površina koje se koriste za pripremu ili konzumaciju hrane. Veliku ulogu u prijenosu patogena ima voda koja je ključna za proizvodnju, preradu i pripremu hrane. Tako se vodom na svježe povrće mogu prenijeti bakterije poput *Listeria innocua*, *Escherichia coli* te *Salmonella spp* (Bintsis, 2017). Tako je putem površinskog navodnjavanja i kontaminiranog komposta zabilježen prijenos *Listeria innocua* na salatu (Oliveira i sur., 2011). Epidemija *Escherichia coli* koja proizvodi verotoksin u Švedskoj 2005. godine također je povezana sa salatama koje je bila kontaminirana putem vode za navodnjavanje (Söderström i sur., 2008). U SAD – u su 2002. i 2005. godine izbile epidemije soja *Salmonella* Newport koja je bila povezana sa rajčicama koje su bile kontaminirane vodom iz ribnjaka koja se koristila za navodnjavanje (Greene i suradnici, 2008). Kukci poput muha, žohara i mrava koji su prilagođeni na suživot s ljudima i prisutni su u zgradama poznati su vektori prijenosa patogena povezanih s hranom (Pava-Ripoll i sur., 2015). Istraživanje provedeno u gradskoj bolnici u Brazilu tako je povezalo mrave sa bakterijama *Escherichia coli* i *Salmonella spp.* (Pesquero i sur., 2008). Druga studija je povezale žohare u bolnicama, postrojenjima za preradu hrane i ugostiteljskim objektima sa bakterijama *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* i *Enterobacter* (García i sur., 2012). Patogeni koji su prisutni u okruženjima za preradu hrane mogu potjecati iz više izvora kao što je sama kontaminirana hrana tj. namirnice, površine koje se koriste za pripremu hrane ili od samih osoba koje rukuju sa hranom. Izvor patogena u prostorima za preradu hrane mogu biti unakrsna kontaminacija, kuhinjski pribor, nedovoljna termička obrada ili neadekvatno skladištenje. Studija provedena u Portugalu među osobama koje rukuju hranom pokazala je da je 20 % zaposlenika imalo nazalnu kontaminaciju, a oko 11 % zaposlenika imalo je ruke kontaminirane bakterijom *Staphylococcus aureus* (Castro i sur., 2016). Osim na polju, u proizvodnji i preradi hrane te ugostiteljskim objektima do kontaminacije namirnica i prijenosa bakterija povezanih s hranom može doći i u kućanstvima. U kućanstvima je najčešći problem unakrsna kontaminacija što je dokazala studija provedena u SAD – u 2015. godine (Kosa i sur., 2015) čiji je cilj bio ispitati svjesnost potrošača o sigurnosti hrane. Studija je pokazala kako 70 % ispitanika ispire sirovo meso peradi što može dovesti do prskanja kontaminirane vode i prijenosa patogena na drugu hranu i površine na kojima se hrana priprema. Studija je pokazala i kako samo 17,5 % potrošača pravilno čuva sirovo meso peradi u hladnjaka (Kosa i sur., 2015).

U nastavku će biti opisane bakterije koje izazivaju bolesti kod ljudi i koji se prenose hranom, a koji su korišteni u ovom istraživanju. Pojedini patogeni (*S. aureus* i *E. faecium*), osim što izazivaju bolesti koje se prenose hranom, nalaze se i u ESKAPE skupini patogena, kada su rezistentni na pojedine klase antibiotika.



### 3.2.3. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* je gram negativna, aerobna bakterija. Stanice su u obliku štapića i pokretne. Može se pronaći u vlažnim okruženjima kao što su tlo, voda ili biljke. Optimalne temperature rasta su mu od 25 do 30°C, a može rasti i na temperaturama ljudskog tijela od 37°C (Scales i suradnici, 2014).

*Pseudomonas fluorescens* se često može naći u hrani spremnoj za jelo. Pokazuje širok raspon temperatura rasta pa je čest problem kod rashlađenih namirnica kao što su sir, mlijeko i mesni proizvodi. Uzrokuje kvarenje hrane lučenjem enzima kao što je lipaza koja djeluje na molekule masti u hrani i uzrokuje oslobađanje nezasićenih glicerola i masnih kiselina (Kumar i suradnici, 2019). Kratkolančane nezasićene masti daju neugodan okus, dok se nezasićene masti srednjih lanaca povezuju sa gorkim okusom. U sirevima se lipaze apsorbiraju unutar masnih kuglica i ostaju u siru, gdje potiču truljenje usred zrenja polutvrđih i tvrdih sireva (Samaržija i suradnici, 2012). Kod hladnog skladištenja mlijeka najprisutniji je *P. fluorescens* (Machado i suradnici, 2015). Nakon toplinske sterilizacije enzimi koje tvori *P. fluorescens* ostaju aktivni i uzrokuju gorčinu, talog i geliranje mlijeka. Uz kvarenje dovode i do stvaranja biofilmova na površini opreme i alata u linijama za proizvodnju nakon čega ih je vrlo teško ukloniti. Stvaranje biofilmova stvara povoljne uvjete za rast drugih patogenih bakterija koji predstavljaju rizik za po zdravlje potrošača (Shpigel i suradnici, 2015). U mesu lipaze razgrađuju gliceride i tvore slobodne masne kiseline koje tvore neugodan okus poput užeglosti (Huis In't Veld, 1996). *P. fluorescens* je izoliran i iz lisnatih zelenih salata prikupljenih iz različitih restorana u Turskoj. Svi izolirani izolati su bili otporni na antibiotike ampicilin, amoksicilin i cefuroksim (Düyüncü i Ulusoy, 2019).

*Pseudomonas fluorescens* općenito se ne smatra patogenom kod ljudi, ali može uzrokovati bakterijemiju. Većina slučajeva bakterijemije može se povezati s korištenjem kontaminirane opreme za intravensku infuziju, a identificiran je i u respiratornim uzorcima. Pronađen je i kod više od 50 % pacijenata sa Chronovom bolesti (Scales i sur., 2014). Infekcije najčešće pogađaju krvotok, a najviše slučajeva je povezano sa bolničkim pretragama. Javlja se u izbijanjima, a najveće izbijanje je povezano sa fiziološkom otopinom pripremljenom u ljekarni kada je zahvaćeno preko 80 pacijenata u šest država (Gershman i sur., 2008). *Pseudomonas fluorescens* pokazuje i značajke oportunističkog patogena u živčanim stanicama gdje se može vezati na citoplazmatsku membranu neurona i izlučivati citotoksine koji mogu uzrokovati staničnu smrt (Picot i sur., 2001)

### 3.2.4. *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. je fakultativno anaerobna, Gram negativna bakterija. Stanice su joj u obliku štapića i pokretne su pomoću flagela. Smatra se mezofilom i može podnijeti ekstremno niske i ekstremno visoke temperature čiji se raspon kreće od 2 do 54°C. Dio su porodice *Enterobacteriaceae* i medicinski su važan patogen kod ljudi i životinja. Rod *Salmonella* sastoji se od dvije vrste i šest podvrsta. Trenutno prepoznate vrste su *S. enterica* i *S. bongori*. *Salmonella enterica* se dalje može podijeliti u podvrste *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae* i *S. enterica subsp. indica* temeljem biokemijskih i genomskih modifikacija (Tindall i sur., 2005). Većina vrsta roda *Salmonella* su fermentatori laktoze, proizvođači hidrogen sulfita, oksidaza negativni te katalaza pozitivni. Uz navedena biokemijska svojstva koja omogućuju identifikaciju *Salmonella* ima sposobnost rasta na citratu, kao jedinom izvoru ugljika, dekarboksilaciju lizina i hidrolizu uree (Jensen i Hoorfar, 2000).

*Salmonella* spp. prirodno obitava u probavnom traktu ljudi i životinja, a može se pronaći i kod divljih ptica i pojedinih kukaca. Zbog prirodnog prisustva u probavnom traktu glavni izvori kontaminacije na farmama su tlo, stelja, stočna hrana i fekalne tvari. Izlučivanjem putem fekalni tvari kukci i životinje mogu bakterije prenijeti na veliki broj mjesta, a može se pronaći i u vodi u kojoj je pokazatelj fekalne kontaminacije (Hoelzer i sur., 2011). *Salmonella* se najčešće širi putem sirove piletine, a izvor joj mogu biti i mnoge druge namirnice kao što su puretina, govedina, svinjetina, jaja, voće, klice, ali i prerađena hrana kao što su maslaci od orašastog voća. Ptice zaražene salmonelom u većini slučajeva ne pokazuju znakove bolesti što dodatno otežava dijagnosticiranje na farmi i omogućava širenje bakterija u proizvodnji hrane (Andino i Hanning, 2015).

Kod zaraze salmonelom simptomi se javljaju u roku od šest sati do maksimalno tri dana od konzumacije kontaminirane hrane. Kod većine zdravih ljudi simptomi uključuju blagi proljev, povraćanje, vrućicu i glavobolju, te prolaze u roku od 2 dana. Kod 90 % zaraženih bolest prolazi bez traženja medicinske pomoći. Kod 7 % ljudi zaraza prolazi uz traženje liječničke pomoći, ali ne zahtjeva hospitalizaciju i procjenjuje se da traje u prosjeku 5 dana (Hoffmann i sur., 2015). Kod ostalih 2 – 3 % slučajeva simptomi su dovoljno ozbiljni da zahtjevaju hospitalizaciju. Simptomi povezani sa hospitalizacijom uključuju krvavi proljev i dehidraciju koja zahtjeva primjenu infuzije. Kod 98 % hospitalizacija dolazi do potpunog ozdravljenja, dok je kod 2 % zabilježen smrtni ishod. Hospitalizacija u prosjeku traje šest dana, a do oporavka dolazi tri dana nakon hospitalizacije (Hoffmann i sur., 2015). Ovakve zaraze godišnje u SAD – u koštaju gospodarstvo preko 3,7 milijardi dolara, od čega se 90 % financijskog tereta povezuje sa smrtnim ishodom (3,3 milijarde dolara), 8 % sa hospitalizacijom (294 milijuna dolara) i 2 % sa ne hospitaliziranim slučajevima (Hoffmann i sur., 2015). U EU se godišnje zabilježi oko 90 000 slučajeva zaraze salmonelom, a procjenjuje se da bi

to moglo donijeti ekonomski teret od 3 milijarde eura godišnje (EFSA, European food safety authority, 2022).

### 3.2.5. *Listeria innocua*

*Listeria innocua* je Gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija koja je prisutna u okolišima kao što su tlo, voda, biljni materijal i hrana. *Listeria innocua* je bliski rođak vrste *Listeria monocytogenes* koja je važan patogen koji se prenosi hranom, a kod ljudi uzrokuje listeriozu. Listerioza je rijetka, ali vrlo često smrtonosna bolest kod ljudi (Orsi i Wiedmann, 2016). Tipični sojevi *L. innocua* smatraju se nepatogenim za ljude i sisavce iako su prijavljeni slučajevi septikemije i meningitisa (Favaro i sur., 2014; Perrin i sur., 2003). Uz tipične sojeve koji su nehemolitički u raznim namirnicama poput morskih plodova u Aziji, svinjetine u Sjevernoj Americi i piletine u Europi zabilježeni su atipični hemolitički sojevi *L. innocua* (Moura i sur., 2019).

Provedene studije koje su istraživale povezanost atipičnih sojeva *L. innocua* i *L. monocytogenes* pokazale su da je patogenost atipičnih sojeva povezana sa patogenosti *L. monocytogenes*. Studije su pokazale da su atipični sojevi *L. innocua* virulentni i sposobni izazvati infekciju, ali u manjoj mjeri od *L. monocytogenes* (Moura i sur., 2019).

### 3.2.6. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je Gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija. Prirodno se nalazi u tlu, vodi i zraku, a kolonizira i nosnu sluznicu i kožu kod ljudi gdje uglavnom ne uzrokuju nikakve zdravstvene tegobe. Temperaturni raspon u kojem je moguć rast *S. aureus* je od 7 do 48°C, a optimalna temperatura rasta je 37°C. Otporan je na smrzavanje pa tako može preživjeti i temperature do -20°C. Posjeduje otpornost na nepovoljne uvjete poput niskog aktiviteta vode i visokog sadržaja soli pa može preživjeti u različitim namirnicama koje inače nisu sklone bakterijskom rastu kao što su to suhomesnati proizvodi (Rasheed i Hussein, 2021).

U hranu najčešće dolaze kontaminacijom preko ljudi pa posebnu opasnost predstavlja hrana koja se termički ne obrađuje prije konzumacija kao salate, kruh, te voće (Castro i sur., 2016). Iako se termičkom obradom bakterije ubijaju, toksini koje je proizvela ostaju i mogu izazvati bolest. Toksini koje proizvodi uključuju citolitičke toksine koji napadaju imunološke i krvne stanice (egzotoksini  $\alpha$  i  $\beta$ ) te superantigenske egzotoksine poput egzotoksina A – G i toksina sindroma toksičnog šoka (Cheung i sur., 2021). Proizvodnja toksina povećava sposobnost *S. aureus* da izazove različite

infekcije koje mogu biti blage, ali i opasne po život (Rasheed i Hussein, 2021). *Staphylococcus aureus* je također razvio i rezistentnost na antimikrobne tvari i širok spektar antibiotika kroz horizontalni prijenos gena, bakteriofage, plazmide i otoke patogensoti (Rasheed i Hussein, 2021).

Stafilokokno trovanje hranom javlja se relativno brzo nakon konzumacije kontaminiranih namirnica, najčešće u roku od tri sata. Simptomi trovanja uključuju povraćanje, grčeve u trbuhu i proljev. Uz najčešće simptome kod ozbiljnijih slučajeva može doći i do glavobolje, grčeva u mišićima i naglih promjena u krvnom tlaku i puls. Do potpunog oporavka najčešće dolazi nakon jednog do tri dana od trovanja. Smrtni slučajevi kod stafilokoknog trovanja hranom su rijetki, ali su zabilježeni kod male djece i starijih osoba sa stopom smrtnosti od oko 4 % (Matthews i sur., 2017).

U Italiji je 2015. godine (Ercoli i sur., 2017) došlo do izbijanja stafilokoknog trovanja hranom u lokalnom restoranu gdje su 24 gosta od njih 42 prijavila gastrointestinalne simptome. Provedena je inspekcija te je utvrđeno da je pet osoba koje rukuju hranom bilo pozitivno na *S. aureus*, a stafilokokni enterotoksin je nađen u desertu i na kuhinjskim površinama. Zaključeno je da kontaminacija potječe od osoba koje rukuju hranom, a nepravilno skladištenje deserta na sobnoj temperaturi omogućilo je rast bakterija i proizvodnju toksina (Ercoli i sur., 2017). U Vijetnamu je 2018. godine (Le i sur., 2021) došlo do velikog trovanja u školskoj kantini koje je rezultiralo hospitalizacijom 352 učenika koji su pokazivali simptome stafilokoknog trovanja hranom. Utvrđena je prisutnost *S. aureus* u dva prehrambena artikla, prženim račićima i piletini. Prisutnost *S. aureus* također je pronađena u uzorcima stolice radnika koji su rukovali hranom i na smrznutom pilećem mesu, ali ne i na rukama radnika. Zaključeno je da je izvor kontaminacije bilo zamrznuto pileće meso. Izolacijom sojeva koji su doveli do trovanja utvrđeno je da su otporni na penicilin i tetraciklin (Le i sur., 2021).

Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) nastao je kao posljedica prijenosa mutacije proteina koji veže penicilin, a prenosi ga bakteriofag (Hartman i Tomasz, 1984). MRSA ima sposobnost izazvati niz infekcija različitih organskih sustava, a najčešće su infekcije kože i potkožnog tkiva, a slijede ih meningitis i upala pluća. Mogućnost infekcije meticilin rezistentnim *S. aureus* najčešće povećava dugotrajan boravak unutar bolnice i korištenje invazivnih načina liječenja poput hemodijalize, venskih i urinarnih katetera (Siddiqui i Koirala, 2022).

Kod liječenja MRSA infekcija kod bolničkih pacijenata najčešće se intravenozno koristi vankomicin na koji je većina MRSA infekcija osjetljiva, iako se ponekad javljaju i slučajevi otpornosti na vankomicin. Ukoliko vankomicin nije dostupan ili postoji opasnost od alergijske reakcije na njega kao alternativa može poslužiti i daptomicin (Siddiqui i Koirala, 2022). Kod MRSA infekcija ključnu ulogu imaju mjere prevencija kako do izbijanja infekcija uopće nebi došlo. Prevencija uključuje stroge higijenske mjere kao što su često pranje ruku sapunom ili sredstvima na bazi alkohola, korištenje rukavica i posebne medicinske opreme kod liječenja pacijenata zaraženih MRSA –

om, izolacija pacijenata i što je manje moguće seljenje pacijenata unutar bolnice (Siddiqui i Koirala, 2022).

Uz prisustvo MRSA – e, u posljednje vrijeme pojavili su si u sojevi vankomicin rezistentnog *Staphylococcus aureus* koji predstavljaju ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju iz razloga što je vankomicin jedan od posljednjih antibiotika dostupnih za liječenje MRSA infekcija. Do rezistencije na vankomicin došlo je uslijed prijenosa gena vanA iz enterokoka rezistentnog na vankomicin (Cong i sur., 2019). Kao i kod MRSA infekcija, VRSA infekcije najčešće se javljaju u bolničkom sustavu gdje su povezane sa visokom stopom smrtnosti, a za sprječavanje pojave VRSE je ključna prevencija koja uključuje stroge higijenske mjere. Ukoliko do izbijanja infekcije VRSA – om dođe najčešće se u liječenju koriste antibiotici daptomicin i linezolid (Cong i sur., 2019).

### **3.2.7. *Enterococcus faecium***

*Enterococcus faecium* je Gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija. Može se pronaći u biljkama, gastrointestinalnom traktu životinja i na hrani. Namirnice u kojima se mogu pronaći enterokoki su uglavnom namirnice životinjskog podrijetla kao što su meso, fermentirani i kuhani proizvodi od mesa i sirevi. Enterokoki spadaju u bakterije mliječne kiseline te su važni u kvarenju hrane i fermentaciji. Primjenjuju se i kao probiotici kod ljudi i životinja, ali su također i važni bolnički patogeni koji uzrokuju bakterijemiju, endokarditis i druge infekcije (Hanchi i sur., 2018). Sojevi koji se koriste kao probiotici u farmaceutskim pripravcima unose se u velikim količinama za liječenje dijareje, sindroma iritabilnog crijeva ili za snižavanje kolesterola i poboljšanje imuniteta. (Franz i sur., 2011) . Neki od sojeva posjeduju i otpornost na antibiotike, te je njihova uloga u bolestima potaknula pitanje o njihovoj sigurnosti za upotrebu u hrani ili kao probiotika (Franz i sur., 2011).

Rod *Enterococcus* svrstava se u rizičnu skupinu dva, koja uključuje mikroorganizme koji nose gene otpornosti na antibiotike i gene virulencije, a mogu se širiti hranidbenim lancem (Jahan i suradnici, 2015). Studije su pokazale da je moguć prijenos gena između roda *Enterococcus* i *S. aureus* (de Niederhäusern i sur., 2011).

Budući da spadaju u bakterije mliječne kiseline u sirovom mlijeku mogu djelovati kao prirodni starteri obzirom da mogu preživjeti temperature hlađenja mlijeka i pasterizacije, te su prilagodljivi na toplinu i različite uvjete rasta (Hanchi i sur., 2018).

*Enterococcus faecium* dio je prirodne mikrobiote mnogih fermentiranih proizvoda, a može se pronaći i u sirovom mesu (Garriga i Aymerich, 2014). Također je prisutan i u ribi i fermentiranim ribljim proizvodima (Ishibashi i sur., 2012).

Kod bolesnih svinja i hospitaliziranih pacijenata izolirana je bakterija *Enterococcus faecium* koja je bila rezistentna na penicilin, amikacin, ampicilin i ciprofloksacin (Lu i sur., 2002). U Koreji (Kim i Koo, 2020) je provedena studija

pojavnosti *E. faecium* u proizvodima od prerađenog svinjskog mesa dostupnih u maloprodaji. Pronađeni sojevi *E. faecium* u mesnim proizvodima bili su rezistentni na nekoliko antibiotika, a najviše na eritromicin (80 %), klindamicin (50 %) i nitrofurantoin (20 %). *E. faecium* otporan na eritromicin dokazuje da se otpornost na lijekove može prenijeti i hranom i uzrokuje zabrinutost za sigurnost hrane i javno zdravlje (Kim i Koo, 2020).

Enterokoki su razvili mnoge mehanizme rezistencije na antibiotike kao što su aminoglikozidi,  $\beta$  – laktami, tetraciklini, kinolini i glikopeptidi. Najveću zabrinutost izaziva rezistentnost na glikopeptide u koje spada vankomicin. Rezistencija na vankomicin javlja se kao posljedica promijene u formiranju peptoglikana koji čini staničnu stijenu bakterije, a koja uzrokuje smanjenje afiniteta vezanja vankomicina (Levitus i sur., 2022).

Enterokoki otporni na vankomicin (VRE) pojavili su se u Europi 1980 – ih godina, a njihova pojava vjerojatno je uzrokovana korištenjem antibiotika avoparcina koji spada u grupu glikopeptida kod stoke za poticanje rasta. U SAD– u je do pojave rezistentnosti vjerojatno došlo uslijed prekomjerne upotrebe vankomicina u bolničkom okruženju (Levitus i sur., 2022).

Enterokoki otporni na vankomicin najveći rizik predstavljaju za pacijente koji su podvrgnuti dugotrajnoj antibiotskoj terapiji koja dovodi do promijena u crijevnoj mikroflori, zatim pacijenti sa težim osnovnim bolestima i imunokompromitirani, te pacijenti koji dugo borave u bolnicama. Pacijenti zaraženi VRE pokazuju širok raspon bolesti, a najčešća je bakterijemija i endokarditis. Uz ove najčešće bolesti, VRE može uzrokovati i infekcije urinarnog trakta koje su povezane za korištenjem urinarnih katetera i abdominalne infekcije (Levitus i sur., 2022).

Kod infekcija uzrokovanih *E. faecalis* liječenje se provodi  $\beta$  – laktamima, dok je većina sojeva *E. faecium* vrlo otporna na  $\beta$  – laktame i aminoglikozide. Ukoliko je VRE vrlo otporan na druge antibiotike liječenje se provodi antibioticima daptomicinom i linezolidom (Levitus i sur., 2022).

### 3.2.8. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* je Gram negativna, nepokretna, aerobna bakterija. Vrste roda *Acinetobacter* sveprisutne su u prirodi te se mogu izolirati iz gotovo svih uzoraka tla i površinskih voda. *A. baumannii* kao patogen najčešće je prisutan na vlažnim tkivima poput sluznica ili područja na koži koja su izložena uslijed ozljeda. Koža i meka tkiva zaražena *A. baumannii* u početku imaju izgled sličan kori naranče nakon čega se na područjima oštećenja mogu vidjeti nekroze praćene bakterijemijom (Sebeny i sur., 2008). Osim infekcija na koži *A. baumannii* uključen je u širok raspon anatomskih regija i povezan sa različitim ishodima bolesti. Široko je prisutan patogen kod imunokompromitiranih osoba i osoba koje imaju produžen boravak u bolnicama, tj. u njima su duže od 90 dana. U bolničkom okruženju čest je uzročnik upala pluća povezanih sa respiratorom. Duži boravci u bolnici, duže vrijeme provedeno na respiratoru i prethodna uporaba antibiotika faktori su koji mogu povećati rizik od upale pluća povezane sa respiratorom (Luna i Aruj, 2007). Širenja infekcija *A. baumannii* u bolnicama mogu biti uzrokovana i zdravstvenim radnicima koji imaju ruke kolonizirane *A. baumannii* te zbog loše higijene. Uz zdravstvene radnike širenju mogu pridonijeti i kontaminirani respiratori i oprema za njegu dišnog sustava (Luna i Aruj, 2007). Osim unutar bolnica, upala pluća koju uzrokuje *A. baumannii* se može pojaviti i izvan bolničkog sustava. Izvor infekcija mogu biti osobe koje nose *A. baumannii* u grlu i javlja se kod osoba povezanim sa pretjeranom konzumacijom alkohola (Anstey i sur., 2002).

*Acinetobacter baumannii* postao je jedan od najčešćih patogena u zdravstvenoj skrbi zahvaljujući svojoj velikoj sposobnosti stjecanja rezistencije na antibiotike. Nekoliko sojeva *A. baumannii* visoko je rezistentno na većinu klinički dostupnih antibiotika. Neki od mehanizama rezistencije koje posjeduje *A. baumannii* su posjedovanje enzima beta laktamaza koji inaktivira beta laktame i enzima koji modificiraju aminoglikozide, efluksne pumpe koje su povezane sa rezistencijom na različite klase antibiotika poput imipemena i tigeciklina, te modifikacija ciljanih mjesta za antibiotike (Lee i sur., 2017). *Acinetobacter baumannii* razvio je rezistentnost na aminoglikozide, karbapeneme, fluorokinolone, cefalosporine, rifampicine, tetracikline i polimiksine (Vázquez-López i sur., 2020).

Antimikrobna terapija protiv *A. baumannii* uključuje korištenje kombinacije dostupnih antibiotika poput kombinacije kolistina i eifampicina, kolistina i minociklina ili kolistina i karbapenema. Uz kombinacije antibiotika koriste se i terapije bakteriofagima koji inficiraju bakterije sa preciznim bakterioličkim djelovanjem. Nedostatak terapija bakteriofagima je njena visoka cijena i mali broj eksperimentalnih dokaza koji ograničavaju njenu upotrebu (Vázquez-López i sur., 2020).

### 3.2.9. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* je Gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja spada u porodicu *Enterobacteriaceae*. Prirodno se nalaze u ljudskim crijevima gdje ne uzrokuju bolesti, te se mogu pronaći u ljudskom izmetu. Sposobna je uzrokovati različite vrste infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi poput, upale pluća, infekcija krvotoka, infekcija rana ili kirurških zahvata te meningitisa. Najčešće se javljaju u bolničkom sustavu među imunokompromitiranim pacijentima koji se liječe zbog drugih stanja (de Koster i sur., 2022). Najveći rizik od infekcije imaju pacijenti koji zahtijevaju korištenje uređaja poput respiratora, intravenskih katetera ili dugotrajno koriste antibiotike (de Koster i sur., 2022). Izvan bolničkog sustava hipervirulentni sojevi mogu izazvati ozbiljne infekcije koje uključuju upalu pluća, piogeni apsces jetre i meningitis kod inače zdravih osoba (Wyres i sur., 2020).

Unutar zdravstvenog sustava *K. pneumoniae* se može širiti kontaktom sa osobe na osobu preko kontaminiranih ruku zdravstvenih radnika ili rjeđe kontaminacijom okoliša. *K. pneumoniae* otporna na antibiotike pronađena je i u pilećem mesu u Alžiru (Chagalla i sur. 2021), a mnogi drugi visokorizični sojevi pronađeni su kod životinja u Kini (Yang i sur., 2019). Pojava sojeva rezistentnih na antibiotike kod životinja i u hrani predstavlja prijetnju sigurnosti hrane i zdravlja životinja i ljudi (de Koster i sur., 2022).

*K. pneumoniae* ima sposobnost lakšeg razvoja rezistencije na antibiotike nego većina drugih bakterija. Ta sposobnost pripisuje se mogućnosti proizvodnje enzima poput beta laktamaza spektra i karbapenemaza (Nirwati i sur., 2019). *K. pneumoniae* razvila je rezistentnost na gotovo sve beta laktame uključujući i karbapeneme zadnje generacije što pokazuje sposobnost brze prilagodbe na promjene u okolišu. Rezistentnost na ove antibiotike može se pripisati prisutnosti gena koji kodiraju otpornost na karbapenemazu. Genima za rezistentnost može se pripisati i rezistentnost *K. pneumoniae* na cefalosporin. Razvoj rezistentnosti na aminoglikozide kod *K. pneumoniae* može biti posljedica modifikacije stanične propusnosti. Niska razina rezistencije na starije generacije antibiotika poput kolistina mogu biti pripisane ograničenoj upotrebi u medicini zbog njihove toksičnosti i predstavljaju mogućnost za liječenje (Effah i sur., 2020). Kao i kod drugih višestruko rezistentnih bakterija za liječenje se primjenjuju kombinacije antibiotika (de Koster i sur., 2022).



### 3.3. Karakteristike ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

Ružmarin (*Salvia rosmarinus* Spenn.) je mala vazdazelena biljna vrsta iz porodice Lamiaceae. Podrijetlom je s Mediterana, ali je široko rasprostranjen u većem dijelu Europe i uzgaja se vrtovima u toplim krajevima (Nieto i sur., 2018). Višegodišnji je grm koji naraste do jednog metra visine, a pojedine biljke mogu doseći i visinu do dva metra. Listovi su mu dugi oko jednog cm i tamnozeleni su boje i sjajni odozgo, dok je naličje lista bijele boje. Ima male plavičaste cvjetove koji se nalaze u pazušnim grozdovima (slika 4). Prilično je otporna biljka na većinu štetočina i biljnih bolesti, dok je u vlažnim uvjetima osjetljiv na gljivične infekcije kao što je pepelnica. U prošlosti se vjerovalo da jača pamćenje, a u tradicionalnoj medicini se koristio kao aromatični sastojak tonika. Listovi mu imaju pomalo gorak okus i danas se svježi ili sušeni koriste kao začini u kulinarstvu, kod pripreme janjetine, piletine, morskih plodova, juha, krumpira i raznog drugog povrća (Britannica, The Editors of Encyclopaedia, 2022).

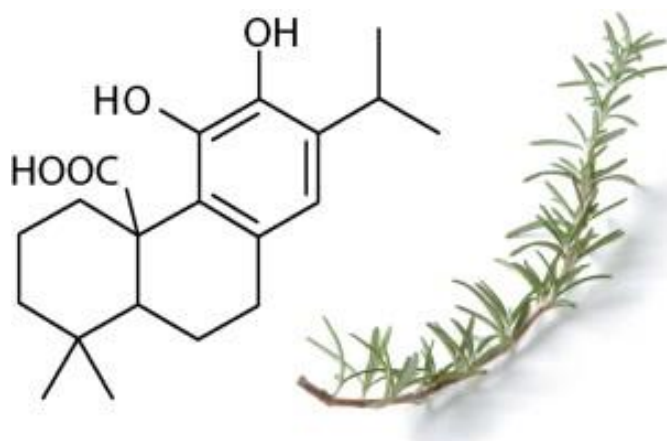


Slika 4. Ružmarin (*Salvia rosmarinus*) ( Izvor: Vrtni centar Flora, <https://flora.com.hr/proizvod/rosmarinus-officinalis-ruzmarin-fi-14/>)

Ružmarin sadrži mnoge spojeve s antioksidativnim djelovanjem, najčešće polifenole. Najvažniji polifenolni spojevi u ružmarinu su karnozinska kiselina, kafeinska kiselina i njeni derivati poput ružmarinske kiseline. Antibakterijska svojstva ružmarina rezultat su djelovanja ružmarinske kiseline, rozmaridifenola, karnozola, epirozmanola, karnozinske kiseline, rozmanola i izorozmanola (Nieto i sur., 2018). Najjače antibakterijsko djelovanje imaju karnozinska i ružmarinska kiselina (Vegara i sur.,

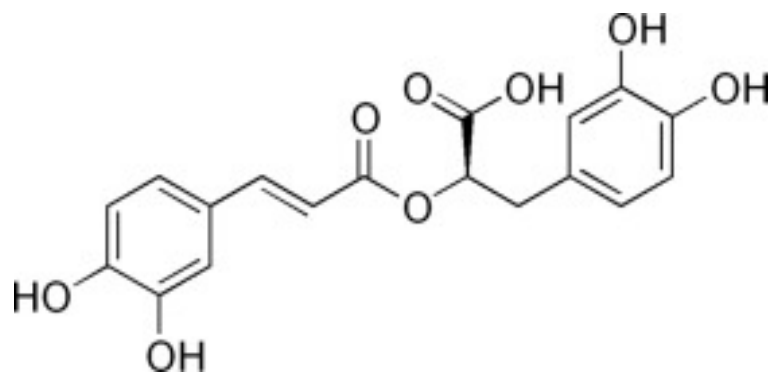
2011). Spojevi koje sadrži ružmarin stvaraju interakcije s proteinima u membrani što uzrokuje gubitak funkcionalnost membrane i njezine strukture (Nieto i sur., 2018).

Karnozinska kiselina je fenolni diterpen kemijske formule  $C_{20}H_{28}O_4$  koji posjeduje antioksidativna i antimikroban svojstva (slika 5). Prvi put ju je otkrio Horst Linde u kadulji 1964. godine. Kasnije je u puno većim koncentracijama otkrivena u ružmarinu, a nalazi se i u mnogim drugim vrstama koje spadaju u porodicu Lamiaceae (Birtić i sur., 2015). Njena koncentracija u biljkama ovisi o uvjetima uzgoja i stresnim uvjetima kojima je biljka izložena tijekom uzgoja. Dokazano je da engleska klima više pogoduje proizvodnji karnozne kiseline od toplih i sušnih uvjeta koji prevladavaju na Mediteranu (Birtić i sur., 2015). Ružmarin izložen povećanom UVB zračenju pokazao je veći sadržaj karnozinske kiseline. U biljkama nije ravnomjerno raspoređena, te je uglavnom prisutna u nadzemnim dijelovima biljke. U ružmarinu je u najvećim koncentracijama prisutna u fotosintetskim dijelovima biljke poput listova i latica (Birtić i sur., 2015).



Slika 5. Strukturna formula karnozinske kiseline (Birtić i sur., 2015)

Ružmarinska kiselina je fenolna kiselina koja se smatra esterom, proizvodom esterifikacije kafeinske kiseline i 3,4 – dihidroksifenil mliječne kiseline. Kemijska formula joj je  $C_{18}H_{16}O_8$  (slika 6). Posjeduje antimikrobna, protuupalna, antioksidativna, antidijabetička i antikancerogena svojstva (Matejczyk i sur., 2018). Ružmarinska kiselina pokazuje obećavajuću antifungalnu i antibakterijsku aktivnost. Također pokazuje sposobnost sprječavanja pričvršćivanja stanica i iskorjenjivanja uspostavljenih biofilmova koje je povezano sa smanjenjem proizvodnje egzopolisaharida. Antifungalna svojstva ružmarinske kiseline uključuju smanjenje mitohondrijske aktivnosti, promijena integriteta membrane i blagu inhibiciju proizvodnje proteaze (Ivanov i sur., 2022).



Slika 6. Strukturna formula ružmarinske kiseline (Izvor: ScienceDirect)

### 3.4. Karakteristike origana (*Origanum vulgare* L.)

Origano (*Origanum vulgare* L.) aromatična je višegodišnja biljna vrsta iz porodice Lamiaceae. Potječe iz brdskih predjela Mediterana i zapadne Azije, a raširen je i u dijelovima Meksika i SAD – a. Uzgaja se kao zimzeleni grm u područjima blage klime. Ima zbijene ovalne listove koji su raspoređeni nasuprotno i prekriveni sitnim dlačicama (slika 7). Mlade stabljike su četvrtaste i dlakave, a s godinama odrvene. Cvjetovi su mali i skupljeni u grozdovima, bijele do ružičaste ili blijedo ljubičaste boje. Bitan je sastojak mediteranske kuhinje i koristi se kao začim u mnogim jelima. Kulinarske varijante poput grčkog i talijanskog origana imaju jaku aromu, a ukrasne varijante blažu i nisu pogodne kuhanje (Britannica, The Editors of Encyclopaedia, 2022).

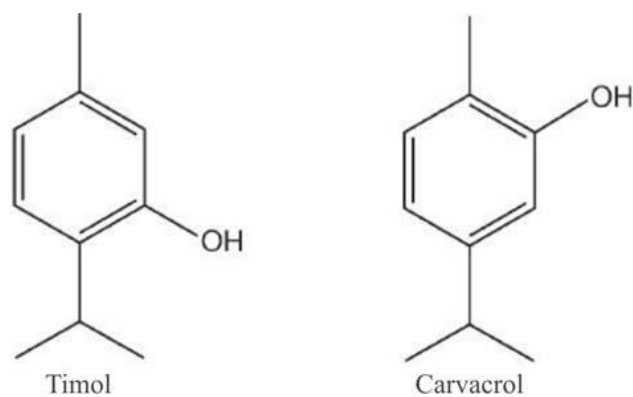


Slika 7. Origano (*Origanum vulgare*) (Izvor: Agrokлуб, <https://www.agroklub.com/hortikultura/kako-osusiti-i-cuvati-origano/78910/>)

Origano sadrži mnoge polifenolne spojeve koji posjeduju antioksidativna i antimikrobna svojstva kao i mnoge druge vrste iz porodice Lamiaceae. Glavni sastojci origana odgovorni za njegova antimikrobna svojstva su fenolni spojevi poput karvakrola i timola. Osim karvakrola i timola koji se nalaze u najvišoj koncentraciji u origanu, antimikrobnoj aktivnosti doprinose i monoterpeni ugljikovodici gama – terpinen ( $\gamma$ -terpinen) i ro – cimen ( $p$ -cimen) (Fournomiti i sur., 2015; Coccimiglio i sur., 2016).

Karvakrol i timol su strukturno vrlo slični spojevi, timol se od karvakrola razlikuje po smještaju hidroksilne skupine na drugom mjestu na fenolnom prstenu (slika 8). Antibakterijsko djelovanje karvakrola i timola povezano je sa njihovom sposobnošću da čine staničnu membranu propusnom (Lambert i sur., 2001). Karvakrol i timol sposobni su razgraditi vanjsku membranu Gram negativnih bakterija, otpuštajući lipopolisaharide koji povećavaju propusnost citoplazmatske membrane (Burt, 2004).

Dokazano je da karvakrol stvara kanale u membrani razdvajajući lance masnih kiselina kod fosfolipida, te omogućava ionima napuštanje citoplazme. Timol se hidrofobno veže za membranske proteine i pomoću vodika se spaja i tako mijenja karakteristike propusnosti membrane. Ro-cimen doprinosi antimikrobnim svojstvima origana uzrokujući bubrenje citoplazmatske membrane u većoj mjeri nego sam karvakrol. Ro-cimen nema izražena antimikrobna svojstva ukoliko se koristi samostalno (Burt, 2004).



Slika 8 Strukturne formule timola i karvakrola (Izvor: ResearchGate, [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estrutura-de-timol-e-carvacrol\\_fig1\\_262757327](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estrutura-de-timol-e-carvacrol_fig1_262757327))

### 3.5. Metode ekstrakcije biljnog materijala

Ekstrakcija je proces odvajanja biljnih metabolita kao što su alkaloidi, glikozidi, fenoli, terpenoidi i flavonoidi korištenjem selektivnih otapala. Konvencionalne metode ekstrakcije uključuju maceraciju, infuziju, dekokaciju, perkolaciju, Soxhlet ekstrakciju i hidrodestilaciju. Moderne metode ekstrakcije uključuju mikrovalnu ekstrakciju i ekstrakciju tekućinama pod tlakom. Moderne netermalne metode ekstrakcije koje se koriste su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim tekućinama, pulsirajuća ekstrakcija potpomognuta električnim poljem (Rasul, 2018). Ekstrakti korišteni u ovom radu dobiveni su ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje.

Maceracija je stara metoda ekstrakcije koja se koristila za pripremu ljekovitih pripravaka. Široko je primjenjiv i jeftin način dobivanja prirodnih proizvoda od biljnog materijala. Kod maceracije se usitnjeni materijal stavlja u zatvorenu posudu u koju se dodaje otapalo i ostavlja da stoji duže vrijeme, tj. dovoljno vremena da otapalo difundira u stanične stijenke što omogućuje otapanje sastojaka prisutnog u biljci. Nakon završene maceracije tekućina se procijedi, a kruti ostatak se preša kako bi se izdvojilo što više otapala. Prednosti ove metode su to što je jednostavna metoda koja ne zahtjeva korištenje komplicirane opreme, štedi energiju i prikladna je za proizvodnju jeftinijih lijekova. Nedostatci ove metode su njeno vremenski dugo trajanje koje varira od nekoliko dana do nekoliko tjedana i potrebne velike količine otapala (Azmir i sur., 2013). Infuzija i dekokacija se baziraju na istom principu kao i maceracija, ali kao otapalo koriste hladnu ili prokuhalu vodu (Rasul, 2018).

Soxhlet ekstrakcija ili kontinuirana vruća ekstrakcija je metoda u kojoj se biljni materijal usitnjava i stavlja u porozni tuljac od celuloze. Celulozni tuljac se zatim stavlja u Soxhlet aparat u kojem se otapalo zagrijava i isparava u celulozni tuljac u kojemu dolazi do kondenzacije što rezultira ekstrakcijom biljnog materijala. Prednosti ove metode su što omogućava ekstrakciju velikih količina biljnog materijala odjednom, omogućava ponovnu upotrebu iskorištenog otapala, ne zahtjeva filtraciju nakon ekstrakcije i vrlo je jednostavna tehnika. Nedostatci Soxhlet ekstrakcije su što se biljni materijal zagrijava na relativno visoku temperaturu što može dovesti do termičkog uništenja nekih spojeva, vrijeme ekstrakcije je dugo i zahtjeva velike količine otapala (Rasul, 2018).

Hidrodestilacija je tradicionalna metoda ekstrakcije biljnih materijala koja ne koristi organska otapala. Kod hidrodestilacije u biljni materijal se dodaju dovoljne količine vode koja se zatim dovodi do vrenja, a alternativno se može koristiti i vodena para koja se dovodi u biljni materijal. Hlađenjem vodom dolazi do kondenzacije pare čime se dobiva mješavina vode (hidrolata) i ulja. Korisna je metoda za ekstrakciju eteričnih ulja iz biljaka i njihovih različitih dijelova (Silva i sur., 2005). Prednosti hidrodestilacije su te što nije potrebna upotreba organskih otapala što čini ovu metodu jeftinom i ekološki prihvatljivom, omogućuje veće količine dobivenog eteričnog ulja i kvaliteta ulja dobivena ovom metodom je ponovljiva. Nedostatci ove metode su

nemogućnost potpune ekstrakcije, mogućnost hidrolize nekih sastojaka uslijed dugotrajnog djelovanja visokih temperatura, nemogućnost kontrole temperature i zahtjeva veći broj zaposlenika, više prostora i energije (Rasul, 2018).

Mikrovalna ekstrakcija koristi neionizirajuće elektromagnetsko zračenje frekvencije 300 Mhz do 300 Ghz. Mikrovalno zračenje prenosi se kao valovi i može prodrijeti u matricu i djelovati izravno na polarne molekule kao što je voda. Temeljni princip ove metode ekstrakcije je prijenos energije pomoću električnog polja. Mikrovalna energija dolazi u kontakt s vlagom unutar matrice što dovodi do isparavanja koje stvara pritisak na staničnu stijenku koja zatim puca i oslobađa bioaktivnu tvar (Zia i sur., 2022).

Ekstrakcija tekućinama pod tlakom je metoda koja koristi visoki tlak u ekstrakciji. Visoki tlak održava otapala u tekućem stanju iznad njihove točke vrelišta što rezultira visokom topljivošću i visokim prodiranjem otapala u matricu biljnog materijala (Zhang i sur., 2018).

Ultrazvučna ekstrakcija koristi ultrazvuk u rasponu od 20 do 2000 kHz. Mehanički učinak ultrazvuka poboljšava površinski kontakt između otapala i biljnog materijala. Ultrazvuk mijenja i narušava fizikalna i kemijska svojstva biljnog materijala i tako olakšava otpuštanje spojeva i pospješuje prodiranje otapala u biljne stanice. Ultrazvučna ekstrakcija primjenjiva je za ekstrakciju termolabilnih i nestabilnih spojeva (Zhang i sur., 2018).

Ekstrakcija superkritičnim tekućinama koristi superkritičnu tekućinu kao ekstrakcijsko otapalo. Superkitične tekućine imaju sličnu topljivost kao tekućine i sličnu difuznost kao plin pa mogu otopiti široku paletu prirodnih proizvoda. Temperatura i tlak čimbenici su koji guraju tvar u njeno superkritično stanje, pa tako CO<sub>2</sub> postaje superkritična tekućina iznad 31,1°C i pri tlaku od 7380 kPa (Zhang i sur., 2018).

Pulsirajuća ekstrakcija potpomognuta električnim poljem radi na principu elektroporacije za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Elektroporacija je pojava u kojoj se stanica izlaže impulsima električnog polja visokog intenziteta koji privremeno destabilizira staničnu membranu. Elektroporacijom se gubi strukturalna funkcionalnost stanične membrane što pospješuje difuziju otapala. Ciljani spojevi tako se ekstrahiraju pod utjecajem električnog polja uz međudjelovanje otapala (Zia i sur., 2022).

### **3.5.1. Ekstrakcija uz visokonaponsko pražnjenje ( high voltage electric discharge extraction – HVED)**

Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem je nova, učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije. Ova metoda smatra se alternativom tehnikom konvencionalnim metodama ekstrakcije. Sustavi za ekstrakciju uz visokonaponsko pražnjenje mogu se podijeliti u tri kategorije, serijske, kontinuirane i cirkulirajuće sustave. Osnovni princip rada je isti kod sva tri sustava, a to je stvaranje pražnjenja zbog lokalnog visokog električnog polja i uništavanje stanica i pojačanje prijenosa uzrokovano raznim sekundarnim pojavama (Li i sur., 2019).

Kod serijskog sustava za ekstrakciju elektroda s pozitivnim naponom nanosena je na iglu. Kada se postigne dovoljno visok impulsni napon dolazi do električnog pražnjenja u vodu zbog visoke jakosti električnog polja koje je koncentrirano u igli. Pražnjenje stvara udarne valove i intenzivnu turbulenciju tekućine emitirajući ultraljubičasto svjetlo i oslobađajući guste aktivne radikale. Uslijed pražnjenja stanica je ozbiljno oštećena i unutarstanična djelatna tvar lako difundira u otapalo. Ekstrakcija u ovakvom sustavu može se podijeliti u tri dijela. Biljni materijal je prvo potrebno pripremiti za ekstrakciju, tj. očistiti ga, osušiti, samljati ili usitniti i prosijati, nakon čega se čuva na određenoj temperaturi do korištenja. Nakon pripreme biljnog materijala slijedi proces obrade HVED – om. Suhi materijal se pomiješa sa otapalom i tretira HVED – om u komori za ekstrakciju. Nakon HVED obrade dodaje se još otapala kako bi se pospješilo difundiranje spojeva koji se ekstrahiraju u otapalo. Zadnji dio ekstrakcije je odvajanje supernatanta od ostataka centrifugiranjem (Li i sur., 2019).

U kontinuiranom sustavu se umjesto igle u kojoj je koncentrirano jako električno polje koriste paralelne mrežaste elektrode. Na jednu elektrodu djeluje visoki napon, a druga služi kao uzemljenje. Da bi se moglo koncentrirati električno polje u kontinuiranom sustavu koristi se izolacijska ploča koja je postavljena između dvije paralelne elektrode. Na izolacijskoj ploči se nalazi mala rupica koja služi kao područje tretmana u komori za ekstrakciju i omogućava da je električno polje visoko koncentrirano (Zhang i sur., 2009).

U cirkulirajućem sustavu komora je cilindričnog oblika, a elektroda za električno pražnjenje je u obliku igle i centrirana je točno u sredinu komore. Cilindrični oblik komore omogućuje veći procesni kapacitet uz relativno malu komoru što rezultira povećanjem učinkovitosti i smanjenjem potrošnje energije.

Ekstrakcijom visokonaponskim električnim pražnjenjem mogu se ekstrahirati fenolne komponente, ulja, polisaharidi i proteini (Li i sur., 2019).

Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem ima mnoge prednosti u odnosu na ostale metode ekstrakcije, a neke od njih su niska potrošnja energije, kratko vrijeme obrade biljnog materijala, niske radne temperature i veći oporavak bioaktivnih komponenti (Banožić i sur., 2021).



### 3.6. Antimikrobno djelovanje ekstrakata ružmarina

Ekstrakt ružmarina koji se komercijalno koristi kao antioksidans lipida u hrani (Oxy'less), a koji je dobiven otapanjem u etanolu (100 mg/ml) testiran je kao antimikrobno sredstvo za patogene koji se nalaze u hrani (del Campo i sur., 2000). Za Gram pozitivne bakterije minimalna inhibitorna koncentracija (*eng. minimum inhibitory concentration*; MIC) iznosila je 1 % za *Leuconostoc mesenteroides*, 0,5 % za *Listeria monocytogenes*, 0,5% za *Staphylococcus aureus*, 0,13% za *Streptococcus mutans* i 0,06% za *Bacillus cereus*. Etanolna otopina ružmarina koncentracije manje od 1 % nije pokazala antibakterijsko djelovanje na Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i *Erwinia carotovora*. Ekstrakt je usporio rast *Penicillium roquefortii* i *Botrytis cinerea* (del Campo i sur., 2000).

Ružmarin uzorkovan u sjevernom području Palestine u lipnju 2009. godine (Jarrar i sur., 2010) korišten je za pripremu ekstrakta sa 80 % - tnm etanolom nakon čega je filtriran i isparen do suhog na 40°C. U istraživanju je korišteno pet kliničkih izolata MRSA – e i standardni bakterijski soj *Staphylococcus aureus* kao kontrola. Antibakterijska aktivnost određena je difuzijom u jažice. Na petrijeve zdjelice sa Muller – Hinton agarom nacjepljene su mikrobne kulture stae 24 h, a u jažice promjera 6 mm dodano je 50 µl ekstrakta koncentracije 100 mg/ml. Zone inhibicije kretale su se od 16 mm do 28 mm za sve ispitivane izolate. MIC vrijednosti ružmarina za svih pet izolata bio je u rasponu od 0,39 do 3,13 mg/ml (Jarrar i sur., 2010).

Eterično ulje ružmarina dobiveno je iz 40 g svježih biljnih dijelova hidrodestilacijom tijekom tri sata i osušeno natrijevim sulfatom. Antimikrobna aktivnost ispitana je na patogene *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* i *Streptococcus sanguinis*. MIC vrijednosti su iznosile > 2000 za *E. faecalis*, 600 za *S. salivarius*, > 2000 za *S. sanguinis*, > 2000 za *S. mitis*, > 2000 za *S. mutans* i 500 za *S. sobrinus*. (Bernarde i sur., 2010).

Antimikrobno djelovanje dva ekstrakta ružmarina s različitim koncentracijama karnozinske kiseline, VivOX 20 i VivOX 40 ispitano je na različitim vrstama roda *Listeria* i sojevima *L. monocytogenes*. MIC vrijednosti određene su u rasponu od 625 µg ekstrakta/ml EtOH do 5000 µg ekstrakta/ml EtOH za ekstrakt VivOX 20 i 312,5 µg ekstrakta/ ml EtOH do 2500 µg ekstrakta/ ml EtOH za ekstrakt VivOX 40 (Rožman i Jeršek, 2009).

Antimikrobna aktivnost ružmarina prikupljenog u sjevernoj Sardiniji ispitana je na Gram pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* i dva soja *Staphylococcus epidermis* izoliranih iz urina, te Gram negativne bakterije *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ulja korištena u istraživanju (S1 prikupljeno u Porticciolo u razini mora i S2 u Monte Doglia na nadmorskoj visini od 400 m) dobivena su hidrodestilacijom pomoću aparata Clevenger. Gram pozitivne bakterije bile su

osjetljivije na ulje ružmarina od Gram negativnih bakterija. MIC vrijednost za *Staphylococcus aureus* je iznosila 2,5 mg/ml za ulje S1 i 3,5 mg/ml za ulje S2, a za *Staphylococcus epidermis* 3 mg/ml za oba ulja. MIC vrijednost za *E. coli* iznosila je >4 mg/ml za oba ulja i za *P. aeruginosa* > 4 mg/ml za oba ulja (Pintore i sur., 2002).

### 3.7. Antimikrobno djelovanje ekstrakata origana

Eterično ulje origana korišteno je za inhibiciju kliničkih izolata *E. coli* otpornih na više lijekova (n = 27), *Klebsiella oxytoca* (n = 7) i *Klebsiella pneumoniae* (n = 16). Rezultati su pokazali da je najosjetljivija bakterija bila *K. oxytoca* s MIC vrijednosti od 0,9 µg/ml. MIC vrijednost za *K. pneumoniae* iznosila je u prosjeku 73,5 µg/ml. Sojevi *E. coli* bili su najotporniji i njihove MIC vrijednosti bile su u rasponu od 219,9 do 236,1 µg/ml (Fournomiti i sur., 2015).

Inhibitorno djelovanje ekstrakta origana pripremljenog ekstrakcijom 5,5 g origana u 100 ml etanola ispitano je na kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter baumannii*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. MIC vrijednosti za *P. aeruginosa* bile su u rasponu od 6,3 do 25 µg/ml, za *B. bronchiseptica* 12,5 µg/ml, za *E. coli* u rasponu od 12,5 do 25 µg/ml, za *B. cenocepacia* u rasponu od 6,3 do 25 µg/ml, za *A. baumannii* iznosile su 12,5 µg/ml, za *M. catarrhalis* 12,5 µg/ml, za *B. subtilis* 6,3 µg/ml i za *S. aureus* su bile u rasponu od 12,5 do 25 µg/ml (Coccimiglio i sur., 2016).

Antimikrobno djelovanje ekstrakata origana ispitano je na uskladištenom pilećem mesu koje je bilo pakirano u vakuumu pod niskim tlakom i na temperaturi od - 18°C (Hać-Szymańczuk i sur., 2019). U meso je dodan origano kao suhi začim, ekstrakt u vodi i etanolu (40 i 70%) i eterično ulje. Dobiveni rezultati pokazali su sposobnost pripravaka origana da ograniči rast mezofilnih aerobnih bakterija i psihrotrofnih bakterija u pilećem mesu. Unatoč statistički neznačajnoj razlici u odnosu na kontrolni uzorak najmanji broj mezofilnih i psihrotrofnih organizama nađen je u mesu u koje je dodano eterično ulje origana. Dodavanje svakog pripravka origana ograničilo je rast bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, a najučinkovitijim se pokazalo eterično ulje i ekstrakt pripremljen u 70% etanola (Hać-Szymańczuk i sur., 2019).

*In vitro* ispitivanje antibakterijskog djelovanja ekstrakata origana u etanolu ispitano je na *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli* (Pérez-Delgado i sur., 2021). Antibakterijsko djelovanje ispitano je metodom difuzije u bunare u agaru. Koncentracije ekstrakata koje su korištene iznosile su 80, 40 i 20 mg/ml. Ekstrakt origana pokazao je prosječne veličine zona inhibicije od 21,64, 15,24 i 11,45 mm za *S. aureus*. Zone inhibicije za *P. aeruginosa* iznosile su 13,31, 12,27 i 7,35 mm i za *E.*

*coli* 12,5, 11,40 i 10,6 mm. Zaključeno je da etanolni ekstrakti origana imaju bakteriostatični učinak (Pérez-Delgado i sur., 2021).

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Laboratorijski uređaji

U ovom istraživanju korišteni su sljedeći uređaji:

- Brojač kolonija, Colony star (Funke Gerber, Njemačka)
- Denzitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Laboratorijska vaga (Santarius AG, Hrvatska)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- Vorteks miješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)

### 4.2. Kemikalije

- Glukoza ( $C_6H_{12}O_6$ , Kemika, Hrvatska)
- Natrij klorid (NaCl) (VWR Chemicals, Belgija)
- Dimetil sulfoksid 10% ( $(CH_3)_2SO$ , Sigma-Aldrich, SAD)
- Resazurin natrijeva sol ( $C_{12}H_6NO_4 \cdot Na$ , Santa Cruz Biotechnology, SAD)

### **4.3. Puferi i indikatorske otopine**

#### **4.3.1. Fiziološka otopina (0,85 %)**

Fiziološka otopina pripravljena je otapanjem 8,5 g NaCl (VWR Chemicals, Belgija) u 1000 ml destilirane vode. Dobivena otopina je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta.

#### **4.3.2. Otopina resazurina (0,02%)**

Indikatorska otopina resazurina (0,02%) pripravljena je otapanjem 0,02 g resazurin natrijeve soli (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u 100 ml sterilne destilirane vode. Ovako pripravljena otopina je sterilno filtrirana kroz membranski filter (promjer pora = 0,22 µm; VWR International, Belgija).

### **4.4. Hranjive podloge**

#### **4.4.1. Brain heart infusion agar (BHI)**

BHI podloga (Biolife, Italija) pripravljena je tako da je 37 g dehidrirane BHI podloge i 15 g agara (Biolife, Italija) otopljeno u 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljena podloga je zatim sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon autoklaviranja BHI podloga je ohlađena na 45-50 °C, po 12 ml BHI podloge je otpipetirano u Petrijeve zdjelice promjera devet cm i ostavljeno da polimerizira na sobnoj temperaturi.

#### **4.4.2. Muller-Hinton agar (MHA)**

MHA podloga (Biolife, Italija) pripravljena je tako da je 38 g dehidrirane MHA podloge otopljeno u 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljena podloga je zatim sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta i ohlađena na 45-50 °C. U Petrijeve zdjelice promjera devet cm je sterilno otpipetirano po 12 ml MHA podloge, nakon čega je podloga ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi.

#### 4.4.3. Müller-Hinton Broth (MHB)

MHB podloga (Biolife, Italija) pripravljena je tako da je 22 g dehidrirane Müller-Hinton podloge otopljeno u 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljena podloga je zatim sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta.

#### 4.4.4. Krumpir dekstrozni agar (PDA)

PDA podloga je pripravljena otapanjem 20 g glukoze (Kemika, Hrvatska) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 ml infuzije krumpira. Infuzija krumpira pripravljena je kuhanjem 200 g neoguljenog i narezanog krumpira u 1000 ml destilirane vode tijekom 30 min. Nakon kuhanja infuzija je filtrirana kroz cjedilo. PDA hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta.

### 4.5. Ekstrakti

U ovom istraživanju ispitano je potencijalno antimikrobno djelovanje sljedećih ekstrakata dobivenih ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje:

- Vodeni ekstrakt ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.)
- Vodeni ekstrakt origana (*Origanum vulgare* L.)

### 4.6. Mikrobne kulture

U ovom istraživanju korištene su komercijalno dostupne mikrobne kulture kupljene od DSMZ-*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* ili *American Type Culture Collection* (ATCC) i višestruko otporne bakterije (*Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae*). Višestruko otporne bakterije prikupljene su iz otpadnih voda i bolničkog okruženja te ustupljene od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KFM) i Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB). Popis korištenih kultura je u nastavku:

- *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205)
- *Pseudomonas syringae* (DSM 10604)
- *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090)

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221)
- *Erwinia amylovora* (DSM 50901)
- *Listeria innocua* (ATCC 33090)
- *A. baumannii* (AB\_6)<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* (AB\_7)<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* (AB\_8)<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* (AB\_9)<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* (AB\_10)<sup>KFM</sup>
- *E. faecium* (SE\_SC\_COL\_40)<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* (SE\_SC\_COL\_73)<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* (SE\_SC\_COL\_119)<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* (193/0)<sup>KFM</sup>
- *E. faecium* (560/2)<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* (SA\_6)<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* (SA\_7)<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* (SA\_8)<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* (SA\_9)<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* (SA – 14)<sup>KFM</sup>
- *K. pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_173)<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_79)<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_68)<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_46)<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_96)<sup>IRB</sup>
- *Botrytis cinerea* (DSM 877)

## 4.7. Određivanje antibakterijskog djelovanja vodenih ekstrakata ružmarina i origana

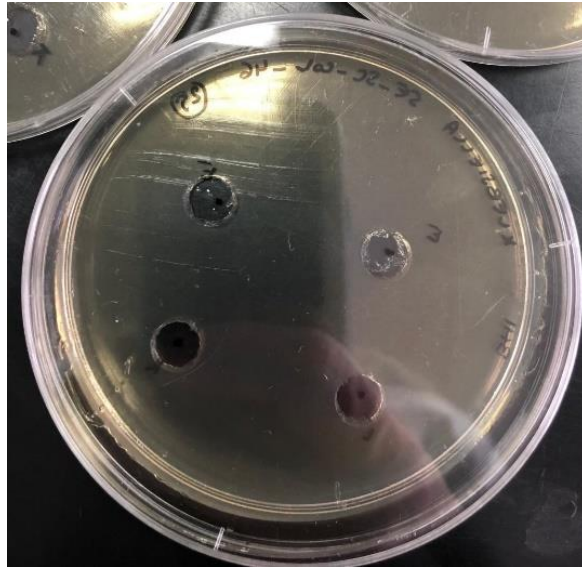
Antimikrobno djelovanje vodenih ekstrakata ružmarina i origana prema ispitivanim bakterijama određena je pomoću modificirane Kirby-Bauerove disk difuzijske metode (Bauer i sur., 1959.), odnosno pomoću metode difuzije iz bunara. Prvi korak u ovoj analizi je priprema odgovarajuće bakterijske biomase. Ispitivane bakterijske kulture pročišćene su metodom iscrpljenja do monokulture na krutoj BHI podlozi. Nakon iscrpljenja izolati su inkubirani (Sanyo MIR – 153, Sanyo electric, Japan) tijekom 24 h u uvjetima optimalnim za rast pojedinih vrsta:

- 37 °C (aerobno): *Acinetobacter baumannii* (AB\_6, AB\_7, AB\_8, AB\_9, AB\_10), *Enterococcus faecium* (SE\_SC\_COL\_40, SE\_SC\_COL\_73, SE\_SC\_COL\_119, 193/0, 560/2), *Staphylococcus aureus* (SA\_6, SA\_7, SA\_8, SA\_9, SA\_14), *Klebsiella pneumoniae* (SE\_SC\_COL\_173, SE\_SC\_COL\_79, SE\_SC\_COL\_68, SE\_SC\_COL\_46, SE\_SC\_COL\_96)
- 30 °C (aerobno): *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205), *Pseudomonas syringae* (DSM 10604), *Erwinia amylovora* (DSM 50901), *Listeria innocua* (ATCC 33090)
- 30 °C (anaerobno): *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. (DSM 14221)

Nakon inkubacije pripravljene su bakterijske suspenzije za svaku vrstu čiji turbiditet odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5 (odgovara bakterijskoj koncentraciji  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) na način da je u sterilnu staklenu epruvetu dodano 3 ml sterilne fiziološke otopine te je sterilnom ezom dodavana jedna po jedna kolonija do postizanja navedenog turbiditeta. Turbiditet je mjereno pomoću denzitometra (DEN-1 Densitometer, BioSan, Latvia).

Ovako pripravljene bakterijske suspenzije su inokulirane pomoću sterilnog vatenog štapića na krute BHI i MHA podloge u 3 smjera uz okretanje ploče za 60 ° između svakog razmazivanja. Zatim su na podlogama širim krajem sterilnog nastavka za mikropipete volumena 1 ml (promjer = 8 mm) izbušena četiri bunara (slika 9).





Slika 9. Bunari u agaru.

Bunari su ispunjeni s 100  $\mu$ l vodenog ekstrakta ružmarina ili origana. Antimikrobno djelovanje oba vodena ekstrakta (100%) prema svim bakterijskim patogenima ispitano je u triplikatima. Obzirom da niske koncentracije dimetil sulfoksida (<1,0% DMSO, Sigma-Aldrich, SAD) ne utječu na bakterijski rast, DMSO (0,5%) je korišten kao negativna kontrola za provjeru bakterijskog rasta. Negativna kontrola je aplicirana na isti način kao i vodeni ekstrakti.

Nakon dodavanja ekstrakata i DMSO, Petrijeve zdjelice su stavljene u hladnjak na 4 °C tijekom 30 minuta, kako bi se izbjeglo isparavanje vodenih ekstrakata i omogućila njihova difuzija u hranjivu podlogu. Ploče su zatim inkubirane u uvjetima optimalnim za rast pojedinačnih ispitivanih bakterijskih vrsta tijekom 24 h.

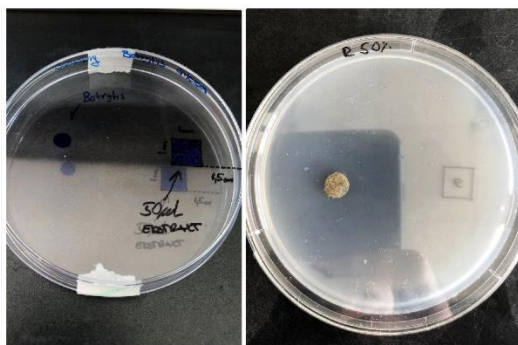
Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije rasta uključujući i promjer bunara, rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti zona inhibicije rasta u milimetrima (mm) s pripadajućim standardnim devijacijama.

#### 4.8. Određivanje antifungalnog djelovanja vodenih ekstrakata ružmarina i origana prema gljivi *Botrytis cinerea*

Antimikrobna aktivnosti vodenih ekstrakata ružmarina i origana prema gljivi *B. cinerea* ispitana je metodom dvojnih kultura (engl. *dual culture assay*, Ali i sur., 2020; Tanapichatsakul i sur. 2020). Izolat *B. cinerea* je oživljen na PDA podlozi i inkubiran pri 30 °C tijekom sedam dana.

Antifungalna aktivnost je određena za ekstrakte ružmarina i origana koncentracija 100%, 50% i 12,5%. Ekstrakti koncentracije 50% pripremljeni su razrjeđivanjem 100%-tnog ekstrakta u omjeru 1:2, tj. miješanjem 7,5 ml 100%-tnog ekstrakta i 7,5 ml sterilne fiziološke otopine, a ekstrakti koncentracije 12,5% razrjeđivanjem 50%-tnog ekstrakta u omjeru 1:4 miješanjem 5 ml 50%-tnog ekstrakta s 15 ml sterilne fiziološke otopine. Dobivene radne otopine sterilno su filtrirane kroz membranske filtere (promjer pora = 0,22 µm, VWR International, Belgija).

Za svaki ispitivani izolat na PDA ploči je 1,5 cm od ruba Petrijeve zdjelice označen kvadrat površine 1 cm<sup>2</sup> na koji je nanoseno 50 µl ekstrakta. Tri cm od kvadrata gdje je nanosen ekstrakt postavljen je micelijski disk gljive *Botrytis cinerea* (DSM 877). Micelijski diskovi su pripremljeni od kulture *B. cinerea* stare sedam dana (slika 10). Za svaku kombinaciju patogen – ekstrakt pripremljene su kontrole tj. u sredinu PDA ploče nanosen je samo micelijski disk. Ovako pripremljene ploče su inkubirane pri 25 °C tijekom sedam dana.



Slika 10. Određivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata ružmarina i origana metodom dvojnih kultura.

Nakon inkubacije izmjeren je radijalni rast *B. cinerea* na pločama tretiranim ekstraktima ružmarina i origana i kontrolnim pločama. Inhibicija fungalnog rasta izražena je kao postotak inhibicije radijalnog rasta tretmana u odnosu na radijalni rast kontrole pomoću sljedeće formule:

$$\text{Inhibicija rasta [\%]} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{radijalni rast tretmana}}{\text{radijalni rast kontrole}} \right]$$

#### 4.9. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije vodenih ekstrakata ružmarina i origana

Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija određene su mikrodilucijskom metodom u mikrotitarskoj ploči uz dodatka resazurina (REMA, engl. *resazurin microplate assay*; Coban, 2012)

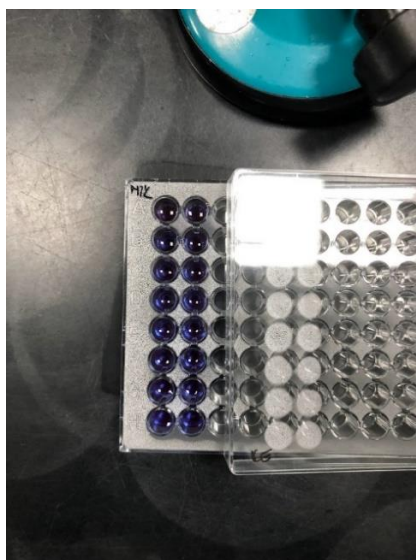
Ispitivani izolati, prvo, su iscrpljeni na krutim BHI podlogama te inkubirani u uvjetima optimalnim za pojedini izolat tijekom 24 sata (poglavlje 3.7.). Nakon inkubacije su pripravljene bakterijske suspenzije čiji turbiditet odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5 (odgovara bakterijskoj koncentraciji  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Dobivene bakterijske suspenzije su zatim razrijeđene u omjeru 1:10 u sterilnoj fiziološkoj otopini do koncentracije  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml. Razrjeđenje je pripravljeno u mikrotubicama volumena 2 ml (Eppendorf, Njemačka) tako da su dvije mikrotubice napunjene s 900  $\mu$ l sterilne fiziološke otopine te je u prvu dodano 100  $\mu$ l bakterijske suspenzije turbiditeta koji odgovara McFarland standardu 0,5. Sadržaj mikrotubice je homogeniziran vorteksiranjem (Vorteks V-1-plus, Biosan, Latvija). U drugu mikrotubicu je dodano 100  $\mu$ l suspenzije iz prve mikrotubice nakon čega je sadržaj vorteksiran. Ovako pripravljene bakterijske suspenzije su sadržavale  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml bakterijskih stanica i korištene su za određivanje MIK i MBK.

MIK i MBK vodenih ekstrakata određeni su u mikrotitarskim pločama, pri čemu je ispitan raspon koncentracija 1,56%-100%. Navedeni raspon koncentracija pripravljeno je u mikrotitarskoj ploči serijskim razrjeđenjem u omjeru 1:2 (tablica 1). U bunare A1 i A2 odpipetirano je po 280  $\mu$ l ispitivanog ekstrakta. U bunare B1 do H1 i B2 do H2 odpipetirano je 140  $\mu$ l tekuće Müller-Hinton podloge. Ispitivani ekstrakt zatim je razrijeđen u omjeru 1:2 u redovima A do G prebacivanjem po 140  $\mu$ l iz bunara u redu A u bunare u redu B pomoću multikanalne pipete. Zatim je 140  $\mu$ l iz bunara u redu B prebačeno u bunare u redu C, te je ovaj korak ponavlján do reda G iz kojeg je na kraju uklonjeno suvišnih 140  $\mu$ l (svaki bunar je sadržavao ukupno 140  $\mu$ l). Bunari u redu H sadržavali su samo 140  $\mu$ l tekuće Muller-Hinton podloge i služili su kao kontrola rasta ispitivanih izolata. U sve bunare je dodano 10  $\mu$ l pripravljenih bakterijskih suspenzija ( $1,5 \times 10^6$  CFU/ml), pa je konačna biomasa svih ispitivanih sojeva u mikrotitarskoj ploči iznosila je oko  $10^5$  CFU/ml.

Tablica 1. Shema pipetiranja na primjeru vodenog ekstrakta origana. EO – ekstrakt origana, 1 - S. aureus (SA\_6), 2 - S. aureus (SA\_7).

c(EO)		1	2
100%	<b>A</b>	280 $\mu$ L EO	280 $\mu$ L EO
50%	<b>B</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
25%	<b>C</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
12,50%	<b>D</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
6,25%	<b>E</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
3,12%	<b>F</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
1,56%	<b>G</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH
Kontrola	<b>H</b>	140 $\mu$ L MH	140 $\mu$ L MH

Ovako pripremljena mikrotitarska ploča stavljena je na inkubaciju pri 35 °C tijekom 5 sati. Nakon inkubacije u svaki bunar je dodano 15  $\mu$ l otopine resazurina (0,02%) te je mikrotitarska ploča inkubirana dodatnih sat vremena. Mikrotitarska ploča je očitana kada je resazurin u kontroli promijenio boju iz plave u ružičastu. Promjena boje je uzrokovana redukcijom resazurina u resofurin u živim stanicama. Minimalna inhibitorna koncentracija je najniža koncentracija kod koje je izostala promjena boje (slika 11).



Slika 11. Mikrotitarska ploča s dodatkom resazurina za određivanje MIK vodenog ekstrakta origana.

Također, u ovom istraživanju provjerena je i točna bakterijska biomasa koja je korištena za određivanje MIK-a vodenih ekstrakata serijskim razrjeđenjem u omjeru 1:10. U red A mikrotitarske ploče otpipetirano je 180  $\mu$ l odgovarajuće bakterijske suspenzije biomase  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml. U sve ostale redove, od B do H, dodano je po 180  $\mu$ l sterilne fiziološke otopine. 20  $\mu$ l je prebačeno iz reda A u red B pomoću multikanalne pipete, zatim je 20  $\mu$ l prebačeno iz bunara u redu B u bunare u redu C te je postupak ponovljen do reda H. Za svaki soj, po 5  $\mu$ l iz svakog bunara je preneseno multikanalnom pipetom na krutu BHI podlogu u četiri ponavljanja. Ploče su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije su prebrojane izrasle kolonije i izračunat je broj bakterija prisutan u korištenoj biomasi prema sljedećoj formuli:

$$\text{Broj bakterija} \left[ \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Broj kolonija}}{V(\text{nacjepljeni uzorak})[\text{mL}]} \times \text{recipročno razrjeđenje uzorka}$$

Rezultati su izraženi kao jedinice koje formiraju kolonije/ml (engl. *colony forming units*, CFU/ml).

#### 4.10. Provjera MIK i MBK subkultivacijom

Nakon vizualnog očitavanja rezultata minimalne inhibitorne koncentracije MIK i MBK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama. Multikanalnom pipetom je odpipetirano po 5 µl iz stupca A na krutu BHI podlogu u 4 ponavljanja. Isti postupak je ponovljen i za stupac B. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice su stavljene na inkubaciju pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije porasle kolonije su izbrojane i izračunat je CFU/ml prema formuli u poglavlju 3.9.

Broj umrlih stanica je izražen u postocima (%) i izračunat prema formuli:

$$\text{Umrle bakterijske stanice [\%]} = \left(1 - \frac{\text{CFU2}}{\text{CFU1}}\right) \times 100$$

gdje je:

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK vrijednosti ekstrakta ružmarine ili origana

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana ekstraktom ružmarina ili origana

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,5%, a minimalna baktericidna (MBK) koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija >99,9%.

#### 4.11. Statistička obrada podataka

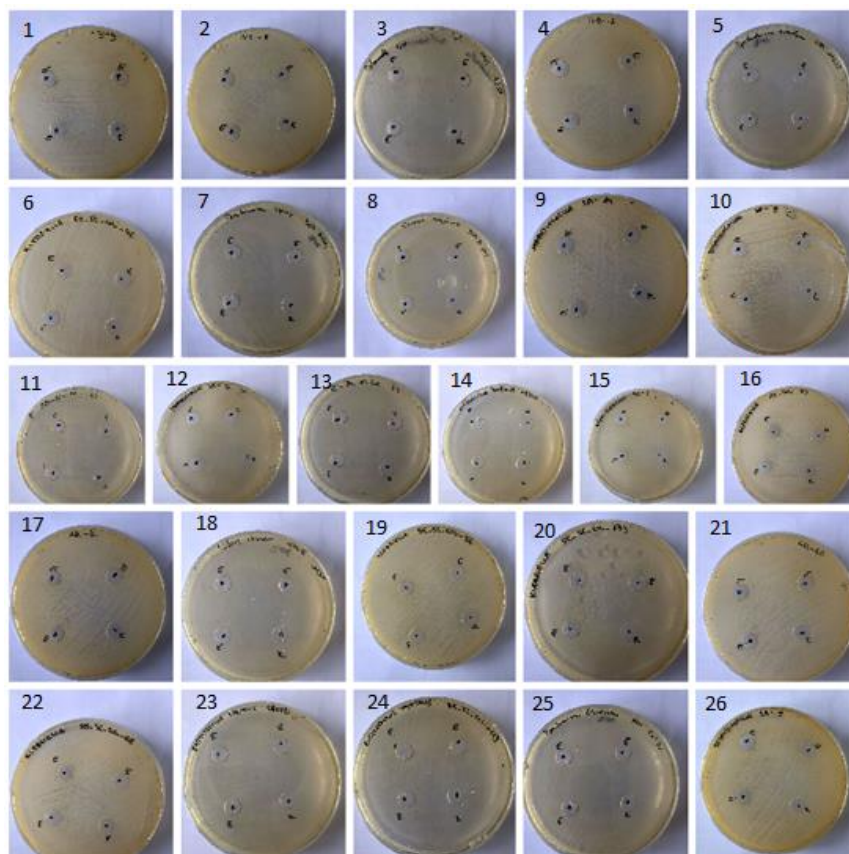
Zone inhibicije bakterijskog rasta, radijalna inhibicija fungalnog rasta te MIK i MBK vrijednosti prikazane su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Srednje vrijednosti međusobno su višestruko uspoređene *t*-testom. Razlike se smatraju statistički značajnima ako je  $p < 0,05$ . Svi podatci i statističke analize provedene su u računalnom programu Microsoft Excel 2016 uz pomoć dodatka Analiza podataka (engl. *Analysis ToolPak*).

## 5. Rezultati

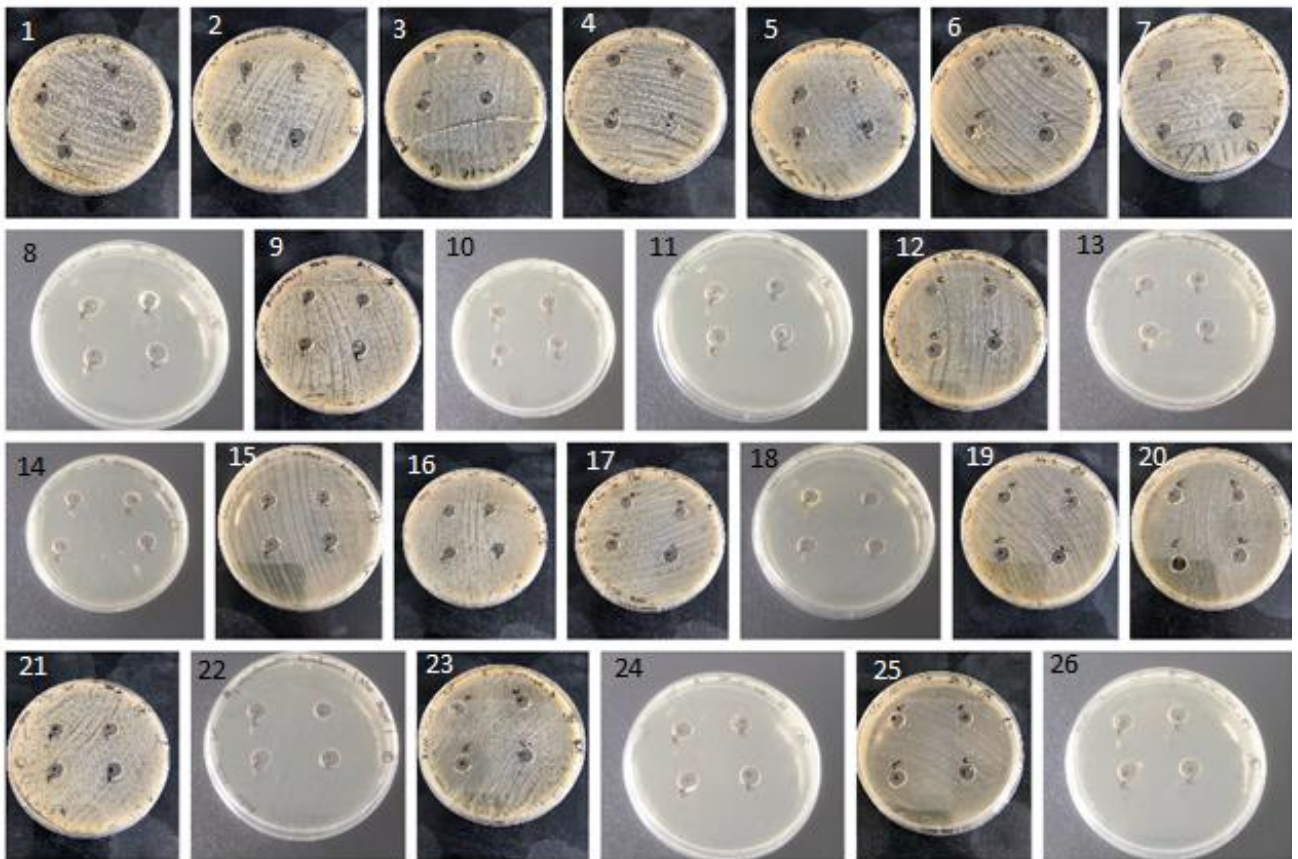
### 5.1. Antimikrobno djelovanje vodenog ekstrakta ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

U ovom istraživanju kvalitativno je ispitano potencijalno inhibitorno djelovanje vodenog ekstrakta ružmarina na patogene od poljoprivrednog značaja (*Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205), *Pseudomonas syringae* (DSM 10604), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090), *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. (DSM 14221), *Erwinia amylovora* (DSM 50901) i *Listeria innocua* (ATCC 33090)) i višestruko otporne bakterije (*S.aureus*, *E. faecium*, *A. baumannii* i *K.pneumoniae*) metodom difuzije iz bunara. Inhibitorno djelovanje se očituje kao zona inhibicije rasta ispitivanih bakterija oko bunara.

Ekstrakt ružmarina nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema ispitanim izolatima na krutoj BHI i MHA podlozi (slika 12 i 13).



Slika 12. Izostanak inhibitornog djelovanja vodenog ekstrakta ružmarina na krutoj BHI podlozi. 1 -DSM 30205 ; 2 -DSM 10604 , 3 -DSM 50090 , 4 -DSM 14221 , 5 -ATCC 33090 ,6 -DSM 50901 , 7 -AB 6 , 8 – AB 7, 9 -AB 8 , 10 – AB 9, 11 -AB 10 , 12 -SE\_SC\_COL\_40 , 13 -SE\_SC\_COL\_73 , 14 - SE\_SC\_COL\_119 , 15 -193/0 , 16 -560/2 , 17 -SA 6 , 18 – SA 7, 19 -SA 8 , 20 -SA 9 , 21 – SA 14, 22 – SE\_SC\_COL\_173, 23 -H2\_COL\_79 , 24 -SE\_SC\_COL\_68 , 25 -SE\_SC\_COL\_46 , 26 - SE\_SC\_COL\_96 .



Slika 13. Izostanak inhibitornog djelovanja vodenog ekstrakta ružmarina na MHA podlozi. 1 -DSM 30205 ; 2 -DSM 10604 , 3 -DSM 50090 , 4 -DSM 14221 , 5 -ATCC 33090 , 6 -DSM 50901 , 7 -AB 6 , 8 – AB 7, 9 -AB 8 , 10 – AB 9, 11 -AB 10 , 12 -SE\_SC\_COL\_40 , 13 -SE\_SC\_COL\_73 , 14 -SE\_SC\_COL\_119 , 15 -193/0 , 16 -560/2 , 17 -SA 6 , 18 – SA 7, 19 -SA 8 , 20 -SA 9 , 21 – SA 14, 22 – SE\_SC\_COL\_173, 23 -H2\_COL\_79 , 24 -SE\_SC\_COL\_68 , 25 -SE\_SC\_COL\_46 , 26 -SE\_SC\_COL\_96 .



Uz potencijalno antibakterijsko djelovanje, ispitano je i antifungalno djelovanje vodenog ekstrakta ružmarina prema *B. cinerea* (DSM 877) metodom dvojnih kultura. Antifungalno djelovanje očituje se kao inhibicija radijalnog rasta.

Niti jedna ispitana koncentracija ekstrakta ružmarina (100 %, 50 % i 12,5 %) nije djelovala inhibitorno na *B. cinerea* (slika 14).



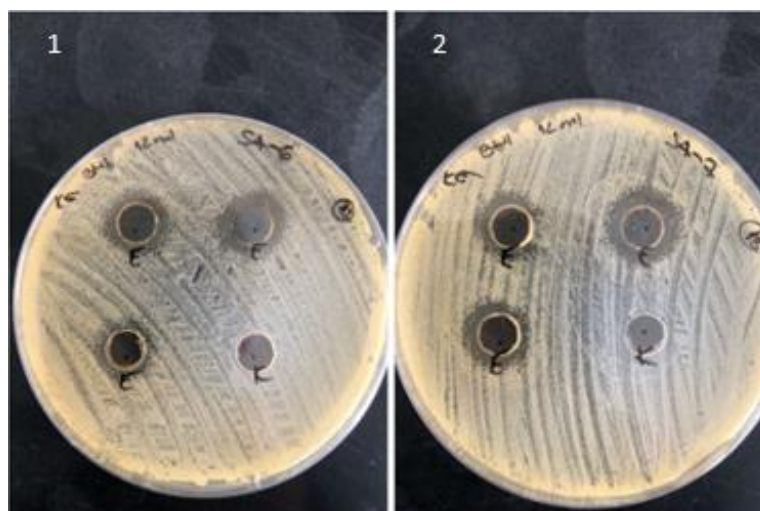
Slika 14. Izostanak inhibitornog djelovanja vodenog ekstrakta ružmarina (100%) na *B. cinerea* (DSM 877). *B. cinerea* je u potpunosti prerasla PDA podlogu.

Obzirom da ekstrakt ružmarina nije djelovao inhibitorno na ispitane mikroorganizme, nisu određene MIK i MBK vrijednosti za vodeni ekstrakt ružmarina.

## 5.2. Antimikrobno djelovanje vodenog ekstrakta origana (*Origanum vulgare* L.)

Potencijalno antibakterijsko djelovanje vodenog ekstrakta origana na patogene od poljoprivrednog značaja (*Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205), *Pseudomonas syringae* (DSM 10604), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. (DSM 14221), *Erwinia amylovora* (DSM 50901) i *Listeria innocua* (ATCC 33090)) i višestruko otporne bakterije (*S.aureus*, *E. faecium*, *A. baumannii* i *K.pneumoniae*) ispitano je metodom difuzije iz bunara gdje se antibakterijsko djelovanje očituje kao zona inhibicije rasta oko bunara.

Ekstrakt origana je inhibirao rast izolata *S. aureus* (SA\_6 i SA\_7) na krutoj BHI podlozi (slika 15, tablica 2). Izolati SA\_6 i SA\_7 ne pokazuju značajne razlike u osjetljivosti na vodeni ekstrakt origana (*t*-test,  $p = 0,80$ ).

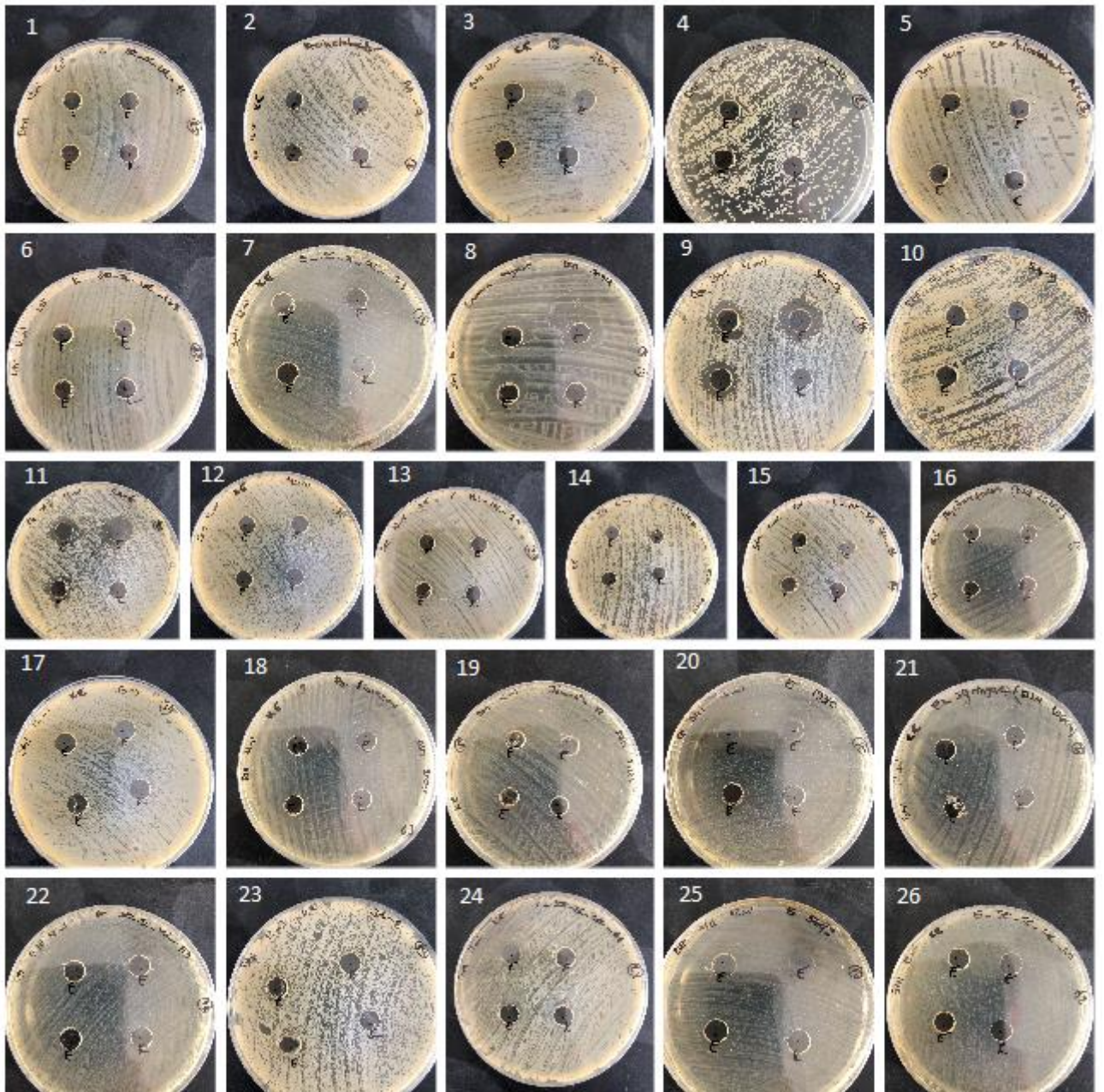


Slika 15. Antibakterijsko djelovanje vodenog ekstrakta origana na *S. aureus* na krutoj BHI podlozi. 1 – SA\_6, 2 – SA\_7.

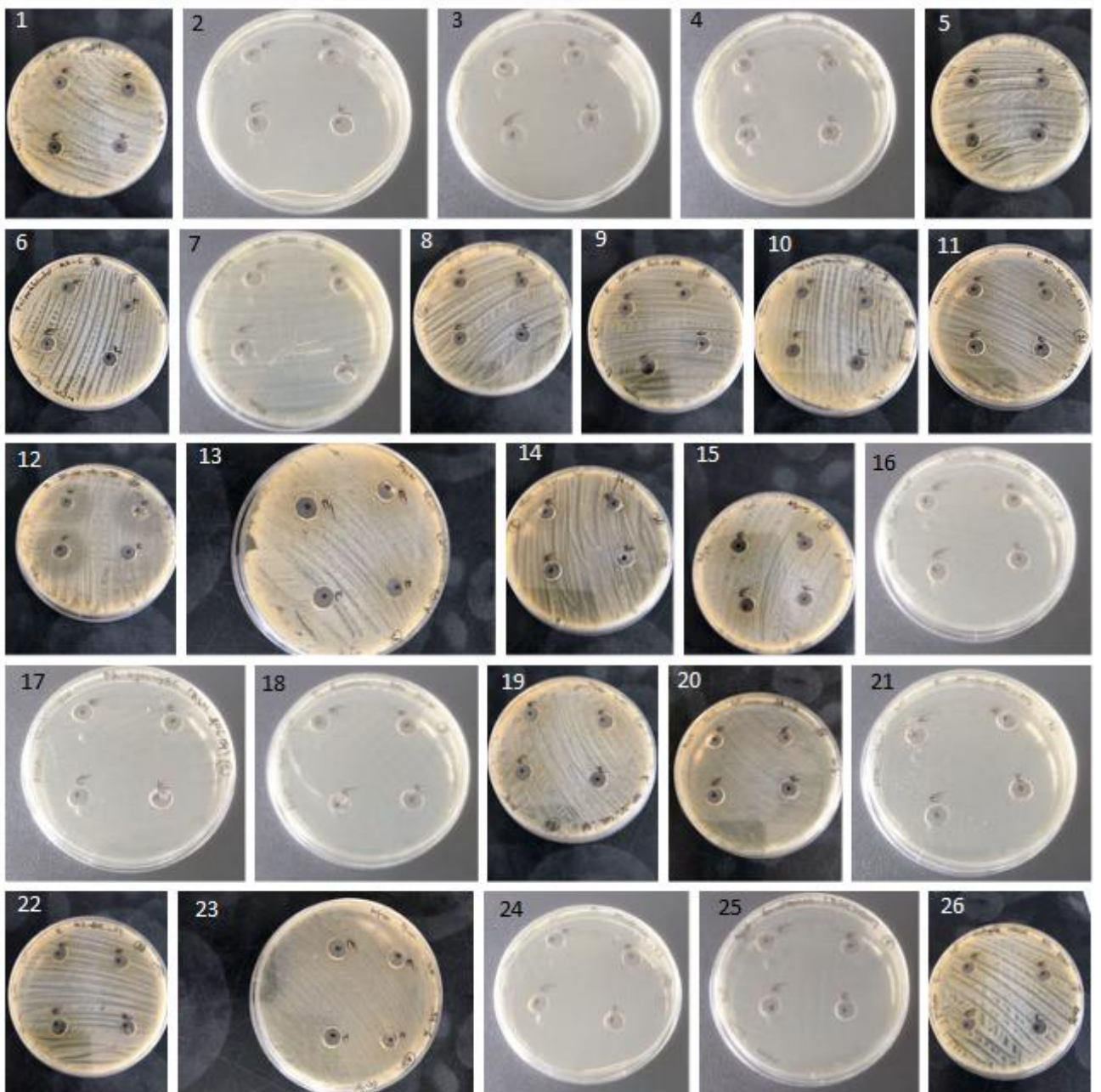
Tablica 2. Antibakterijsko djelovanje vodenog ekstrakta origana na *S. aureus*. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Vrsta	Izolat	Zona inhibicije rasta [mm]
<i>S. aureus</i>	SA_6	13,33 ± 2,08
	SA_7	14,00 ± 3,61

Ekstrakt origana nije djelovao inhibitory na ostale izolate na BHI (slika 16), niti na MHA podlozi (slika 17).



Slika 16. Izostanak inhibitorynog djelovanja vodenog ekstrakta origana na BHI podlozi. 1 -DSM 30205 ; 2 -DSM 10604 , 3 -DSM 50090 , 4 -DSM 14221 , 5 -ATCC 33090 ,6 -DSM 50901 , 7 -AB 6 , 8 – AB 7, 9 -AB 8 , 10 – AB 9, 11 -AB 10 , 12 -SE\_SC\_COL\_40 , 13 -SE\_SC\_COL\_73 , 14 -SE\_SC\_COL\_119 , 15 -193/0 , 16 -560/2 , 17 -SA 6 , 18 – SA 7, 19 -SA 8 , 20 -SA 9 , 21 – SA 14, 22 – SE\_SC\_COL\_173, 23 -H2\_COL\_79 , 24 -SE\_SC\_COL\_68 , 25 -SE\_SC\_COL\_46 , 26 -SE\_SC\_COL\_96 .



Slika 17. Izostanak inhibitorynog djelovanja vodenog ekstrakta origana na MHA podlozi. 1 -DSM 30205 ; 2 -DSM 10604 , 3 -DSM 50090 , 4 -DSM 14221 , 5 -ATCC 33090 , 6 -DSM 50901 , 7 -AB 6 , 8 – AB 7, 9 -AB 8 , 10 – AB 9, 11 -AB 10 , 12 -SE\_SC\_COL\_40 , 13 -SE\_SC\_COL\_73 , 14 -SE\_SC\_COL\_119 , 15 -193/0 , 16 -560/2 , 17 -SA 6 , 18 – SA 7, 19 -SA 8 , 20 -SA 9 , 21 – SA 14, 22 – SE\_SC\_COL\_173, 23 -H2\_COL\_79 , 24 -SE\_SC\_COL\_68 , 25 -SE\_SC\_COL\_46 , 26 -SE\_SC\_COL\_96 .

Uz potencijalno antibakterijsko, određeno je i antifungalno djelovanje vodenog ekstrakta origana na *B. cinerea* (DSM 877) metodom dvojnih kultura. Niti jedna ispitana koncentracija ekstrakta origana (100%, 50% i 12,5%) nije inhibirala rast *B. cinerea* (slika 18).



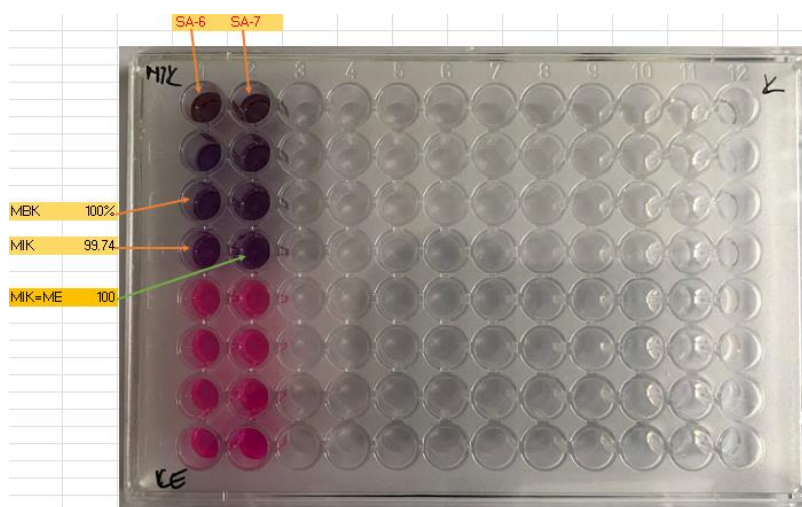
Slika 18. Izostanak inhibitornog djelovanja vodenog ekstrakta origana (100%) na *B. cinerea* (DSM 877). *B. cinerea* je u potpunosti prerasla PDA podlogu.

Dalje u istraživanju određene su MIK i MBK vrijednosti vodenog ekstrakta origana samo za osjetljive izolate (SA\_6 i SA\_7).

### 5.3. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije vodenog ekstrakta origana

Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) vrijednosti vodenog ekstrakta origana određene su metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (REMA). MIK vrijednost je očitana vizualno, tj. najniža koncentracija ekstrakta origana gdje je izostala promjena boje iz plave u ružičastu označava MIK.

Minimalna koncentracija ekstrakta origana koja je inhibirala rast izolata *S. aureus* SA\_6 i SA\_7 iznosila je 12,5 % (slika 19).



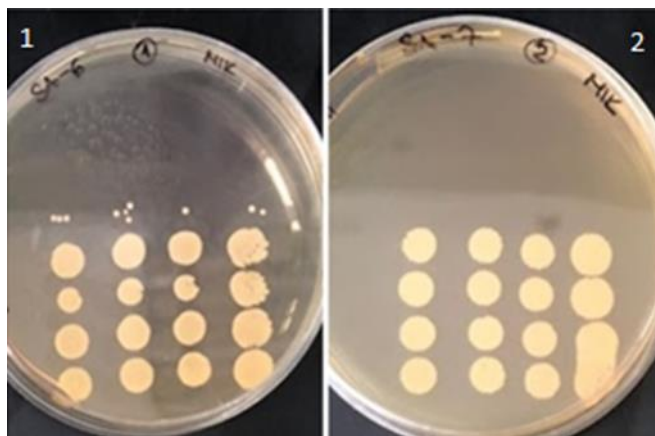
Slika 19. Vizualno određivanje MIK vrijednosti ekstrakta origana.

Nakon vizualnog određivanja MIK vrijednosti, MIK i MBK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama.

Prilikom subkultivacije, vidljivo je da koncentracije vodenog ekstrakta origana u rasponu od 6,25% do 1,56% nisu inhibirale rast SA\_6, niti SA\_7 te da je najniža koncentracija koja je djelovala inhibitorno iznosila 12,5% što se poklapa s vizualno određenim MIK vrijednostima za iste izolate.

Iako je nekoliko kolonija izolata *S. aureus* SA\_6 naraslo i pri koncentraciji vodenog ekstrakta origana od 12,5% (slika 20.1), tom koncentracijom ubijeno je 99,74% bakterija, čime je potvrđeno da MIK ekstrakta origana iznosi 12,5 %. S druge, strane minimalna baktericidna koncentracija ekstrakta origana iznosi 25% (ubijeno 100% bakterija, 20.1 i 20.2).

Za izolat *S. aureus* SA\_7 subkultivacijom je potvrđeno da je minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta origana jednaka minimalnoj baktericidnoj koncentraciji i iznosi 12,5%, slike 20.1 i 20.2).



Slika 20. Validacija MIK i MBK vrijednosti subkultivacijom na krutim BHI pločama. 1 – Soj *S. aureus* SA\_6, 2 – Soj *S. aureus* SA\_7.

## 6. Rasprava

Provedenim ispitivanjem antimikrobne aktivnosti ekstrakta ružmarina dobivenog ekstrakcijom uz visokonaponsko pražnjenje nije dokazana sposobnost inhibicije rasta biljnih patogena *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* i *Erwinia amylovora*, patogena koji izazivaju bolesti kod ljudi i prenose se hranom *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* i *Enterococcus faecium*, te višestruko rezistentnih patogena *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*, iako je antimikrobna aktivnost ekstrakata ružmarina dokazana su u različitim drugim istraživanjima (Jarrar i sur., 2010; Bernarde i sur., 2010; del Campo i sur., 2000).

Tako je, na primjer, ekstrakata ružmarina dobiven ekstrakcijom u etanolu (100 mg/ml) pokazao inhibitorno djelovanje na Gram pozitivne bakterije *Leuconostoc mesenteroides* (MIK = 1%), *Listeria monocytogenes* (MIK = 0,5 %), *Staphylococcus aureus* (MIK = 0,5 %), *Streptococcus mutans* (MIK = 0,13%) i *Bacillus cereus* (MIK = 0,06%). Isti ekstrakt nije pokazao inhibitorni utjecaj na Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i *Erwinia carotovora* (del Campo i sur., 2000). Ispitivanje provedeno na eteričnim uljima ružmarina (S1 i S2) prikupljenog na Sardiniji (Pintore i sur., 2002) pokazalo je inhibitorno djelovanje na Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (MIK: 2,5 do 3,5 mg/ml) i *Staphylococcus epidermis* (MIK = 3 mg/ml). Gram negativne bakterije *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* bile su manje osjetljive na eterična ulja ružmarina, a MIK je za oba patogena i oba korištena ulja bio je veći od 4 mg/ml (Pintore i sur., 2002).

Budući da su u ovom istraživanju korišteni vodeni ekstrakti ružmarina, možemo zaključiti da su evidentne razlike, s obzirom na rezultate sličnih istraživanja, posljedica korištenja etanolnih pripravaka, budući da i sam etanol pokazuje intenzivna antimikrobna svojstva. Također, možemo pretpostaviti da eterična ulja sadrže veće koncentracije inhibitornih spojeva nego vodeni ekstrakti dobiveni visokonaponskim pražnjenjem.

Ekstrakt origana korišten u ovom istraživanju, pokazao je inhibitorno djelovanje na dva soja *Staphylococcus aureus* (SA\_6 i SA\_7). Metodom difuzije bunara u agaru, ekstrakt origana pokazao je zone inhibicije koje su iznosile  $13,33 \pm 2,08$  mm (soj SA\_6) i  $14,00 \pm 3,61$  mm (soj SA\_7). Ekstrakt origana pokazao je inhibitorno svojstvo na Brain Heart Infusion agaru (BHI agar), dok je na Muller – Hinton agaru inhibicija istog ekstrakta izostala, pa bi se u budućim istraživanjima mogao utvrditi i utjecaj agara na difuziju inhibitornih tvari. Nakon dobivenih rezultata probira inhibitornih svojstava origana provedeno je istraživanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) kojima je kvantificiran učinak ekstrakta origana. MIK i MBK ispitane su metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (REMA). MIK vrijednost je očitana vizualno, a prepoznata je kao koncentracija ekstrakta origana pri kojoj je izostala promijena boje iz ljubičaste u ružičastu. Vizualnim očitanjem



mikrotitarske ploče utvrđeno je da je minimalna koncentracija ekstrakta origana koja je inhibirala rast *Staphylococcus aureus* (izolata SA\_6 i SA\_7) iznosila 12,5 %. Vrijednost MBK-e ekstrakta origana za izolat SA\_6 iznosila 25%, dok je MBK vrijednost za izolat SA\_7 bila jednaka MIK vrijednosti i iznosila je 12,5 %. Ekstrakt origana nije pokazao inhibitorno djelovanje na rast ostalih ispitivanih patogena iako je prijašnjim istraživanjima dokazano da ima sposobnost inhibicije rasta pojedinih bakterija. Tako je istraživanje eteričnog ulja origana (Fournomiti i sur., 2015) dokazalo inhibiciju rasta višestruko rezistentne bakterije *Klebsiella pneumoniae* s MIK vrijednosti od 73,5 µg/ml. Istraživanje Coccimiglio i sur. (2016) dokazalo je inhibitorni učinak alkoholnog ekstrakta origana na višestruko otpornu bakteriju *Acinetobacter baumannii* (MIK = 12,5 µg/ml).

U ovom radu, dokazan je potencijal vodenih ekstrakata origana za inhibiciju rasta patogenih bakterija *Staphylococcus aureus*. Budući da se u većini ostalih istraživanja koriste etanolni ekstrakti bilja ili ekstrakti u kojima su korištena druga otapala, izostanak ili smanjeno inhibicijsko djelovanje vodenih ekstrakata nije iznenađujuće. Međutim, budući da je voda jeftino i svuda dostupno otapalo, ovaj tip ekstrakcije je jedan od najekonomičnijih. Iz tog razloga nužna su i daljnja istraživanja u tom smjeru.

## 7. Zaključak

Metodom difuzije bunara u agaru nisu dokazana inhibitorna svojstva vodenog ekstrakta ružmarina na rast patogenih bakterija korištenih u ovom radu (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium*, te *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*), čime nije potvrđena hipoteza da će ekstrakt ružmarina pokazati inhibitorna svojstva prema patogenim bakterijama.

Vodeni ekstrakt origana pokazao je inhibitorna svojstva prema dva soja bakterije *Staphylococcus aureus* (SA\_6 i SA\_7). Srednje vrijednosti zona inhibicije sa pripadajućim standardnim devijacijama za soj SA\_6 iznosile su  $13,33 \pm 2,08$  mm, dok su za soj SA\_7 iznosile  $14,00 \pm 3,61$  mm.

Minimalna inhibitorna (MIK) ekstrakta origana za sojeve SA\_6 i SA\_7 iznosila je 12,5 %.

MBK vrijednost ekstrakta origana za soj SA\_6 iznosila je 25 %, a za soj SA\_7 je bila 12,5 %.

## 8. Literatura

1. Andino A., & Hanning I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal* 2015:1 - 16. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
2. Anstey N. M., Currie B. J., Hassell M., Palmer D., Dwyer B., & Seifert H. (2002). Community-acquired bacteremic *Acinetobacter pneumonia* in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2):685 - 686. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.685-686.2002>
3. Arrebola E., Cazorla F. M., Perez-García A., & de Vicente A. (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins* 3(9):1089-1110. <https://doi.org/10.3390/toxins3091089>
4. Babst B. A., Gizatullina D. I., Lacroix B., Gifford A. N., & Citovsky V. (2014). *Agrobacterium* T-DNA-encoded protein Atu6002 interferes with the host auxin response. *Molecular plant pathology*, 15(3):275–283. <https://doi.org/10.1111/mpp>.
5. Banožić M., Jozinović A., Grgić J., Miličević B., & Jokić S. (2021). High voltage electric discharge for recovery of chlorogenic acid from tobacco waste. *Sustainability (Switzerland)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/su13084481>
6. Bashan Y. (1997). Alternative Strategies for Controlling Plant Diseases Caused by *Pseudomonas syringae*. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7\\_105](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7_105)
7. Bernardes W. A., Lucarini R., Tozatti M. G., Flauzino L. G., Souza M. G., Turatti I. C., Andrade e Silva M. L., Martins C. H., da Silva Filho A. A., & Cunha W. R. (2010). Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 65(9-10):588–593. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-9-1009>
8. Bhardwaj A., Malik R. K., & Chauhan P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal of Microbiology* 48(3):317-325. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0041-2>
9. Bintsis T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3):529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
10. Birtić S., Dussort P., Pierre F. X., Bily A. C., & Roller M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115 (1):9-19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.026>
11. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "oregano". *Encyclopedia Britannica*, 10 Jun. 2021, <https://www.britannica.com/plant/oregano>. Pristupljeno 12.08.2022.

12. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "rosemary". Encyclopedia Britannica, 25 Jul. 2021, <https://www.britannica.com/plant/rosemary>.  
Pristupljeno 12.08.2022
13. Burt S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223 - 253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
14. Castro A., Santos C., Meireles H., Silva J., & Teixeira P. (2016). Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. *Journal of Infection and Public Health*, 9(2):153 - 160. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.08.001>
15. Cecchini M., Langer J., & Slawomirski L. (2015). *Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: Economic Issues, Policies and Options for Action*.
16. Chaalal N., Touati A., Bakour S., Aiss M. A., Sott A., Lavigne J. P., & Pantel A. (2021). Spread of OXA-48 and NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 27(4):492 - 500. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0419>
17. Coban A. Y. (2012). Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7):2191 - 2193. <https://doi.org/10.1128/JCM.00471-12>
18. Coccimiglio J., Alipour M., Jiang Z. H., Gottardo C., & Suntres Z. (2016). Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:1 - 8. <https://doi.org/10.1155/2016/1404505>
19. Cong Y., Yang S. & Rao X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features, *Journal of advanced research*, 21:169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>
20. de Koster S., Rodriguez Ruiz J. P., Rajakani S. G., Lammens C., Glupczynski Y., Goossens H., & Xavier B. B. (2022). Diversity in the Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* ST101 of Human, Environmental, and Animal Origin. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838207>
21. de Niederhäusern S., Bondi M., Messi P., Iseppi R., Sabia C., Manicardi G., & Anacarso I. (2011). Vancomycin-resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 62(5):1363 - 1367. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9868-6>
22. del Campo J., Amiot M. J., & Nguyen-The C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10):1359 - 1368. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.10.1359>
23. Düyüncü D., & Ulusoy S. (2019). Yeşil Salatalardan *Pseudomonas fluorescens* İzolasyonu ve İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları. *Akademik Gıda*, 17(2019): 444–449. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.667250>

24. Effah C. Y., Sun T., Liu S., & Wu Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>
25. EFSA, European Food Safety Authority (2022). <https://www.efsa.europa.eu/en> . Pristupljeno 30.07.2022.
26. Ercoli L., Gallina S., Nia Y., Auvray F., Primavilla S., Guidi F., Pierucci B., Graziotti C., Decastelli L., & Scuota S. (2017). Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(7):407 - 413. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2267>
27. Favaro M., Sarmati L., Sancesario G., & Fontana C. (2014). First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Reports*, 1(2). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.003103>
28. FAO, Food and Agriculture Organization (2022). <https://www.fao.org/home/en/> . Pristupljeno 31.07.2022.
29. FDA, U.S. Food and Drug Administration (2022). <https://www.fda.gov/> . Pristupljeno 01.08.2022.
30. Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., & de Vuyst L. (2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *U International Journal of Food Microbiology* 106(1):1 - 24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
31. Fournomiti M., Kimbaris A., Mantzourani I., Plessas S., Theodoridou I., Papaemmanouil V., Kapsiotis I., Panopoulou M., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. E., & Alexopoulos A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano ( *Origanum vulgare* ), sage ( *Salvia officinalis* ), and thyme ( *Thymus vulgaris* ) against clinical isolates of *Escherichia coli* , *Klebsiella oxytoca* , and *Klebsiella pneumoniae* . *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.23289>
32. Franz C. M. A. P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., & Gálvez A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology* 151(2):125 - 140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
33. Friedman N. D., Temkin E., & Carmeli Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 22(5):416 - 422. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>
34. García F., Notario M. J., Cabanás J. M., Jordano R., & Medina L. M. (2012). Incidence of bacteria of public health interest carried by cockroaches in different food-related environments. *Journal of Medical Entomology*, 49(6):1481 - 1484. <https://doi.org/10.1603/ME12007>
35. Garriga M., & Aymerich T. (2014). The Microbiology of Fermentation and Ripening. *Handbook of Fermented Meat and Poultry: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118522653.ch13>

36. Gershman M. D., Kennedy D. J., Noble-Wang J., Kim C., Gullion J., Kacica M., Jensen B., Pascoe N., Saiman L., McHale J., Wilkins M., Schoonmaker-Bopp D., Clayton J., Arduino M., & Srinivasan A. (2008). Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clinical Infectious Diseases*, 47(11):1372 - 1379. <https://doi.org/10.1086/592968>
37. Greene S. K., Daly E. R., Talbot E. A., Demma L. J., Holzbauer S., Patel N. J., Hill T. A., Walderhaug M. O., Hoekstra R. M., Lynch M. F., & Painter J. A. (2008). Recurrent multistate outbreak of *Salmonella newport* associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. *Epidemiology and Infection*, 136(2): 157 - 165. <https://doi.org/10.1017/S095026880700859X>
38. Hać-Szymańczuk E., Cegiełka A., Karkos M., Gniewosz M., & Piwowarek K. (2019). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. *Food Science and Biotechnology*, 28(2):449 - 457. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0491-1>
39. Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., & Hammami R. (2018). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology* 9(8). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
40. Hartman B.J., Tomasz A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158(2):513-516. doi: 10.1128/jb.158.2.513-516.1984.
41. Hoelzer K., Switt A. I. M., & Wiedmann M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research* 52(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>
42. Hoffmann S., Macculloch B., & Batz M. (2015). Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States. *Economic Cost of Foodborne Illnesses in the United States*. doi: 10.22004/ag.econ.205081
43. Huis In't Veld J. H. J. H. I. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1):1 - 18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)
44. Ishibashi N., Himeno K., Fujita K., Masuda Y., Perez R. H., Zend, T., Wilaipun P., Leelawatcharamas V., Nakayama J., & Sonomoto K. (2012). Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(5):947 - 953. <https://doi.org/10.1271/bbb.110972>
45. Ivano, M., Kostić M., Stojkovi, D., & Sokovic M. (2022). Rosmarinic acid—Modes of antimicrobial and antibiofilm activities of common plant polyphenol. *South African Journal of Botany*, 146:521 - 527. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.050>

46. Jahan M., Zhanel G. G., Sparling R., & Holley R. A. (2015). Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 199:78 - 85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.013>
47. Jarrar N., Abu-Hijleh A., & Adwan K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(2):121 - 123. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60049-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60049-1)
48. Jensen A. N., & Hoorfar J. (2000). Immediate differentiation of *Salmonella*-resembling colonies on brilliant green agar. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8(3):219 - 225. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2000.tb00219.x>
49. Kaur I. (2016). Novel Strategies to Combat Antimicrobial Resistance. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, 4(4). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000292>
50. Kim H. J., & Koo M. (2020). Occurrence, antimicrobial resistance and molecular diversity of *Enterococcus faecium* in processed pork meat products in Korea. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091283>
51. Kosa K. M., Cate, S. C., Bradle, S., Chambers E., & Godwin S. (2015). Consumer-reported handling of raw poultry products at home: Results from a national survey. *Journal of Food Protection*, 78(1):180 - 186. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-231>
52. Kumar H., Franzetti L., Kaushal A., & Kumar D. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology* 69(9):873 - 883. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>
53. 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
54. Lamichhane J. R., Varvaro L., Parisi L., Audergon J. M., & Morris C. E. (2014). Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the forest for the trees. *Advances in Agronomy*, 126:235 - 295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800132-5.00004-3>
55. Le H. H. T., Dalsgaard A., Anderses P. S., Nguyen H. M., Ta Y. T., & Nguyen T. T. (2021). Large-Scale *Staphylococcus aureus* Foodborne Disease Poisoning Outbreak among Primary School Children. *Microbiology Research*, 12(1): 43 - 52. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010005>
56. Lee C. R., Lee J. H., Park M., Park K. S., Bae I. K., Kim Y. B., Cha C. J., Jeong B. C., & Lee S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options.

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(55):1 - 35. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
57. Lehmacher A., Bockemühl J., & Aleksic S. (1995). Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and Infection*, 115(3):501 - 511. <https://doi.org/10.1017/S0950268800058660>
  58. Levitus M., Rewane A., & Perera T. B. (2022). Vancomycin-Resistant *Enterococci*. StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
  59. Li Z., Fan Y., & Xi J. (2019). Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chemistry*, 277: 246 - 260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.119>
  60. Lu H. Z., Weng X. H., Li H., Yin Y. K., Pang M. Y., & Tang Y. W. (2002). *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3):913 - 917. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.913-917.2002>
  61. Luna C. M., & Aruj P. K. (2007). Nosocomial *Klebsiella pneumonia*. *Respirology* 12( 6):787 - 791. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01147.x>
  62. Machado S. G., da Silva F. L., Bazzolli D. M. S., Heyndrickx M., Costa P. M. de A., & Vanetti M. C. D. (2015). *Pseudomonas spp.* and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *Journal of Food Science*, 80(8):1482 - 1489. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12957>
  63. Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies* 11(1):33 - 39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
  64. Matejczyk M., Świśłocka R., Golonko A., Lewandowski W., & Hawrylik E. (2018). Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*, 63(1):14 - 21. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.07.003>
  65. Matthews K. R., Kniel K. E., & Montville T. J. (2017). Food Microbiology: An Introduction, Fourth Edition. *Food Microbiology: An Introduction, Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1128/9781555819392>
  66. Rasul M.G. (2018). Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*, 6.
  67. Moura A., Disson O., Lavina M., Thouvenot P., Huang L., Leclercq A., Fredriksson-Ahomaa M., Eshwar A. K., Stephan R., & Lecuit M. (2019). Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than listeria monocytogenes. *Infection and Immunity*, 87(4). <https://doi.org/10.1128/IAI.00758-18>



68. Müller T., Ulrich A., Ott E. M., & Müller M. (2001). Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2):268 - 278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x>
69. Nieto G., Ros G., & Castillo J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>
70. Nikaido H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
71. Nirwati H., Sinanjung K., Fahrnissa F., Wijaya F., Napitupulu S., Hati V. P., Hakim M. S., Meliala A., Aman A. T., & Nuryastuti T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
72. Norelli J. L., Jones A. L., & Aldwinckle H. S. (2003). Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87(7):756-765.
73. Ogier J. C., & Serror P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3): 291 - 301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>
74. Oliveira M., Usall J., Viñas I., Solsona C., & Abadias M. (2011). Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiology*, 28(3):590 - 596. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.004>
75. Orsi R. H., & Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(12):5273 - 5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
76. Pava-Ripoll M., Pearson R. E. G., Miller A. K., & Ziobro G. C. (2015). Detection of foodborne bacterial pathogens from individual filth flies. *Journal of Visualized Experiments*, 96:1 – 9. <https://doi.org/10.3791/52372>
77. Penalver R., Vicedo B., Salcedo C. I., & López M. M. (1994). *Agrobacterium radiobacter* Strains K84, K1026 and K84 Agr-Produce an Antibiotic-like Substance, Active In Vitro against *A. tumefaciens* and Phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. *Biocontrol Science and Technology*, 4(3):259 - 267. <https://doi.org/10.1080/09583159409355334>
78. Pendleton J. N., Gorman S. P., & Gilmore B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11(3):297 - 308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
79. Pérez-Delgado O., Alvarado-Pineda R. L., & Yacarini-Martínez A. E. (2021). In vitro antibacterial activity of crude ethanolic extract from the leaves of *Origanum vulgare* , against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 .

- Journal of the Selva Andina Research Society*, 12(1): 21 - 29. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2021.120100021x>
80. Perrin M., Bemer M., & Delamare C. (2003). Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11):5308 - 5309. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003>
  81. Pesquero M. A., Elias Filho J., Carneiro L. C., Feitosa S. B., Oliveira M. A. C., & Quintana R. C. (2008). Ants in a hospital environment and its importance as vector of bacteria. *Neotropical Entomology*, 37(4):472 - 477. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2008000400017>
  82. Picot L., Abdelmoula S. M., Merieau A., Leroux P., Cazin L., Orange N., & Feuilloley M. G. J. (2001). *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: Adherence to nerve cells. *Microbes and Infection*, 3(12):985 - 995. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01462-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01462-9)
  83. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri, R., & Casanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1):15 - 19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1022>
  84. Rasheed N. A., & Hussein N. R. (2021). *Staphylococcus aureus*: An overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*, 8(3):1160 - 1183.
  85. Reygaret C. W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* 4(3):482 – 501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229
  86. Rodoni B. C., Merriman P. R., McKirdy S. J., & Wittwer G. (2006). Costs associated with fire blight incursion management and predicted costs of future incursions. *Acta Horticulturae*, 704:55 - 62. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.704.5>
  87. Rožman T., & Jeršek B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93(1): 51 - 58. <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0007->
  88. Samaržija D., Zamberlin Š., & Pogačić T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2):77 - 95.
  89. Santander R. D., & Biosca E. G. (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: Evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *Peer Journals*, 2017(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.3931>
  90. Savary S., Willocquet L., Pethybridge S. J., Esker P., McRoberts N., & Nelson A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3(3):430 - 439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

91. Scales B. S., Dickson R. P., Lipuma J. J., & Huffnagle G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4):927–948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
92. Sebeny P. J., Riddle M. S., & Petersen K. (2008). *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clinical Infectious Diseases* 47( 4):444 - 449. <https://doi.org/10.1086/590568>
93. Shpigel N. Y., Pasternak Z., Factor G., & Gottlieb Y. (2015). Diversity of bacterial biofilm communities on sprinklers from dairy farm cooling systems in Israel. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139111>
94. Siddiqui A. H., & Koirala J. (2022). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. StatPearls. StatPearls Publishing.
95. Silva L. , Nelson D., Drummond M. , Dufossé, Laurent G. & Maria Beatriz A. (2005). Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*. 38: 1087-1096. [10.1016/j.foodres.2005.02.025](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.025)
96. Söderström A., Österberg P., Lindqvist A., Jönsson B., Lindberg A., Blide Ulander S., Welinder-Olsson C., Löfdahl S., Kaijser B., de Jong B., Kühlmann-Berenzon S., Boqvist S., Eriksson E., Szanto E., Andersson S., Allestam G., Hedenström I., Ledet Muller L., & Andersson Y. (2008). A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(3):339 - 349. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0065>
97. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D. L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outtersson K., Patel J., Cavaleri M., Cox E. M., Houchens C. R., Grayson M. L., Hansen P., Singh N. & Zorzet A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3): 318 - 327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
98. Tindall B. J., Grimont P. A. D., Garrity G. M., & Euzéby J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 521 - 524. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>
99. Vanneste J. L. (2017). The Scientific, Economic, and Social Impacts of the New Zealand Outbreak of Bacterial Canker of Kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Annual Review of Phytopathology*, 55: 377 - 399. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035530>
100. Vázquez-López R., Solano-Gálvez S. G., Vignon-Whaley J. J. J., Vaamonde J. A. A., Alonzo L. A. P., Reséndiz A. R., Álvarez M. M., López E. N. V., Franyuti-Kelly G., Álvarez-Hernández D. A., Guzmán V. M., Bañuelos J. E. J., Felix J. M., Barrios J. A. G., & Fortes T. B. (2020). *Acinetobacter baumannii*

- resistance: A real challenge for clinicians. *Antibiotics* 9( 4).  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
101. Vegara S., Funes L., Martí N., Saura D., Micol V., & Valero M. (2011). Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. *Food Chemistry*, 128(4): 827 - 872.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.109>
  102. WHO, World Health Organization (2022). <https://www.who.int/> . Pristupljeno 30.07.2022.
  103. Wyres K. L., Lam M. M. C., & Holt K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology* 18(6): 344 - 359.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
  104. Yang F., Deng B., Liao W., Wang P., Chen P., & Wei J. (2019). High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin. *Infection and Drug Resistance*, 2019(12): 2729 - 2737.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S219155>
  105. Zhang L., Sun B., & Zhu X. (2009). Organic dye removal from aqueous solution by pulsed discharge on the pinhole. *Journal of Electrostatics*, 67(1): 62 - 66.  
<https://doi.org/10.1016/j.elstat.2008.11.003>
  106. Zhang Q. W., Lin L. G., & Ye W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*,13(20): 1 - 26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
  107. Zia S., Khan M. R., Shabbir M. A., Aslam Maan A., Khan M. K. I., Nadeem M., Khalil A. A., Din A., & Aadil R. M. (2022). An Inclusive Overview of Advanced Thermal and Nonthermal Extraction Techniques for Bioactive Compounds in Food and Food-related Matrices. *Food Reviews International* 38(6): 1166 - 1196. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1772283>

## 9. Životopis

Karlo Elblinger rođen je 17.07.1996. u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje stekao je u Prirodoslovnoj školi Vladimir Prelog, smjer geološki tehničar, koju je pohađao od 2011. do 2015. godine. Nakon srednje škole upisuje preddiplomski studij Ekološka poljoprivreda na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje diplomski studij Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi 2020. godine na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.