

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB**

**SVEUČILIŠNI SPECIJALISTIČKI STUDIJ
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA**

Pero Grgić

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA SMILJA,
LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE TE NJIHOVA MOGUĆA
PRIMJENA U PREVENCIJI BAKTERIJSKOG ZAGAĐENJA HRANE**

Specijalistički rad

OSIJEK, 2024.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB**

**SVEUČILIŠNI SPECIJALISTIČKI STUDIJ
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA**

Pero Grgić

**ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA SMILJA,
LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE TE NJIHOVA MOGUĆA
PRIMJENA U PREVENCIJI BAKTERIJSKOG ZAGAĐENJA HRANE**

Specijalistički rad

OSIJEK, 2024.

Tema rada prihvaćena je na 2. sjednici Sveučilišnog vijeća za sveučilišne poslijediplomske interdisciplinarne (specijalističke) studije održanoj, dana 7. rujna 2023.godine.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Sveučilišni specijalistički studij Zaštita prirode i okoliša

Specijalistički rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarne znanosti
Znanstveno polje: Poljoprivreda, Biologija

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE TE NJIHOVA MOGUĆA PRIMJENA U PREVENCIJI BAKTERIJSKOG ZAGAĐENJA HRANE

Pero Grgić

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Kratki sažetak specijalističkog rada: S obzirom na rastuću potražnju za sigurnijim i prirodnijim metodama za zaštitu hrane od bakterijskog zagađenja, prirodna antimikrobna sredstva, kao što su eterična ulja, ponovno su privukla interes znanstvene zajednice. S obzirom na izvrsne uvjete za uzgoj ljekovitog bilja u Republici Hrvatskoj, ovaj rad pruža pregled moguće primjene eteričnih ulja u prevenciji javnozdravstvenog problema bakterijskog zagađenja hrane te prikazuje utvrđene antibakterijske aktivnosti dobivenih eteričnih ulja smilja, lovora, ružmarina i kadulje protiv ispitivanih sojeva *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*.

Broj stranica: 87

Broj slika: 24

Broj tablica: 10

Broj literaturnih navoda: 234

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antibakterijska aktivnost, eterična ulja, smilje, lovor, ružmarin, kadulja, sigurnost hrane, bakterijsko zagađenje, prirodni konzervansi.

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Stela Jokić, redovita profesorica u trjanom izboru, predsjednica
2. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, redovita profesorica, član
3. izv. prof. dr. sc. Zorana Katanić, izvanredna profesorica, član
4. izv. prof. dr. sc. Liljana Krstin, izvanredna profesorica, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Ruder Bošković Institute, Zagreb****University specialist study Enviromental Protection and Nature Conservation****Specialist thesis****Scientific Area:** Intedisciplinary Sciences**Scientific Field:** Agronomy, Biology**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF IMMORTELLE, BAY LEAF,
ROSEMARY, AND SAGE AND THEIR POSSIBLE APPLICATION IN THE PREVENTION
OF BACTERIAL FOOD CONTAMINATION**

Pero Grgić

Thesis performed at: Department of Biology, University of Osijek**Supervisor/s:** Valentina Pavić, PhD, Full Professor, Department of Biology, Univerity of Osijek

Short abstract: Given the growing demand for safer and more natural ways to prevent bacterial food contamination, the scientific community has become more interested in natural antimicrobial agents, such as essential oils. Considering the excellent conditions for the cultivation of medicinal plants in the Republic of Croatia, this work presents an overview of the potential use of essential oils in the prevention of the public health problem of bacterial food contamination. It also demonstrates the established antibacterial activities of the obtained essential oils of immortelle, bay laurel, rosemary and sage against the tested strains of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

Number of pages: 87**Number of figures:** 24**Number of tables:** 10**Number of references:** 234**Original in:** Croatian**Key words:** antibacterial activity, essential oils, helichrysum, bay laurel, rosemary, sage, food safety, bacterial contamination, natural preservatives.**Date of the thesis defense:****Reviewers:**

1. *PhD Stela Jokić, full professor with tenure, president*
2. *PhD Karolina Vrandečić, full professor, member*
3. *PhD Zorana Katanić, associate professor, member*
4. *PhD Liljana Krstin, associate professor, substitute member*

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Čast mi je iskazati veliku zahvalnost svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Valentini Pavić koja me je svojim iskustvom, stručnošću i strpljivošću usmjeravala u izradi ovoga stručnog rada.

Zahvaljujem se svim profesorima ZPIO-a i svome ravnatelju Srednje strukovne škole Šibenik Draženu Seksi na podršci i svim mojim dosadašnjim mentorima tijekom školovanja.

Na kraju, posebno se i od srca zahvaljujem supruzi Mireli, koja je uvijek bila uz mene, davala mi podršku i vjerovala u mene.

Pero Grgić

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO	3
2.1.	LJEKOVITO BILJE I GLAVNE ODLIKE	3
2.2.	MORFOLOŠKA OBILJEŽJA BILJAKA	6
2.2.1.	Smilje <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	6
2.2.2.	Lovor <i>Laurus nobilis</i> L.....	8
2.2.3.	Ružmarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	11
2.2.4.	Kadulja <i>Salvia officinalis</i> L.	14
2.3.	HIDROLATI I ETERIČNA ULJA	18
2.4.	KEMIJSKI SASTAV I ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV ETERIČNIH ULJA: SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE	20
2.4.1.	Eterično ulje smilja	20
2.4.2.	Eterično ulje lovora	23
2.4.3.	Eterično ulje kadulje	24
2.4.4.	Eterično ulje ružmarina	25
2.5.	ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST I PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U PREVENCIJI BAKTERIJSKOG ZAGAĐENJA HRANE	26
2.5.1.	Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije	26
2.5.2.	Bakterije i njihove karakteristike.....	27
2.5.3.	Najčešće bakterije koje uzrokuju zagađenje hrane.....	30
2.6.	UTJECAJ PRIRODNIH DODATAKA NA ODRŽIVOST PREHRAMBENIH PROIZVODA	34
3.	MATERIJAL I METODE.....	40
3.1.	PRIPRAVA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE POMOĆU DESTILACIJE VODENOM PAROM	40
3.2.	ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI ETERIČNIH ULJA SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE	44
3.2.1.	Priprema hranjive podloge i bujona.....	44
3.2.2.	Odabir bakterijskih organizama i nasađivanje bakterijskih kultura	44
3.2.3.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	45
3.2.4.	Statistička analiza podataka.....	46
4.	REZULTATI I RASPRAVA	47
5.	ZAKLJUČCI	69
6.	LITERATURA.....	71
7.	ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

U Republici Hrvatskoj postoje dobri uvjeti za razvoj industrijske proizvodnje eteričnih ulja iz samoniklog i plantažno uzgojenog bilja. Neka eterična ulja (lavande, kadulje, lovora, borovice, metvice, anđelike, kamilice i dr.) važan su izvozni proizvod (Šilješ i sur., 1991). Na kvalitetu eteričnog ulja, koje se može dobiti iz neke sirovine, utječu mnogi faktori, primjerice svojstva tla, vremenski uvjeti u kojima je biljka rasla, nadmorska visina, način uzgoja, vrijeme i način berbe sirovine, te tehnike proizvodnje (Lekić, 2012). Eterično ulje sprječava razvoj uzročnika zaraznih bolesti, ali to ne znači da ih i uništava (Keršek, 2004). Eterična ulja aromatične su tvari prisutne u specijaliziranim stanicama ili žlijezdama pojedinih biljaka koje koriste za privlačenje oprašivača, ali i za zaštitu od predatora i štetnika. Drugim riječima, eterična ulja dio su imunološkog sustava biljke (Butnariu i Sarac, 2018).

Zahvaljujući brojnim sekundarnim biljnim metabolitima, ljekovite biljke poput smilja, lovora, ružmarina i kadulje koriste se dugi niz godina kao začini u prehrambenoj industriji, u farmakologiji zbog ljekovitih svojstava, te u prirodnim proizvodima za njegu, zbog svog repelentnog i insekticidnog djelovanja (Bakkali i sur., 2008).

Unatoč razvoju tehnologije u industriji i proizvodnji hrane, velik i značajan zdravstveni problem je očuvanje hrane od zaraze humanim patogenima. U današnje vrijeme tradicionalni se konzervansi pokušavaju zamijeniti prirodnim sredstvima kao što su ljekovita bilja, začini, eterična ulja i razni biljni ekstrakti. Prekomjernom i neprimjerenom upotrebom antibiotika došlo je do razvoja otpornosti kod mnogih sojeva patogenih bakterija. Eterična ulja s visokim udjelom fenolnih komponenti kao što su karvakrol, eugenol i timol, mogu ostvariti snažan antibakterijski učinak na patogene u hrani (Burt, 2004). Ove fenolne spojeve karakterizira izraženo antibakterijsko djelovanje te se mogu koristiti u svrhu očuvanja hrane i sprječavanja razvoja bakterija koje mogu uzrokovati propadanje hrane ili prijenos bolesti. Zbog pojave sve veće otpornosti patogenih bakterija na određene antibiotike, nužna su daljnja istraživanja ljekovitih bilja s ciljem poboljšanja očuvanja hrane. Primjena prirodnih konzervansa poput ljekovitog bilja, začina, eteričnih ulja i biljnih ekstrakata može biti vrlo učinkovita u sprječavanju propadanja hrane i očuvanju svježine proizvoda, pružajući istovremeno dodatne zdravstvene i ekološke koristi. Međutim, važno je pravilno istražiti i ispitati ove alternative kako bi se osigurala njihova učinkovitost i sigurnost u različitim vrstama hrane i proizvoda.

Prednost djelovanja eteričnih ulja nad sintetskim konzervansima i antimikrobnim lijekovima jest sinergistički učinak raznih sastavnica, protiv kojih je teže razviti mehanizme otpornosti (Lis-Balchin i Deans, 1997). Primjerice, jedno eterično ulje može sadržavati nekoliko različitih komponenti, poput fenolnih spojeva, terpena, ketona i estera, koji zajedno djeluju na različite biološke procese u mikroorganizmima, poput funkcije stanične membrane, inhibicije enzima ili poremećaje metabolizma. Ovaj kompleksan pristup otežava mikroorganizmima razvoj mehanizama otpornosti, jer bi morali razviti otpornost na više različitih kemijskih spojeva istovremeno (Hyldgaard i sur., 2012). Eterična ulja su također svrstana u podgrupu fitobiotika, tj. sastojci dobiveni iz biljka uklopljeni u hranu s ciljem poboljšanja proizvodnih svojstava životinje, štite njihovo zdravlje i poboljšavaju proizvodna svojstva životinja, odnosno poboljšavaju svojstva namirnice dobivene od tih životinja.

U usporedbi sa sintetski dobivenim antibioticima i anorganskim kemijskim tvarima, ovi proizvodi dobiveni iz biljaka su prirodni, dokazano manje toksični, ne stvaraju rezidue te bi mogli postati idealni dodaci hrani za životinje i uspješno zamijeniti antibiotske promotore rasta u hrani za životinje (Windisch i sur., 2008). S druge strane, smilje, lovor, ružmarin i kadulja bogat su izvor eteričnih ulja koja sadrže ključne komponente od potencijalnog prehrambenog, farmaceutskog i ekonomskog značaja.

Cilj ovog rada bio je pružiti pregled postojeće literature o različitim biološkim aktivnostima eteričnih ulja, uključujući njihova antimikrobna, protuupalna, antioksidacijska svojstva, ispitati antibakterijsku aktivnost hidrolata i eteričnih ulja smilja, lovora, ružmarina i kadulje dobivenih hidrodestilacijom na rast odabranih sojeva mikroorganizama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* te ujedno pružiti osvrt i pregled dosadašnjih istraživanja njihove primjene u sprječavanju javnozdravstvenog problema bakterijskog zagađenja hrane.

2. OPĆI DIO

2.1. LJEKOVITO BILJE I GLAVNE ODLIKE

U svijetu se koristi približno 20 000 ljekovitih biljaka. Od toga je 1100 vrsta dobro istraženo, dok se od 250 vrsta dobivaju osnovni sastojci za proizvodnju suvremenih lijekova s biljnim aktivnim tvarima (Galle, 2001). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) smatra da se biljke čiji jedan ili više biljnih dijelova sadrže jednu ili više biološki aktivnih tvari koje se mogu koristiti u terapijske svrhe ili za kemijske i farmaceutske sinteze, mogu smatrati ljekovitim biljem. S druge strane, biljke koje sadrže jednu ili više aktivnih tvari posebnog okusa ili mirisa, a koriste se za spravljanje mirisa, aroma, napitaka i kozmetičkih proizvoda, ubrajaju se u aromatično bilje. U različitim izvorima, bilje koje se koristi u medicinske svrhe često se naziva općenito ljekovito bilje, a obuhvaća ljekovito, začinsko i aromatično bilje. Najčešća definicija ljekovitog bilja obuhvaća biljke ili njihove dijelove koji se koriste u svrhu liječenja ili ublažavanja bolesti, održavanja zdravlja ili poboljšanja općeg blagostanja.

Ljekovite tvari u biljkama nastaju izmjenom tvari u razvoju i životu biljke te se pohranjuju u njezinim različitim dijelovima. Ljekovite tvari obično nisu ravnomjerno raspoređene po cijeloj biljci. Katkada ih je više u cvjetovima, a kod drugih vrsta u listovima, korijenju ili drugim organima. Osobitost ljekovitih biljaka je i u tome da se kod različitih biljaka iste vrste ljekovite tvari mogu naći u različitim količinama. To prije svega ovisi o staništu biljke, o vremenu branja, kao i o daljnjem postupku obrade ubranih dijelova (Keršek, 2004). Osim ljekovitih tvari, prisutne su i druge tvari koje zovemo balastne tvari. Međutim, takve tvari nerijetko utječu na ljekovita svojstva neke biljke, tako mogu doprinijeti terapijskim učincima ljekovitih biljaka. Prisutnost prirodnih regulatora poput fitohormona, fitonutrijenata, enzima, esencijalnih masnih kiselina i drugih aktivnih spojeva, jedna je od prednosti ljekovitih biljaka u odnosu na sintetizirane lijekove. Posebna je značajka ljekovitih biljaka u tome što one najčešće sadrže više različitih ljekovitih tvari, od kojih jedna može biti dominantna te u velikoj mjeri određuje ljekovita svojstva te biljke i mogućnost njezine primjene (Keršek, 2004). Zbog brzog razvoja kemijske sinteze posljednjih godina, pretpostavljalo se da će sintetizirani spojevi s poboljšanim terapijskim učincima istisnuti ljekovito bilje. Međutim, svjedoci smo naglog povećanja potražnje za proizvodima od ljekovitog bilja u zapadnoeuropskim zemljama (Ekor, 2014; Mahady, 2001; Sile i sur., 2023). Važno je napomenuti da kombinacija različitih ljekovitih tvari u

biljkama često rezultira sinergijskim učinkom, što znači da njihovo zajedničko djelovanje može biti jače nego djelovanje svake tvari pojedinačno. Stoga se ljekovite biljke često koriste u obliku ekstrakata ili biljnih pripravaka kako bi se iskoristile sve prednosti njihovog kompleksnog kemijskog sastava.

Tlo igra ključnu ulogu u rastu i razvoju ljekovitog bilja te može utjecati na kvalitetu i sadržaj ljekovitih spojeva u biljkama. Tlo pruža hranjive tvari koje su potrebne biljkama za rast i razvoj, uključujući dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij i mnoge druge elemente. Ovi nutrijenti igraju ključnu ulogu u sintezi biokemijskih spojeva u biljkama, uključujući i ljekovite tvari poput alkaloida, flavonoida, terpena i drugih (Yang i sur., 2018). Različit sastav tla, poput sadržaja humusa, pijeska, gline i drugih materijala, mogu utjecati na sposobnost tla da zadrži vlagu, njegovu aeriranost i drenažu. Ovi faktori mogu imati utjecaj na rast korijena biljaka i apsorpciju hranjivih tvari te mogu utjecati na kvalitetu i količinu ljekovitih spojeva u biljkama (Kome i sur., 2019). Husnjak i sur. (2018) navode da je tlo temeljno prirodno bogatstvo u Republici Hrvatskoj te predstavlja njezin najznačajniji prirodni stalni izvor. Prema Britvec i sur. (2015) Republika Hrvatska s gledišta biološke raznolikosti jedna je od najbogatijih zemalja Europe. Velika raznolikost otoka i priobalja daju hrvatskom obalnom području međunarodno značenje.

U tom je smislu Jadransko more s otocima, osobito važno za Hrvatsku jer pruža mnogo pogodnosti za uspješan razvoj poljoprivrede, turizma, ribarstva i marikulture. Prema podacima Hrvatske poljoprivredne komore, u Republici Hrvatskoj se uzgaja i prikuplja oko 170 vrsta ljekovitoga i aromatičnoga bilja. Jadranska obala i otoci su jedinstveno i osebujno područje, koje se ističe općim karakteristikama, neobičnim reljefom, klimom, složenom geološkom prošlošću, raznolikošću staništa, bogatom bioraznolikošću i relativno dobrim stanjem očuvanosti (Kovačić i sur., 2008). Jadransko more s otocima ima veliku važnost za nas zbog pogodnosti za uspješan razvoj poljoprivrede, ali i drugih gospodarskih grana kao što su turizam, ribarstvo i marikultura. Prirodni i geografski uvjeti, posebice pedološki i klimatski, omogućuju uspješan samonikli rast i uzgoj ljekovitog bilja na ovom području.

Jedan od preduvjeta za uspješan uzgoj i povećanje proizvodnje ljekovitih i aromatičnih biljaka u Hrvatskoj u svakom je slučaju poznavanje njihovih ekoloških karakteristika. Iako u Republici Hrvatskoj postoje povoljni uvjeti za uzgoj, kao i duga tradicija korištenja ljekovitih i aromatičnih biljaka, današnja proizvodnja tih kultura kod nas nije razvijena u zadovoljavajućoj mjeri (Ljubičić i Britvec, 2019). Nadalje, isti autori navode kako se u Republici Hrvatskoj može uzgajati puno veći broj ljekovitih i aromatičnih vrsta, nego što je to sad slučaj.

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku i Ministarstva poljoprivrede, ukupna površina ekoloških oraničnih usjeva u Republici Hrvatskoj za aromatsko, ljekovito i začinsko bilje u 2022. godini je iznosila 4407 ha, kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Površina ekoloških oraničnih usjeva u Republici Hrvatskoj (ha) u razdoblju od 2017. do 2022. godine za aromatsko, ljekovito i začinsko bilje (Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede, 2022).

Površina ekoloških oraničnih usjeva u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2017. do 2022. godine	2017.	2018.	2019.	2020.	2021.	2022.
ha	5100	5274,03	4004	4194	4782	4407

Tablica 2. Ekološka proizvodnja oraničnih usjeva (t) u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2017. do 2022. godine za aromatsko, ljekovito i začinsko bilje (web 1, Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede, 2022).

Ekološka proizvodnja oraničnih usjeva u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2017. do 2022. godine	2017.	2018.	2019.	2020.	2021.	2022.
t	4239	3939	2797	2867	3374	3083

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku i Ministarstva poljoprivrede ukupna ekološka proizvodnja oraničnih usjeva u Republici Hrvatskoj za aromatsko, ljekovito i začinsko bilje u 2022. godini je iznosila 3083 tone (t), što je vidljivo iz Tablice 2.

Prema statističkim podacima Državnog zavoda za statistiku i Ministarstva poljoprivrede izvoz eteričnih ulja i rezinoida (EUR) iz Republike Hrvatske u države članice Europske unije za 2020. godinu iznosio je u vrijednosti od 13.791,152 EUR od toga u Europsku uniju (15 zemalja) 9.223,626 EUR; Austriju 5.149,851 EUR; Njemačku 78,847 EUR; Ujedinjeno kraljevstvo 69,306 EUR; Grčku 43,115 EUR; Francusku 15,319 EUR; Italiju 11,736 EUR; Nizozemsku 3.853,47 EUR; Španjolsku 1,959 EUR; Belgiju 15 EUR, dok za Dansku, Finsku, Irsku, Luksemburg, Portugal i Švedsku izvoz je bio 0 (web 1).

Šatović i sur. (2012) navode da je uzgoj ljekovitih i aromatičnih biljaka većinom organiziran na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima i to uglavnom kao sporedna

aktivnost. Nadalje, relativno je malo obiteljskih gospodarstava specijalizirano za proizvodnju ljekovitih i aromatičnih biljaka.

2.2. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA BILJAKA

2.2.1. Smilje *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Smilje je trajnica koja pripada porodici glavočika (Asteraceae) i rodu *Helichrysum* (Tablica 3.). Rod *Helichrysum* obuhvaća više od 600 vrsta rasprostranjenih diljem svijeta, a oko 25 vrsta je porijeklom s Mediterana (Ninčević i sur., 2019; Anderberg, 1991). Naziv roda potječe od grčkih riječi *helios*, što znači sunce i *chryson*, što znači zlato (Perrinial i sur., 2009; Beljo i sur., 2016).

Tablica 3. Botanička sistematika smilja (Hulina, 2011).

TAKSONOMSKA JEDINICA	NAZIV
CARSTVO (<i>regnum</i>)	Plantae
ODJELJAK (<i>phylum, divisio</i>)	Magnoliophyta
RAZRED (<i>clasis</i>)	Magnoliopsida
PODRAZRED (<i>subclasis</i>)	Magnoliideae
RED (<i>ordo</i>)	Asterales
PORODICA (<i>familia</i>)	Asteraceae
ROD (<i>genus</i>)	<i>Helichrysum</i>
VRSTA (<i>species</i>)	<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don

Smilje je vazdazeleni polugrm (Clapham, 1976; Galbany-Casals i sur., 2006; Rogošić, 2011). Stabljika je bijelo pustenasta, uspravna i visoka 20-50 cm. Listovi su naizmjenični, usko linearni, tupog vrha, prema dolje previjenog ruba, dugi 3-4 (6) cm, široki oko 20 mm, kožasti, jako aromatični. Više cvjetova zajedno sakupljeno je u guste, 2-4 mm široke glavice koje izgledaju kao jedan cvijet (Slika 1). Glavice su sakupljene u vršnim, gotovo ravnim, 2-8 cm širokim gronjama. Cvjetovi su zlatnožuti, intenzivna mirisa, te cvate od lipnja do kolovoza (Galbany-Casals i sur., 2006), a plod je jednosjemena roška (Domac, 1994; Dubravec, 1996; Glavaš, 2019).



Slika 1. Smilje u cvatu (autor: Pero Grgić)

2.2.1.1. Stanište, ekologija i rasprostranjenost

Smilje raste na suhim mjestima, stijenama i pijescima u blizini mora te bušicama. Rasprostranjeno je na većem dijelu Sredozemlja: južna Europa, sjeverozapadna Afrika, Mala Azija (Kovačić i sur., 2008). Sredozemno smilje *Helichrysum italicum* je rasprostranjeno u središnjem području u sjevernoj Africi i na Cipru (Galbany-Casals i sur., 2006). Smilje uspješno raste na lakim propusnim karbonatnim tlima te dobro podnosi sušu i minimalnu količinu hraniva plitkih tala mediteranskog područja (Pohajda i sur., 2015). Sredozemno smilje je kserofitna vrsta, koja prirodno raste na suhim, pjeskovitim i kamenitim područjima mediteranske regije. Ta karakteristika omogućuje da raste u širokom rasponu mediteranskih visina, između razine mora i 2200 m (Nostro i sur., 2001; Galbany-Casals i sur., 2011).

Smilje u Republici Hrvatskoj raste u Dalmatinskoj zagori, na otocima, duž jadranske obale, najčešće uz rubove putova i na kamenjarskim pašnjacima (Galbany-Casals i sur., 2011). Dobro podnosi sušu, ima snažan korijenski sustav koji može prodrijeti duboko u tlo u potrazi za vlagom. Najčešće uspijeva na karbonatnim i skeletnim tlima lakšeg teksturnog sastava te ocjeditim tlima. Smilju ne odgovaraju teška tla koja zadržavaju vodu (Ninčević, 2020). Raste po kamenjarima, točilima, napuštenim vinogradima, gromačama, uz putove, u pukotinama stijena. Često s velikom učestalošću pokriva terene, te je poznata biljka jadranskog područja (Glavaš, 2019).

Iz baze podataka Flora Croatica (Slika 2) vidljivo je da je smilje u Republici Hrvatskoj rasprostranjeno na otocima i uz obalni pojas.



Slika 2. Rasprostranjenost smilja u Republici Hrvatskoj (Web 2)

Pri podizanju plantažnog nasada smilja važno je koristiti deklarirani kvalitetni sadni materijal, a sadnju presadnica najjednostavnije je obaviti strojno te prema postojećoj mehanizaciji prilagoditi sadnju (Slika 3).



a

b

Slika 3. a) Nasad smilja nasad smilja u cvatu (lijevo) i b) nasad smilja nakon berbe (desno) (autor: Branka Bilandžija, uz dozvolu autora)

2.2.2. Lovor *Laurus nobilis* L.

Lovor pripada porodici lovorika (Lauraceae) i rodu *Laurus* (Tablica 4.), a dolazi od latinske riječi *laurus*, što znači slavljem i *nobilis*, tj. plemenit (Houdret, 2002).

Tablica 4. Botanička sistematika lovora (Glavaš, 2019)

TAKSONOMSKA JEDINICA	NAZIV
CARSTVO (<i>regnum</i>)	Plantae
ODJELJAK (<i>phylum, divisio</i>)	Magnoliophyta
RAZRED (<i>clasis</i>)	Magnoliopsida
PODRAZRED (<i>subclasis</i>)	Magnoliidae
RED (<i>ordo</i>)	Lurales
PORODICA (<i>familia</i>)	Lauraceae
ROD (<i>genus</i>)	<i>Laurus</i>
VRSTA (<i>species</i>)	<i>Laurus nobilis</i> L.

Lovor je vazdazeleni grm ili nisko stablo koje može narasti i do 10 m visine. Listovi stoje naizmjenično, jajastog su oblika i na oba kraja zašiljeni. Dvodomni, žućkastobijeli cvjetovi razvijaju se u obliku čuperaka u pazušcima listova. Lovor cvate od ožujka do svibnja (Slika 4a). Lovorov plod je jajasta koštunica koja je u početku zelena (Slika 4b), a u kasnu jesen poprima tamnomodru boju. Koštunica je sjajna, do 18 mm duga i do 12 mm široka. Listovi su kožasti i tvrdi, vazdazeleni, do 12 cm dugi i 3-5 cm široki, valovita ili nerijetko nazubljena ruba, tamnozeleni i sjajni. Karakterističnog su, jako aromatičnog mirisa (Kuštrak, 2014). Plod je tamnoplava jajasta koštunica (Gelenčir i Gelenčir, 1991).



a



b

Slika 4. a) Lovor u cvatu (lijevo) i b) plod lovora (desno) (autor: Pero Grgić)

2.2.2.1. Staniše, ekologija i rasprostranjenost

Lovor je rasprostranjen po zemljama oko Sredozemnog mora, a kod nas raste uz jadransku obalu, pojedinačno ili u skupinama s ostalim zimzelenim grmljem. Može se naći i do 300-400 m nadmorske visine. Ima ga u Istri, oko Opatije, na Lošinju, Rabu, Pagu, Braču, Hvaru, Visu, Pelješcu te gotovo uz cijelu južnodalmatinsku obalu.

Na nekim mjestima formira male šume. Raste u sastojinama vazdazelenih šuma hrasta crnike, u graničnim područjima prema submediteranu. Podnosi jaču zasjenjenost, izdržljiv je na sušu i otporan na jake vjetrove, te podnosi niske temperature do -18°C . Domovina lovora je Mala Azija, odakle se raširio po cijelom Sredozemlju, gdje raste kao divlja, ali i kao kultivirana biljka (Kovačić i sur., 2008). Uzgaja se i za ukras po vrtovima u područjima s umjerenom klimom. Dobro podnosi orezivanje te se može raznoliko oblikovati (Grlić, 2005).

Prema bazi podataka Flora Croatica (Slika 5) vidljivo je da je lovor u Republici Hrvatskoj rasprostranjen i da raste u Istri, Hrvatskom primorju i Dalmaciji, u priobalju i po otocima. Na nekim mjestima tvori malene šume (na obroncima Učke-Lovran, Opatija). U većim količinama lovor raste i u južnoj Dalmaciji; u Dubrovačkom primorju je uz kadulju najrasprostranjenija, ali i najvažnija biljka iz skupine ljekovitih i aromatskih biljaka toga kraja. U Hrvatskoj lovor raste na području Jadrana, pojedinačno ili u skupinama, u šumama i makijama hrasta crnike i sastojinama crnog i bijelog graba.

U nekim ga krajevima ima toliko mnogo da su pojedina mjesta po njemu dobila ime, Lovran u Istri, Lovrove na Silbi i Lovreta na području Splita (Glavaš, 2019).



Slika 5. Rasprostranjenost lovora u Republici Hrvatskoj (Web 2)

Lovor raste na smeđim karbonatnim tlima na flišu otprilike 63-73 % čestica praha i gline, te 27-37 % čestica pijeska, a preferira slabo kiselu do neutralnu reakciju tla (Gračanin, 1952; Šimić, 2018). Lovor je u biološko-ekološkom pogledu heliofilna i termofilna vrsta. Prostire se u krajevima gdje godišnja temperatura iznosi 16 °C – 19 °C, a količine oborina tijekom ljeta su od 50-100 mm, relativna vlaga zraka do 60 % (Španjol i sur., 2021). Osjetljiv je na hladnoću, ali ju može podnijeti. Prema Noordhuisu (1995) lovor najbolje prezimi pri temperaturama od 5 do 10 °C.

Obzirom da je lovor autohtona biljna vrsta na Mediteranu kao takva je i vrlo korisna za pošumljavanje na Mediteranu te je sastavni dio zimzelenih sredozemnih šuma i makija. Lovor ima dobro razvijen korijen i zbog toga je pogodan za vezivanje i zaštitu tla od erozija (Španjol i sur., 2021).

Lovor se može saditi kao vjetrozaštitna vrsta jer odolijeva jačim vjetrovima (Barčić i sur., 2021). Zadebljali korijenov vrat lovoru omogućuje preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (npr. sušni uvjeti, požari i oštećenja stabljike), a ima i visoke potencijale za razmnožavanje i klonski rast (Španjol i sur., 2021). Također, lovor ima visoku sposobnost izbjegavanja pojave vodenog stresa na lišću, stvarajući nisku brzinu transpiracije i sposobnost brzog obnavljanja sadržaja vode u tkivima (Alessi i sur., 2021).

Tijekom posljednjih desetljeća u šumama južne Europe zabilježeno je kontinuirano širenje populacije lovora. Nekoliko čimbenika su pokretači ovog fenomena: globalno zatopljenje, promjena korištenja zemljišta, povećanje atmosferskog CO₂ itd. (Alessi i sur., 2021). Uz sve navedene prednosti ova šumska vrsta nije u potpunosti iskorištena, u šumarstvu na kršu, mediteranskoj poljoprivredi, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Španjol i sur., 2021).

2.2.3. Ružmarin *Rosmarinus officinalis* L.

2.2.3.1. Stanište, ekologija i rasprostranjenost

Prema bazi podataka Flora Croatica (Slika 6), vidljivo je da ružmarin u Republici Hrvatskoj raste na sunčanim i kamenitim predjelima našeg priobalja i na otocima.

Najbujnije se razvija u Dalmaciji te je važna biljka makije mediteranskog područja. Samoniklo raste u Italiji (na Sardiniji i Siciliji), južnoj Francuskoj i Korzici, kao i u Grčkoj, Turskoj i na sjevernoafričkoj obali. Ružmarin je osjetljiv na hladnoću i mrazeve, pa se u zemljama s oštrom kontinentalnom klimom ne razvija. Uzgaja se u Francuskoj,

Španjolskoj, Portugalu, a od afričkih zemalja u Maroku i Tunisu. Te su zemlje i izvoznice ružmarinova lista i eteričnog ulja. Međutim, ružmarin se uzgaja i u Kaliforniji, kao i u Kini (Kuštrak, 2014).

Ružmarin raste u najtoplijim, suhim i kamenitim dijelovima Sredozemlja i u Hrvatskoj, na najtoplijim otocima, na suhim krševitim obroncima u blizini morske obale (Slika 7a,b), izložen vlažnim morskim vjetrovima (Galle, 2001; Kovačić i sur., 2008). Grlić (2005) navodi da ružmarin raste na našem primorju, ali se mnogo i uzgaja kao ukrasni grm, kao začinska biljka i za proizvodnju eteričnog ulja.

Pretpostavlja se da su ružmarin iz pradomovine, zapadnog Sredozemlja, u davna vremena rasprostranili benediktinci. Danas su na našim prostorima zajednice ružmarina sasvim udomaćene; pripadaju bušicama zapadnomediteranskih zajednica ružmarina (Kovačić i sur., 2008).



Slika 6. Rasprostranjenost ružmarina u Republici Hrvatskoj (Web 2).

Zuazo i Pleguezuelo (2008) navode kako ružmarin svojim razgranatim korjenovim sustavom i brzim širenjem može kvalitetno poslužiti i kao stabilizator tla na kosinama, sprječavajući eroziju. Nadalje, jedna od mogućnosti su i zidne kaskade ili živice, pri čemu tvori prirodnu ogradu.



a



b

Slika 7. a) Nasad ružmarina s mulch folijom, b) Uzgojni oblik ružmarina (autor: Pero Grgić)

Ružmarin pripada porodici Lamiaceae i rodu *Rosmarinus* (Tablica 5.), a dolazi od grč. riječi *ros* što znači rosa i *marinus* što znači more (morska rosa) (Savković, 2017).

Tablica 5. Botanička sistematika ružmarina (Begum i sur., 2013.).

TAKSONOMSKA JEDINICA	NAZIV
CARSTVO (<i>regnum</i>)	Plantae
ODJELJAK (<i>phylum, divisio</i>)	Magnoliophyta
RAZRED (<i>clasis</i>)	Magnoliopsida
PODRAZRED (<i>subclasis</i>)	Magnoliideae
RED (<i>ordo</i>)	Lamiales
PORODICA (<i>familia</i>)	Lamiaceae
ROD (<i>genus</i>)	<i>Rosmarinus</i>
VRSTA (<i>species</i>)	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

Ružmarin je vazdazeleni, gusti i vrlo razgranati grm visine 50-150 (200) cm. Korijenov sustav je dobro razvijen. Vazdazeleni listovi su unakrsno nasuprotni, jednostavni, sjedeći, duguljasto linearni, tupog vrha, malo sužene osnove, cijelog i prema dolje previjenog ruba. Listovi su kožasti, debeli, 2-3 (4) cm dugački i 2-4 mm široki (Slika 8a). Ružmarin je vrlo aromatična biljka i obiluje nektarom što privlači i korisne kukce. Cvjetovi su gotovo sjedeći, po nekoliko ih je u prividnim pršljenima, postranim grozdovima na kratkim izbojcima. Vjenčić cvijeta je svijetloplav do ljubičastoplav, 1-1,2 cm dugačak, izvana slabo dlakav (Slika 8b).

Plod je kalavac koji se raspada na četiri smeđa, valjkasta, gola, jednosjemena oraščića. Plodovi dozrijevaju u različito doba godine, ovisno o vremenu cvjetanja, a najviše ljeti (Grlić, 2005; Hulina, 2011; Glavaš, 2019).



Slika 8. a) Stabljika i listovi ružmarina (lijevo) i b) ružmarin u cvatu (desno)

(autor: Pero Grgić)

2.2.4. Kadulja *Salvia officinalis* L.

Kadulja pripada porodici Lamiaceae i rodu *Salvia* (Tablica 6.) (Dubravec i Dubravec, 2001). Dolazi od latinske riječi *salvare* što znači spašavam ili liječim (Lesinger, 1999; Grlić, 2005).

Tablica 6. Botanička pripadnost vrste *Salvia officinalis* L. (Drew i Sytsma, 2012).

TAKSONOMSKA JEDINICA	NAZIV
CARSTVO (<i>regnum</i>)	Plantae
ODJELJAK (<i>phylum, divisio</i>)	Magnoliophyta
RAZRED (<i>clasis</i>)	Magnoliopsida
PODRAZRED (<i>subclasis</i>)	Magnoliideae
RED (<i>ordo</i>)	Lamiales
PORODICA (<i>familia</i>)	Lamiaceae
ROD (<i>genus</i>)	<i>Salvia</i>
VRSTA (<i>species</i>)	<i>Salvia officinalis</i> L.

Nizak polugrm (50 cm) ugodna mirisa i većinom nerazgranjenih stabljika koje su uspravne ili malo polegle, jasno četverobridne i pri dnu drvenaste (Slika 9, 10).



Slika 9. Kadulja (autor: Pero Grgić)

Listovi kratkih peteljki produženi su ili eliptični, gotovo bijeli, debeli i pustenasti, dugi oko 5 (7,5) cm i jako aromatični, valovita ruba i jasne nervature smješteni u nasuprotim parovima (Slika 9, 10).



Slika 10. Uzgojni oblik kadulje (autor: Pero Grgić)

Vrlo medonosni cvjetovi dvousnati, najčešće ružičasto ljubičastih vjenčića i u pazušcima listova skupljeni u cvatove nalik na klas. Čaške su jasno dvousnate i često tamnije ružičasto ljubičaste boje. Pricvjetni listovi su ovalni, dlakavi i žljezdasto istočkani.

Cvate od svibnja do srpnja. Plodovi su sitni tamnosmeđi oraščići, dugi 2 - 4 mm (Kovačić i sur., 2008).

2.2.4.1. Stanište, ekologija i rasprostranjenost

Kadulja je biljka našeg primorja i krša. Raste uz čitavu jadransku obalu, na kamenjaru i oskudnom tlu. Mjestimično zalazi i duboko u unutrašnjost. U kulturi je rasprostranjena i po mnogim drugim zemljama izvan sredozemnog područja (Grlić, 2005). Biljka punog svijetla, tipični element sredozemnih travnjaka i pašnjaka, sve do mediteransko-montanog pojasa. Podnosi velike temperaturne razlike, niske zimske temperature i malu vlažnost zraka (Kovačić i sur., 2008). Kadulja je termofilna biljka, stoga visoke temperature pogoduju rastu i nagomilavanju eteričnog ulja (Šilješ i sur., 1991). Nadalje, kadulja dobro podnosi sušu, međutim, mlade biljke uzgojene generativnim putem (sjemenom) za početni rast zahtijevaju prilično vlage. Kadulja se preventivno može zagrnuti nakon duge košnje. Nije osjetljiva na kvalitetu tla, ali ne odgovaraju joj ni lagana, pjeskovita niti hladna i vlažna glinena tla. Najbolje će rezultate postići na toplim humusnim tlima s dobrim vodozračnim režimom (Slika 11).



Slika 11. Nasad kadulje u grmolikom obliku (autor: Pero Grgić)

Kadulja se stoljećima uzgaja u vrtovima, stoga se danas može pronaći na svim kontinentima, ponegdje i udomaćena. Kadulja samoniklo raste na suhim, kamenitim tlima i priobalju. Nije pretjerano osjetljiva na mraz. Kadulja se uzgaja najviše u Mađarskoj,

Francuskoj i Njemačkoj, dok kao samonikla najviše raste na području Sredozemlja. Prema Slici 12. vidljivo je da je najrasprostranjenija duž sjevernog Jadrana (otoci Krk i Cres), srednjeg i južnog Jadrana, do planine Biokovo na jugu (Trinajstić, 1992; Galle, 2001; Web 2), unutrašnjosti krškog područja (Velebit, Veliko Rujno i do 1000 m nadmorske visine) (Kuštrak, 2005) te bližeg kontinentalnog područja, uključujući dijelove Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije (Ristić i sur., 1999).



Slika 12. Rasprostranjenost kadulje u Republici Hrvatskoj (Web 2.)

Kadulja ima i ukrasnu vrijednost te se često sadi u vrtovima zbog mirisa, privlačnih listova i cvjetova. Nije zahtjevna biljka i lako se uzgaja i njeguje. Izvrsno podnosi sušu te se smatra pioninom vegetacije u pošumljavanju i vezivanju krša i sprječavanju erozije (Židovec, 2006; Greguraš, 2013). Prema Gregurašu (2013) pčelari su prvi koji su primijetili njezino nestajanje u nekim dijelovima Dalmacije što predstavlja jednu od prijetnji koje bi mogle utjecati na populaciju kadulje uslijed nekontroliranog branja, ali i napuštanja ispaše koza i ovaca koje zamjenjuju garig i makiju.

Najveći dio površine otoka Paga čine kamenjarski pašnjaci primorskog brdena i kršina (*Asphodelo – Chrysopogonetum typicum*) na čijoj se bioprodukciji temelji pašno ovčarstvo otoka te kamenjar kovilja i ljekovite kadulje. Šimić (1980) navodi kako je kadulja je izrazito medonosna biljka te da je poslije bagrema najvrjednija biljka za pčele. Znatne količine ove aromatične i začinske biljke se izvoze u SAD, gdje se koristi kao začim za mesne konzerve (Grlić, 2005).

2.3. HIDROLATI I ETERIČNA ULJA

U klasične metode izolacije eteričnih ulja svrstavane su hidrodestilacija, parna hidrodestilacija, hidrodifuzija, direktna parna destilacija, ekstrakcija organskim otapalima (Soxhlet ekstrakcija), te hladno prešanje. U modernije, inovativne metode svrstavane su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta hladnom atmosferskom plazmom, mikrovalna hidrofuzija i gravitacija te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Handa, 2008; Sadgrove i Jones, 2015). Najčešće je upotrebljavana vodena destilacija od navedenih metoda izolacija eteričnog ulja (Turek i Stintzing, 2013), posebno za biljke koje sadrže visok udio osjetljivih spojeva. Proces destilacije vodenom parom u osnovi uključuje prolazak vodene pare kroz biljni materijal, što uzrokuje oslobađanje eteričnih ulja iz biljaka. Zatim se smjesa vodene pare i eteričnih ulja kondenzira, a zbog razlika u njihovim talištima, eterična ulja se odvajaju od vode.

Hidrolati, često nazivani i hidrosoli, hidroflorati, biljni aromatični otpadi, aromatične vode, cvjetne vodice i esencijalne aromatične vode, nusprodukti su destilacije biljnog materijala pri proizvodnji eteričnih ulja. Hidrolati su kiselkaste tekućine (pH vrijednosti od 4,5 do 5,5) s ugodnim do neugodnim i od sličnog do različitog mirisa u odnosu na eterično ulje (Aćimović i sur., 2020).

Hidrolati su se dugo vremena definirali kao otpadni proizvodi vodene destilacije sve dok se nije istražila njihova važnost analizirajući njihovu antimikrobnu i antifungalnu sposobnost. Sadrže promjenjivu količinu eteričnog ulja (obično manju od 1 g/L) i hlapljive, u vodi topljive, sekundarne metabolite (D'Amato i sur., 2018). Kvaliteta hidrolata može se razlikovati ovisno o postupku destilacije i izvoru biljnih materijala.

Hidrolati nastaju tijekom ekstrakcije eteričnih ulja iz aromatičnih biljaka, sastoje se od kondenzirane vode u procesu destilacije i od polarnih, hidrofilnih, hlapljivih komponenata ulja koje tvore vodikove veze s vodom. Tijekom postupka destilacije, destilat se razdvaja u polarnu ili hidrofilnu fazu (hidrolat) i nepolarnu hidrofobnu fazu (eterično ulje) tako da polarnost velikim dijelom određuje u kojoj mjeri će se pojedini spojevi distribuirati u određenu fazu. Neki su spojevi prisutni u oba proizvoda, ali u različitim koncentracijama, a neki se mogu pronaći samo u hidrolatu ili eteričnom ulju.

Hidrolati obično sadrže manje od 0,10% vodom topivih aromatičnih spojeva (tj. hlapljivih organskih spojeva) iz eteričnog ulja, koji ostaju otopljeni u vodenoj fazi. Aćimović i sur. (2020) su dobili vrlo aromatične hidrolate koji su sadržavali 0,17 % aromatičnih

spojeva preostalih nakon vodene frakcije, a njihov sastav se prilično razlikovao od sastava eteričnog ulja.

Eterična su ulja, prema definiciji ISO (*International Standards Organization*), uljasti proizvodi intenzivnog mirisa koji se dobivaju destilacijom vodenom parom iz biljaka ili dijelova biljaka ili prešanjem iz kore voća iz porodice citrusa. Vrlo su rasprostranjena u biljnom svijetu i nalaze se u svakoj biljci koja ima izrazito mirisne dijelove. Poznato je približno 3000 različitih eteričnih ulja, od koji samo oko 150 ima praktičnu vrijednost i primjenu (Šilješ i sur., 1991).

Prema kemijskoj definiciji eterična ulja su hlapljive aromatske hidrofobne tekućine dobivene iz biljnih dijelova kao što su kora, cvjetovi, plodovi, listovi i sl. (Nazzaro i sur., 2017; Šilješ i sur., 1991). Mnoga istraživanja potvrđuju antibakterijsko, antivirusno, antifungalno te insekticidno djelovanje eteričnih ulja zbog velikog broja sekundarnih metabolita (monoterpena, seskviterpena te njihovih derivata (Palfi i sur., 2018; Bajalan i sur., 2017; Baratta, 1998a i b; Basak i Guha, 2018; Bhavaniramya i sur., 2019; Borges i sur., 2019; Bozin i sur., 2007; Kanat i Alma, 2004).

Svim eteričnim uljima svojstvena je snažna hlapljivost. Pri hlapljenju se razvija intenzivan, za brojne vrste specifičan miris. Gotovo sva eterična ulja lakša su od vode, pa plivaju na površini. Tako su i dobila naziv „ulja“, iako nemaju ništa zajedničkog s masnim uljima. Pri određivanju njihove čistoće i moguće je izvesti vrlo jednostavan pokus. Na papir se nanese kapljica pravog ulja i kapljica eteričnog ulja. U početku obje tvari pokazuju svima dobro poznatu masnu mrlju, koja kod eteričnih ulja nestane za najviše 24 sata, a kod masti se raširi i ostaje trajno. Eterična su ulja većinom bezbojna ili blago žućkasta (Galle, 2001).

Eterična ulja se u vodi slabo ili uopće ne otapaju. Imaju snažan, više ili manje osobit i najčešće ugodan miris. U biljci nastaju eterična ulja u posebnim uljnim žlijezdama, uljnim stanicama ili žljezdastim dlakama na površini biljke. Eterično ulje pojedine biljke je smjesa više različitih spojeva, točnije mješavina zasićenih i nezasićenih derivata ugljikovodika, poput alkohola, fenola, estera, aldehida i terpena (Butnariu i Sarac, 2018).

Eterična se ulja mogu nalaziti u svim organima biljke, ali njihova koncentracija i sastav variraju između različitih dijelova. Kemijski sastav eteričnih ulja ovisi o više čimbenika, uključujući dob biljke, dio biljke koji se koristi, razvojnu fazu, uvjete rasta te vrijeme berbe. Kemijski sastav i količina eteričnog ulja iste biljke mogu varirati i ovisno o

različitim klimatsko-pedološkim uvjetima područja na kojima se uzgaja, kao i sezonskim promjenama (Burčul, 2014).

Eterična ulja imaju različita djelovanja, uključujući antioksidacijsko, antibakterijsko, antivirusno, antimikotičko, protuupalno i antitumorsko djelovanje, pri čemu se najviše istražuju zbog antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja. Među glavnim komponentama eteričnih ulja s farmakološkim djelovanjem su 1,8-cineol, kamfor i α -pinen (Borges i sur., 2019). Eterična ulja s visokim udjelom fenolnih komponenti, kao što su karvakrol, eugenol i timol, mogu ostvariti najbolji antibakterijski učinak na patogene u hrani (Burt, 2004). Najznačajnije komponente eteričnih ulja odgovorne za antimikrobnu aktivnost su: karvakrol, timol, eugenol, *p*-cimen, karvon, cimetaldehid, terpinen i kapsaicin (Hengl i sur., 2011).

Hrvatska raspolaže povoljnim prirodnim resursima i klimatskim uvjetima za uzgoj aromatičnog i ljekovitog bilja te proizvodnju eteričnih ulja. Postojeća autohtona flora omogućuje sakupljanje sirovina iz prirode što pruža dobar temelj za razvoj prerađivačke industrije fokusirane na destilaciju eteričnih ulja. Neki od potencijalnih proizvoda su eterična ulja lavande, vriska, lovora, kadulje, matičnjaka koja imaju primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Uz odgovarajuće marketinške aktivnosti ta ulja mogu postati prepoznatljiv izvozni brend Hrvatske.

2.4. KEMIJSKI SASTAV I ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV ETERIČNIH ULJA: SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE

2.4.1. Eterično ulje smilja

Brojni su autori istraživali kemijski sastav eteričnog ulja smilja u Hrvatskoj (Blažeković i sur., 1995; Mastelić i sur., 2005; Čavar Zeljković i sur., 2015). Istraživan je kemijski sastav eteričnog ulja smilja na području Općine Dugopolje u različitim fazama razvoja biljke (Politeo, 2003). Metodom plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) provedene su analize eteričnog ulja, izoliranog iz svježeg biljnog materijala tijekom različitih vegetacijskih perioda razvoja biljke. Identificirano je ukupno 67 spojeva, koji spadaju u monoterpenke (C_{10}), seskviterpenke (C_{15}) i neterpenke spojeve, odnosno njihove ugljikovodike, alkohole, estere, karboksilne kiseline, karbonilne spojeve i okside (Politeo, 2003). Monoterpen α -pinen i ester neril-acetat, čine većinu sastava eteričnog ulja smilja, dok su među zastupljenijima još prisutni α -cedren, kariofilen, limonen i nerol.

Utvrđeno je da je α -pinen dominantna komponenta ulja u vrijeme najintenzivnijeg razvoja biljke neposredno nakon cvatnje, a neril-acetat je dominantna komponenta ulja u vrijeme pune cvatnje biljke i u jesen. Fenoli su zastupljeni u malim količinama. Karvakrol je identificiran s 0,62 %, eugenol s 0,36 %, a 3-izopropil fenol s 0,30 % udjela. Blažeković i suradnici (1995) su istraživali varijacije u sastavu i sadržaju eteričnih ulja izoliranih iz biljaka *H. italicum* sakupljenih na različitim lokacijama i u različitim vegetativnim fazama razvoja. U ranoj fazi razvoja biljke u ulju su prevladavali monoterpeni α - pinen (do 28,9 %), neril-acetat (do 9,0 %) i nerol (do 2,0 %). Najmanji sadržaj α -pinena je u vrijeme cvatnje (4,2 %) i neposredno nakon cvatnje, sukladno rezultatima istraživanja Politeo (2003), a najviši sadržaj utvrđen je u vrijeme pojave prvih mladica. Približavanjem vremena cvatnje povećavao se sadržaj seskviterpenskih spojeva, od kojih su najzastupljeniji α -cedren (do 16,67 %), italicen (do 10,42 %), α -kurkumen (do 28,06 %) i γ -kurkumen (do 16,65 %). Među seskviterpenima, posebno se ističe γ -kurkumen kao zanimljiv spoj u smilju (Škunca, 2018) zbog protuupalnog (Aćimović i sur., 2020), antikancerogenog (Gismondi i sur., 2020), antimikrobnog (Djihane i sur., 2017) i antioksidacijskog djelovanja (Erbaš i sur., 2023). Udio eteričnog ulja u cvjetnim glavicama vrlo je nizak, ima svega 0,075-0,2 %, ali ima vrlo bogat sastav. U njemu dominiraju neril-acetat i nerol. Posebno su cijenjeni kemotipovi smilja koji sadrže spojeve italidone (Glavaš, 2019). Italidioni djeluju protuupalno i štite kožu od onečišćenja i UV zračenja (Combes i sur., 2017).

Eterična ulja smilja iz Republike Hrvatske, sličnog su sastava kao iz Italije (Bianchini i sur., 2001; Ninčević i sur., 2019). Blažeković i sur. (1995) su proučavali sastav eteričnog ulja smilja u devet prirodnih populacija iz Hrvatske, a glavni spojevi su bili: α -pinen, neril-acetat, α -cedren, nerol, α -kurkumen, γ -kurkumen i geranil-acetat (Tablica 7.). Rezultati su pokazali sličnost u kvalitativnom sastavu ulja u svih devet populacija, a različitost u količini pojedinih komponenti.

Tablica 7. Glavne sastavnice eteričnog ulja vrste *H. italicum* s različitih područja Hrvatske (preuzeto i prilagođeno prema Bilandžija i sur., 2023)

Lokalitet	Metoda	Sadržaj eteričnog ulja (%)	Glavne sastavnice	Literatura
Različite lokacije duž Jadranske obale	GC-FID GC-MS	0,08-0,32	α -pinen, α -terpineol, neril-acetat, α -cedren, italicen, α -kurkumen, γ -kurkumen, spatulenol	Blažeković i sur., 1995.

Područje Splita	GC-MS	0,12	α -pinen, α -cedren, aromadendren, β -kariofilen, neril-acetat, geranil-acetat	Mastelić i sur., 2005.
Područje Zadra, Šibenika i Knina	GC-MS	0,020	α -pinen, γ -kurkumen, neril-acetat, β -selinen, izotalicen, β -kariofilen, α -kurkumen	Staver i sur., 2018.
Područje Brača, Biokova, Tjarice i Makarske	GC-MS	0,02-0,12	neril-acetat, α -trans-bergamoten, α -humulen, β -akoradien, α -kurkumen, rosifoliol	Ćavar Zeljković i sur., 2015.

Nadalje, u provedenim istraživanjima ispitan je utjecaj nadmorske visine i klimatskih čimbenika poput temperature, oborina, izloženosti suncu (Ćavar Zeljković i sur., 2015; Melito i sur., 2016) te utjecaj staništa i vrste tla na kojem biljka raste na sastav i količinu eteričnog ulja *H. italicum* (Leonardi i sur., 2013). Prilagodba na različite okolišne čimbenike osim što uzrokuje raznolikost morfoloških, kemijskih i genetskih karakteristika vrste *H. italicum*, također utječe i na kvalitativne i kvantitativne značajke eteričnog ulja (Melito i sur., 2016; Bilandžija i sur., 2023). Ćavar Zeljković i sur. (2015) su analizirali su uzorke eteričnog ulja *H. italicum* s različitih lokacija (Brač, Biokovo, Tjarica, okolica Makarske) na Jadranskoj obali te je utvrđeno da su uzorci sličnog sastava, uz prisutne značajne razlike u postotnom sadržaju pojedinih komponenti. Tako je postotak oksigeniranih monoterpena i seskviterpena bio veći u uzorcima s Biokova i iz okolice Makarske, čime je utvrđeno da je razina oksigeniranih monoterpena i seskviterpena u eteričnom ulju veća na višim nadmorskim visinama (uzorak s Biokova) i pri većoj izloženosti suncu (uzorak iz okolice Makarske). Za razliku od oksigeniranih komponenti, razina monoterpenskih ugljikovodika pokazala je suprotan trend.

Eterično ulje *H. italicum* sintetizira se i odlaže egzogeno, u žljezdanim dlakama koje su prisutne na površini cvjetova (latice, lapovi) i listova (pricvjetni i listovi stabljike) (Rodrigues i sur., 2015; Bilandžija i sur., 2023). Pored eteričnog ulja kao nusprodukt destilacije smilja vodenom parom nastaje i cvjetna vodica ili hidrolat, koji također ima visokovrijedna terapijska svojstva. Međutim, moguće ga je samo 3-6 mjeseci skladištiti i čuvati na hladnom i tamnom mjestu zbog mikrobiološke netabilnosti (Rajić i sur., 2015).

Smilje posjeduje spojeve insekticidnih i repelentnih svojstava. Obzirom da komarci prenose razne epidemijske bolesti i dalje se istražuju eterična ulja i ekstrakti koji su manje štetni za ljude i okoliš, a mogu zamijeniti sintetičke insekticide i repelente. Eterično ulje izolirano iz lišća *H. italicum*, s otoka Elba, uzrokuje smrtnost komaraca *Aedes albopictus* pri koncentraciji od 300 ppm sa smrtnošću u rasponu od 98,30% do 100% (Conti i sur. 2010). Nadalje, Drapeau i sur. (2009) testirali su repelentni potencijal protiv komarca *Aedes aegypti*, dok su Benelli i sur. (2014) dokazali larvicidni učinak eteričnog ulja *H. italicum* na istog. Rezultati su pokazali kako se eterično ulje može smatrati sekundarnim čimbenikom za proširenje zaštite jačih repelentnih molekula. Benelli i sur. 2018; u svojim istraživanjima su dokazali insekticidnu repelentnu aktivnost eteričnog ulja smilja protiv *Culex quinquefasciatus*, *Sitophilus zeamais* i *Musca domestica*.

2.4.2. Eterično ulje lovora

Macut (2019) navodi kako je lovor bogat fenolnim spojevima, najviše flavonoidima i fenolnim kiselinama, a najznačajniji izolat lovorovog lista je eterično ulje. Eterično se ulje dobiva ekstrakcijom iz lista lovora, odnosno vodenom destilacijom listova. Nadalje, pripisuju mu se snažna antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Osušeni listovi lovora u prosjeku daju 1-3 % eteričnog ulja. Razlike u kemijskom sastavu ulja uvjetovane su pedološkim i klimatskim čimbenicima.

Sastav ulja lovora čine cineol do 50 %, terpeni, seskviterpeni, metil-eugenol, eugenol, eugenol-acetat, terpineol, geraniol i linalol. Miris je težak i začinski, sličan cineolu, a okus gorak (Šilješ i sur., 1991). Eterično ulje uglavnom sadrži monoterpene (91,8 %) i manje seskviterpene (1,4 %). Glavni sastojci su 1,8-cineol (22,8 - 42,3 %), α -terpineol-acetat (11,2-11,4 %), linalol (7,4-12,5 %), metil-eugenol, sabinen i linalol. Ukupno je identificirano 155 spojeva, uključujući monoterpene, seskviterpene, fenilpropanoide i druge spojeve poput tanina i gorkih tvari (Macchioni i sur., 2006).

U plodovima ima do 1 % eteričnog i oko 30 % masnog ulja s palmitinskom, oleinskom, laurinskom i linolnom kiselinom. Tiještenjem plodova ili iskuhavanjem s vodom izdvaja se smjesa ulja. Osim toga, u plodovima ima laurina, miristicina, škroba, šećera, smole, fitosterola, miricilnog alkohola (triantan-1-ol) i drugih tvari (Glavaš, 2019).

Analizom tuniskog ulja identificirana su dva glavna spoja: 1,8-cineol (42,3 %) i α -terpineol acetat (11,2 %), od ukupno 24 sastojka (Bouzouita i sur., 2001). Usporedbom ekstrakata dobivenih superkritičnom ekstrakcijom i eteričnih ulja nije utvrđena značajna razlika u sastavu. Glavni spojevi bili su 1,8-cineol, linalol, α -terpineol-acetat i metil-eugenol

(Caredda i sur., 2002). Novoidentificirani spoj u ulju listova je δ -terpineol (Braun i sur., 2001). U listovima, pupoljcima, cvjetovima i plodovima dominira 1,8-cineol, uz α -terpineol-acetat, sabinen, α - i β -pinen, β -elemen, α -terpineol, linalol i eugenol (Kilic i sur., 2004).

2.4.3. Eterično ulje kadulje

Kuštrak (2005) navodi kako se najveći udio eteričnog ulja nalazi se u listu kadulje, a sadržaj ulja je uvjetovan geografskim podrijetlom i ovisi o mjesecu branja kadulje, sa manjim udjelom eteričnog ulja u cvijetu, a najmanjim u stabljici kadulje.

U literaturi se spominju dva kaduljina ulja: obično (*Aetheroleum salviae*) i muškato (*Aeuheroleum salviae sclareae*). Kaduljino ulje iz biljke *Salvia officinalis* L. dobiva se iskorištenjem 1,3-2,5 %. Sastav ulja: tujon (do 50 %), dipenten α -borneol, *p*-cimen, 1,8-cineol, (+)-kamfor, (+) i (-)-pinen, salven, dipenten, seskviterpeni, linalol. Sastav tog ulja uvelike se razlikuje ovisno o kraju gdje biljka raste. Primjerice, španjolska kadulja uopće ne sadrži tujon, dalmatinska kadulja sadrži oko 50% tujona, dok grčka kadulja ima samo do 5 % tujona, ali zato ima izrazito visok sadržaj 1,8-cineola (do 66 %). Ulje ima jak, karakterističan miris na kamfor (Šilješ i sur., 1991). *Aetheroleum salviae*: eterično ulje dobiva se vodenom destilacijom mladih, još zelenih grančica i listova, neposredno prije cvatnje biljke, i gotovo je bezbojno (Galle, 2001). Ostale sastojke čine diterpenska gorka tvar karnozol (pikrosalvin) i srodna negorka karnozolna kiselina, zajedno s triterpenskim kiselinama poput urosolne i oleanolne kiseline te triterpenom germanikolom. Ovi spojevi su predmet istraživanja u području fitoterapije i prirodne medicine te se proučavaju zbog svojih potencijalnih terapijskih primjena.

Prisutni su i flavoni i njihovi glikozidi, npr. salvigenin (1-3 %) i tanini kao što je ružmarinska kiselina (3-8 %) (Galle, 2001). Listovi sadrže 1 do 2,5 % eterično ulja koje sadrži α - i β - tujon, 1,8- cineol, borneol, kamfor, kariofilen, kondenzirane i hidrolizirajuće tanine (3 do 8%), diterpenske gorke tvari (karnozol, 12- metileter deoksikarnozol, rozmanol i 7- metileter rozmanol), fenolne kiseline (ružmarinsku, kavenu, klorogenu i ferulnu). Ružmarinska kiselina je antioksidans i djeluje protuupalno, dok tanini djeluju adstringentno. Eterično ulje kadulje je bistra, žućkasta do zelenožućkasta, lako hlapljiva tekućina, karakteristična mirisa i okusa, koja najčešće uzrokuje osjećaj pečenja na jeziku. Štiti biljku od hladnoće i vrućine, a svojim mirisom privlači insekte i tjera biljojede. Glavni sastojci su lakohlapljivi monoterpeni: α - i β -tujon, 1,8-cineol, (+)-kamfor, borneol i bornil-

acetat, te seskviterpeni: humulen, (-)-kariofilen i viridiflorol. Nadalje, osim terpena, u mješavinama se nalaze i fenolni spojevi, fenilpropani i spojevi sa sumporom (Kuštrak, 2005).

2.4.4. Eterično ulje ružmarina

Oduvijek se koriste listovi ružmarina i iz njih dobiveno eterično ulje, koje sadrži tvar vrlo sličnu kamforu iz kamforovca (*Cinamomum camphora*) pa se naziva ružmarinov kamfor (Kovačić i sur., 2008). Na kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina najviše utječe geografski položaj, niže temperature tijekom zimskih mjeseci, srednja mjesečna temperatura i godišnji, odnosno mjesečni raspon temperature. Prema rezultatima istraživanja, koncentracija kamfora se povećavala u hladnijim uvjetima u odnosu na koncentraciju 1,8-cineola i obrnuto (Lakušić i sur., 2012).

Eterično ulje *Aetheroleum rosmarini* dobiva se vodenom destilacijom iz cijele biljke. Svijetložuto ulje ugodna je mirisa i blago gorka okusa. Listovi sadrže 1,5-2,5 % eteričnog ulja. Glavni su sastojci ulja (+)- α -pinen (do 37%), 1,8- cineol (do 30 %), (+) verbenon (do 17 %), borneol (do 7 %), (-)-kamfor (do 7%) i racemični limonen (do 4 %). U listovima se također nalazi mnogo ružmarinske kiseline, zatim su utvrđeni diterpenska karnozolna kiselina, triterpenske kiseline (ursolna i oleanonska), flavonoidi (luteolin, genkvanin, diosmetin) i njihovi glikozidi, alkaloidi (betulin i amarine) i flavoni (apigenin, luteolin, genkvanin) (Galle, 2001; Glavaš, 1999).

U eteričnom ulju ružmarina prisutni su: monoterpeni s kisikom (49,36 %), monoterpenski ugljikovodici (3,3 %), oksigenirani seskviterpeni (37,36 %), seskviterpenski ugljikovodici (1,88 %) te fenilpropanski derivati (0,02 %) (Miljanović i sur., 2020). Eterično ulje ružmarina u svom kemijskom sastavu sadrži: u najvećem udjelu borneol (18,11 %), manol (13,47 %), berbenon (13,24 %), kamfor (12,77 %), 1,8-cineol (4,55 %) i linalol (4,02 %).

Ozcan i Chalchat (2008) navode da eterično ulje ružmarina sadrži 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, kamfor, linalol, limonen, borneol, mircen, terpineol i kariofilen. Kokkini i sur., 2003. navode kako su glavni sastojci eteričnog ulja ružmarina α -pinen, 1,8-cineol, kamfor i borneol. Ulja smanjene količine α -pinena i kamfora i povećane količine 1,8-cineola i borneola su bolje kvalitete (Kokini i sur., 2003).

2.5. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST I PRIMJENA ETERIČNIH ULJA U PREVENCIJI BAKTERIJSKOG ZAGAĐENJA HRANE

Antibakterijsko djelovanje je važna komponenta koja se ispituje kod biljaka u novijim istraživanjima (Klančnik i sur., 2010; Craft i sur., 2017; Al-Abri i sur., 2022; Pintore i sur., 2002; Ed-Dra i sur., 2021; Bhavaniramy i sur., 2019). Prirodni proizvodi, ekstrakti dobiveni iz biljaka u današnje vrijeme predstavljaju neograničen izvor za razvoj i proizvodnju pripravaka i lijekova različitih kemijskih sastava. Postoji nekoliko metoda koje se koriste u određivanju antibakterijskih svojstava biljnih ekstrakata, a najčešće korištene metode su:

- metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)
- metoda razrjeđivanja agara (eng. *Agar dilution*) i
- disk difuzijska analiza (eng. *Disk diffusion*).

2.5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije

Razina antibakterijske aktivnosti koja inhibira rast bakterije određuje se *in vitro* testiranjem aktivnosti standardizirane koncentracije bakterija u serijskim razrjeđenjima. Najniža koncentracija ekstrakta koja inhibira rast bakterija naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Metoda minimalne inhibitorne koncentracije pripada dilucijskim metodama te se može izvoditi na tekućoj ili krutoj podlozi.

Biljni ekstrakt se serijski razrijedi hranjivim bujonom (tekućom hranjivom podlogom) gdje se zatim inokulira ispitivani soj bakterije. Inkubacija traje od 18 do 24 sata na 35-37 °C nakon čega se prati zamućenje (bujona) ili porast kolonija što označava prisutnost bakterija. MIC se izražava u mg/L ili g/ml (Bedenić, 2009). Uz MIC još se pojavljuje termin minimalna baktericidna koncentracija (MBC) koja označava najnižu koncentraciju ekstrakta koji usmrćuje sve mikroorganizme na podlozi (Pramila i sur., 2011).

Iako se MIC i MBC koriste kao popularne metode za otkrivanje antibakterijske aktivnosti i one imaju neke nedostatke kao nemogućnost otkrivanja postantibiotskog efekta za koji se kasnije koriste farmakokinetička i farmakodinamička modeliranja (Kiem i Schentag, 2006).

2.5.2. Bakterije i njihove karakteristike

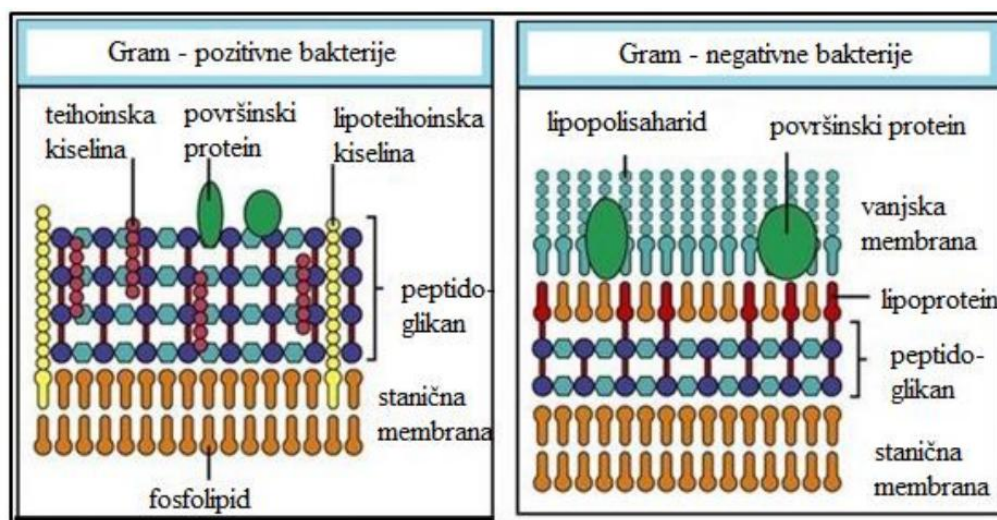
Bakterije su jednostanični, mikroskopom vidljivi organizmi za koje se kaže da su najbrojniji na zemaljskoj kugli. Iako su bile poznate još od kraja 17 stoljeća, tek početkom 19. stoljeća dobivaju svoj današnji naziv od grčke riječi *bakterion* što u prijevodu znači štapić ili palica. Veličina im se kreće od 0.3 do 20 μm . Mogu biti kuglaste, štapičaste, zavojite ili „L“ oblika (različitih oblika) (Marinculić i sur., 2009). Većina ih je tako malena da se u vidnome polju svjetlosnog mikroskopa mogu promatrati samo pod najvećim povećanjem. Bakterije su prokariotski organizmi, nemaju staničnu jezgru i nemaju unutarstanične strukture omeđene membranom. Umjesto stanične jezgre, bakterije sadrže nukleoid, genetički materijal bakterije, obično u obliku kružne molekule DNA. Ova struktura nije omeđena membranom kao što je jezgra u eukariotskim stanicama. Također, bakterije nemaju organele poput mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma, koji su prisutni u eukariotskim stanicama. Bakterijske stanice sadrže različite strukture kao što su ribosomi, stanična stijenka, flagela i plazmide, ali su te strukture manje složene i raznolike u usporedbi s eukariotskim stanicama (Zhou i Li, 2015). Mnoge bakterije apsorbiraju nutrijente iz svoga okoliša, koristeći različite mehanizme poput difuzije, aktivnog transporta ili endocitoze. Međutim, neke imaju sposobnost stvaranja vlastitih nutrijenata putem procesa fotosinteze ili drugih sintetičkih procesa, poput kemolitotrofije ili kemoheterotrofije. Što se tiče pokretljivosti, neke bakterije su nepokretne i nalaze se pričvršćene za površine, dok su druge sposobne za aktivno kretanje koristeći flagele ili druge strukture poput pilusa. Bakterije su naširoko rasprostranjene u prirodi, gotovo svim okruženjima na Zemlji, uključujući vodene ekosustave, tla, zraka te unutar drugih organizama kao što su biljke i životinje (Jurtschuk, 1996). One imaju ključnu ulogu u razgradnji organske tvari, ciklusu hranjivih tvari te u održavanju ekološke ravnoteže. Iako mnoge bakterije imaju korisne i neophodne uloge u prirodi, određene vrste bakterija mogu biti patogene i uzrokovati bolesti kod biljaka, životinja i ljudi. Ove patogene bakterije mogu biti odgovorne za razne bolesti, od blagih infekcija do ozbiljnih zdravstvenih problema (Duraković i Redžepović, 2005).

Jedan od prvih koraka u identifikaciji bakterija jest složeno (diferencijalno) bojanje (Duraković i Redžepović, 2005). Metoda bojanja bakterija po Gramu, koju je razvio danski znanstvenik Hans Christian Gram 1884. godine, jedna je od najvažnijih tehnika u mikrobiologiji. Gramova tehnika bojanja dijeli bakterije u dvije velike skupine na temelju njihove reakcije na bojanje. Prema ovoj metodi, bakterije se mogu klasificirati kao gram-

pozitivne ili gram-negativne, ovisno o tome jesu li zadržale ili nisu zadržale boju nakon postupka bojanja. Gram-pozitivne bakterije zadržavaju boju i prikazuju se ljubičastim ili tamno plavim bojama pod mikroskopom, dok gram-negativne bakterije gube boju i prikazuju se crvenom ili ružičastom bojom nakon dodavanja kontraboje (obično sa saharinom).

Razlike između gram-pozitivnih i gram - negativnih bakterija uglavnom se očituju u sastavu i strukturi njihove stanične stijenke (Jawetz i sur., 2012). Gram-negativne bakterije i gram-pozitivne bakterije razlikuju se prema debljini peptidoglikanskog sloja (Brown i sur., 2015). Gram-pozitivne bakterije karakterizira deblji sloj peptidoglikana u njihovoj staničnoj stijenci, koji može činiti do 90% ukupne mase stijenke. Osim peptidoglikana, gram-pozitivne bakterije također mogu sadržavati dodatne komponente kao što su teihinske kiseline i lipoteihinske kiseline. S druge strane, gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana, koji kako navode Schleifer i Kandler (1972) obično čini manje od 10 % ukupne mase stanične stijenke. Uz peptidoglikan, stanična stijenka gram-negativnih bakterija sadrži i dodatne slojeve poput vanjske membrane, periplazme i lipopolisaharida.

Duraković (1991) navodi da je debljina peptidoglikanskog sloja kod gram-negativnih bakterija varijabilna, ovisno o rodu bakterija, ali je peptidoglikanski sloj kod gram-negativnih bakterija puno tanji od istoga kod gram-pozitivnih bakterija (Slika 13). Nadalje, gram-pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu koja sadrži lipopolisaharidni sloj i zbog toga njihove stijenke sadrže deblji sloj peptidoglikana koji ih štiti od negativnih okolišnih čimbenika.



Slika 13. Prikaz usporedbe stanične stijenke gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (preuzeto i prilagođeno prema Murphy i sur., 2008)

Gram-negativne i gram-pozitivne bakterije boje se različito jer su im stanične stijenke različite. Gram-pozitivne bakterije zadržavaju boju zbog debljeg sloja peptidoglikana, dok gram-negativne bakterije gube boju zbog vanjske membrane koja djeluje kao prepreka za zadržavanje boje. Gram-negativne i gram-pozitivne bakterije mogu uzrokovati različite vrste infekcija, te zahtijevaju različite vrste antibiotika. Osim toga, postoji sve veća zabrinutost zbog porasta otpornosti gram-negativnih bakterija na antibiotike, što otežava liječenje infekcija uzrokovanih ovim bakterijama. Otpornost bakterija na antibiotike može biti posljedica različitih faktora, uključujući prirodnu otpornost na određene antibiotike, mutacije u genima koji kodiraju za ciljeve antibiotika, kao i stjecanje gena otpornosti putem horizontalnog prijenosa između bakterija. Bakterije su izuzetno važne za ljude i igraju ključnu ulogu u različitim aspektima našeg života. Koriste se u industriji proizvodnje hrane, proizvodnje antibiotika, probiotika, lijekova, cjepiva, starter kultura za fermentaciju, insekticida, enzima, goriva i otapala (Cherednyk i Starkova, 2017; Fedorenko i sur. 2015; Raveendran i sur., 2018). Osim toga, bakterije su ključni igrači u mnogim ekološkim procesima, poput razgradnje organske tvari i fiksacije dušika, te imaju važnu ulogu u održavanju ravnoteže u okolišu. Mnoge su vrste bakterija, pa i fitopatogenih, raščlanjene na niže fiziološke „podvrste“ koje se morfološki ne razlikuju, a nazivaju se „soj“. Sojevi bakterija često se ne razlikuju morfološki, što znači da ih nije moguće razlikovati samo na temelju vanjskog izgleda. Umjesto toga, razlikuju se na temelju fizioloških, genetičkih ili biokemijskih karakteristika. Sojevi mogu imati različite karakteristike, uključujući otpornost na antibiotike, virulenciju ili sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima okoliša. Bakterije imaju sposobnost vrlo brze reprodukcije, često mnogo brže od gljiva. Ovo je zbog njihove jednostavne građe i bržeg metabolizma (Kišpatić, 1992). Brza reprodukcija omogućuje im da se brzo razmnožavaju i šire, što ih čini ključnim igračima u procesima poput razgradnje organske tvari, fermentacije i obnavljanja tla. Međutim, također može doprinijeti brzom širenju infekcija i bolesti u biljkama, životinjama i ljudima.

Kako bi se bakterije uspješno razmnožavale u okolišu u kojem se nalaze (uključivši i hranu kao okoliš bakterija), one moraju imati na raspolaganju određene hranjive tvari, vodu, određeni stupanj kiselosti (pH) i prikladne atmosferske uvjete. Bakterija u okolini mora naći izvor niza čimbenika (ugljik, vodik, kisik, dušik, fosfor, elemente u tragovima) kako bi sintetizirala vlastite makromolekule (ugljikohidrate, lipide, proteine, nukleinske kiseline). Sintezom vlastitih makromolekula bakterije rastu i razmnožavaju se. Svim

bakterijama za rast i razmnažanje neophodna je voda, pa oduzimanje vode (isušenje) štetno djeluje na bakterije.

Svaka vrsta bakterija ima optimalni pH za rast, zatim maksimum aciditeta (najniži pH) i maksimum alkaliteta (najviši pH). Većini bakterijskih vrsta optimalan pH za rast iznosi oko 7.0 (neutralan) ± 1 jedinica. Većina patogenih bakterija podnosi promjenu pH i do ± 4 jedinice oko neutralnog pH. Ova sposobnost prilagodbe pH okoliša ključna je za preživljavanje patogenih bakterija u različitim tjelesnim fluidima domaćina ili u tlu, vodi ili drugim okolišnim uvjetima gdje pH može varirati.

Kao i svako živo biće, i bakterije imaju za svoj rast optimalnu temperaturu, zatim minimum i maksimum, unutar kojih postoje mogućnosti za rast bakterija. Bakterije koje se mogu naći u hrani uglavnom dobro rastu pri temperaturi oko 30 °C. Optimalna temperatura rasta ima manji raspon, s time da granica za minimalnu temperaturu rasta nije oštro definirana. Gornja granica ovisi o mogućnosti djelovanja staničnih enzima i samim tim je strogo definirana. Porastom temperature iznad optimalne brz je pad rasta bakterija (Marinculić i sur., 2009).

Kao izvor hrane većina bakterija rabi organske kemijske spojeve koji se u prirodi stvaraju od uginulih organizama, ili do hrane dolaze iz živog organizma na kojemu žive u jednoj od mnogobrojnih zajednica (parazitizam ili sinergizam, primjerice). Neke bakterije mogu same sintetizirati organske spojeve fotosintezom, a neke dolaze do hrane iz anorganskih izvora. Bakterije napadaju sve, svaki list koji padne s drveta, svaku uginulu životinju. Sve ono što nazivamo vrenjem, truljenjem i raspadanjem, djelo je bakterija. One u živoj prirodi održavaju vječni tijek kolanja tvari, one su motori razgradnje, a čovjek i životinje korisnici su toga procesa (Duraković i Redžepović, 2005).

2.5.3. Najčešće bakterije koje uzrokuju zagađenje hrane

Najčešće bakterije koje uzrokuju zagađenje hrane uključuju različite vrste mikroorganizama, od kojih su neki patogeni i mogu uzrokovati bolesti kod ljudi. Neke od najčešćih bakterija koje se povezuju s kontaminacijom hrane uključuju rod *Salmonella* spp., koje mogu uzrokovati salmonelozu, ozbiljnu bakterijsku infekciju koja se prenosi putem kontaminirane hrane, osobito mesnih proizvoda, jaja, mliječnih proizvoda i povrća. Kontaminacija hrane sojevima *Escherichia coli* često se povezuje s nedovoljno termički obrađenim mesom, nepasteriziranim mliječnim proizvodima i kontaminiranom vodom.

Staphylococcus aureus se često pronalazi kod hrane koja se priprema ili čuva na neprimjerenim temperaturama, poput mesnih proizvoda, mliječnih proizvoda i proizvoda od jaja. *Listeria monocytogenes* je bakterija koja može uzrokovati ozbiljne bolesti poput listerioze kod ljudi, posebno kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom, trudnica i starijih osoba. Kontaminirana hrana, poput sirovog mlijeka, nepasteriziranih sireva, pašteta i gotovih jela, može biti izvor infekcije. Osim navedenih, i druge bakterije mogu uzrokovati zagađenje hrane, poput *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* i drugih. Prevencija kontaminacije hrane i pravilno rukovanje hranom ključni su za sprječavanje bolesti povezanih s hranom.

Jedan od razloga zašto bakterije nisu uspjele razviti otpornost na eterična ulja jest taj što su ta ulja kompleksne smjese različitih biološki aktivnih kemijskih spojeva. Ti spojevi djeluju na bakterije putem različitih mehanizama što otežava bakterijama razvijanje otpornosti. Za razliku od nekih antibiotika ili konzervansa u hrani, koji imaju samo jedan mehanizam djelovanja, eterična ulja sadrže različite komponente koje mogu djelovati na bakterije na više načina. Na primjer, neki spojevi u eteričnim uljima mogu oštetiti stanične membrane bakterija, poremetiti njihove metaboličke procese ili djelovati kao antimikrobni agensi. Ovaj multifaktorski pristup otežava bakterijama razvijanje otpornosti na eterična ulja jer bi one morale razviti otpornost na više različitih mehanizama djelovanja istovremeno. Drugim riječima, razvoj otpornosti bakterija na eterična ulja zahtijeva istovremeni prijenos više gena, što je rijetko i teško ostvarivo, kako je istaknuto u radu (Aljaafari i sur., 2021). Ipak, važno je napomenuti da, iako je razvoj otpornosti na eterična ulja manje vjerojatan u usporedbi s nekim drugim antimikrobnim sredstvima, nije potpuno isključen. Stoga je važno koristiti eterična ulja s oprezom i razumijevanjem, te ih koristiti kao dio sveobuhvatnih strategija za kontrolu mikroorganizama.

Mehanizmi djelovanja eteričnih ulja su temeljeni na djelovanju biološki aktivnih komponenti na citoplazmatsku membranu i staničnu stijenkku bakterija. To može rezultirati povećanom propusnošću membrane, što dovodi do gubitka ionske ravnoteže, povećanja fluidnosti membrane i poremećaja u funkciji proteina u staničnoj membrani. Osim toga, djelovanje eteričnih ulja može dovesti do oštećenja stanične stijenke bakterija, što dodatno oslabljuje njihovu integritet i funkcionalnost. Poremećaji u staničnoj membrani i staničnoj stijenci mogu rezultirati inhibicijom vitalnih staničnih procesa poput staničnog disanja, sinteze proteina i ionskog transporta, što na kraju dovodi do smrti bakterijskih stanica (Reichling i sur., 2009). Ukratko, složenost djelovanja eteričnih ulja na bakterije putem više mehanizama, što otežava razvoj otpornosti bakterija na ta ulja.

2.5.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je jedan od najopasnijih oblika bakterije *Staphylococcus*, s kuglastim oblikom (lat. *cocci*), grupirane u nakupine nalik grozdovima (grč. *staphyle*). *S. aureus* je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija i tvori zlatnožute okrugle kolonije. *Staphylococcus aureus* je poznat po svojoj otpornosti na sušenje, toplinu i povećanu koncentraciju soli od 15 % (Taylor i Unakal 2024). Može se naći u različitim okolišima, uključujući kožu i sluznicu toplokrvnih životinja te u prirodnom okolišu poput tla, prašine, vode i zraka (Adams i Moss, 2008).

Ova bakterija može biti prisutna kao dio normalne mikroflore kod ljudi, posebno na koži i u nosnoj sluznici, gdje se može nalaziti u 20 do 50 % populacije. Međutim, u određenim uvjetima, *Staphylococcus aureus* može izazvati vrlo teške infekcije, uključujući kožne infekcije, upale pluća, infekcije krvi (sepsu) i infekcije rana (Budimir i sur., 2012). *Staphylococcus aureus* može biti izoliran i iz fecesa, što ukazuje na mogućnost širenja bakterije putem kontaminirane hrane ili vode. Stoga je važno obratiti pažnju na higijenu i pravilno rukovanje hranom kako bi se spriječila infekcija.

2.5.3.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je gram-pozitivna, štapićasta bakterija, koja se može naći u različitim okolišima, uključujući tlo, probavni trakt preživača i ljudi te morsku vodu (Härtig i Jahn, 2012). Proizvodi endospore koje joj omogućuju preživljavanje ekstremnih uvjeta okoline, poput visokih ili niskih temperatura, suše i kemijskih stresora. *B. subtilis* se često koristi kao modelni organizam u istraživanjima replikacije bakterijskih kromosoma i diferencijacije stanica zbog svoje prirodne mogućnosti preobrazbe i sposobnosti stvaranja endospora te obilja molekulsko-bioloških i genetičkih informacija koje posjeduje (Sueoka, 1997).

Nadalje, *B. subtilis* je izolirana iz morske vode i epifitne mikroflore i najproduktivniji je iz ovoga roda u proizvodnji antibiotika koji suzbijaju rast fitopatogenih mikroorganizama. Pri temperaturi tla oko 0 °C, stvara spore, kao i u alkalnim tlima (Đukić i sur., 2007).

Bacillus subtilis nije samo iznimno važan patogen, nego je i važan agens u kvarenju hrane. Budući da ima sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima okoline i proizvodnje

različitih bioloških spojeva, poput antibiotika, čini ga važnim organizmom za istraživanje sporulacije, germinacije spora i otpornosti spora. To je ključno za primjenu u različitim područjima, uključujući industriju, poljoprivredu i medicinu.

2.5.3.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli jedna je od bakterija koje zajednički obitavaju u probavnom sustavu sisavaca. Jedan je od najviše istraženih organizama u mikrobiologiji i često se koristi kao modelni organizam za različita istraživanja. *E. coli* je gram-negativna štapičasta bakterija koja se može kretati pomoću trepetljiki, a njen metabolizam je fakultativno anaeroban, što znači da može rasti i u prisutnosti kisika i bez njega. Kolonizacija ljudskog probavnog trakta ovom bakterijom obično se događa unutar 40 sati po rođenju, kada se *E. coli* veže za sloj sluzi koji oblaže crijevnu sluznicu (Hadžić i sur., 2021).

Iako se *E. coli* uobičajeno ne smatra patogenim mikroorganizmom, određeni sojevi mogu uzrokovati različite infekcije, uključujući infekcije mokraćnog sustava i probavnog sustava. Ovi sojevi mogu proizvoditi enterotoksine koji uzrokuju dijareju (Duraković i Redžepović, 2005), a mogući su i ozbiljniji oblici infekcija poput upale žuči, upale pluća, meningitisa kod novorođenčadi te teških oblika sepse.

E. coli se često koristi kao indikator fekalne kontaminacije u vodi i hrani jer je prisutna u crijevima sisavaca, uključujući ljude, te njena prisutnost može ukazivati na potencijalnu kontaminaciju fekalijama (Croxen i sur., 2013). Ova bakterija se može izolirati iz različitih izvora, uključujući stolicu novorođenčadi, što je prvi put opisao znanstvenik Theodor Escherich 1885. godine, a kompletni genom je sekvencioniran 1997. godine.

2.5.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas bakterije, uključujući *Pseudomonas aeruginosa*, prisutne su u mnogim okruženjima, posebno u tlu i vodi. Ovim bakterijama pogoduju vlažna okruženja, te se često mogu pronaći u različitim mjestima kao što su umivaonici, toaleti, neadekvatno klorirani bazeni i vruće kade, te zastarjele ili inaktivirane antiseptičke otopine (Bédard i sur., 2016). Ponekad se *Pseudomonas* mogu naći i na koži u pazusima i genitalnom području zdravih ljudi (Wilson i Pandey, 2024).

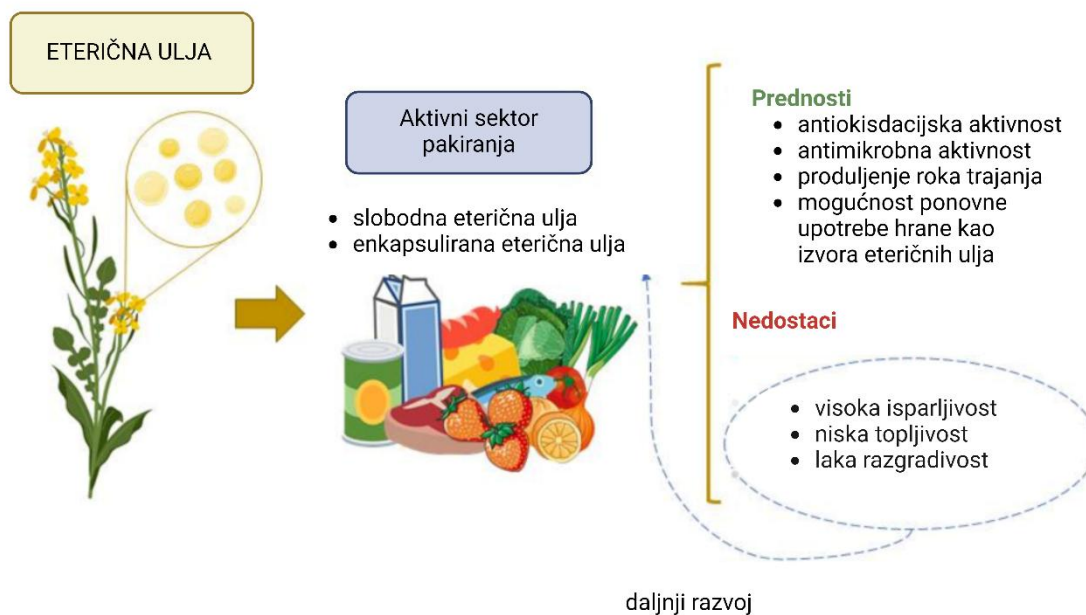
Pseudomonas aeruginosa glavni je gram-negativna, aerobna i široko je rasprostranjena u vodama okoliša. Oportunistički je patogen koji lako preživljava nepovoljne životne uvjete, uključujući nedostatak hranjivih tvari. Čest je uzrok infekcija mokraćnih putova te infekcija rana i upala (Duraković i Redžepović, 2005). S obzirom na potencijalnu opasnost, važeći pravilnici zahtijevaju odsutnost *Pseudomonas aeruginosa* u vodi za piće, gotovom proizvodu, kao niti u vodi za kupanje i rekreaciju (Kovačić, 2018). Ovo su mjere opreza koje se poduzimaju radi zaštite javnog zdravlja i sprječavanja mogućih infekcija uzrokovanih ovom bakterijom. *P. aeruginosa* odgovorna je za teške infekcije u bolnicama (nosokomijalne) i u zajednici, te je prisutna u kroničnim infekcijama pluća pacijenata s cističnom fibrozom. Virulentnost bakterije ovisi o mnogim čimbenicima koji su povezani s stanicama i izvanstaničnim čimbenicima, što omogućuje kolonizaciju domaćina, preživljavanje, invaziju i postojanje infekcija (Khalifa i sur. 2011).

2.6. UTJECAJ PRIRODNIH DODATAKA NA ODRŽIVOST PREHRAMBENIH PROIZVODA

Većina dopuštenih prehrambenih aditiva primjenjuje se zbog svojih svojstava konzerviranja, koja se pripisuju njihovoj priznatoj bioaktivnosti. Aditivi s antimikrobnim svojstvima mogu kontrolirati kvarenje hrane i/ili spriječiti kontaminaciju patogenima koji se prenose hranom, uključujući octenu, jabučnu, mliječnu, benzojevu, sorbinsku i propionsku kiselinu, kalijeve i kalcijeve acetate, ugljikov(IV) oksid, benzoate, sorbate, propionate, nitrite, nitrate. Najčešće korišteni aditivi koji sprječavaju tamnjenje hrane uzrokovano kemijskim ili enzimskim reakcijama su sulfiti. Iako su svi ti spojevi dopušteni za upotrebu u prehrambenoj industriji, trenutni trend je zamjena kemijski sintetiziranih spojeva prirodnim. U tom smislu, korištenje eteričnih ulja smatra se alternativom korištenju sintetskih aditiva (Ribeiro-Santos i sur., 2017).

U aktivnom pakiranju, materijali za pakiranje mogu sadržavati komponente s biološkim svojstvima namijenjenim polaganom otpuštanjem u hranu (Slika 14) (Ribeiro-Santos i sur., 2017). Antimikrobna svojstva eteričnih ulja zajedno s antioksidacijskom aktivnošću, analizirana su u nekoliko studija gdje je utvrđeno da su učinkoviti protiv širokog spektra patogena koji se prenose hranom.

Konkretno, antimikrobni učinci eteričnih ulja često su povezani s njihovim hidrofobnim/lipofilnim karakterom koji im omogućuje prodiranje kroz membrane i njihove slojeve (Hassoun i sur., 2020).



Slika 14. Strategije primjene eteričnih ulja u sektoru aktivne ambalaže za hranu: prednosti i nedostaci (preuzeto i prilagođeno prema Carpena i sur., 2021).

Jestivi ambalažni filmovi smatraju se dodatcima prehrani više nego sastojcima, jer ne pružaju značajnu nutritivnu vrijednost hrani koju oblažu. Utjecaj jestivih filmova i premaza na okus hrane tijekom konzumiranja jestivog pakiranog proizvoda trebao bi biti minimalan (Debeaufort i sur., 1998), stoga se izravno dodavanje eteričnih ulja u prehrambene proizvode ograničava. Eterična ulja imaju intenzivnu aromu koja može predstavljati problem kada intenzitet arome prelazi prihvatljivu razinu za potrošače (Hyldgaard i sur., 2012).

Međutim, dodavanjem odabranih organskih kiselina ili eteričnih ulja u jestive filmove i premaze moguće je kontrolirati rast bakterija. Eterična ulja se mogu nanijeti na jestivi film ili inkapsulirati u jestive i biorazgradive polimere ili vrećice. Također, moguće je inkapsulirati eterična ulja u nanoemulziju kako bi se spriječila interakcija eteričnih ulja s hranjivim matricama.

Ugrađivanje antibakterijskih, antifungalnih i antioksidacijskih aktivnih komponenti u prehrambene proizvode može dovesti do promjena u fizičko-kemijskim svojstvima proizvoda (Hyldgaard i sur., 2012). Dodavanje aktivnih komponenti može utjecati na teksturu proizvoda, čineći ga mekšim, tvrdim, pjenastim ili drugačijim u konzistenciji. Neke aktivne komponente mogu utjecati na boju proizvoda, što može rezultirati promjenama u njegovom izgledu. Eterična ulja mogu značajno promijeniti okus i aromu

proizvoda. To može biti željeno ili neželjeno, ovisno o vrsti proizvoda i preferencijama potrošača. Dodavanje aktivnih komponenti može utjecati na stabilnost proizvoda, uključujući i njegovu trajnost, otpornost na oksidaciju i promjene u teksturi tijekom vremena.

Jestivi film ili premaz je tanak sloj jestivog materijala koji se koristi u prehrambenoj industriji za pakiranje hrane ili za postavljanje između komponenata hrane. Ovaj oblik ambalaže sve se više koristi zbog svojih dobrih barijernih svojstava prema vodi, plinovima i UV zračenju, što može poboljšati kvalitetu konačnih proizvoda, produljiti njihov rok trajanja, poboljšati organoleptička i mehanička svojstva te smanjiti količinu otpadnog materijala. Proteini, polisaharidi, voskovi i lipidi su najčešći materijali koji se koriste za izradu jestive ambalaže. Proteini poput kolagena, želatine ili mliječnih proteina mogu se koristiti za izradu biorazgradive ambalaže s dobrim mehaničkim svojstvima. Polisaharidi poput škroba, alginata ili celuloze mogu pružiti fleksibilnost, čvrstoću i biorazgradivost. Prirodni voskovi poput pčelinjeg voska te biljna ulja ili masti pružaju otpornost na vlagu i ulja. U procesu izrade mogu se dodati različiti plastifikatori, koji smanjuju lomljivost i povećavaju fleksibilnost i otpornost na lomove (poput glicerina, sorbitola, saharoze, kukuruznog sirupa i drugih), kao i funkcionalni aditivi poput antioksidansa, antimikrobnih sredstava i nutrijenata kako bi se poboljšala stabilnost i sigurnost proizvoda koji se čuvaju u takvoj ambalaži. Jestiva ambalaža koristi se već dugi niz godina u industriji, a primjeri uključuju kapsule, obloge za kobasice, čokoladne obloge, obloge od šećera i slično. Mnoge studije su potvrdile potencijalnu primjenu eteričnih ulja u izradi jestive aktivne ambalaže u prehrambenoj industriji, zbog njihove funkcionalne sposobnosti kao antimikrobnih i antioksidacijskih sredstava. Aktivna ambalaža odnosi se na materijale koji u svom sastavu mogu sadržavati tvari koje se oslobađaju u pakiranom proizvodu ili imaju funkciju apsorpiranja tvari iz pakiranja (Galić, 2009).

Jestivi aktivni filmovi s eteričnim uljem lovora pokazali su se kao vrlo korisni u prehrambenoj industriji. Karboksimetil celuloza (CMC) korištena je za izradu filmova s različitim koncentracijama eteričnih ulja lovora, a film s 15 % eteričnog ulja lovora pokazao se kao najbolji u barijernim svojstvima na djelovanje vodene pare, s 50 % poboljšanim svojstvima u usporedbi s CMC filmovima bez eteričnih ulja lovora (Rincón i sur., 2019).

Optička barijerna svojstva povećavaju se s većim udjelom eteričnog ulja (veći udio kemijskih spojeva), pa se s 15 % udjela eteričnog ulja u CMC filmovima ta svojstva poboljšavaju za 97 %. To može pomoći u sprječavanju oksidacije lipida u hrani i produljiti

rok trajanja hrane. Istraživanje Rincón i sur. (2019) također je pokazalo da pripremljeni filmovi mogu djelomično ili potpuno inhibirati rast određenih mikroorganizama koji su česti patogeni u hrani, poput *Escherichia coli* i *Candida glabrata*. Stoga se upotreba eteričnih ulja u jestivim pakiranjima smatra najboljom opcijom za daljnji razvoj ovih materijala, jer eterična ulja mogu djelovati i kao plastifikatori koji smanjuju krhkost i povećavaju fleksibilnost materijala (Rincón i sur., 2019). Korištenje jestivih filmova koji sadrže eterična ulja kao metodu očuvanja mesa se pokazalo učinkovito i omogućuje postupno oslobađanje fenolnih spojeva tijekom skladištenja. Učinci biljnih ekstrakata poput ružmarina, sjemenki grožđa, zelenog čaja i gingka na očuvanje hrane su se pokazali uspješnim (Theivendran i sur., 2006).

Dodavanje eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u kobasice od mljevenog mesa smanjilo je razinu rezidualnog nitrita, oksidaciju lipida i migraciju flavonoida poput hesperidina i narirutina, što je pokazala i studija koju su proveli Viuda-Martos i suradnici (2010). Rezultati istraživanja provedenih na ekstraktu ružmarina, dodanom u različitim koncentracijama u svježe i zamrznute svinjske kobasice, uspoređivani su s dodatkom BHA (butilirani hidroksianisol) i BHT (butilirani hidroksitoluen). Rezultati su pokazali da su ekstrakti s eteričnim uljem ružmarina jednako učinkoviti antioksidansi kao i BHA i BHT, te u nekim slučajevima čak pružaju bolje rezultate (Sebranek i sur., 2005).

Prema istraživanju Fernandez-Lopez i suradnika (2005), dodavanje eteričnog ulja ružmarina pokazalo je pozitivan učinak na kvalitetu mesnih okruglica. Utvrđena je učinkovitost u potpunom smanjenju oksidacije lipida i blagom smanjenju broja bakterija mliječne kiseline i soja *Listeria* u mesu. Bakterije mliječne kiseline su bakterije koje su uobičajene u fermentiranim namirnicama poput mesa, a njihovo smanjenje može pomoći u sprječavanju kvarenja i produžiti svježinu proizvoda.

Čovječanstvo je u životinjskom svijetu jedinstveno po težnji prilagodbe okoliša prema vlastitim potrebama. Hrana predstavlja glavni pokretač tog procesa adaptacije okolišu kroz povijest. Potreba za hranom snažno korelira s plodnošću tla, klimatskim promjenama i dostupnošću izvora hrane. Ljudska prehrana evoluirala je paralelno s promjenama okoliša, uzimajući u obzir faktore poput plodnosti tla, klimatskih promjena i dostupnosti izvora hrane. Ova težnja za prilagodbom hrane i okoliša rezultirala je razvojem različitih poljoprivrednih tehnika, promjenama u uzgoju i ishrani, te migracijama radi pronalaska plodnijih područja ili novih izvora hrane.

Mikroorganizmi su igrali ključnu ulogu u ljudskoj prehrani kroz povijest, kao sastavni dio procesa fermentacije hrane poput mliječnih proizvoda, kiselog kupusa, kruha, vina i drugih fermentiranih namirnica. Međutim, uz tu korist, mikroorganizmi mogu također uzrokovati probleme svojim djelovanjem na namirnice i stočnu hranu, poput kvarenja hrane ili uzrokujući bolesti. Mikroorganizmi imaju veliku važnost u teoriji i praksi skladištenja, prerade, prodaje i distribucije hrane i pića (Duraković i Duraković, 2001). Mogu biti uzrok kvarenja hrane, ali isto tako mogu biti korisni u procesima poput fermentacije ili konzerviranja hrane. Kontrola mikroorganizama je ključna kako bi se osigurala sigurnost hrane i produžio njen rok trajanja. Ljekovito i aromatično bilje koje se dodaje hrani s ciljem poboljšanja senzorskih svojstava te povećanja nutritivne vrijednosti proizvoda mogu djelovati i kao prirodni konzervansi (Nedorostova i sur., 2009).

Nadalje, ljekovito i aromatično bilje koristi se u aromatiziranju hrane te kao prirodni konzervansi i kao takvi se smatraju najčešće korištenim prirodnim antimikrobnim sredstvima. Korištenje ljekovitog i aromatičnog bilja kao prirodnih konzervansa može biti korisno u smanjenju potrebe za korištenjem sintetičkih aditiva i konzervansa, što može biti poželjno za potrošače koji preferiraju prirodne i organske proizvode. Osim toga, dodavanje bilja hrani može pružiti dodatnu dimenziju okusa i mirisa, čineći jela ukusnijima i privlačnijima. Antimikrobna aktivnost ljekovitih i aromatičnih biljaka ovisi o vrsti aktivne komponente koju sadrži, zatim vrsti namirnice u kojoj se koristi te vrsti samog mikroorganizma (Tajkarimi i sur., 2010).

Antimikrobno djelovanje bilja pripisuje se uglavnom eteričnim uljima i nekim fenolnim spojevima. Kod mnogih ljekovitih i aromatičnih biljaka istraživana su antimikrobna svojstva te je potvrđeno da rast gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija i kvasaca, mogu inhibirati kadulja, majčina dušica, cimet, češnjak, crveni luk i dr. (Witkowska i sur., 2013). Gram-pozitivne bakterije su osjetljivije na antimikrobno djelovanje eteričnih ulja od gram negativnih bakterija (Gross-Bošković i sur., 2019).

Ljekovito bilje ima snažno antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje koje je različito i ovisi o koncentraciji i vrsti aktivnih komponenti. Zahvaljujući ovim učincima produžuje se trajnost proizvoda sprječavajući rast i razmnožavanje patogenih bakterija koji uzrokuju kvarenje hrane. Ovi spojevi mogu djelovati na različite načine, uključujući oštećenje staničnih membrana mikroorganizama, inhibiciju enzimskih procesa potrebnih za njihov rast i reprodukciju te neutralizaciju slobodnih radikala koji mogu uzrokovati oksidativni stres. Zbog svega navedenoga sve je veća svjesnost potrošača o njihovim učincima dovela do veće upotrebe ljekovitih i aromatičnih biljaka u proizvodnji hrane

umjesto primjene kemijskih konzervansa (Gross-Boskovic i sur., 2019). Ljekovite i aromatične biljke sadrže više aktivnih tvari koje posjeduju antimikrobna, antifungalna, antiparazitna, protuupalna i druga svojstva, a najpoznatije takve biljke potječu s Mediterana (Christaki i sur., 2012). Prisutna je primjena eteričnih ulja u prehrambenoj industriji u svrhu sprječavanja kvarenja hrane, produživanja roka trajanja, no mogu se koristiti i za umanjivanje nuspojava korištenja kemijskih konzervansa (Sharafi i sur., 2010).

3. MATERIJAL I METODE

Prvi dio istraživanja proveden je u školskom vrtu i poljoprivrednom praktikumu Srednje strukovne škole Šibenik. U jesen su uzete zeljaste reznice iz školskog vrta dužine 10 cm. Navedene ljekovite biljke su uzgojene vegetativnim načinom u plasteniku u PVC lončićima. Nakon dostizanja visine sadnice od oko 15 cm i grmolik uzgojni oblik, u lipnju su posađene na prethodno pripremljene pokusne parcele. Ljekovite biljke su nakon toga brane i uz pomoć mini destilerije DSB15S3 tvrtke Letina Intech d.o.o., Čakovec obavljen je postupak destilacije vodenom parom za dobivanje hidrolata i eteričnih ulja (Tablica 8.). Drugi dio istraživanja proveden je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku.

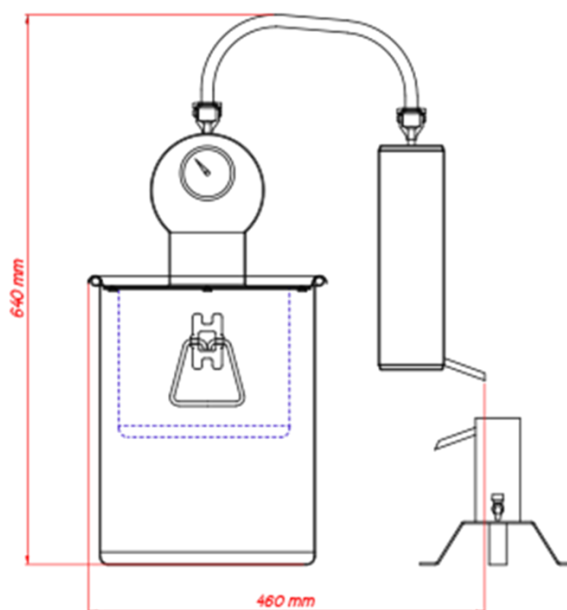
Tablica 8. Vrijeme branja i destilacije

Ljekovito bilje	Vrijeme branja i destilacije mjesec/godina
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	kolovoz/2021.
<i>Laurus nobilis</i> L.	veljača/2021.
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	studeni/2021.
<i>Salvia officinalis</i> L.	studeni/2021.

3.1. PRIPRAVA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE POMOĆU DESTILACIJE VODENOM PAROM

Mini destilerija DSB15S3 prikazana na Slikama 15 i 16. služi za proces destilacije vodenom parom ljekovitog i začinskog bilja, žitarica i voća. Ovaj uređaj omogućuje preciznu kontrolu temperature tijekom procesa destilacije, što je ključno za očuvanje kvalitete eteričnih ulja. Korištenje vodene pare kao nosača omogućuje nježno izdvajanje eteričnih ulja iz biljnog materijala, čime se čuva njihov prirodni sastav i svojstva. Eterično ulje hlapi zajedno s vodenom parom te se nakon hlađenja kondenzira i lako odjeljuje od vode. Kod tog procesa, tekućine unutar destilerije se ne miješaju, pa je moguće destilirati tvari daleko ispod njihove točke vrelišta. To znači da se eterično ulje destilira u procesu ispod 100 °C. Točke vrelišta različitih komponenti eteričnog ulja su jako različite, te je optimalna temperatura 50-60 °C. Za grijanje se može koristiti plinski ili električni štednjak. Za hlađenje je dovoljan priključak na vodovodnu mrežu. Na kondenzatoru (Slika 17) se nalazi brtva za ulaz i izlaz rashladne tekućine. Na poklopcu se nalazi analogni termometar (Slika 18) za praćenje temperature unutar destilacije. Kontrola temperature je ključna kako

bi se izbjeglo pregrijavanje, koje može dovesti do razgradnje osjetljivih spojeva ili čak do isparavanja hlapljivih tvari prije nego što se kondenziraju. Prisutnost analognog termometra omogućuje nadzor temperature unutar destilacije, što omogućuje korisnicima da prilagode postavke grijanja i osiguraju optimalne uvjete za destilaciju. Ukoliko je previsoka temperatura u destileriji, doći će do raspadanja eteričnih ulja i drugih tvari koji mogu onečistiti eterično ulje. Svrha separatora (Slika 19) je kontinuirano odvajanje eteričnog ulja od hidrolata.



Slika 15. Shematski prikaz destilacije vodenom parom (Letina Intech d.o.o., Čakovec)



Slika 16. Oprema mini destilerije DSB15S3 (autor: Pero Grgić)



Slika 17. Matica (lijevo). Kondenzator s ulazom i izlazom rashladne tekućine ispustom (desno) (autor: Pero Grgić)



Slika 18. Poklopac s analognim termometrom (lijevo). Perforirana košara (desno), (autor: Pero Grgić)



Slika 19. Separator/florentinska posuda (lijevo). Spajanje poklopca s perforiranom košarom (desno), (autor: Pero Grgić)

Prije početka destilacije potrebno je pripremiti biljni materijal u svrhu omogućavanja pristupa pare biljci u kojima se nalaze eterična ulja. Način i veličina usitnjavanja ovise o sirovini. Koš za bilje (perforirana košara) se ne smije prepuniti kako u destileriji ne bi došlo do previsokog tlaka (biljke ne smiju ograničiti strujanje pare). Cvjetove i listove, odnosno nedrvenaste dijelove biljke prije destilacije nije potrebno usitnjavati (Slika 20). Stjenke njihovih stanica su tanke i propusne za eterično ulje. Korijen i stabljike biljaka potrebno je prije destilacije usitniti sjeckanjem. Perforirana košara ne smije biti u kontaktu s vodom, odnosno ne smije biti uronjena u vodu, već samo vodena para prolazi kroz njega. Mini destilerija DSB15S3 izrađena je od kvalitetnoga i nehrđajućeg čelika (W.Nr. 1. 4301 IIIId, AISI304) volumena 15 litara. Volumen perforirane košare je 6 litara.



a

b

Slika 20. a) Usitnjavanje biljnog materijala-ružmarina, b) Cvjetovi lavande u perforiranoj košari) (autor: Pero Grgić)

3.2. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI ETERIČNIH ULJA SMILJA, LOVORA, RUŽMARINA I KADULJE

3.2.1. Priprema hranjive podloge i bujona

Za nasadivanje bakterija korištena je Müller Hinton čvrsta hranjiva podloga. Za pripremu 100 ml čvrste hranjive podloge izvagano je 2,2 g Müller Hintona, 0,5 g ekstrakta kvasca i 1,5 g agara. Zatim je dodano 1 ml glicerola te 0,25 M otopina PBS-a (fosfatni pufer, engl. *Phosphate Buffer Saline*) s podešenom pH vrijednosti na 7,4 do 100 ml, te je zagrijavano do vrenja 10 minuta. Nakon čega su podloge autoklavirane 15 minuta pri 121 °C. Nakon autoklaviranja i kratkog hlađenja, podloge su izliveno u sterilne Petrijeve posude. Nakon potpunog hlađenja i skrutnjavanja, podloge su pohranjene u hladnjaku do nasadivanja bakterijskih kultura.

Za pripremu 1 l tekućeg Müller Hinton bujona otopljeno je 22 g Müller Hintona u 1 l destilirane vode. Tekući bujon je zagrijan do potpunog otapanja, a zatim steriliziran autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta. Pripremljena tekuća podloga ohlađena je i korištena za daljnje istraživanje.

3.2.2. Odabir bakterijskih organizama i nasadivanje bakterijskih kultura

Četiri korištene bakterije izolirane su iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih s Mikrobiološkog odjela Zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. Vrste *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* odabrane su kao dva najčešće korištena modelna organizma u istraživanjima te kao česti ljudski patogeni koji predstavljaju gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvane u hladnjaku u dubokom agaru. Na sterilnu i ohlađenu Müller Hinton čvrstu hranjivu podlogu nasadene su bakterijske kulture, nakon čega su inkubirane u inkubatoru (Binder BD 56, Binder GmbH, Tuttlingen, Njemačka) tijekom 18-24 sata pri temperaturi od 37 °C.

Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarlandovom standardu po principu uspoređivanja sa suspenzijom poznatog zamućenja. McFarlandov standard neophodan je pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni vrijednostima na McFarland skali (Tablica 9.). Za određivanje minimalne inhibitorne

koncentracije korišten je standard 0,5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi $150 \times 10^6/\text{ml}$. Gustoće bakterijskih suspenzija mjerene su u sterilnoj fiziološkoj otopini na denzitometru (McFarland tube Densitometer DEN-1, Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK). Suspenzija inokuluma (McFarland 0,5) korištena je unutar 15 minuta od standardizacije, što je vrlo važan faktor za izbjegavanje bilo kakve promjene veličine inokuluma (Wanger, 2007).

Tablica 9. Vrijednost standarda na McFarland skali (Preuzeto i prilagođeno prema McFarland, 1907).

Standard	Koncentracija bakterija ¹ x 10 ⁶ / ml	Teoretska optička gustoća ² na 550 nm	Apsorbancija pri 600 nm
0,5	150	0,125	0,063
1	300	0,25	0,123
2	600	0,50	0,242
3	900	0,75	0,431
4	1200	1,00	0,653
5	1500	1,25	0,867

¹Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost

²Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije

3.2.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Minimalne inhibitorne koncentracije uzoraka eteričnih ulja određene su modificiranom metodom mikrodilucije prema Gu i Wang (2010). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korištene su sterilne polipropilenske mikrotitarske pločice sa 96 jažica. Ciprofloksacin je ko-testiran kao pozitivna kontrola, pod istim uvjetima. Najprije je u svaku jažicu pipetirano 100 μl Müller Hinton tekućeg bujona. U jažice prvog stupca dodano je 100 μl uzorka eteričnih ulja, nakon čega su rađena serijska dvostruka razrijeđena unutar mikrotitarske pločice. Svaki uzorak je rađen u tri ponavljanja. Korišten je 24- satni inokulum, a u svaku je jažicu inokulirano 300×10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150×10^6 bakterija/mL). Tako pripremljene pločice stavljene su na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacijskog perioda u svaku jažicu dodano je 50 μL trifenil tetrazolij klorida (TTC engl. *2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride*) i stavljeno je na reinkubaciju na 37

°C tijekom 3 sata. TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji 0,5 mg/ml se koristi kao indikator reducirajućih tvari u podlozi što je vidljivo prema promjeni boje medija u ružičastu. Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitavane su golim okom. Pojava ružičastog obojenja znak je rasta bakterija. Najveće razrjeđenje ekstrakata pri kojem nije došlo do pojave ružičastog obojenja predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog eteričnog ulja.

3.2.4. Statistička analiza podataka

Normalnost distribucije podataka izračunata je Shapiro-Wilk testom. S obzirom da podaci ne prate normalnu raspodjelu, razlike u antibakterijskoj aktivnosti ispitivanih eteričnih ulja utvrđene su Kruskal-Wallis testom s post hoc Dunnovim testom uz Bonferronijevu korekciju. Statistička analiza provedena je u statističkom programskom paketu Statistika 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD) na razini značajnosti od $\alpha = 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Destilacijom ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), kadulje (*Salvia officinalis*), lovora (*Laurus nobilis*) i smilja (*Helichrysum italicum*) pomoću mini destilerije DSB15S3 dobiveni su hidrolati i eterična ulja navedenih ljekovitih biljaka uzgojenih u školskom vrtu i poljoprivrednom praktikumu Srednje strukovne škole Šibenik. Najveći prinos eteričnog ulja u obliku mjehurića na površini hidrolata dobiven je kod ružmarina, kadulje i lovora, svako eterično ulje po 3 ml (5 % prinosa). Manji prinos zabilježen je kod smilja; svega dvije kapi eteričnog ulja (< 1 % prinosa). Temperature isparavanja eteričnog ulja kretale su se oko 90 °C za sve analizirane biljke. Ukupno trajanje procesa destilacije bilo je oko 2 sata. Omjer količine biljnog materijala i dobivenog hidrolata bio je 1:20, odnosno iz 60 g biljnog materijala dobiveno je oko 1200 ml hidrolata. Mini destilerija pokazala je zadovoljavajuću učinkovitost, a dobiveni rezultati u skladu su s očekivanim prinosima eteričnog ulja analiziranih biljaka.

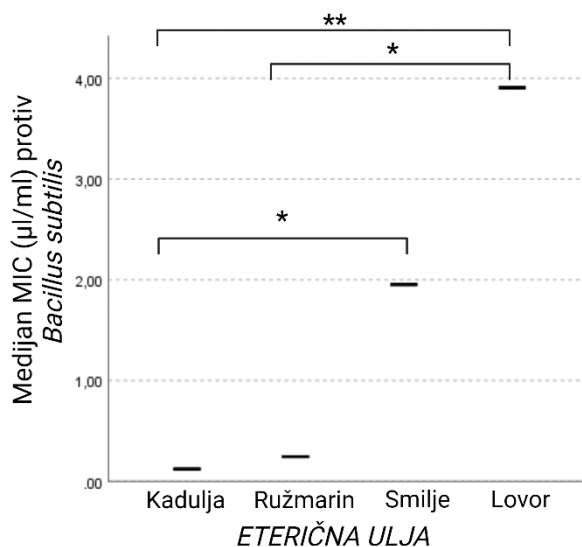
Destilacijom dobiveni hidrolati smilja, lovora, ružmarina i kadulje nisu pokazali antibakterijsku aktivnost protiv ispitivanih sojeva bakterija. Međutim, destilacijom dobivena eterična ulja pokazala su antibakterijsku aktivnost protiv sojeva *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, što je vidljivo iz **Tablice 10**. Među ispitivanim eteričnim uljima, ulje kadulje je pokazalo najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju protiv sva četiri ispitivana soja (0,48828 µl/ml protiv soja *Pseudomonas aeruginosa*, te 0,12207 µl/ml protiv ostalih sojeva). Najviša minimalna inhibitorna koncentracija utvrđena je za eterično ulje smilja protiv soja *Staphylococcus aureus* (62,5 µl/ml). Antibiotik ciprofloksacin je ko-inkubiran pri istim uvjetima te je pokazao antibakterijsko djelovanje protiv sva četiri ispitivana soja.

Tablica 10. Minimalne inhibitorne vrijednosti dobivenih eteričnih ulja smilja, lovora, ružmarina i kadulje

MIC (µl/ml)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ETERIČNO ULJE KADULJE	0,12207	0,12207	0,12207	0,48828
ETERIČNO ULJE RUŽMARINA	0,24414	0,48828	0,12207	1,95313
ETERIČNO ULJE SMILJA	1,95313	62,50000	0,48828	7,81250
ETERIČNO ULJE LOVORA	3,90625	7,81250	1,95313	7,81250
CIPROFLOXACIN (µg/ml)	1,95	3,91	3,91	7,81

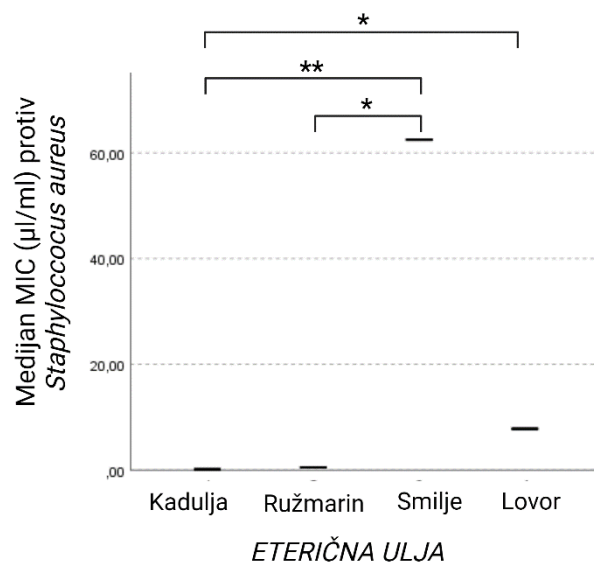
Između ispitivanih eteričnih ulja postoji statistički značajna razlika u antibakterijskoj aktivnosti izraženoj u minimalnim inhibitornim koncentracijama ($\chi^2(3) = 12$, $p = 0,007$).

Post hoc analizom utvrđene su statistički značajne razlike antibakterijske aktivnosti protiv soja *Bacillus subtilis* između eteričnog ulja kadulje i smilja ($p=0,036$), eteričnog ulja kadulje i lovora ($p=0,002$) te eteričnog ulja ružmarina i smilja ($p=0,036$), što je prikazano na Slici 21.



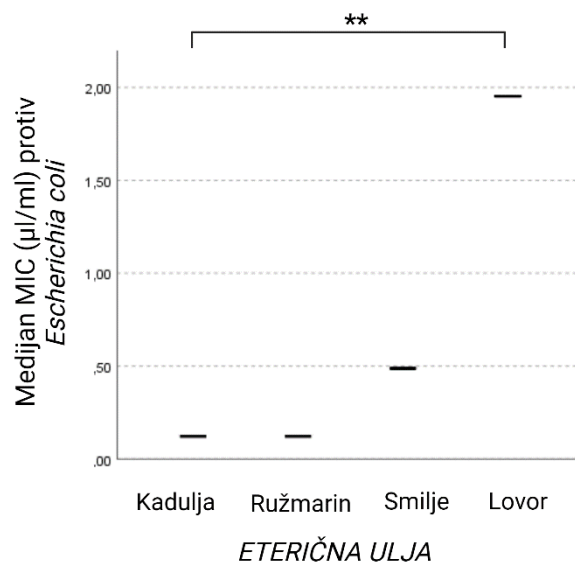
Slika 21. Grafički prikaz antibakterijske aktivnosti eteričnih ulja protiv soja *Bacillus subtilis* izraženoj u minimalnim inhibitornim koncentracijama MIC (µl/ml), (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Post hoc analizom uz Dunnettov test ($p < 0,05$) utvrđene su statistički značajne razlike antibakterijske aktivnosti protiv soja *Staphylococcus aureus* između eteričnog ulja kadulje i smilja ($p=0,002$), eteričnog ulja kadulje i lovora ($p=0,036$) te eteričnog ulja ružmarina i smilja ($p=0,036$), prikazano na Slici 22.



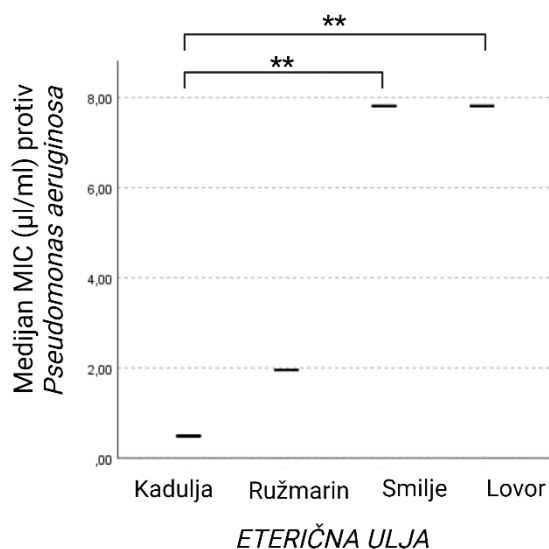
Slika 22. Grafički prikaz antibakterijske aktivnosti eteričnih ulja protiv soja *Staphylococcus aureus* izraženoj u minimalnim inhibitornim koncentracijama MIC (µl/ml), (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Protiv soja *Escherichia coli* utvrđene su statistički značajne razlike antibakterijske aktivnosti između eteričnog ulja kadulje i lovora ($p = 0,006$), prikazano na Slici 23.



Slika 23. Grafički prikaz antibakterijske aktivnosti eteričnih ulja protiv soja *Escherichia coli* izraženoj u minimalnim inhibitornim koncentracijama MIC (µl/ml), (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Protiv soja *Pseudomonas aeruginosa* utvrđene su statistički značajne razlike antibakterijske aktivnosti između eteričnog ulja kadulje i smilja ($p=0,006$) te eteričnog ulja kadulje i lovora ($p=0,006$), prikazano na Slici 24.



Slika 24. Grafički prikaz antibakterijske aktivnosti eteričnih ulja protiv soja *Pseudomonas aeruginosa* izraženoj u minimalnim inhibitornim koncentracijama MIC (µl/ml), (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

U ovom istraživanju, destilacijom ružmarina, kadulje i lovora postignuti su viši prinosi eteričnih ulja, pri čemu je iz svake biljke dobiveno po 3 ml ulja. Visoki prinosi vjerojatno su rezultat njihovih prirodnih svojstava i adaptacije na sušna staništa koja favoriziraju visoku proizvodnju aromatičnih i zaštitnih spojeva u biljci. S druge strane, smilje je dalo znatno manji prinos, svega dvije kapi eteričnog ulja, što je u skladu sa literaturom (Aćimović i sur., 2022; Kunc, 2022; Genčić i sur., 2021). Mali prinos može biti posljedica specifičnih uvjeta uzgoja ili genetskih faktora koji utječu na količinu i sastav eteričnih ulja. Naime, sastav eteričnog ulja smilja je mješavina raznih aromatskih tvari, uglavnom monoterpena i seskviterpena, međutim sastav varira i s uvjetima ekstrakcije. Destilacija je najčešće korištena metoda ekstrakcije eteričnih ulja smilja, iako je iskorištenje vrlo nisko (<1 %), daje viši prinos u odnosu na destilaciju parom i modernu (ekološki prihvatljivu) tehniku - destilaciju uz pomoć mikrovalova (Jažo i sur., 2022). Ova

razlika među naglašava važnost razumijevanja utjecaja ekoloških i genetskih faktora na proizvodnju eteričnih ulja u različitim biljkama.

Temperatura isparavanja eteričnih ulja kretala se oko 90 °C za sve analizirane biljke, što je standardna temperatura za učinkovitu destilaciju bez rizika od degradacije termolabilnih komponenti.

Analiza antibakterijske aktivnosti eteričnih ulja utvrdila je statistički značajne razlike u njihovoj učinkovitosti (Kruskal-Wallis test $\chi^2(3) = 12, p = 0.007$). Među ispitivanim eteričnim uljima, ulje kadulje je pokazalo najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju protiv sva četiri ispitivana soja što može biti povezano s literaturno poznatim visokim udjelom tujona, cineola, kamfora, borneola i kariofilena. Ovi spojevi imaju snažna antibakterijska svojstva. Na primjer, cineol je poznat po svojim antiseptičkim i protuupalnim svojstvima, dok tujon ima izrazitu antimikrobnu aktivnost. Treba napomenuti da postoji velika kemijska varijacija u eteričnim uljima kadulje. Najčešći je kemotip α -tujon > kamfor > 1,8-cineol, dok su manje zastupljeniji kemotip bogat α -humulenom, kemotip bogat β -tujonom, kemotip 1,8-cineol/kamfor i kemotip sklareol/ α -tujon (Craft i sur., 2017). Sastav eteričnih ulja uvelike varira i može imati značajan učinak na biološke aktivnosti. Trenutačno ne postoje studije koje povezuju sastav ulja kadulje s biološkim aktivnostima, što je jedno od ograničenja i ovog istraživanja.

Dobiveni rezultati antibakterijskih svojstava eteričnih ulja iz ružmarina, kadulje, lovora i smilja mogu se usporediti s rezultatima sličnih istraživanja. Mastelić i suradnici (2005) proučavali su eterično ulje smilja *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don iz Hrvatske. Frakcionirano je na terpenske i terpenoidne frakcije te analizirano GC/MS-om te je identificirano 52 spoja. Glavni ugljikovodici ulja bili su α -pinen (10,2 %), α -cedren (9,6 %), aromadendren (4,4 %), β -kariofilen (4,2 %) i limonen (3,8 %), dok su glavni spojevi koji sadrže kisik bili neril-acetat (11,5 %), 2-metilcikloheksil-pentanoat (8,3 %), 2-metilcikloheksil-oktanoat (4,8 %) i geranil-acetat (4,7 %). Procijenjeno je antibakterijsko i antifungalno djelovanje eteričnog ulja i njegovih terpenskih i terpenoidnih frakcija disk difuzijskim testom i određena minimalna inhibitorna koncentracija protiv *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Eterično ulje i njegova terpenoidna frakcija pokazali su veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na terpensku frakciju, posebno protiv *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.

Al-Abri i suradnici (2022) su analizirali sastav i antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja dobivenog iz listova lovora (*Laurus nobilis*) uzgojenih u Omanu. Cilj istraživanja bio je identificirati kemijske komponente eteričnog ulja lovorika te evaluirati njihovu učinkovitost protiv tri bakterijska soja, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, te gljivice *Candida albicans*. Najveća aktivnost utvrđena je protiv *S. aureus*, a najmanja protiv *E. coli*. Eterično ulje je također bilo aktivno protiv gljivice *C. albicans*, sa rasponom zone inhibicije od 6-14 mm. Rezultati GC-MS analize pokazali su da je (E)- β -kariofilen glavna komponenta sa oko 59,62 %. Ostale glavne komponente uključivale su α -selinen (14,03 %), α -humulen (8,65 %), β -selinen (4,99 %) i α -pinen (4,98 %). Istraživanje predlaže njegovu potencijalnu primjenu kao prirodno antimikrobno sredstvo u različitim aplikacijama, uključujući očuvanje hrane i medicinske tretmane. Ova studija doprinosi širem razumijevanju potencijalnih koristi eteričnih ulja i njihove primjene u borbi protiv mikrobnih infekcija.

Bouaziz i suradnici (2009) su ispitivali baktericidna svojstva eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom nadzemnog dijela kadulje *Salvia officinalis* L., uzgojene u vrtovima Tunisa, i plinskom kromatografijom–spektrometrijom mase (GC–MS) identificirano je 44 spoja. Utvrđeni su snažni baktericidni i fungicidni učinci s minimalnim baktericidnim/fungicidnim koncentracijama u rasponu od 0,031 do 0,25 μ l/ml. Koncentracije eteričnih ulja od 0,5 % i 1 % (v/v) rezultirale su smanjenjem vitalnosti za više od 5 i 4 log jedinice po ml za standardne bakterije i gljivice, unutar 5-minutnog vremena kontakta. Korištenje uzorkivača zraka i raspršivača aroma pokazalo je smanjenje ukupnog broja mikroba i ukupnog broja kvasaca i plijesni nakon 1h, 6h i 24h u odabranoj prostoriji za testiranje (72 %, 73 % i 70 %), odnosno (54 %, 55 % i 55 %). Eterična ulja *S. officinalis* pokazala su snažnu paru aktivnost protiv bakterija, kvasaca i gljivica, podupirući njihovu upotrebu kao prirodnog ekološki prihvatljivog dezinficijensa za kontrolu mikroba koji se prenose zrakom.

Pintore i suradnici (2002) proveli su detaljnu analizu eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) sa Sardinije i Korzike, koje karakterizira kemotip α -pinen/verbenon/bornil acetat. Koristeći GC–RI, GC–MS i ¹³C-NMR tehnike, identificirali su 58 spojeva. Istraženo je antimikrobno djelovanje dva uzorka sa Sardinije, a oba su pokazala umjereno antibakterijsko djelovanje. Gram-pozitivne bakterije bile su osjetljivije (MIC od 2,5-4 mg/ml) od Gram-negativnih bakterija. Eksperimenti s vremenom ubijanja pokazali su da su potrebna produljena vremena (60 minuta) za potpunu inaktivaciju

bakterijskog inokuluma. Ovo istraživanje pružilo je uvid u potencijalnu primjenu eteričnih ulja ružmarina u kontroli mikrobnog rasta, posebno u kontekstu sigurnosti hrane i javnog zdravlja.

Bozin i suradnici (2007) su istraživali karakteristike eteričnih ulja nekih biljaka iz obitelji Lamiaceae, uključujući kadulju i ružmarin. Istraživanje je uključivalo identifikaciju i karakterizaciju njihovih sastojaka, te ispitivanje potencijalne antibakterijske i antioksidacijske aktivnosti. Istraživanje je pokazalo da su ta eterična ulja imala znatne antibakterijske i antioksidacijske aktivnosti. Posebno, eterična ulja su pokazala učinkovitost protiv soja *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ali ne i protiv *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultati su naglasili potencijal upotrebe tih ulja u poboljšanju sigurnosti hrane zbog njihovih antimikrobnih svojstava.

Istraživanje koje je proveo Mohsenzadeh (2007) procijenjivalo je antibakterijsku aktivnost odabranih iranskih eteričnih ulja majčine dušice (*Thymus vulgaris*), paprene metvice (*Mentha piperita* L.), sjemenki kima (*Carum carvi*), komorača (*Foeniculum vulgare*), estragona (*Artemisia dracuncululus*) i penije (*Mentha pulegium*) protiv sojeva *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Cilj istraživanja bio je ispitati učinkovitost eteričnih ulja kao potencijalnih antibakterijskih sredstava koji bi mogli biti korišteni u liječenju ili prevenciji infekcija uzrokovanih ovim patogenima. Rezultati su pokazali da određena eterična ulja iz Irana posjeduju značajne antibakterijske sposobnosti protiv oba testirana soja bakterija. Eterična ulja paprene metvice, sjemenki kima, penije i komorača imala su umjeren učinak na ispitivane mikroorganizme, dok je eterično ulje estragona bilo manje učinkovito. Analiza je otkrila da su neka ulja bila posebno učinkovita, čime su se istaknula kao mogući prirodni antibakterijski agenti. Ovo istraživanje doprinosi rastućem tijelu znanstvenih dokaza koji podržavaju upotrebu eteričnih ulja u antimikrobnim aplikacijama, potencijalno pružajući alternativu standardnim antibakterijskim tretmanima.

Komparativna studija koju je proveo Toroglu (2007) se usredotočila na ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti i antagonističkog učinka eteričnih ulja dobivenih iz *Thymus eigii* (M. Zohary i RH. Davis) i *Pinus nigra* Am. sub sp *pallasiana* i *Cupressus sempervirens* L. Cilj ovog istraživanja bio je otkriti i kvantificirati sposobnost eteričnih ulja u suzbijanju rasta i aktivnosti različitih mikroorganizama, što bi moglo imati primjenu u medicinskim, farmaceutskim i prehrambenim industrijama. Rezultati istraživanja pokazali su da eterična ulja imaju značajne antimikrobne sposobnosti protiv širokog spektra bakterija i gljivica, uključujući neke patogene sojeve koji su otporni na konvencionalne

antibiotike. Posebno, istraživanje je identificiralo nekoliko biljnih vrsta čija ulja pokazuju izražene antagonističke učinke. Uočen je antagonistički učinak protiv svih 13 ispitivanih bakterija pri primjeni kombinacije eteričnog ulja *T. eigii* i *P. nigra*. Sinergistički učinak utvrđen je protiv soja *E. coli*, *P. pyocyaneus* i *E. faecalis* pri kombinaciji eteričnog ulja *T. eigii* (0,5 µl) i *P. nigra* (1 µl), ali je utvrđen i u slučaju *E. coli*, *P. pyocyaneus*, *E. faecalis* i *M. smegmatis* kombinacijom eteričnog ulja *T. eigii* (0,5 µl) i *P. nigra* (2 µl), kada je došlo i do aditivnog učinka protiv soja *B. brevis*. Sinergistički i kombinirani učinak dvaju ili više sredstava premašuje zbroj njihovih pojedinačnih učinaka. Ova studija pruža dragocjene informacije o potencijalnoj upotrebi eteričnih ulja kao alternativnih antimikrobnih sredstava u različitim aplikacijama, s obzirom na njihovu prirodnu podlogu i širok spektar djelovanja.

Ed-Dra i suradnici (2021) su proveli sveobuhvatnu evaluaciju upotrebe eteričnog ulja majčine dušice (*Thymus vulgaris*) kao prirodnog aditiva protiv različitih serotipova bakterije *Salmonella enterica*. Cilj ovog istraživanja bio je testirati antimikrobnu učinkovitost ovog eteričnog ulja protiv više serotipova *Salmonella enterica*, koji su česti uzročnici bolesti prenosivih hranom. Rezultati istraživanja su pokazali da eterično ulje majčine dušice posjeduje izražene antimikrobne sposobnosti protiv raznih serotipova *Salmonella enterica*. Rezultati sugeriraju da bi eterično ulje majčine dušice moglo biti korisno kao siguran i prirodan aditiv u prehrambenoj industriji, posebno u svrhu poboljšanja sigurnosti hrane i smanjenja rizika od infekcija sojem *Salmonella enterica*. Ovo istraživanje pruža važne informacije koje bi mogle pomoći u razvoju novih strategija za kontrolu patogena u prehrambenom lancu.

Bhavaniramya i suradnici (2019) su pružili pregled istraživanja sa fokusom na antimikrobne i antioksidacijske primjene eteričnih ulja. Cilj je bio istražiti potencijalnu upotrebu eteričnih ulja kao prirodnih konzervansa koji bi poboljšali sigurnost i kvalitetu hrane inhibiranjem rasta mikroorganizama i oksidacije u hrani. Prikazano je kako eterična ulja imaju značajne antimikrobne i antioksidacijske sposobnosti, što ih čini učinkovitim u zaštiti hrane od bakterijskih i gljivičnih infekcija, kao i od oksidativnog kvarenja. Različite vrste eteričnih ulja kao što su ulje čajevca, limunovo ulje, ulje klinčića, ulje cimeta i ulje majčine dušice, pokazale su značajnu antimikrobnu i antioksidacijsku aktivnost, a također su učinkovito produljile rok trajanja proizvoda od žitarica i povećale kvalitetu sigurnosti hrane. Utvrđene su specifične komponente eteričnih ulja koje su najučinkovitije u borbi protiv patogena i očuvanju svježine hrane. Antibakterijska djelovanja eteričnih ulja uvelike

su povezana s prisutnošću spojeva poput cimetaldehida, citrala, karvakrola, eugenola ili timola, nakon čega slijede terpeni i drugi spojevi uključujući ketone (β -mircen, α -tujon ili geranil acetat) koji pokazuju slabiju aktivnost, dok su ugljikovodici uglavnom neaktivni. Karvakrol, eugenol i timol glavni su aktivni spojevi koji učinkovito inhibiraju rast mikroorganizama ometanjem staničnih membrana, što dovodi do promjena u protoku elektrona, pokretačkoj snazi protona i aktivnom transportu te koagulaciji. Rezultati ovog pregleda mogli bi pomoći u razumijevanju mehanizama djelovanja eteričnih ulja na mikroorganizme i njihovu potencijalnu upotrebu u razvoju novih antimikrobnih i antioksidacijskih proizvoda za upotrebu u prehrambenoj industriji, što bi moglo imati veliki utjecaj na povećanje sigurnosti hrane.

Bakkali i suradnici (2008) su pružili sveobuhvatan pregled postojeće literature o različitim biološkim aktivnostima eteričnih ulja, uključujući njihova antimikrobna, protuupalna, antioksidacijska svojstva te njihov potencijalni utjecaj na ljudsko zdravlje i različite ekosustave. Rezultati pregleda literature pokazali su da eterična ulja posjeduju širok spektar bioloških učinaka koji mogu biti korisni u raznim primjenama, od medicinskih tretmana do očuvanja okoliša. Međutim, istraživanje je također istaknulo potrebu za daljnjim detaljnim studijama kako bi se bolje razumjeli mehanizmi djelovanja eteričnih ulja i njihova sigurnost pri korištenju, posebno u kontekstu mogućih toksičnih učinaka pri visokim dozama ili dugotrajnoj uporabi. Ovi rezultati pružaju temelj za buduća istraživanja i razvoj u području bioloških aplikacija eteričnih ulja, kao i za donošenje informiranih odluka o njihovoj upotrebi u medicini, prehrambenoj industriji i drugim područjima.

Vergis i suradnici (2014) su se usredotočili na analizu raznih studija o učinkovitosti eteričnih ulja u suzbijanju mikroorganizama u prehrambenim proizvodima. Cilj ovog pregleda bio je sistematizirati postojeće znanstvene dokaze koji podupiru upotrebu eteričnih ulja kao sigurnih i učinkovitih antimikrobnih agenasa, te istražiti njihov potencijal za integraciju u prehrambenu industriju. Rezultati su pokazali da eterična ulja imaju širok spektar antimikrobnih svojstava, koja su učinkovita protiv različitih patogenih bakterija, gljivica i virusa. Također, utvrđene su ključne komponente eteričnih ulja, odgovorne za njihovu antimikrobnu aktivnost, te su razmatrani mogući mehanizmi djelovanja. Na temelju analiziranih studija, autori su predložili eterična ulja kao prirodne alternative sintetičkim konzervansima u prehrambenoj industriji, uzimajući u obzir njihovu biološku sigurnost i prihvatljivost za potrošače.

Na temelju rezultata naših ispitivanja možemo reći da eterična ulja kadulje, ružmarina, smilja i lovora imaju zajamčena antibakterijska svojstva. Razlike u kemijskom sastavu, koncentraciji ključnih spojeva, ili njihovim omjerima u uzorcima ulja mogu značajno utjecati na razine antibakterijske aktivnosti. U svrhu boljeg uvida u utjecaj pojedinih faktora na antibakterijsku aktivnost eteričnih ulja, potrebna su dodatna istraživanja koja će detaljnije istražiti kemijske profile tih ulja i njihove mehanizme djelovanja, što će omogućiti optimizaciju njihovog korištenja u različitim primjenama u aspektu sigurnosti hrane.

Sigurnost hrane ključna je stvar za potrošače kao i za prehrambenu industriju. Doista, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuje da se 1 od 10 ljudi svake godine razboli zbog konzumacije kontaminirane hrane, a kao rezultat tome 420 000 ih umre (Web 3). Učestale prijetnje sigurnosti hrane, koje imaju značajne društvene i ekonomske posljedice, stvaraju hitnu potrebu za razvojem novih i netoksičnih konzervansa s snažnim antimikrobnim i antioksidacijskim svojstvima, kako bi se osigurala sigurnija opskrba hranom. S tim u vezi, stvarne sintetičke kemikalije, koje se obično koriste za kontrolu soja patogena, izazivaju ozbiljne preokupacije vezane uz ljudsko zdravlje (Prakash i sur., 2015; Falleh i sur., 2020). Upotreba sintetskih antimikrobnih spojeva koji se koriste u proizvodnji hrane izazvala je zabrinutost potrošača, jer ih povezuju sa brojnim toksikološkim poteškoćama, alergijama, pojavom raka i drugih degenerativnih bolesti (Syngai i Ahmed 2019).

Neki sintetski antimikrobni agensi, odobreni od strane regulatornih agencija i korišteni kao konzervansi za hranu, bili su zdravstvena prijetnja za potrošače (Gutiérrez-del-Río i sur., 2018). Na primjer, sulfiti (skupina spojeva na bazi sumpora koji se komercijalno koriste kao konzervansi za hranu) povezani su s nekim antinutritivnim posljedicama kao što je razgradnja tiamina ili vitamina B1 u hrani.

S porastom svijesti o zdravoj prehrani i zelenoj potrošnji, sve više ljudi preferira proizvode koji sadrže prirodne konzervanse i odbijaju jesti hranu s umjetnim ili kemijski sintetiziranim aditivima. Ova promjena u potrošačkim preferencijama rezultirala je povećanom potražnjom za prirodnim i ekološki prihvatljivim metodama sterilizacije hrane.

Eterična ulja su prepoznata kao jedan od prirodnih izvora s antimikrobnim svojstvima. Međutim, primjena eteričnih ulja kao konzervansa u hrani može imati ograničenja zbog njihovih jakih okusa i aroma koje mogu utjecati na senzorsku kvalitetu i preferencije potrošača. Ograničavajuća je i niska stabilnost, niska topljivost u vodi i

volatilnost, što sprječava njihovu široku praktičnu upotrebu u većem omjeru (Maurya i sur., 2021). Stoga je važno razviti strategije koje će minimizirati senzorske promjene kada se eterična ulja primjenjuju u hrani kako bi se smanjio rizik od negativnog utjecaja na kvalitetu proizvoda (Oh i sur., 2022). Ovo može uključivati pravilnu doziranu primjenu eteričnih ulja, kombiniranje s drugim sastojcima koji mogu umanjiti njihovu aromu, ili korištenje tehnologija koje omogućuju postupno oslobađanje mirisa i okusa tijekom skladištenja i konzumacije hrane. Na taj način, moguće je iskoristiti antimikrobna svojstva eteričnih ulja u hrani dok se istovremeno minimizira njihov utjecaj na senzorsku kvalitetu proizvoda. Unatoč razvoju tehnologije u industriji i proizvodnji hrane, velik i značajan zdravstveni problem je očuvanje hrane od zaraze humanim patogenima. Prekomjernom upotrebom antibiotika razvila se rezistencija na velik broj sojeva patogena. Eterična ulja koja imaju visoki postotak fenolnih komponenti kao što su karvakrol, eugenol i timol, mogu ostvariti najbolji antibakterijski učinak na patogene u hrani.

Nadalje, primjena eteričnih ulja pruža novi ekološki prihvatljiv pristup za zaštitu hrane, jer više od 150 biljaka koje daju eterična ulja, smole i destilate su općenito priznate kao sigurne za konzumaciju bez ograničenja unosa i označeni su kao GRAS ili općenito prepoznati kao sigurni i izuzeća od toksičnosti za sisavce prema FDA (engl. *Food and Drug Administration*) odnosno Upravi za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (Food and Drug Administration, 2022; Pisoschi i sur., 2018; Bhavaniramy i sur., 2019; Chaudhari i sur., 2020). Ove biljke uključuju razne vrste biljaka poput origana, ružmarina, kadulje, majčine dušice, bosiljka, lovora, metvice, peršina, estragona, korijandera, maslačka, lavande i vrijeska. Eterična ulja dobivena iz ovih biljaka često se koriste u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi i za poboljšanje arome i okusa proizvoda. Oznaka GRAS osigurava da su ovi sastojci sigurni za konzumaciju kada se koriste u prehrambenim proizvodima u skladu s uputama o doziranju i primjeni. Međutim, važno je imati na umu da, iako su ovi sastojci općenito priznati kao sigurni, pojedinci mogu imati individualne alergijske reakcije ili netolerancije na određene tvari, stoga se uvijek preporučuje oprez prilikom korištenja bilo kojeg novog prehrambenog sastojka. Stoga, važno je i prepoznati potrebu za standardizacijom kvalitete eteričnih ulja.

Rao i suradnici (2019) su pružili poseban osvrt na mehanizme djelovanja eteričnih ulja na mikroorganizme u hrani uz razmatranje različitih strategija za poboljšanje njihove antimikrobne učinkovitosti. Rezultati pregleda literature pokazali su da eterična ulja djeluju kroz različite mehanizme, uključujući oštećenje stanične membrane mikroorganizama, inhibiciju njihovih vitalnih funkcija, i interferenciju s njihovom genetskom regulacijom.

Također, istraživanje je ukazalo na inovativne pristupe koji mogu povećati učinkovitost eteričnih ulja, kao što su nanoemulzije, mikroenkapsulacija, i kombinacija s drugim antimikrobnim agensima. Ovi nalazi pružaju važne smjernice za daljnji razvoj i primjenu eteričnih ulja kao sigurnijih i prirodnijih alternativa sintetičkim konzervansima u industriji hrane.

S obzirom na česte pojave kontaminacije hrane patogenim bakterijama poput *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli* O157:H7, jedan od ključnih zahtjeva javnog zdravstva je sigurnost hrane. Sintetički konzervansi dugi niz godina korišteni u prehrambenoj industriji mogu izazvati različite neželjene učinke poput alergija, intoksikacije, raka i drugih degenerativnih bolesti. Zbog toga je potrebno pronaći nove prirodne izvore konzervansa. Eterična ulja pokazuju izvrsna antioksidacijska svojstva te se mogu koristiti kao konzervansi u hrani ili kao dio ambalaže i jestivih premaza, pružajući time dodatnu zaštitu od oksidacije i produžujući rok trajanja proizvoda. Njihova prirodna svojstva čine ih poželjnim alternativama sintetičkim konzervansima, omogućavajući proizvodnju sigurnije hrane za potrošače (Ameer i sur., 2024).

Porodica Lamiaceae jedna je od najvažnijih u proizvodnji eteričnih ulja s antimikrobnim i antioksidacijskim djelovanjem, a biološka svojstva pojedinog eteričnog ulja ovise o njegovom kemotipu. Stoga je važno dobro poznavati kemijski sastav i stabilnost spojeva ulja. Također, važno je spomenuti fenomen antimikrobne otpornosti koji je prisutan i u prehrambenoj industriji te se stoga sve češće koriste ekstrakti aromatičnih ljekovitih biljaka i njihova eterična ulja radi kontrole rasta patogenih mikroorganizama. Dokazano je da pojedine hlapljive komponente eteričnih ulja pojačavaju njihovo antimikrobno djelovanje zbog sinergijskog učinka, poput eteričnog ulja ružmarina gdje dolazi do sinergijskog učinka α -pinena i 1,8-cineola (Bhavaniramy i sur., 2019).

Biljni ekstrakti se često koriste kao dodaci prehrani zbog njihovih nutritivnih i ljekovitih svojstava. Istraživanja su pokazala da dodavanje biljnih eteričnih ulja i ekstrakata u prehrambene proizvode može pružiti antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje te utjecati na produženje trajnosti proizvoda. Učinci ovise o vrsti dodanih spojeva (Theivendran i sur., 2006).

Dodatci hrani, poznati kao aditivi, su tvari koje se namjerno dodaju hrani tijekom tehnoloških postupaka, kao što je na primjer konzerviranje hrane, a obično se ne konzumiraju samostalno kao hrana. Biljni pripravci, eterična ulja i izolirane komponente biljaka (kao što su pigmenti) mogu biti prikladna alternativa sintetskim aditivima (Bolouri

i sur., 2022). Brojna istraživanja su potvrdila da različite skupine biljaka sadrže spojeve koji imaju baktericidna i fungicidna svojstva te mogu poslužiti kao prirodni dodaci prehrani za sprječavanje kvarenja hrane i održivost namirnica. Također, ljekovite biljke su izuzetno snažni antioksidanasi. Uporaba prirodnih dodataka prehrani je danas sveprisutna u proizvodnji hrane, posebno u tehnologiji proizvodnje mesa i mesnih prerađevina, mliječnih i pekarskih proizvoda, te se koristi i kao sastojak jestivih ambalažnih filmova i punila u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Dodavanjem začinskih i ljekovitih biljaka u različite vrste proizvoda može se značajno poboljšati nutritivna kvaliteta proizvoda, a istovremeno povećati njihov ljekoviti potencijal i održivost (Zorić i sur., 2018).

Različite namirnice sadrže nutrijente u različitim količinama, što značajno utječe na antimikrobno djelovanje eteričnih ulja (Fisher i Phillips, 2006). U namirnicama bogatim masnoćama i uljima, eterična ulja pokazuju slabije antimikrobno djelovanje, dok su učinkovitija u namirnicama s visokim udjelom proteina. Također, niže pH vrijednosti hrane poboljšavaju njihov antimikrobni učinak, a njihova učinkovitost ovisi o temperaturi skladištenja, količini kisika i koncentraciji aktivnog sastojka (Tajkarimi i sur., 2010). Različite namirnice sadrže nutrijente u različitim količinama, što značajno utječe na antimikrobno djelovanje eteričnih ulja (Fisher i Phillips, 2006).

Kod mnogih ljekovitih i aromatičnih biljaka, poput kadulje i majčine dušice, istraživana su antimikrobna svojstva te je potvrđeno da mogu inhibirati rast gram-negativnih, gram-pozitivnih bakterija i kvasaca (Witkowska i sur., 2013). Ova je studija također potvrdila da su gram-pozitivne bakterije osjetljivije na antimikrobno djelovanje eteričnih ulja od gram-negativnih bakterija, kao već spomenuto istraživanje Gross-Bošković i sur. (2019).

Već godinama se provode istraživanja o antimikrobnom djelovanju različitih ljekovitih i začinskih biljaka i njihovih spojeva zbog toga što su bogati ekstraktima i eteričnim uljima s poznatom antimikrobnom aktivnošću (Ozcan i Chalchat, 2008). Koriste se kao različiti aditivi za produženje roka trajanja hrane i sprječavanje rasta mikroorganizama. Međutim, postoji veliki interes za korištenje alternativnih rješenja, a posebno prirodnih proizvoda, odnosno korištenja ljekovitih i začinskih biljaka (Huntanen, 1980; Marino i sur., 2001).

Munekata i sur. (2020) su pružili pregled istraživanja utjecaja eteričnih ulja protiv patogenih sojeva *Escherichia coli* u prehrambenim proizvodima. Rezultati pregleda pokazali su da eterična ulja imaju značajan potencijal u suzbijanju rasta *E. coli*, što je posebno važno za osiguranje sigurnosti hrane. Pregled je također istaknuo specifične

spojeve prisutne u eteričnim uljima odgovorne za antimikrobnu aktivnost poput timola, karvakrola i eugenola. U slučaju korištenja sub-minimalnih inhibitornih koncentracija eteričnih ulja protiv patogene *E. coli*, regulacija gena povezanih s virulencijom može se odvijati tijekom lag i eksponencijalne faze. Međutim, potrebno je više dokaza koji podupiru ovaj utjecaj/mehanizam budući da je ovaj učinak primijećen *in vitro* (medij kulture), a ne u prehranbenim sustavima. Dodatno, dobiven je suprotni rezultat između *in vitro* i prehranbenog sustava koji podržava hipotezu da matrica može igrati glavnu ulogu u primjeni eteričnih ulja za inhibiciju sinteze Shiga toksina. Što se tiče bakteriostatskog i baktericidnog učinka u prehranbenim sustavima, učinak je ovisio o sastavu eteričnih ulja, sastavu matrice hrane i uvjetima obrade. Važni izazovi u primjeni eteričnih ulja u slobodnom obliku mogu se nadmašiti ugradnjom u emulziju (kada se koristi kao dodatak hrani). Strategija koja najviše obećava za inhibiciju rasta patogene *E. coli* u hranidbenim matricama je oblaganje ili umatanje u film koji sadrži eterična ulja. Autori sugeriraju da bi eterična ulja mogla služiti kao efikasna, prirodna alternativa za sintetičke aditive, te potiču daljnja istraživanja kako bi se optimizirala njihova upotreba u različitim prehranbenim matricama.

Istraživanja su pokazala da eterično ulje lovora djeluje antimikrobno protiv nekih vrlo osjetljivih sojeva patogenih bakterija, bakterija i kvasaca (Fidan i sur., 2019). U Dalmaciji listove koriste kod konzerviranja i pakiranja suhog voća, naročito smokava, a ujedno je i repelent (Kuštrak, 2005; Grlić, 2005). Macchioni i sur. (2006) u svojim istraživanjima navode da eterično ulje lovora posjeduje akaricidno djelovanje protiv vrste *Psoraptres cuniculi*.

Brojna istraživanja pokazala su da se eterično ulje kadulje može koristiti za biološku kontrolu štetnika. Eterično ulje i ekstrakt kadulje ne mogu naštetiti korisnim kukcima, stoga je prihvaćena kao alternativna metoda u biološkoj kontroli (Larocque i sur., 1999). Kadulja preventivno djeluje u sprječavanju pojave štetnika u skladištenju mahunarki, stoga neki ljudi dodaju nekoliko listova prilikom skladištenja mahunarki kao repelent protiv štetnika u skladištu (Dal Bello i sur., 2001). Na takav se način sjemenke mahunarki dugoročno čuvaju zaštićene od napada štetnika, stoga je potvrđeno da se kadulja može koristiti za skladištenje sjemena (Altíndal i Altíndal, 2011). Brojna istraživanja navode kako kadulja, uz ostale pripadnike roda Lamiaceae može biti korištena u sprječavanju organske deterioracije u hrani (Nieto, 2017). Nadalje, dokazano je kako kadulja ima jak bakteriostatski i baktericidni učinak (Longaray Delamare i sur., 2007). Eterično ulje

kadulje ima jak antibakterijski učinak na bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, te da je zapaženo i virucidno djelovanje na *Herpesvirus simplex* (Pop i sur., 2013). Brojna istraživanja govore o tome kako eterično ulje ružmarina ima utvrđene antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti, pa su tako Gouveia i sur. (2016) proveli istraživanje o učinku eteričnih ulja u hrani, gdje je ružmarinovo antimikrobno djelovanje na *L. monocytogenes* trajalo do 14 dana.

Listovi biljaka poput kadulje, majčine dušice, origana i vlasca iz porodice *Lamiaceae* godinama se dodaju mesu, ribi i prehrambenim proizvodima. Osim što poboljšavaju okus, određeni začini i eterična ulja produljuju rok trajanja hrane zbog svoje antimikrobne aktivnosti (Farag i sur., 1989). Tijekom proizvodnog lanca, voće i povrće mogu biti kontaminirani u bilo kojem trenutku, uključujući proizvodnju, berbu, skladištenje i transport. Tijekom berbe, križna kontaminacija, odnosno prijenos bakterija ili drugih mikroorganizama s jedne sirovine na drugu, npr. voća i povrća, može se smanjiti pranjem proizvoda vodom i kemijskim dezinficijensima (Hoorfar, 2014).

Najčešći dezinficijensi koji se koriste tijekom pranja voća i povrća su klor i peroctena kiselina. Međutim, važno je imati na umu da ove kemikalije mogu biti štetne za površine koje dolaze u kontakt s hranom, poput nehrđajućeg čelika, ako se koriste u prevelikim količinama ili nepravilno rukuju. Također, ako se ne koristi u pravilnoj koncentraciji, može predstavljati rizik za zdravlje konzumenata, ali posebice radnika koji s njima rukuju (Banach i sur., 2015). Eterična ulja i njihovi aktivni sastojci, postali su alternativa kemijskim dezinficijensima za kontrolu križne kontaminacije u sustavima pranja nakon berbe. Pružaju novu, ekološki prihvatljivu metodu pranja svježeg voća i povrća s minimalnim utjecajem na okoliš (Maurya i sur., 2021).

Što se tiče prehrambene sigurnosti, mikroorganizmi i njima povezani toksini su glavni faktori koji dovode do značajnog kvarenja hrane i biodeterioracije zbog njihovog dugoročnog utjecaja duž lanca hrane i prehrambenog lanca. Osim izravnih zdravstvenih posljedica, kontaminacija hrane također može imati i ekonomske posljedice, uključujući gubitke u industriji hrane, troškove zdravstvene skrbi i izgublenu produktivnost. Postizanje prehrambene sigurnosti temelji se na pristupu, stabilnosti, uporabi i očuvanju hrane. Posebno je zabrinjavajuće što u nekoliko zemalja u razvoju prijavljen je gubitak od 25-30 % hrane zbog mikrobiološke kontaminacije (Bondi i sur., 2017).

Mikrobiološka kontaminacija hrane u različitim fazama proizvodnje i obrade može rezultirati raznim bolestima prenesenim hranom. Osim mikrobiološke kontaminacije, neki

bakterijski i gljivični patogeni poznati su po proizvodnji toksina koji unosom kontaminiranom hranom mogu izazvati ozbiljne bolesti. Mnogi od tih mikrobioloških toksina su termostabilne prirode i nisu uništeni visokim temperaturama tijekom kuhanja ili obrade hrane (Rajkovic, 2014), te mogu uzrokovati različite bolesti, uključujući trovanje hranom, botulizam, salmonelozu, stafilokokne infekcije i druge.

Bakterije mogu proizvoditi dvije glavne vrste toksina: endotoksine i egzotoksine. Egzotoksini su proteinski spojevi koji se izlučuju iz bakterijskih stanica i djeluju na okolne stanice i tkiva. Oni mogu uzrokovati širok spektar simptoma i bolesti kod ljudi. Primjeri bakterija koje proizvode egzotoksine uključuju *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Clostridium perfringens* (Rajkovic i sur., 2020), dok su endotoksini sastavni dijelovi stanične stijenke gram-negativnih bakterija, poput lipopolisaharida (LPS). Kada se bakterijske stanice razgrade ili unište, endotoksini se oslobađaju i mogu uzrokovati imunološke reakcije kod domaćina. Endotoksini su često manje specifični u svom djelovanju i mogu izazvati šok i upalne reakcije kod domaćina (Rešetar i sur., 2015).

Kontroli mikrobne kontaminacije hrane značajno su doprinijeli različiti kemijski konzervansi poput sulfita, natrijevog nitrita, klorida, natrijevog benzoata, kalijevog sorbata, sulfita, triklosana, kalijevog laktata i sl. (Gutiérrez-del-Río i sur., 2018). Međutim, ovi kemijski konzervansi su izazvali negativne zabrinutosti kod potrošača zbog njihovih dugotrajnih ciklusa degradacije, toksičnosti za okoliš, ponovnog pojavljivanja štetnika i potencijalnih rizika od karcinogeneze i teratogeneze kod ljudi i životinja (Basak i Guha, 2018; Falleh i sur., 2020). Stoga, biljni konzervansi, posebno eterična ulja i njihovi aktivni sastojci dobiveni iz aromatičnih i ljekovitih biljaka, privlače sve veću pažnju u prehrambenoj industriji zbog širokog spektra antibakterijskih, antifungalnih i antioksidacijskih svojstava.

Eterična ulja ekstrahirana iz biljaka smatraju se inhibitorima rasta ljudskih patogena, kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Mycobacterium sp.* i *Vibrio vulnificus*. Među nekoliko aromatičnih biljaka s antimikrobnim djelovanjem istaknute su one iz porodice Lamiaceae, poput *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* i *Salvia officinalis* (Pierozan i sur., 2009).

Eterična ulja mogu biti potencijalna antimikrobna strategija protiv bakterija koje su otporne na antibiotike, poput *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Lu i sur., 2018). Zahvaljujući svojoj hidrofobnoj prirodi,

eterična ulja učinkovito prodiru kroz lipidni dvosloj bakterijske stanične membrane, ometajući transport iona, propuštajući stanične materijale, mijenjajući protok elektrona posredovan silom protona i naposljetku dovodeći do stanične smrti (Burt, 2004, Vasconcelos i sur., 2018).

Među glavnim uzročnicima bolesti prenesenih hranom, *Escherichia coli* se ističe zbog učestalih epidemija svake godine. *Escherichia coli* je patogen koji se povezuje s uzročenjem višestrukih epidemija u zadnjih nekoliko desetljeća povezanih s raznim gotovim jelima ako što su klice češnjaka, mljeveno meso bizona, salata od piletine, odresci od govedine, sirovi mliječni sir i umak od morskih plodova (Koutsoumanis i sur., 2020). Nedavna istraživanja su pokazala povećanje zagađenosti ovom bakterijom u svježem voću i povrću te fermentiranim namirnicama, što predstavlja zabrinutost za prehrambenu industriju (Braïek i Smaoui, 2019; Bai i sur., 2021). Konzumiranje kontaminirane hrane s patogenom *E. coli* može uzrokovati proljev, povraćanje i postojani proljev, kao i ozbiljnije posljedice poput hemoragičnog kolitisa, završne bubrežne bolesti i u nekim slučajevima hemolitičkog uremijskog sindroma.

Nedavna istraživanja su pokazala da se primjenom eteričnih ulja može spriječiti sinteza toksina i proliferacija *E. coli* u prehrambenim sustavima. Osim toga, strategija koja se koristi za primjenu eteričnih u hrani igra ključnu ulogu u sprečavanju razvoja *E. coli*. Upotreba eteričnih ulja može biti vrijedna strategija za sprječavanje kontaminacije hrane patogenom *E. coli*. Eterična ulja sadrže prirodne spojeve s antimikrobnim svojstvima koji mogu inhibirati rast mikroorganizama i smanjiti rizik od bolesti izazvanih hranom.

Uključivanjem eteričnih ulja u materijale za pakiranje hrane ili upotrebom kao prirodnih konzervansa u prehrambenim proizvodima, moguće je stvoriti dodatnu barijeru protiv patogenih bakterija i produljiti rok trajanja hrane. Međutim, prije upotrebe eteričnih ulja kao strategije sigurnosti hrane, važno je pažljivo procijeniti njihovu sigurnost i učinkovitost. Na ovaj način može se smanjiti potreba za kemijskim konzervansima, ali su i dalje potrebna daljnja istraživanja kako si se optimizirala upotreba eteričnih ulja u materijalima za pakiranje hrane i osigurala njihova sigurnost i učinkovitost (Munekata i sur., 2020).

Radi poboljšanja zaštite protiv rasta i proizvodnje toksina patogenih *E. coli* i drugih mikroorganizama, prehrambena industrija koristi antimikrobne spojeve (prehrambene konzervanse). Ti spojevi su ograničeni na određene granice zbog mogućih zdravstvenih rizika (Younes i sur., 2019).

Učinkovitost eteričnih ulja kao antimikrobnih sredstava u prehrambenim proizvodima opisana je u nekoliko studija protiv raznih mikroorganizama koji uzrokuju propadanje hrane i bolesti: meso i proizvodi od mesa (Aminzare i sur., 2016), mliječni proizvodi (Gouvea i sur., 2017), riba i riblji proizvodi (Hassoun i sur., 2017) i povrće (Prakash i sur. 2018.). Osim toga, eterična ulja imaju potencijal u borbi protiv raka (podržano *in vivo* studijama) (Sharifi-Rad i sur., 2018) i smatraju se općenito prepoznatima kao sigurne (GRAS).

Korištenje eteričnih ulja na razini minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) može uzrokovati značajan učinak na stanice *E. coli*. Mnoga istraživanja ističu da su morfološke promjene u membrani glavni i najznačajniji baktericidni učinak na *E. coli* uzrokovan primjenom eteričnih ulja. Kada se eterična ulja primijene, dolazi do promjena u strukturi i funkcionalnosti membrane bakterijske stanice. Ove promjene mogu uključivati oštećenje ili destabilizaciju membrane, što rezultira gubitkom integriteta membrane i propuštanjem unutarstaničnih tvari iz stanice. Kao rezultat toga, vitalni metabolički procesi unutar stanice mogu biti narušeni, što dovodi do inhibicije rasta i reprodukcije bakterija te, u konačnici, njihovog uništenja (Bajpai i sur., 2013; Patra i sur. 2015).

Kada su izložene eteričnim uljima, stanice *E. coli* mogu prolaziti kroz morfološke promjene koje uključuju oticanje i deformaciju. Karakteristični oblik štapića s ravnim površinama može se transformirati u difuzan i neujednačen oblik. Drugim riječima, integritet se postupno smanjuje, a stanice počinju oticati. U takvom stanju dolazi do izbacivanja intracelularnih komponenti, a daljnje izlaganje stanica učincima eteričnih ulja dovodi do kolapsa površine i liziranja stanica (Bajpai i sur., 2013).

Studija koju su proveli Moghimi i sur. (2016) istraživala je utjecaj nanoemulzifikacije eteričnog ulja *Thymus daenensis* na patogeni soj *E. coli*. Rezultati su pokazali da nanoemulzificirano ulje na razini minimalne inhibitorne koncentracije (0,4 mg/ml) značajno poboljšava ispuštanje intracelularnih komponenata (nukleinske kiseline, proteina i kalija) u usporedbi sa slobodnim uljem na razini MIC-a (4,0 mg/ml). Ta razlika povezana je s intenzivnom deformacijom i oštećenjem membrane *E. coli* tretirane nanoemulzificiranim uljem. Nasuprot tome, primijećeno je samo blago skupljanje kada je *E. coli* izložen slobodnom ulju. Ovi rezultati naglašavaju važnost nanoemulzifikacije eteričnih ulja kao potencijalne strategije za poboljšanje njihove učinkovitosti u inhibiciji rasta patogenih bakterija poput *E. coli*. Nanoemulzije omogućuju bolju penetraciju i interakciju eteričnih ulja s bakterijskim stanicama, što rezultira intenzivnijim oštećenjem membrane i inhibicijom rasta bakterija. Također je važno spomenuti da baktericidni učinak

eteričnih ulja na patogeni soj *E. coli*, također može biti pod utjecajem fiziološkog stanja mikroorganizma (Sharifi-Rad i sur., 2016).

Studije koje su proveli Van Haute i suradnici (2016) te Karam i suradnici (2019) ukazuju na potencijalnu primjenu eteričnih ulja u marinadama kako bi se poboljšala sigurnost svježeg pilećeg mesa od *E. coli*. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da mariniranje mješavinom timola i karvakrola kao rezultat ima smanjenje broja *E. coli* za 0,8 log CFU/g nakon 21 dana skladištenja. U istom smjeru, Van Haute i sur. (2016) nisu primijetili nikakav utjecaj na broj *E. coli* na koži pilećeg mesa mariniranog s eteričnim uljima cimeta, origana i majčine dušice.

Uključivanje eteričnih ulja u premaze i filmove je zanimljiv pristup koji može poboljšati sigurnost protiv *E. coli*. Uključivanje eteričnog ulja anisa (1; 1,5 i 2 %) u jestivi hitosan film izazvalo je smanjenje broja ispod granice detekcije metode ove bakterije u pilećem hamburgeru nakon tri dana skladištenja (Mahdavi i sur., 2018). Sličan učinak je zabilježen kada su autori koristili hitosan film s 0,5 % eteričnog ulja anisa. U ovom tretmanu, smanjenje broja *E. coli* O157:H7 ispod granice detekcije postignuto je nakon šest dana skladištenja.

Abdeldaiem i sur. (2017) su proučavali upotrebu eteričnih ulja ružmarina, cimeta, komorača i kardamoma u sprječavanju proliferacije *E. coli* u ribljim štapićima od šarana. Autori su primijetili da se inhibicijski učinak postiže za sva testirana eterična ulja, posebno u prvih šest dana skladištenja na 4 °C.

Kavas i sur. (2015) uočili su značajan pad broja *E. coli* O157: H7 u polutvrdom turskom siru proizvedenom s eteričnim uljima majčine dušice i karanfilića (1,5 %) tijekom 60 dana hlađenja. Nadalje, eterično ulje majčine dušice je pokazalo veći antimikrobni učinak od eteričnog ulja klinčića. Kavas i sur. (2015) u svojim istraživanjima također navode zaključke o učinku đumbirovog eteričnog ulja (1,5%) protiv *E. coli* O157:H7, a smanjenje je bilo 4,2 log CFU/g nakon 30 dana skladištenja u usporedbi s netretiranim uzorcima.

Za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa* kod kritičnih pacijenata često je potrebna primjena više antibiotika u velikim količinama. Primjena visokih doza antibiotika u kliničkom okruženju, zajedno s njihovom upotrebom u nekim poljoprivrednim i stočarskim objektima, stvara veliki pritisak na selekciju sojeva bakterija otpornih na antibiotike (Pruden i sur., 2006). Velike količine antibiotika otpuštaju se u otpadne vode bolnica i gradova zbog nepotpunog metabolizma u ljudi i životinja ili zbog nepravilnog odlaganja neiskorištenih lijekova (Nagulapally i sur., 2009). Te tvari

naposljetku završavaju u različitim prirodnim okolišnim komponentama (Van i sur., 2022; (Zhang i sur., 2009; Li i sur., 2015; Karkman i sur., 2018; Savin i sur., 2021). Svi ti faktori stvaraju visoki selektivni pritisak za razvoj bakterijskih sojeva koji su otporni na više antibiotika i podupiru povećane stope otpornosti (Kunhikannan i sur., 2021). Zbog visokih stopa otpornosti na antibiotike, hitno su potrebna alternativna rješenja za teško lječive infekcije uzrokovane otpornim sojevima *P. aeruginosa*.

U posljednjih nekoliko godina znanstvenici su istraživali alternativne fizičke, kemijske ili biološke načine borbe protiv otpornog soja *P. aeruginosa*, kao što su: modulatori virulencije (uključujući inhibitore formiranja biofilma), antimikrobna cjepiva, genetski modificirane bakterije, bakteriofagi, eterična ulja i njihovi spojevi dobiveni iz biljaka i druge metode uklanjanja mikroorganizama (Zarif i sur., 2021).

U dosadašnjim su istraživanjima predstavljeni brojni prirodni i sintetski spojevi za modulaciju rasta i virulencije *P. aeruginosa*, patogen koji je također poznat po svojoj sposobnosti razvijanja biofilma i visokoj toleranciji na antimikrobne tvari i imunološki sustav domaćina (Hamad i sur., 2020). Ekstrakti raznih prirodnih proizvoda i eterična ulja određenih biljaka (poput lavande, eukaliptusa i agruma) pokazali su inhibicijske učinke protiv rasta i virulencije soja *P. aeruginosa* (Davis i sur., 2009; Winska i sur., 2019).

Studija Van i suradnika (2022) ukazuje na potencijalnu primjenu eteričnih ulja u kontroli formiranja biofilma od *P. aeruginosa*, čak i kada se koriste u subinhibicijskim koncentracijama. Biofilmovi su kompleksne strukture koje bakterije stvaraju kako bi se zaštitile od vanjskih utjecaja, uključujući antimikrobne tvari, što ih čini otpornijima na liječenje i često su povezani s kroničnim infekcijama. Ovi rezultati sugeriraju da bi eterična ulja mogla biti korisna u kontroli formiranja biofilma *Pseudomonas aeruginosa*, što bi moglo biti važno za prevenciju infekcija i smanjenje virulencije ovog patogena. Osim toga, ova istraživanja naglašavaju potencijalnu primjenu eteričnih ulja kao ekoloških i održivih alternativa za kontrolu različitih infekcija, uključujući one koje uzrokuju otporni patogeni.

Stafilokokna bolest uzrokovana hranom jedna je od najčešćih prehrambenih bolesti na svijetu koja proizlazi iz kontaminacije hrane preformiranim enterotoksinima *S. aureusa*. To je jedan od najčešćih uzroka prijavljenih prehrambenih bolesti u Sjedinjenim Državama. Istraživanja su pokazala su da neprikladno rukovanje hranom u maloprodaji čini većinu epidemija stafilokokne bolesti uzrokovane hranom. Međutim, nekoliko studija dokumentiralo je prevalenciju *S. aureusa* u mnogim prehrambenim proizvodima, uključujući sirovo meso u maloprodaji, što ukazuje na potencijalni rizik od kolonizacije *S. aureusa* i naknadne infekcije kod potrošača. Prisutnost patogena u prehrambenim

proizvodima predstavlja potencijalnu opasnost za potrošače i uzrokuje ozbiljne ekonomske gubitke te smanjenje produktivnosti ljudi kroz prehrabene bolesti. Simptomi stafilokokne bolesti uzrokovane hranom uključuju mučninu, povraćanje i grčeve u trbuhu s ili bez proljeva. Preventivne mjere uključuju sigurno rukovanje i obradu hrane, održavanje hladnog lanca, adekvatno čišćenje i dezinfekciju opreme, sprječavanje križnog onečišćenja kod kuće i u kuhinji, te sprečavanje onečišćenja od farme do stola (Kadariya i sur., 2014).

S. aureus je komensalni i oportunistički patogen koji može uzrokovati širok spektar infekcija, od površinskih infekcija kože do teških i potencijalno smrtonosnih invazivnih bolesti (Lowy, 1998). Ova uobičajena bakterija je važan patogen zbog kombinacije "toksinom posredovane virulencije, invazivnosti i otpornosti na antibiotike". Ovaj organizam se pojavio kao glavni patogen za nosokomijalne i zajednički stečene infekcije. *S. aureus* ne formira spore, ali može uzrokovati kontaminaciju proizvoda tijekom pripreme i obrade hrane.

S. aureus je organizam otporan na dehidraciju s mogućnošću preživljavanja u potencijalno suhim i stresnim okruženjima, kao što su ljudski nos i koža te neživi predmeti kao što su odjeća i površine (Chaibenjawong, 2011). *S. aureus* može ostati sposoban za život na rukama i okolišnim površinama nakon početnog kontakta na dulje vrijeme (Scott i sur., 1990; Kusumaningrum i sur., 2002). Ove karakteristike pogoduju rastu organizma u mnogim prehrambenim proizvodima (Loir i sur., 2003).

Bacillus vrste, poput *Bacillus cereus*, predstavljaju izazov u prehrambenoj industriji zbog njihove sposobnosti da uzrokuju kontaminaciju i kvarenje hrane. Ove bakterije su aerobne, sporulirajuće i štapičaste, a spore mnogih *Bacillus* vrsta su otporne na različite uvjete, uključujući toplinu, zračenje, dezinfekcijska sredstva i dehidraciju, što ih čini teškim za eliminaciju iz prehrambenih proizvoda i okoliša. *Bacillus cereus*, primjerice, može uzrokovati trovanje hranom putem toksina koji se proizvode u hrani tijekom rasta bakterija. Simptomi trovanja hranom ovom bakterijom mogu se pojaviti nakon konzumiranja kontaminirane hrane poput mesnih i povrtnih jela, umaka, tjestenine, deserta i mliječnih proizvoda. Iako su toksini povezani s *Bacillus cereusom* identificirani, još uvijek nisu identificirani toksini za druge *Bacillus* vrste koje mogu uzrokovati trovanje hranom (Kramer i Gilbert, 1989). S obzirom na njihovu sposobnost kontaminacije i izazivanja trovanja hranom, važno je pravilno rukovati, skladištiti i pripremati hranu kako bi se smanjio rizik od kontaminacije.

U usporedbi s drugim istraživanjima, provedeno istraživanje stavlja naglasak na potencijal primjene eteričnih ulja kao prirodnih antimikrobnih sredstava, što je posebno

važno u svjetlu rastuće opornosti na antibiotike. Daljnja istraživanja trebala bi uključivati optimizaciju uvjeta za destilaciju i ekstrakciju u svrhu postizanja maksimalne učinkovitosti i kvalitete eteričnih ulja. Poželjno bi bilo uključiti detaljniju analizu kemijskog sastava eteričnih ulja, kao i ispitivanje njihove učinkovitosti i sigurnosti u različitim primjenama kako u medicini tako i u prehrambenoj industriji, što bi moglo dodatno potvrditi rezultate ovog istraživanja i pružiti dodatne informacije o optimalnim uvjetima za destilaciju i ekstrakciju eteričnih ulja. Dublje istraživanje kemijskog sastava eteričnih ulja omogućilo bi identifikaciju najaktivnijih antibakterijskih spojeva. Provedeno istraživanje pruža ukazuje na značajan potencijal eteričnih ulja iz odabranih mediteranskih biljaka kao prirodnih antibakterijskih sredstava. U kontekstu rastuće otpornosti na konvencionalne antibiotike, eterična ulja mogu pružiti održivu alternativu za prevenciju bakterijskog zagađenja hrane.

5. ZAKLJUČCI

Analizom ovog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- prinosi eteričnih ulja dobivenih destilacijom vodenom parom u mini destileriji su bili različiti: ružmarin, kadulja i lovor dali su po 3 ml eteričnog ulja (5 % prinosa), dok je smilje imalo prinos od svega dvije kapi ulja (< 1 % prinosa).
- temperature isparavanja eteričnog ulja bile su stabilne i kretale su se oko 90 °C za sve analizirane biljke, što ukazuje na konzistentnost procesa destilacije.
- proces destilacije trajao je oko 2 sata, što se pokazalo učinkovitim za dobivanje eteričnih ulja iz analiziranih biljaka.
- omjer količine biljnog materijala i dobivenog hidrolata bio je 1:20.
- utvrđene su statistički značajne razlike u antibakterijskoj aktivnosti dobivenih eteričnih ulja protiv ispitivanih sojeva *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*.
- među ispitivanim eteričnim uljima, ulje kadulje je pokazalo najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju protiv sva četiri ispitivana soja (0,48828 µl/ml protiv soja *Pseudomonas aeruginosa*, te 0,12207 µl/ml protiv ostalih sojeva).
- najviša minimalna inhibitorna koncentracija utvrđena je za eterično ulje smilja protiv soja *Staphylococcus aureus* (62,5 µl/ml).

Mini destilerija je pokazala zadovoljavajuću učinkovitost u destilaciji ljekovitog bilja, a utvrđene antibakterijske aktivnosti su u skladu s očekivanjima i potencijalno pružaju mogućnosti za primjenu u prehrambenoj industriji u svrhu poboljšanja sigurnosti hrane. Razlike u kemijskom sastavu i uvjeti eksperimenata mogu utjecati na antibakterijsku aktivnost, stoga su potrebna daljnja istraživanja za detaljniji uvid u kemijski sastav i mehanizme djelovanja eteričnih ulja.

Primjena ovih prirodnih antimikrobnih agensa može doprinijeti smanjenju rizika od kontaminacije hrane bakterijskim patogenima, što je ključno za očuvanje zdravlja potrošača. Osim toga, korištenje prirodnih antimikrobnih sredstava može biti poželjnija opcija u odnosu na sintetičke konzervanse, posebno s obzirom na rastuću svijest o potrebi za prirodnim i ekološki prihvatljivim proizvodima. Stoga, rezultati ovog istraživanja pružaju korisne smjernice za potencijalnu primjenu eteričnih ulja u industriji hrane kao sigurnih i učinkovitih antimikrobnih sredstava. Iako su ova eterična ulja prirodna i imaju

manje nuspojava od sintetičkih antibiotika, potrebno je provesti daljnja istraživanja o njihovoj sigurnosti i učinkovitosti u prevenciji bakterijskog zagađenja hrane. Primjena eteričnih ulja smilja, lovora, ružmarina i kadulje u hrani može biti korisna kao prirodni konzervansi koji produžuju rok trajanja hrane i smanjuju rizik od bakterijskog zagađenja. Međutim, prije upotrebe bilo kojeg eteričnog ulja u hrani, potrebno je provjeriti njegovu sigurnost i pravilnu dozu, jer prekomjerna upotreba može dovesti do toksičnosti. U konačnici, ovo istraživanje može dati temelj za razvoj novih prirodnih antimikrobnih sredstava koja se mogu koristiti u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija, što je važno s obzirom na rastuću otpornost bakterija na sintetičke antibiotike. Budući da se sve više ljudi okreće prirodnom načinu života i prehrane, eterična ulja smilja, lovora, ružmarina i kadulje mogu biti korisna u različitim primjenama u prehrambenoj industriji, uključujući i proizvodnju organske hrane. Ovakva istraživanja mogu također biti korisna za razvoj novih terapija za liječenje bakterijskih infekcija, posebno za one bolesnike koji ne podnose sintetičke antibiotike ili koji su razvili otpornost na njih. Uzimajući u obzir da su bakterijske infekcije jedan od najčešćih uzroka bolesti i smrti u svijetu, istraživanja koja proučavaju antibakterijska svojstva prirodnih tvari, poput eteričnih ulja, imaju veliku važnost u razvoju novih strategija protiv otpornosti na antimikrobna sredstva. Osim toga, važno je istaknuti ulogu očuvanja prirodnog okoliša. S obzirom na izvrsne uvjete za uzgoj ljekovitog bilja u Republici Hrvatskoj, korištenje biljnih resursa poput smilja, lovora, ružmarina i kadulje za proizvodnju eteričnih ulja podsjeća nas na važnost očuvanja prirode. Promicanje održive proizvodnje hrane koja uključuje korištenje prirodnih sastojaka ne samo da podržava zdravlje ljudi, već i pridonosi zaštiti okoliša i biološke raznolikosti. Ukupno gledajući, ova istraživanja imaju širok spektar potencijalnih koristi, od medicinske primjene do održivosti okoliša, ističući važnost interdisciplinarnog pristupa u rješavanju globalnih izazova.

6. LITERATURA

Abdeldaiem MHM, Ali HGM, Hassanien MFR. 2017. Impact of different essential oils on the characteristics of refrigerated carp (*Cyprinus carpio*) fish fingers. *J Food Meas Charact* 11(3)

Aćimović MG, Tešević VV, Smiljanić KT, Cvetković MT, Stanković JM, Kiprovska BM, Sikora VS. 2020. Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced Technologies* 9 2:54-70.

Aćimović M, Zeremski T, Šovljanski O, Lončar B, Pezo L, Zheljzkov VD, Pezo M, Šuput D, Kurunci Z. 2022. Seasonal Variations in Essential Oil Composition of Immortelle Cultivated in Serbia. *Horticulturae* 8(12):1183.

Adams MR, Moss MO. 2008. Food microbiology. 3rd edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 463 p.

Al-Abri SS, Said SA, Al Touby SS, Hossain MA, Al-Sabahi JN. 2022. Composition analysis and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Laurus nobilis* grown in Oman. *J Bioresour Bioprod* 7(4):328-334.

Alessi N, Wellstein C, Spada F, Zerbe S. 2021. Population structure of *Laurus nobilis* L. in Central Italian forests: evidence for its ongoing expansion. *Rend Fis Acc Lincei* 32:1-12.

Aljaafari MN, AlAli AO, Baqais L, Alqubaisy M, AlAli M, Molouki A, Ong-Abdullah J, Abushelaibi A, Lai K-S, Lim S-HE. 2021. An Overview of the Potential Therapeutic Applications of Essential Oils. *Molecules* 26, 628.

Altındağ D, Altındağ N. 2011. The effects of sage volatile oil (*Salvia officinalis*) and Turkish oregano volatile oil (*Origanum onites*) on stored cowpea (*Vigna sinensis* L.) seed. *J Med Plants Res* 5 20:5017–5020.

Ameer MA, Wasey A, Salen P. 2024. *Escherichia coli* (e Coli 0157 H7), in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Aminzare M, Hashemi M, Hassanzad Azar H, Hejazi J. 2016. The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: A review. *J Hum Environ Health Promot* 1:63–74.

Anderberg AA. 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribe *Gnaphalieae* (Asteraceae). *Opera Bot* 104:1-195.

Bai X, Nakatsu CH, Bhunia AK. 2021. Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. *Foods* 10 9:2117.

Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Ind Crops Prod* 107:305–311.

- Bajpai VK, Sharma A, Baek KH. 2013. Antibacterial mechanism of action of *Taxus cuspidata* stem essential oil against selected foodborne pathogens. *J Food Saf* 33:348–359.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475.
- Banach JL, Sampers I, Haute SV, van der Fels-Klerx HJ. 2015. Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *Int J Env Res Pub He* 12 8:8658-8677.
- Baratta MT. 1998a. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J Essent Oil Res* 10 6:618-627.
- Baratta MT. 1998b. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr J* 13 4:235-244.
- Barčić D, Habjanec V, Španjol Ž, Šango M. 2021. Analiza podizanja vjetrozaštitnih pojasa na mediteranskom kršu Hrvatske. *Šumarski list* 145 3-4:175-183.
- Basak S, Guha P. 2018. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *J Food Sci Technol* 55: 4701–4710.
- Bédard E, Prévost M, Déziel E. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen*, 5(6), 937–956.
- Bedenić B. 2009. Antibakterijski lijekovi. *Medicinska mikrobiologija*. Štamparija Fojnica, Zenica. BiH. 221-252 str.
- Begum A, Sandhya S, Shaffath Ali S, Ravindran Vinod K, Reddy S, Banji D. 2013. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci Pol Technol Aliment* 12:61-73.
- Beljo J, Barbarić M, Čagalj M, Duranović A, Filipović A, Ivanković M, Kohnić A, Mandić A, Leko M, Prlić M, Rajić M, Ostojić I, Trkulja V. 2016. Ekološka proizvodnja smilja i eteričnog ulja-dosadašnje spoznaje. *Algoritam Stanek, Mostar; Algoritam, Zagreb*. 69-80 str.
- Benelli G, Giordani C, Pavela R, Casettari L. 2018. Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Ind Crops Prod* 112, 668-680.
- Benelli G, Canale A, Conti B. 2014. Eco-friendly Control Strategies Against the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Repellency and Toxic Activity of Plant Essential Oils and Extracts. *Pharmacology online* 1, 44-51.

- Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications. *Grain Oil Sci Technol* 2:49–55.
- Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF. 2001. Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). *Flavour Frag J* 16:30-34.
- Bilandžija B, Bilandžija L, Pollak L, Inić S. 2023. Metode dobivanja i parametri procjene kakvoće eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja. *Kem Ind* 72 (1-2) 45-54.
- Blažeković N, Petričić J, Stanić G, Maleš Ž. 1995. Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast. *Acta Pharm* 45:517–522.
- Bolouri P, Salami R, Kouhi S, Kordi M, Asgari Lajayer B, Hadian J, Astatkie T. 2022. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules* 27, 8999.
- Bondi M, Lauková A, de Niederhausern S, Messi P, Papadopoulou C. 2017. Natural preservatives to improve food quality and safety. *J Food Qual* 1090932.
- Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. 2019. *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol* 229:29-45.
- Bouaziz M, Yangui T, Sayadi S, Dhouib A. 2009. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food Chem Toxicol* 47: 2755-2760.
- Bouzouita N, Chaabouni MM, Nafti A, Lognay G. 2001. Chemical Composition of *Laurus nobilis* Oil from Tunisia. *J Essent Oil-Bear Plants* 13(2):116-117.
- Bozin B, Mimica-Dukić N, Samojlik I, Jovin E. 2007. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J Agric Food Chem* 55 19:7879–7885.
- Braïek O, Smaoui S. 2019. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Res Int* 1-13.
- Braun NA, Kohlenberg B, Manfred M, Hammerschmidt FJ. 2001. δ -Terpinyl Acetate. A New Natural Component from the Essential Leaf Oil of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) *J Essent Oil Res* 13(2):95-97
- Britvec M, Bogdanović S, Ljubičić I, Vitasović Kosić I. 2015. Rijetke biljke jadranskog priobalja. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. 213 str.
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620-630.

- Budimir A, Bošnjak Z, Kalenić S. 2012. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) u Hrvatskoj. Infektološki glasnik 32 2:59-66.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. Int J Food Microbiol 94 3:223-253.
- Burčul F. 2014. Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Doktorski rad.
- Butnariu M, Sarac I. 2018. Essential Oils from Plants. J Biotech Biomed Sci 1 4:35-43.
- Caredda A, Porcedda S, Marongiu B, Soro C. 2002. Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of *Laurus nobilis* Essential Oil. J Agric Food Chem 50(6):1492-6.
- Carpena M, Nuñez-Estevez B, Soria-Lopez A, Garcia-Oliveira PN, Prieto MA. 2021. Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. Resources 10 1:7.
- Chaibenjawong P, Foster SJ. 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. Arch Microbiol 193 2:125–135.
- Chaudhari AK, Singh VK, Das S, Prasad J, Dwivedy AK. 2020. Improvement of in vitro and in situ antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative. Food Chem Toxicol 143:111536.
- Cherednyk T, Starkova O. 2017. Bacteria - the Workhorses of Biotechnology. Presented at the Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution : 83 International scientific conference of young scientist and students, Book of abstract. - Kyiv : NUFT, 145 str.
- Christaki E, Giannenas I, Florou-Paneri PC, Bonos E. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. Agriculture 2(4):228-243.
- Clapham AR. 1976. Helichrysum Miller in: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (Ur.) Flora Europaea Vol. 4 Cambridge University Press, Cambridge, UK, 128-131 str.
- Combes C, Legrix M, Rouquet V, Rivoire S, Grasset S, Cenizo V, Moga A, Portes P. 2017. *Helichrysum italicum* essential oil prevents skin lipids peroxidation caused by pollution and UV. J Invest Dermatol 137 (10) S221.
- Conti B, Canale A, Bertoli A, Gozzini F, Pistelli L. 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 107 6:1455-61.
- Craft JD, Satyal P, Setzer WN. 2017. The Chemotaxonomy of Common Sage (*Salvia officinalis*) Based on the Volatile Constituents. Medicines 4(3):47.

- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26(4), 822–880.
- Ćavar Zeljković S, Šolić ME, Maksimović M. 2015. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. Nat Prod Res 29 19:1874-1877.
- D'Amato S, Serio A, Lopez CC, Paparella A. 2018. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. Food Control 86:126–137.
- Davis SC, Perez R. 2009. Cosmeceuticals and natural products: Wound healing. Clin Dermatol 27:502–506.
- Dal Bello G, Padin S, Lopez Lastra C, Fabrizio M. 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J Stored Prod Res 37, 77-84.
- Debeaufort F, Quezada-Gallo JA, Voilley A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 38(4):299-313.
- Djihane B, Nouioua W, Soltani E, De Haro JP, Esteban MA, Zerroug MM. 2017. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (roth) g. don essential oil and their antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. Saudi Pharm J 25(5):780-787.
- Domac R. 1994. Flora Hrvatske - Priručnik za određivanje bilja. Školska knjiga, Zagreb.
- Drapeau J, Touraud D, Fröhler C, Gordon U. 2009. Repellent studies with *Aedes aegypti* and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. Flavour Fragr J 24(4):160-169.
- Drew BT, Sytsma KJ. 2012. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe *Menthae* (Lamiaceae). Am J Bot 9 5:933-953.
- Dubravec KD, Dubravec I. 2001. Biljne vrste livada i pašnjaka. Školska knjiga, Zagreb.
- Dubravec KD. 1996. Botanika, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Duraković S, Redžepović S. 2005. Bakteriologija u biotehnologiji, knjiga druga – I. dio. Kugler, Zagreb.
- Duraković S. 1991. Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb.
- Đukić DA, Jemcev VT, Kuzmanova J. 2007. Biotehnologija zemljišta. Štamparija Budućnost AD, Novi Sad. Srbija. 509 str.
- Ed-Dra A, Nalbone L, Rhazi Filali F, Trabelsi N, Oulad El Majdoub Y, Bouchrif B, Giarratana F. 2021. Comprehensive evaluation on the use of *Thymus vulgaris* essential oil as natural additive against different serotypes of *Salmonella enterica*. Sustainability. 13(8):4594.

- Ekor M. 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 10;4:177.
- Erbaş S, Erdoğan Ü, Mutlucan M. 2023. The scent compounds of immortelle ecotypes (*Helichrysum italicum* (roth) g. don.) grown in Türkiye and its new products (absolute and concrete). *South Afr J Bot* 158:301-311.
- Falleh H, Jemaa MB, Saada M, Ksouri R. 2020. Essential oils: a promising eco-friendly food preservative. *Food Chem* 330:127268.
- Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Protect* 52:665–667.
- Fedorenko V, Genilloud O, Horbal L, Marcone GL, Marinelli F, Paitan Y, Ron EZ. 2015. Antibacterial Discovery and Development: From Gene to Product and Back. *Biomed Res Int* 2015, 591349.
- Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, Zheljaskov VD. 2019. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules* 24(4):804.
- Fisher K, Phillips CA. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol* 101:1232-1240.
- Food and Drug Administration. 2022. Substances affirmed as generally recognized as safe in food. In Code of Federal Regulations (21 CFR Part 184). U.S. Government Printing Office.
- Galbany-Casals M, Saez L, Benedi C. 2006. A taxonomic revision of *Helichrysum sect. Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Can J Bot* 84:1203-1232.
- Galbany-Casals M, Blanco-Moreno JM, Breitwieser I. 2011. Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin?. *Plant Biology*, 13(4), 678-687.
- Galle TK. 2001. Hrvatsko ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Galić K. 2009. Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (1-2), 23-31.
- Gelenčir J, Gelenčir J. 1991. Atlas ljekovitog bilja, Zagreb.
- Genčić MS, Aksić J M, Živković Stošić MZ, Randjelović PJ, Stojanović NM, Stojanović-Radić ZZ, Radulović NS. 2021. Linking the antimicrobial and anti-inflammatory effects of immortelle essential oil with its chemical composition – The interplay between the major and minor constituents. *Food Chem Toxicol* 158, 112666.

- Gismondi A, Di Marco G, Canini A. 2020. *Helichrysum italicum* (roth) g. don essential oil: composition and potential antineoplastic effect. *South Afr J Bot.* 133:222-226.
- Glavaš M. 2019. Enciklopedija domaćeg ljekovitog bilja. Naklada Ceres, Zagreb.
- Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede u 2022. Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za poljoprivrednu politiku, EU i međunarodnu suradnju, Zagreb.
- Gouvea FDS, Rosenthal A, Ferreira EHDR. 2017. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: A review. *Ciência Rural* 47:e20160908.
- Gouveia AR, Alves M, Silva JA, Saraiva C. 2016. The Antimicrobial Effect of Rosemary and Thyme Essential Oils Against *Listeria Monocytogenes* in Sous Vide Cook-chill Beef During Storage. *Procedia Food Sci* 7:173-176.
- Gračanin Z. 1952. Pedološka studija Arboretuma Trsteno. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb.
- Grlić Lj. 2005. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Ex Libris, Rijeka.
- Greguraš D. 2013. Genetic diversity and population structure of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Doktorski rad.
- Gross-Bošković A, Stražanac D, Sokolić D, Petričević S, Bogdanović T. 2019. Upotreba, značaj i kontaminanti u začinima i začinskom bilju u proizvodnji toplinski neobrađenih mesnih proizvoda. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu.* 21(4):397-409.
- Gu W, Wang SF. 2010. Synthesis and antimicrobial activities of novel 1H-dibenzo[ac]carbazoles from dehydroabiatic acid. *Eur J Med Chem* 45:4692–4696.
- Gutiérrez-del-Río I, Fernández J, Lombo F. 2018. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *Int J Antimicrob Agents* 52:309–315.
- Hadžić L, Šeol Martinec B, Pintarić S. 2021. Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*, *Hrvatski veterinarski vjesnik* 29:3.
- Hamad MNF, Marrez DA, El-Sherbieny SMR. 2020. Toxicity Evaluation and Antimicrobial Activity of Purified Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biointerface Res Appl Chem* 10:6974–6990.
- Handa SS. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. U: *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, (Swami, S., Singh, K. S. P., Longo, G., Dutt, D., ured.), United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trst, 42-133 str.
- Härtig E, Jahn D. 2012. Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Adv Microb Physiol* 61:195-216.

- Hassoun A, Carpena M, Prieto MA. 2020. Simal-Gandara J, Özogul F, Özogul Y, Çoban ÖE, Guðjónsdóttir M, Barba FJ, Marti-Quijal FJ, Režek Jambrak A, Maltar Strmečki, Gajdoš Kljusurić J, Regenstein JM Use of spectroscopic techniques to monitor changes in food quality during application of natural preservatives: A review. *Antioxidants* 9:882.
- Hassoun A, Çoban ÖE. 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends Food Sci Technol* 68:26–36.
- Hengl B, Šperanda M, Kralik G. 2011. Enhancing the productive performances and broiler meat quality by phytogens MESO, 13 (5) 354-363.
- Hoorfar J. 2014. *Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practice, innovative commercial solutions and case studies*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Sawston, UK, 472 str.
- Houdret J. 2002. *Ljekovito bilje uzgoj i uporaba: cjelovit i praktičan vodič za uspješan uzgoj bilja i sveobuhvatan popis bilja*. Naklada Dušević & Kršovnik, Rijeka.
- Hulina N. 2011. *Više biljke stablašice. Sistematika i gospodarsko značenje*, Zagreb.
- Huntanen CN. 1980. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J Food Prot* 43:195–196.
- Husnjak S, Bensa A. 2018. Pogodnost poljoprivrednog zemljišta za navodnjavanje u agrotegijama Hrvatske. *Hrvatske vode* 26 105:157-180.
- Hyldgaard M, Meyer LR, Mygind T. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front microbiol* 3 12:12.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Medical Microbiology*, 26th edition, McGraw Hill Lange Medical, New York, 24-188 str.
- Jažo Z, Glumac M, Drventić I, Žilić L, Dujmović T, Bajić D, Vučemilo M, Ivić E, Bektić S, Anačkov GT. 2022. The Essential Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Influence of Steam, Hydro and Microwave-Assisted Distillation. *Separations*. 9(10):280.
- Jurtshuk P. 1996. Bacterial Metabolism, in: Baron, S. (ur.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed Res Int* 2014:827965.
- Kanat M, Alma MH 2004. Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* Schuff.) *Pest Manag Sci* 60 2:173-177.

- Karam L, Roustom R, Abiad MG, El-Obeid T, Savvaidis IN. 2019. Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *Int J Food Microbiol* 291:42–47.
- Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MP. 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol* 26:220–228.
- Kavas G, Kavas N, Saygili D. 2015. The effects of thyme and clove essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of kashar cheese. *J Food Qual* 38:405–412.
- Keršek E. 2004. Ljekovito bilje u vinu i rakiji. VBZ, Zagreb. 161 str.
- Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. 2011. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin* 69:393–403.
- Kiem S, Schentag JJ. 2006. Relationship of minimal inhibitory concentration and bactericidal activity for treatment of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 27 1:51-67.
- Kilic A, Hafizoglu H, Kollmannsberger H, Nitz S. 2004. Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers, and fruits of *Laurus nobilis* L. *J Agric Food Chem* 52(6):1601-6.
- Kišpatić J. 1992. Opća fitopatologija, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 81:121-126.
- Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E. 2003. Herbs of the Labiatae. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Caballero B, Ed.). Elsevier, London/New York, 3082–3090 str.
- Kome G, Enang R, Tabi F, Yerima B. 2019. Influence of Clay Minerals on Some Soil Fertility Attributes: A Review. *Open J Soil Sci* 9:155-188.
- Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F. 2020. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 18 1:5967.
- Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J. 2008. Flora jadranske obale i otoka: 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga d.d. PMF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. 558 str.
- Kramer JM, Gilbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: *Foodborne Bacterial Pathogens* (Doyle MP, Ed.). Marcel Dekker, New York, 21 str.

- Kunc N, Frlan A, Baričević D, Kočevar Glavač N, Kokalj Ladan M. 2022. Essential Oil and Hydrosol Composition of Immortelle (*Helichrysum italicum*). *Plants* 11(19):2573.
- Kunhikannan S, Thomas CJ, Franks AE, Mahadevaiah S, Kumar S, Petrovski S. 2021. Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *MicrobiologyOpen* 10:e1197.
- Kusumaningrum HD, van Putten MM, Rombouts FM, Beumer RR 2002. Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *J Food Prot* 65 1:61–65.
- Kuštrak D. 2005. Farmakognozija fitofarmacija. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
- Kuštrak D. 2014. Morfološka i mikroskopska analiza začina. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
- Lakušić DV, Ristić MS, Slavkowska VN, Šinžar-Sekulić JB, Lakušić BS. 2012. Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chem Biodiversity* 9 7:1286-1302.
- Larocque N, Vincent C, Belanger A, Bourassa JP. 1999. Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *J Chem Ecol* 25(6): 1319-1330.
- Lekić A. 2012. Egzotične drvenaste vrste - eterična ulja. Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Diplomski rad.
- Leonardi M, Ambryszewska KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, Pistelli L. 2013. Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodiversity* 10:343–345.
- Lesinger I. 1999. Ljekovitost povrća, voća i začina. Biblioteka Kućna biljna ljekarnica, Volosko. 148 str.
- Lis-Balchin M, Deans SG. 1997. Bioactivity of Selected Plant Essential Oils against *Listeria Monocytogenes*. *J App Microb* 82 759-762.
- Li J, Cheng W, Xu L, Strong PJ, Chen H. 2015. Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:4587-4596.
- Loir YL, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2 1:63–76.
- Longaray Delamare AP, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem* 100, 603-608.
- Lowy FD. 1998. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339(8):520–532.

- Lu WC, Huang DW, Wang CCR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, Li PH. 2018. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Drug Anal* 26 1:82-89.
- Ljubičić I, Britvec M. 2019. Ljekovite i aromatične biljke kamenjarskih pašnjaka sjevernojadranskih otoka. *Agronomski Glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* 81 3:127-143.
- Macchioni F, Perrucci S, Cioni PL, Morelli I, Castilho P, Cecchi F. 2006. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oil against *Psoroptes cuniculi*. *J Essent Oil Res* 18 1:111-114.
- Macut M. 2019. Utjecaj metoda ekstrakcije na udio eteričnog ulja i fenolni sastav lista lovora (*Laurus nobilis* L.) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Diplomski rad. 30-40 str.
- Mahady GB. 2001. Global harmonization of herbal health claims. *J Nutr* 131(3):1120S-1123S.
- Mahdavi V, Hosseini SE, Sharifan A. 2018. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food Sci Nutr* 6:269–279.
- Marinculić A, Habrun B, Barbić Lj, Beck R. 2009. Biološke opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu, HAH, Osijek. 26 str.
- Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol* 67:187–195.
- Mastelić J, Politeo O, Jerković I, Radosević N. 2005. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem Nat Compd* 41 1:35–40.
- Maurya A, Prasad J, Das S, Dwivedy AK. 2021. Essential oils and their application in food safety. *Front sustain food syst* 5: 653420.
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument forestimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index for vaccines. *JAMA* 49:1176-1178.
- Melito S, Petretto GL, Podani J, Foddai M, Maldini M, Chessa M, Pintore G. 2016. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. *Ind Crops Prod* 80:242–250.
- Miljanović A, Bielen A, Grbin D, Marijanović Z, Andlar M, Rezić T, Roca S, Jerković I, Vikić-Topić D, Dent M. 2020. Effect of Enzymatic, Ultrasound, and Reflux Extraction Pretreatments on the Chemical Composition of Essential Oils. *Molecules* 25 20:4818.

- Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements DJ. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chem* 194:410–415.
- Mohsenzadeh M. 2007. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pak J Biol Sci* 10(20):3693-3697.
- Munekata PES, Pateiro M, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez R, Zhong JL, Lorenzo JM. 2020. The Role of Essential Oils against Pathogenic *Escherichia coli* in Food Products. *Microorganisms* 8 6:924.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Janeway, C., 2008. *Janeway's immunobiology*, 7th ed. Garland Science, New York.
- Nagulapally SR, Ahmad A, Henry A, Marchin GL, Zurek L, Bhandari A. 2009. Occurrence of ciprofloxacin, trimethoprim sulfamethoxazole, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Water Environ Res* 81:82-90.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* 10 4:86.
- Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20:157-160.
- Ninčević T, Grdiša M, Šatović Z, Jug-Dujaković M. 2019. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Ind Crops Prod* 111487.
- Ninčević T. 2020. Genetska i biokemijska raznolikost sredozemnog smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Doktorski rad. 4-91 str.
- Nieto G. 2017. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines* 4(3):63.
- Noordhuis KT. 1995. *Vrt-veliki priručnik za cijelu godinu*. Veble commerce, Zagreb. 51 str.
- Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. 2001. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 17:517-520.
- Oh J, Kim H, Beuchat LR, Ryu JH. 2022. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on a laboratory medium and black peppercorns by individual and combinations of essential oil vapors. *Int J Food Microb* 132:108487.
- Ozcan MM, Chalchat JC. 2008. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int J Food Sci Nutr* 59 7-8:691–698.

- Palfi M, Konjevoda P, Vrandečić K, Čosić J. 2018. Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. Poljoprivreda 24 2:20-26.
- Patra JK, Das G, Baek KH. 2015. Antibacterial mechanism of the action of *Enteromorpha linza* L. essential oil against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Bot Stud 56:1–9.
- Perrinial R, Morone-Fortunato I, Lorussob E, Avato P. 2009. Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. microphyllum (Willd.) Nyman. Ind Crops Prod 29:395-403.
- Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos ACA, Lerin LA, Di Luccio M, Mossi AJ, Atti-Serafini L, Cansian RL, Oliveira JV. 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. Ciênc Tecnol 29 4:764-770.
- 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 Fragr J 17:15-19.
- Pisoschi AM, Pop A, Georgescu C, Turcuş V, Olah NK, Mathe E. 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. Eur J Med Chem 143:922–935.
- Pohajda I, Dragun G, Visković PL. 2015. Smilje. Savjetodavna služba, Zagreb. 8 str.
- Politeo O. 2003. Sezonske varijacije kemijskog sastava i biološka aktivnost eteričnog ulja smilja, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Prirodoslovno matematički fakultet Zagreb. Magistarski rad. 65-70 str.
- Pop A, Muste S, Muresan C, Pop C, Salanta I. 2013. Comparative study regarding the importance of sage (*Salvia officinalis* L.) In terms of antioxidant capacity and antimicrobial activities. Hop Med Plants 21:66-74.
- Prakash A, Baskaran R, Paramasivam N, Vadivel V. 2018. Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. Int Food Res 111:509-523.
- Pramila DM, Xavier R, Marimuthu K, Kathiresan S, Khoo ML, Senthilkumar M, Sathya K, Sreeramanan S. 2011. Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). J Med Plant Res 6 2:331-335.
- Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH, Carlson K. 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. Environ Sci Technol 40:7445-7450.
- Rajkovic A. 2014. Microbial toxins and low level of foodborne exposure. Trends Food Sci 38:149-157.

- Rajkovic A, Jovanovic J, Monteiro S, Decler M, Andjelkovic M, Foubert A, Beloglazova N, Tsilla V, Sas B, Madder A, De Saeger S, Uyttendaele M. 2020. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19(4):1605-1657.
- Rajić M, Bilić M, Aladić K, Šimunović D, Pavković T, Jokić S. 2015. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. *Glas. zašt. bilja* 38 (6) 16–26.
- Rao J, Chen B, McClements DJ. 2019. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. *Annu Rev Food Sci Technol.* 10(1):365-387.
- Rešetar D, Pavelić SK, Josić D. 2015. Foodomics for investigations of food toxins. *Curr Opin Food Sci* 4:86–91.
- Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview. *Forsch Komplementmed.* 16(2):79-90.
- Ribeiro-Santos R, Andrade M, de Melo NR, Sanches-Silva A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci* 61:132–140.
- Ristić MS, Brkić DD, Nastovski TLj. 1999. Hemijski sastav etarskog ulja žalfije. U: *Žalfija (Salvia officinalis L.)*, Brkić D, ur. Institut za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić”, Beograd i Art Grafik, Beograd, Srbija. 29-42 str.
- Rincón E, Serrano L, Balu AM, Aguilar JJ, Luque R, García A. 2019. Effect of bay leaves essential oil concentration on the properties of biodegradable carboxymethyl cellulose-based edible films. *Materials* 12(15):2356.
- Rodrigues AM, Silva L, Falé PLV, Serralheiro ML, Ascensão L. 2015. Glandular Trichomes and Biological Activities in *Helichrysum italicum* and *H. stoechas*, Two Asteraceae Species Growing Wild in Portugal. *Microsc Microanal* 21 5:91–92.
- Rogošić J. 2011. Bilinar cvjetnjača hrvatske flore s ključem za određivanje bilja. Sveučilište u Zadru, Zadar. 530-536 str.
- Sadgrove N, Jones G. 2015. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture.* 5(1), 48–102.
- Savin M, Alexander J, Bierbaum G, Hammerl JA, Hembach N, Schwartz T, Schmithausen RM, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. 2021. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. *Sci Rep* 11 1:16622.
- Savković D. 2017. Enciklopedija ljekovitog, korisnog i medonosnog bilja. Begen, Zagreb. 323-331 str.

- Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36 4:407-477
- Scott E, Bloomfield SF. 1990. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *J Appl Bacteriol* 68 3:271–278.
- Sebranek JG, Kristen Robbins K, Sewalt VJ, Houser TA. 2005. Comparison of a natural Rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Sci*, 69(2), 289–296.
- Sharafi SM, Rasooli I, Owlia P, Taghizadeh M, Astaneh SD. 2010. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn Mag* 6 23:147-153.
- Sharifi-Rad J, Soufi L, Ayatollahi SAM, Iriti M, Sharifi-Rad M, Varoni EM, Shahri F, Esposito S, Kuhestani K, Sharifi-Rad M. 2016. Anti-bacterial effect of essential oil from *Xanthium strumarium* against shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol* 62 9:69–74.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res* 32:1675-1687.
- Syngai G.G, Ahmed G, 2019. Chapter 11 - Lysozyme: A Natural Antimicrobial Enzyme of Interest in Food Applications, in: Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, 169–179 str.
- Sile I, Teterovska R, Onzevs O, Ardava E. 2023. Safety Concerns Related to the Simultaneous Use of Prescription or Over-the-Counter Medications and Herbal Medicinal Products: Survey Results among Latvian Citizens. *Int J Environ Res Public Health* 20(16):6551.
- Staver MM, Gobin I, Ratkaj I, Petrović M, Vulinović A, Dinarina-Sablić M, Broznić D, 2018. In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *J Essent Oil-Bear Plants* 21, 77–91.
- Sueoka N. 1997. Cell Membrane and Chromosome Replication in *Bacillus subtilis*; *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press. 59:35-53.
- Šatović Z, Carović-Stanko K, Grdiša M, Jug-Dujaković M, Kolak I, Liber Z. 2012. Conservation of medicinal and aromatic plants in Croatia. Report of a Working Group on Medicinal and Aromatic Plants. Second Meeting, 16-18 December 2004, Strumica, Macedonia FYR. Third Meeting, 26– 28 June 2007, Olomouc, Czech Republic, Lipman, Elinor (ur.). Rim: Bioversity International, 2009. 59-61 str.
- Šilješ I, Grozdanić Đ, Grgesina I. 1991. Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja. Školska knjiga, Zagreb. 20 -24 str.

- Šimić I. 2018. Stanje ishranjenosti biljaka tipičnih za renesansu kao podloga za revitalizaciju arboretuma Trsteno. Agronomski fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Doktorski rad, 122 str.
- Škunca A. 2018. Fototransformacije spojeva prisutnih u eteričnim uljima, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Završni rad. 28 str.
- Španjol Ž, Dorbić B, Vučetić M. 2021. Planika (*Arbutus unedo* L.) i lovor (*Laurus nobilis* L.) – značajne (važne) vrste našeg mediteranskog krša. Vatrogastvo i upravljanje požarima 11 2:29-71.
- Tajkarimi M, Ibrahim S, Cliver D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21 9:1199-1218.
- Taylor TA, Unakal CG. 2024. *Staphylococcus aureus* Infection, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Theivendran S, Hettiarachchy SN, Johnson GM. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. *J Food Sci* 71(2):M39 - M44.
- Toroglu S. 2007. In vitro antimicrobial activity and antagonistic effect of essential oils from plant species. *J Environ Biol* 28(3):551-9.
- Trinajstić I. 1992. Endemi hrvatske flore: Ljekovita kadulja - *Salvia officinalis* L., endemična, ljekovita, medonosna i ukrasna biljka. *Priroda: popularno naučni prilog "Glasnika" Hrvatskog prirodoslovnog društva* 81 9/10 34-36.
- Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12(1), 40-53.
- Van Haute S, Raes K, Van der Meeren P, Sampers I. 2016. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control* 68, 30–39.
- Van LT, Hagiú I, Popovici A, Marinescu F, Gheorghe I, Curutiu C, Ditu LM, Holban AM, Sesan TE., Veronica Lazar V. 2022. Antimicrobial Efficiency of Some Essential Oils in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Plants* 11 15: 2003.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* 120:198-203.
- Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. 2015. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55 (10):1320-1323.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Sánchez-Zapata E, Fernández-López J. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr J* 25(1):13 – 19.
- Wanger A. 2007. Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies Antimicrobial Susceptibility. *Testing Protocols*. 53-73 str.

Wilson MG, Pandey S. 2024. *Pseudomonas aeruginosa*, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86(14):E140-E148.

Winska K, Maczka W, Lyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules* 24 11:2130.

Witkowska AM, Hickey DK, Alonso-Gomez M, Wilkinson M. 2013. Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *J Food Res* 2 4:37-54.

Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules* 23(4):762.

Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel KH, Fowler P, Frutos Fernandez MJ, Fürst P, Gürtler R, Gundert-Remy U. 2019. EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF). Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives. *EFSA J* 17:e05625.

Zarif ME, Yehia SA, Biță B, Sătulu V, Vizireanu S, Dinescu G, Holban AM, Marinescu F, Andronescu E, Grumezescu AM. 2021. Atmospheric pressure plasma activation of hydroxyapatite to improve fluoride incorporation and Modulate Bacterial Biofilm. *Int J Mol Sci* 22 23:13103.

Zhang T, Zhang M, Zhang X, Fang HH. 2009. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose fermenting Enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ Sci Technol* 43 10:3455–3460.

Zhou X, Li Y. 2015. Chapter 1 - Basic Biology of Oral Microbes, in: *Atlas of Oral Microbiology*. Academic Press, Oxford, 1–14 str.

Zorić M, Ćorić N, Jokić S, Šubarić D, Lončarić M. 2018. Prirodni dodatci prehrani kao nositelji nutritivne kvalitete, ljekovitog potencijala i održivosti proizvoda. Hranom do zdravlja: zbornik radova s 10. međunarodnog znanstveno-stručnog skupa Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek i Tuzla, 75-89 str.

Zuazo VHD, Pleguezuelo CRR. 2008. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers. A review. *Agron Sustain Dev* 28, 65–86.

Židovec V, Vršek I, Kolak I, Liber Z, Šatović Z. 2006. Mirisava kadulja, potencijalna vrsta za uređenje krajobraza, *Sjemenarstvo* 23, (1), 45-56.

Mrežni izvori:

Web 1: <https://poljoprivreda.gov.hr/statistika/ekoloska-poljoprivreda-96/96>

Web 2: Nikolić T. ur. (2015 - nadalje): Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, zadnji pristup 04.07.2024.

Web 2: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>, zadnji pristup 04.07.2024.

7. ŽIVOTOPIS

Grgić Pero rođen je 23. srpnja 1980. godine u Varešu (BiH). Osnovnu školu je završio u Vrpolju, a srednjoškolsko obrazovanje u Slavonskom Brodu. Nakon odsluženja vojnog roka upisuje prijediplomski studij poljoprivrede, smjer Vinogradarstvo, vinarstvo i voćarstvo na Veleučilištu u Požegi, koji završava 2004. godine. Nastavlja daljnje obrazovanje na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku na prijediplomskom studiju poljoprivrede, smjer Bilinogojstvo, koji završava 2009. godine. Diplomira 2014. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku te stječe zvanje mag. ing. agr. Iste godine završava na Filozofskom fakultetu u Osijeku pedagoško-psihološko-didaktičko-metodičku izobrazbu. 2016. godine uspješno polaže stručni ispit za nastavnika. Na Pučkom otvorenom učilištu Algebra 2018. godine završava program osposobljavanja i usavršavanja za voditelja izradbe i provedbe projekata financiranih iz EU fondova, a 2019. program osposobljavanja i usavršavanja za specijalistu zaštite na radu. 2021. godine napreduje u zvanje mentora. Od 2004. do 2013. godine zaposlen je u Pan papirnoj industriji d.o.o. kao planer proizvodnje Welpapea. Nakon toga se zapošljava u poljoprivrednoj ljekarni kao stručni savjetnik u prodaji. Od 2015. godine do danas radi u Srednjoj strukovnoj školi u Šibeniku na radnom mjestu nastavnika poljoprivredne skupine predmeta i praktične nastave. Voditelj je učeničke zadruge Ruke. Bio je koordinator tri Erasmus+ projekta u Srednjoj strukovnoj školi Šibenik iz područja strukovnog obrazovanja. Bio je voditelj triju projekata financiranih od strane Ministarstva poljoprivrede i Ministarstva znanosti i obrazovanja. Od 2018. godine predavač je strukovnih predmeta iz područja poljoprivrede na Pučkom otvorenom učilištu Libar u Šibeniku. 2019. godine je bio predavač strukovnih predmeta iz područja poljoprivrede na Učilištu Izvor znanja Vodice. Bio je član povjerenstva izrade revizije standarda zanimanja Agrotehničar/Agrotehničarka pri Agenciji za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih (2023.). Član je povjerenstva za vrednovanje Zahtjeva za upis standarda kvalifikacije, sektor: Poljoprivreda, prehrana i veterina, pri Agenciji za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih (2023.). Vanjski je stručnjak za praćenje i razvoj strukovnog obrazovanja, podrške uvođenju novih strukovnih kurikuluma te osiguranju kvalitete strukovnog obrazovanja (2023.).