



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Marta Kiš

**DEKONTAMINACIJSKI UČINAK
ORGANSKIH KISELINA PREMA
SOJEVIMA BAKTERIJE *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA 4/O:3 NA POVRŠINI
SVINJSKOG MESA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Veterinary Medicine

Marta Kiš

**DECONTAMINATION EFFECT OF
ORGANIC ACIDS AGAINST *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA 4/O:3 STRAINS ON
PORK SURFACE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



University of Zagreb

Veterinarski fakultet

Marta Kiš

**DEKONTAMINACIJSKI UČINAK
ORGANSKIH KISELINA PREMA
SOJEVIMA BAKTERIJE *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA 4/O:3 NA POVRŠINI
SVINJSKOG MESA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Marta Kiš

**DECONTAMINATION EFFECT OF
ORGANIC ACIDS AGAINST *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA 4/O:3 STRAINS ON
PORK SURFACE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Prof. Nevijo Zdolec, PhD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Marta Kiš, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima od onih navedenih u radu.

(popis studenta)

Zagreb, 2025.

O MENTORU

Dr. sc. Nevijo Zdolec redoviti je profesor u Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Bio je mentor jednom doktorandu na doktorskom studiju *Veterinarske znanosti* na temu patogene *Yersinia enterocolitica* u lancu proizvodnje svinjskog mesa, te mentor 35 diplomanada. Posljednjih pet godina institucijski je vodio dva kompetitivna projekta financirana sredstvima EU. Autor je preko 130 izvornih i preglednih znanstvenih radova, urednik međunarodne znanstvene knjige te koautor sveučilišnih udžbenika i priručnika. U bazi Scopus objavio je 73 rada koji su citirani 1100 puta uz h-index 16.

Odabrani radovi posljednjih 5 godina, vezani uz temu ovog dokorskog rada:

ZDOLEC, N., M. KIŠ (2021): Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. *Processes*, 9, 5, 815.

ZDOLEC, N., M. KIŠ, D. JANKULOSKI, K. BLAGOEVSKA, S. KAZAZIĆ, M. PAVLAK, B. BLAGOJEVIĆ, D. ANTIĆ, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, V. PAŽIN (2022): Prevalence and persistence of multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in tonsils of slaughter pigs from different housing systems in Croatia. *Foods*, 11, 10, 1459.

ZDOLEC, N., A. KOTSIRI, K. HOUF, A. ALVAREZ-ORDÓÑEZ, B. BLAGOJEVIC, N. KARABASIL, M. SALINES, D. ANTIC (2022): Systematic review and meta-analysis of the efficacy of interventions applied during primary processing to reduce microbial contamination on pig carcasses. *Foods*, 11, 2110, 18.

FERRI, M., B. BLAGOJEVIC, P. MAURER, B. HENGL, C. GULDIMANN, S. MOJSOVA, I. SAKARIDIS, B. ANTUNOVIC, E. GOMES-NEVES, N. ZDOLEC, M. VIEIRA-PINTO, S. JOHLER (2023): Risk based meat safety assurance system – An introduction to key concepts for future training of official veterinarians. *Food control*, 146, 109552, 12.

KIŠ, M., D. FUŠTIN, N. ZDOLEC (2023): Relevance of meat juice seroprevalence and presence of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. in pig tonsils for risk management at slaughter. *Processes* 11, 2234, 10.

ZAHVALA

Velika hvala mojem mentoru, prof. dr. sc. Neviju Zdolecu na nesebičnoj pomoći, razumijevanju te znanstvenom i stručnom usmjeravanju kroz sve ove godine, a posebno prilikom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvalnost dugujem i svojim kolegama, djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane na podršci, susretljivosti i savjetima.

Zahvaljujem se dr. sc. Snježani Kazazić s Instituta Ruđer Bošković te prof. dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na stručnim savjetima i pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela doktorskog rada.

Hvala mojim dragim prijateljicama Ani, Dolores, Ivani, Jasmini, Ket i Lei na bezuvjetnom prijateljstvu i podršci u najpotrebnijim trenucima studentskog života.

Posebno hvala mojoj dragoj kolegici Ani Međurečan na svakodnevnom zajedničkim trenucima u kojima me oraspoloži kada je i najteže.

Na kraju, hvala mojoj mami i sestri na neizmjeranoj podršci i ljubavi.

Doktorski rad izrađen je na Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Predstojnica: prof. dr. sc. Željka Cvrtila

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane.

SAŽETAK

Domaća svinja prirodni je nosioc patogenih bioserotipova bakterije *Yersinia enterocolitica* u tonzilama i crijevu, a konzumacija nedovoljno toplinski obrađenog svinjskog mesa rizični faktor u epidemiologiji jersinioze, četvrte zoonoze po učestalosti u Europi. Ciljevi ovog istraživanja bili su: utvrditi dekontaminacijski učinak mliječne i octene kiseline na mesu inokuliranom različitim sojevima *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 u laboratorijskim uvjetima, utvrditi utjecaj primjene organskih kiselina na organoleptička svojstva mesa te istražiti pojavnost križne rezistencije *Y. enterocolitica* 4/O:3 na organske kiseline i antibiotike.

Provedeno je ukupno 20 dekontaminacijskih protokola prema pojedinačnom soju *Y. enterocolitica* 4/O:3 (N=10; podrijetlom iz svinjskih tonzila) površinski inokuliranom na svinjsko meso ($4 \log_{10}$ CFU/g; *m. longissimus dorsi*). U protokolima dekontaminacije (N=200) ispitivan je utjecaj primjene 2 %- i 4 %-tnih otopina mliječne i octene kiseline različitih temperatura (25 °C i 80 °C) i duljine izloženosti (prskanja 10 i 30 sekundi) na populaciju *Y. enterocolitica* 4/O:3, u odnosu na dekontaminaciju vodom. Brojnost populacije svakog inokuliranog soja *Y. enterocolitica* 4/O:3 mjerena je neposredno nakon dekontaminacije te 24 sata nakon hlađenja dekontaminiranog mesa. S ciljem induciranja acidorezistencije te križne rezistencije na antibiotike, na odabranim najotpornijim sojevima nakon dekontaminacije provedena je prilagodba na kisele uvjete *in vitro* te po višekratnom izlaganju kiselinama ponovljena dekontaminacija mesa, kao i testiranje otpornosti stresiranih izolata *Y. enterocolitica* 4/O:3 na ceftazidim, cefotaksim, tetraciklin, gentamicin i ciprofloksacin. Neinokulirani uzorci mesa su nakon dekontaminacije podvrgnuti organoleptičkoj evaluaciji tijekom koje su ocjenjivani parametri boje, mirisa, teksture, okusa te ukupnog dojma.

Inokulirana populacija *Y. enterocolitica* u kontrolnim uzorcima nije se mijenjala značajno tijekom hlađenja ($p > 0,05$), dok je primjena otopina organskih kiselina dovela do smanjenja populacije za $0,73 \log_{10}$ CFU/g koja je zatim dodatno smanjena za $0,13 \log_{10}$ CFU/g nakon hlađenja ($p < 0,05$). Isti trend broja inokulirane populacije pojavio se i u protokolima dekontaminacije mesa vodom, ali bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između njihovog broja nakon 24 sata. Dekontaminacijski učinak postignut primjenom otopina mliječne kiseline bio je značajno veći ($p < 0,05$) od octene kiseline i vode, no samo u tijeku nultog testiranja, dok se njihov učinak izjednačava nakon 24 sata. Faktorskom analizom utvrđeno je kako su vruće otopine primjenjene tijekom duljeg izlaganja najznačajnije za redukciju broja bakterija ($p < 0,05$) za razliku od vrste kiseline te njezine koncentracije ($p > 0,05$). Testirani sojevi *Y. enterocolitica* 4/O:3 pokazali su visoki stupanj prilagodbe kiselim uvjetima, a istovremeno nije došlo do

značajnog odstupanja od početnih minimalnih inhibicijskih koncentracija testiranih antibiotika. PCA analizom potvrđeno je kako su vruće otopine obje kiseline kao i vode rezultirale nepoželjnim organoleptičkim svojstvima mesa. S druge strane, primjena hladnih otopina mliječne kiseline i vode nije utjecala na značajne promjene organoleptičkih svojstava mesa za razliku od otopina octene kiseline.

Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene organskih kiselina u dekontaminacijske svrhe, pri čemu mliječna kiselina dominira, no njezin učinak je gotovo istovjetan primjeni vode. Učinak je primarno uvjetovan temperaturom primjene otopine te duljinom izlaganja. Rezultati ne upućuju na mogućnost stjecanja otpornosti na organske kiseline i antimikrobne lijekove. Obzirom na narušena organoleptička svojstva mesa, primjena octene kiseline, ali i ostalih ispitivanih otopina pri visokoj temperaturi se ne preporučuje. Ovo je prvo istraživanje osjetljivosti *Y. enterocolitica* prema organskim kiselinama kojim su obuhvaćeni ostali aspekti važni pri razmatranju sigurnosti i učinkovitosti njihove primjene u dekontaminaciji svinjskog mesa.

Ključne riječi: *Yersinia enterocolitica* 4/O:3, svinjsko meso, organske kiseline, dekontaminacija, rezistencija, organoleptička svojstva

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION

The European Union's food hygiene legislation has always aimed to identify potential risks to consumer health and, accordingly, to impose control measures along the entire production chain. Despite this fact and compliance with the postulates of Good Hygiene Practice (GHP) and the principles of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system, microbiological contamination of incoming raw materials and final products is sometimes unavoidable. To reduce this potential contamination, i.e. the risk from foodborne pathogens, additional tools and techniques are used, such as the decontamination of meat with approved agents. The use of organic acids in the decontamination of carcasses and portioned meat at the slaughterhouse level has been the subject of numerous studies for many years and is seen as a way of improving the hygienic condition of the carcasses, but also the safety of the meat, taking into account the antimicrobial effect on pathogenic microorganisms. Lactic acid and acetic acid belong to the group of organic acids that have been most studied so far, as they are widely distributed in nature and used in the food industry. Their decontamination potential depends on four groups of factors: application technique (method, amount of solvent, number of applications, combinations with other methods), decontaminant (type of acid, concentration, pH), degree of contamination (type and number of target microorganisms, sensitivity to acids) and meat properties (type, composition, carcass parts). In addition to investigating the effects of decontaminants on carcass hygiene and meat safety, their potential negative effects on sensorial properties and the role of adaptability to newly created acidic conditions in the development of acid resistance and crossresistance to antimicrobial drugs should be investigated, too. Most previous studies on the decontaminating effect of organic acids have been carried out on beef and have focused on pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*, in contrast to the pathogenic *Yersinia enterocolitica*, which is generally neglected in veterinary public health, but also in control programs in pig slaughterhouses. Yersinosis is currently the fourth most common zoonosis in the European Union and pigs are natural carriers of pathogenic bioserotypes of this bacterium, making pork the main source of infection for humans. To reduce the risk of contamination of pork with the pathogenic *Y. enterocolitica*, preventive measures must be taken both on the farm and at the slaughter line. In addition to standard processing procedures in the slaughterhouse, such as tying the rectum, cleaning the equipment when splitting the carcass and head, or removing the head before splitting, decontamination with organic acid solutions can be considered as an additional

method to reduce the risk of *Y. enterocolitica* transmission in the meat chain. This research aimed to determine the decontaminating effect of organic acids on pork inoculated with different *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains under laboratory conditions and to compare their effect with that of water. In addition, their influence on the organoleptic properties of the meat will be investigated and the relationship between the resistance of *Y. enterocolitica* 4/O:3 to antimicrobial agents and to organic acids will be determined. The results of this research will provide a scientific basis for improved control of pathogenic *Y. enterocolitica* in the pork production chain as a major source of human infection.

MATERIALS AND METHODS

Each of pig-originated *Y. enterocolitica* strains (N=10) used in the experiment was propagated in PSB broth (Peptone, Sorbitol and Bile salts, PSB, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and cultured on selective agar (Cefsulodin, IrgasanTM and Novobiocin, CIN, Merck, Darmstadt, Germany) for 24 hours at 30 °C. Decontamination solutions were prepared by diluting liquid concentrated (90%-99.5%) lactic and acetic acid (Merck, Germany) with distilled water, to obtain 2% and 4% solutions. The decontamination protocols were performed on fresh retail pork (*M. longissimus dorsi*). For each individual treatment a piece of meat with an average weight of 100 grams, of the same size and thickness was used, on which the pH was measured before bacterial inoculation. PSB broth containing pure active culture of *Y. enterocolitica* 4/O:3 strain was serially diluted 1:9, and 1 mL of the appropriate dilution was spread evenly on the meat surface with a sterile L-stick, resulting in an average meat contamination of 4 log₁₀ CFU/g (control). To simulate the decontamination conditions at the slaughterline, the protocols were started 5 minutes after inoculation of the bacteria on the meat (attachment time). Prepared solutions of organic acids with a concentration of 2% and 4% and water were applied at different temperatures (25 °C and 80 °C) and exposure times (10 and 30 seconds) to the previously contaminated meat by spraying it with an automatic sprayer under a pressure of 3 bar from a distance of 10 cm, resulting in a total of 20 different protocols for 10 strains of *Y. enterocolitica* (N=200 treatments). The reduction in the number of inoculated *Y. enterocolitica* populations per gram of meat (R; log₁₀) was measured at hour 0 and after 24 hours of chilling at 4 °C. To determine the changes of pH of the meat after decontamination, the pH of the control and test samples was measured 0 and 24 hours after homogenization. To determine whether the exposure of *Y. enterocolitica* 4/O:3 to solutions of organic acids causes the acquisition of resistance and the consequent ineffectiveness of decontamination treatments, acid-stress tests were performed in which the strains were exposed to solutions of lactic acid and acetic acid at

a concentration of 2%. The most resistant strains that showed the highest percentage of survival were subjected to further exposures to the same organic acid solutions to promote their adaptability to acidic conditions. A total of 15 consecutive treatments were carried out with each acid, and after every third treatment, the antimicrobial susceptibility of the strains was tested using the E-test (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France). At the end of the last treatment, the stressed strains were inoculated onto the meat and the decontamination treatments with 2% lactic and acetic acid solution were repeated to compare the differences in susceptibility compared to the results of the previously performed treatments with non-stressed strains. Antimicrobial susceptibility testing was performed after the 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th exposures to acidic solutions, and a total of 5 antibiotics were used in each case: Ceftazidime (256 TZ), Cefotaxime (32 CTL), Tetracycline (256 TC), Gentamicin (256 GM) and Ciprofloxacin (32 CI). The sensorial evaluation of decontaminated and *Yersinia*-free meat samples (N=20) was carried out 24 hours after chilling by five member panel. Compared to the untreated sample (control), evaluation considered the parameters of color, odor, texture, taste (cooked samples) and overall impression, i.e. the combination of all evaluation characteristics. For each property observed, scores from 1 to 5 were awarded for each grade in accordance with the specified descriptions of the requirements.

RESULTS

Decontamination with acidic solutions led to a reduction in the inoculated population of *Y. enterocolitica* 4/O:3 populations in almost all combinations of acid concentration, solution temperature and decontamination duration. The inoculated population of *Y. enterocolitica* in the control samples does not change significantly during refrigeration ($p>0.05$), while the application of organic acid solutions led to a 0.73 log reduction in the population after initial decontamination which was reduced by a further 0.13 log after cooling and amounted to 0.86 log ($p<0.05$). The same trend of the number of inoculated population appeared in the meat decontamination protocols with water, but without a statistically significant difference ($p>0.05$) between the treated populations after 0 and 24 hours. Comparing the results of meat decontamination with acetic acid using eight protocols, the average reduction values before chilling the meat ranged from 0.33 ± 0.25 to 0.91 ± 0.38 log₁₀ CFU/g, while after the application of lactic acid they ranged from 0.69 ± 0.09 to 1.24 ± 0.42 log₁₀ CFU/g ($p<0.05$). The reduction values obtained by water were statistically significantly lower than those obtained by lactic acid ($p<0.05$) and ranged from 0.41 ± 0.15 to 0.81 ± 0.11 log₁₀ CFU/g, while there was no significant difference when compared with acetic acid ($p>0.05$). After 24 hours, the reduction values

achieved by acetic acid increased from 0.70 ± 0.20 to $1.19 \pm 0.56 \log_{10}$ CFU/g. In the protocols with lactic acid, they remained almost the same (0.57 ± 0.23 to $1.15 \pm 0.26 \log_{10}$ CFU/g) and thus did not differ significantly from the reductions achieved with acetic acid, in contrast to the initial measurement. The values of the reductions achieved by water decontamination were also higher after 24 hours and ranged from 0.57 ± 0.17 to $0.98 \pm 0.14 \log_{10}$ CFU/g. A comparison of the differences between the identical decontamination protocols with lactic and acetic acid shows a significantly higher efficacy of lactic acid in the 0th hour ($p < 0.05$) in 75% of the cases. In accordance with the previous results, the reduction values after the 24th hour did not differ significantly between the observed protocols ($p > 0.05$). No significant differences ($p > 0.05$) were found in pathogen reduction between 2% and 4% solutions of lactic and acetic acid under the conditions of applying the same solution temperature and exposure duration, and the influence of concentration did not change even after cooling the decontaminated meat. On the contrary, statistically significantly higher ($p < 0.05$) reductions were obtained with hot acid solutions, but only with a longer exposure time of 30 seconds, which in most cases was also measured 24 hours after the meat had cooled. In this respect, exposure over a period of 30 seconds had a significant effect ($p < 0.05$) on a higher reduction in the population of *Y. enterocolitica* compared to a shorter exposure of 10 seconds, but only in the case of the application of hot solutions. As for water, a statistically significant higher reduction ($p < 0.05$) was achieved with a treatment of 30 seconds, both when using cold and hot water. When comparing the temperature factor, a statistically significantly higher reduction ($p < 0.05$) was achieved when using hot water, but only with a longer exposure time of 30 seconds. Even after 24 hours of chilling the meat, the reduction in all four water decontamination protocols increased significantly ($p < 0.05$) compared to the baseline values. A side-by-side comparison of all three groups shows that the initial decontamination with cold acidic solutions achieved a significantly higher reduction ($p < 0.05$) of the population of *Y. enterocolitica* with the introduction of 2% and 4% lactic acid, and with shorter and longer exposure, compared to for decontamination with cold water. Heating the solutions also confirmed the same, indicating that the initial reductions of *Y. enterocolitica* with acetic acid solutions were not statistically different compared to water of the same temperature and duration of decontamination ($p > 0.05$). In contrast to acetic acid, decontamination with lactic acid solutions led to a higher reduction in the meat pH value by 1.14 ± 0.32 ($p < 0.05$), so that the final values ranged between 4.23 ± 0.18 and 5.13 ± 0.13 . After 24 hours of refrigeration of the meat decontaminated with lactic acid solutions, the pH increased significantly (0.90 ± 0.24) ($p < 0.05$) compared to the protocols with acetic acid, and the values ranged from 5.43 ± 0.17 to 5.69 ± 0.20 , as in the case of acetic acid. For both acids, in each of the

protocols, the decrease in meat pH immediately after decontamination was positively correlated with its increase after 24 hours ($r=0.91$). However, it was found that in more than 50% of cases, a statistically significant decrease in the pH of decontaminated meat did not result in a statistically significant decrease in the inoculated population of *Y. enterocolitica*. When the strains are exposed to 2% solutions of lactic and acetic acid, their adaptation to the newly created acidic conditions is shown by the high percentage of survivors during successive exposures to extremely low pH values (2.15-2.78) and the recovery of those damaged cells whose number reached a minimum of $8 \log_{10}$ CFU/mL after each exposure cycle. The results presented show that none of the strains tested acquired resistance to antibiotics as a result of repeated exposure to lactic acid and acetic acid solutions. The MIC values measured for all five antibiotics decreased or increased equally during the measurement period. When repeating the decontamination protocols on such stressed strains, in 50% of the protocols performed ($N=18$) a lower reduction in bacterial counts was observed compared to the reductions obtained in the first test with the same treatments, while in six protocols (25%) it was higher than that obtained after the first test. Although this showed a weaker decontamination effect of the acids compared to the first test, it was not statistically significant ($p>0.05$). When evaluating the meat color parameter according to the acetic acid decontamination protocols, the meat sample treated with hot 4% acetic acid solution for 30 seconds was assigned the lowest average score (1.80 ± 0.83) compared to the control sample ($p<0.05$). As for the protocols in which lactic acid was used, the worst sensorially evaluated meat was after decontamination using hot solutions of 2% and 4% acid solution during a longer exposure, but without a significant difference compared to the control sample ($p>0.05$). Looking at the average of the scores obtained for each acid, the protocols with acetic acid were assigned a lower score (3.27 ± 0.78) compared to those with lactic acid (4.15 ± 0.81) ($p<0.05$). For the odor parameter, the protocols with acetic acid also scored the lowest compared to the protocols with lactic acid and water (<0.05). When evaluating the texture of the meat, no significant differences were found either after treatment with lactic acid or water ($p>0.05$). Regarding the taste parameter, statistically significant differences were found in the meat samples treated with acetic acid solutions after treatment with hot 4% acetic acid solution for 30 seconds ($p<0.05$), where the "sour" taste of the meat dominated. In the case of lactic acid and water, the assigned scores were higher and no significant difference in taste was observed compared to the control sample ($p>0.05$). In the evaluation of the overall impression of the meat, the lowest values were found after the decontamination protocol with hot 2% and 4% acetic acid for 30 seconds ($p<0.05$), and the same was recorded in the case of lactic acid and water, but without a significant difference compared to the control sample

($p>0.05$). Principal component analysis performed shows that the application of high temperature in all three groups studied (both types of acids and water) had the strongest impact on the undesirable appearance of the meat, especially in terms of its color.

CONCLUSION

Considering all the results of this work, the decontamination potential of both types of acids in reducing the number of *Y. enterocolitica* on pork is evident. The effect is primarily determined by the temperature of acid application and the duration of exposure. Regarding the type of acid, a better decontamination effect was obtained with lactic acid, and the reduction in bacterial counts was higher when hot solutions and longer exposure times were used. The antimicrobial effect achieved by using lactic acid was also significantly higher than the effect of water, but their effect equalized after 24 hours. The results do not indicate the possibility of acquiring resistance to organic acids and antimicrobial agents. Considering the adverse effects on the organoleptic properties of meat, the use of acetic acid and other tested solutions at high temperature is not recommended. This is the first study of the susceptibility of *Y. enterocolitica* to organic acids, which also covers other aspects that are important when it comes to the safety and efficacy of their use in the decontamination of pork.

KEY WORDS: *Yersinia enterocolitica* 4/O:3, pork, organic acids, decontamination, resistance, sensorial properties

POPIS PRILOGA

SLIKE

Slika 1. Aktivacija *Yersinia* stabilnog enterotoksina u inficiranom domaćinu

Slika 2. Faze klaoničke obrade svinja

Slika 3. Broj prijavljenih slučajeva jersinioze u Europskoj uniji tijekom posljednjih 10 godina

Slika 4. Razina mikrobiološke kontaminacije trupova svinja tijekom klaoničke obrade

Slika 5. Mehanizam djelovanja organskih kiselina na bakterijsku stanicu

Slika 6. Izomeri (D i L oblik) mliječne kiseline

Slika 7. Kemijska struktura molekule octene kiseline

Slika 8. Faktori utjecaja na učinkovitost aplikacije organskih kiselina na trupu

Slika 9. pH vrijednost površine svinjskog *M. longissimus dorsi* nakon izlaganja otopinama octene i mliječne kiseline

Slika 10. Pregled križne otpornosti bakterija izazvane prilagodbom na kiselinu

Slika 11. Prikaz spektra masa *Y. enterocolitica* na MALDI-TOF MS

Slika 12. Izgled kolonija *Y. enterocolitica* 4/O:3 na CIN agaru

Slika 13. Primjena dekontaminacije na liniji klaoničke obrade svinja sukladno razini mikrobiološke kontaminacije tijekom pojedinih faza

Slika 14. Postupak dekontaminacije mesa otopinama organskih kiselina i vodom

Slika 15. Standardna krivulja ovisnosti optičke gustoće (600 nm) o broju bakterijskih stanica (CFU/mL)

Slika 16. Testiranje osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na otopine organskih kiselina i antibiotike

Slika 17. Broj *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina (N=16) 0. i 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 18. Broj *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola vodom (N=4) 0. i 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 19. Primjer redukcije broja *Y. enterocolitica* od 0,58 $\log_{10}$ CFU/g nakon provedbe dekontaminacijskog protokola sa 4 %-tnom otopinom octene kiseline temperature 80 °C tijekom 30 sekundi (lijevo-pozitivna kontrola; desno-testni uzorak)

Slika 20. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama octene kiseline (N=8) 0. i 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 21. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama mliječne kiseline (N=8) 0. i 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 22. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola vodom (N=4) 0. i 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 23. Usporedba redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20) 0. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 24. Usporedba redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20) 24. sat ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 25. Dinamika promjene pH vrijednosti mesa nakon dekontaminacijskih protokola (N=16)

Slika 26. Prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva *Y. enterocolitica* (N=3) u odnosu na izmjerene pH vrijednosti bujona kroz 15 dana izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline ($\log_{10}$ CFU/mL)

Slika 27. Prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva *Y. enterocolitica* (N=3) u odnosu na izmjerene pH vrijednosti bujona kroz 15 dana izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline ($\log_{10}$ CFU/mL)

Slika 28. Prosječne vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) antibiotika (N=5) prema testiranim sojevima (N=3) nakon izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 29. Povećanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) od 0,5 (prvo testiranje; slika lijevo) do 1,5 (peto testiranje; slika desno) kod soja br. 40 nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline

Slika 30. Prosječne vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) antibiotika (N=5) prema testiranim sojevima (N=3) nakon izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 31. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline (N=8) na nestresiranim i stresiranim sojevima (N=3) ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Slika 32. Grafički prikaz organoleptičke procjene mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20)

Slika 33a. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline

Slika 33b. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline

Slika 34a. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline

Slika 34b. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline

Slika 35. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s vodom

Slika 36. Biplot dijagram PCA analize povezanosti dekontaminacijskih protokola (N=20) i organoleptičkih svojstava mesa 0. sat

Slika 37. Biplot dijagram PCA analize povezanosti dekontaminacijskih protokola (N=20) i organoleptičkih svojstava hlađenog mesa 24. sat

Slika 38. Toplinska mapa ocjena organoleptičkih svojstava mesa (N=5) ovisno o provedenom dekontaminacijskom protokolu (N=20)

Slika 39. Toplinska mapa s dendrogramima dekontaminacijskih protokola (N=20) temeljem organoleptičke ocjene dekontaminiranog mesa

TABLICE

Tablica 1. Najznačajniji pokazatelji virulencije bakterije *Yersinia enterocolitica*

Tablica 2. Oznake dekontaminacijskih protokola korištenih u postupcima dekontaminacije svinjskog mesa

Tablica 3. Opis obilježja za svježe svinjsko meso

Tablica 4. Ocjene s opisom zahtjeva

Tablica 5. pH vrijednosti 2 %- i 4 %-tnih otopina mliječne i octene kiseline pri 25 °C ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 6a. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 6b. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 7a. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 7b. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 8a. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 8b. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 9a. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 9b. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 10. Dekontaminacijski učinak vode na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 11. Skupni dekontaminacijski učinak provedenih protokola na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 12. Prikaz početne (0. sat) prosječne redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu s obzirom na primijenjeni dekontaminacijski protokol i inokulirani soj ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 13. Prikaz prosječne redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu nakon hlađenja 24 sata pri 4 °C s obzirom na primijenjeni dekontaminacijski protokol i tretirani soj ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 14. Usporedba dekontaminacijskog učinka protokola različitih vrsta organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Tablica 15. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih koncentracija organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Tablica 16. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih temperatura organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Tablica 17. Usporedba dekontaminacijskog učinka organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat tijekom različitih vremenskih izlaganja

Tablica 18. Utjecaj glavnih faktora dekontaminacije na ishod redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon 24 sata

Tablica 19. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta na ishod redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon 24 sata

Tablica 20. Usporedba dekontaminacijskog učinka vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat tijekom različitih vremenskih izlaganja

Tablica 21. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih temperatura vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Tablica 22. Usporedba dekontaminacijskog učinka otopina octene kiseline, mliječne kiseline i vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Tablica 23. pH vrijednosti mesa prije i nakon provedenih dekontaminacija 0. i 24. sat (pH ; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tablica 24. Preživljavanje sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon stresiranja otopinama organskih kiselina ($\log_{10}$ CFU/mL; $\bar{x} \pm \text{SD}$) u TSB-u

Tablica 25. Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) u TSB-u tijekom 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline u trajanju od 60 sekundi

Tablica 26. Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) u TSB-u tijekom 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline u trajanju od 60 sekundi

Tablica 27. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za pet antibiotika u sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline

Tablica 28. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za pet antibiotika u sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline

Tablica 29. Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola octenom i mliječnom kiselinom prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu (0. sat) nakon prethodnog stresiranja 2 %-tnim otopinama navedenih kiselina *in vitro*

Tablica 30. Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola octenom i mliječnom kiselinom (redukcije) prema nestresiranim i stresiranim sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $x \pm SD$) na svinjskom mesu (0. sat)

Tablica 31. Rezultati ocjene boje mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($x \pm SD$)

Tablica 32. Rezultati ocjene mirisa mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($x \pm SD$)

Tablica 33. Rezultati ocjene teksture mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($x \pm SD$)

Tablica 34. Rezultati ocjene okusa mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($x \pm SD$)

Tablica 35. Rezultati ocjene ukupnog dojma mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($x \pm SD$)

POPIS OZNAKA I KRATICA

AMR – antimikrobna rezistencija

ATR – engl. *acid tolerance response*

CFU – engl. *colony forming unit*

CIN – selektivni medij za izolaciju *Yersinia* spp. (engl. *Cefsulodin, IrgasanTM and novobiocin*)

DHP – dobra higijenska praksa

ECDC – Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*)

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

EUCAST – Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

FSO – ciljevi sigurnosti hrane (engl. *Food Safety Objectives*)

GRAS – općenito priznata kao sigurna (engl. *Generally Recognized As Safe*)

HACCP – sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*)

HPI – visoko patogena regija kromosoma (engl. *High pathogenicity island*)

ISO – međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*)

Ka – konstanta disocijacije

MALDI-TOF – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

McF – McFarland standard (engl. *McFarland standards*)

MIC – minimalna inhibicijska koncentracija

OD – optička gustoća (engl. *Optical density*)

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PCA – analiza glavnih komponentata (engl. *Principal Component Analysis*)

pKa – konstanta kiseline

PMF – proton-motorna sila (engl. *Proton motive force*)

PO – kriterij procesne higijene (engl. *Performance Objectives*)

PSB – pepton sorbitol žučni bujon (engl. *Peptone, Sorbitol and Bile Salts*)

RTE – hrana spremna za konzumaciju (engl. *ready-to-eat*)

TSB – triptoza sojin bujon (engl. *Tryptic Soy Broth*)

Sadržaj:

1.	UVOD	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1.	Enteropatogena <i>Yersinia</i> spp.	4
2.1.1.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	4
2.1.2.	Jersinioza ljudi.....	7
2.2.	Važnost patogene <i>Y. enterocolitica</i> u lancu proizvodnje svinjskog mesa	9
2.2.1.	Uloga klaoničke obrade svinja u kontaminaciji mesa	9
2.2.2.	Svinjsko meso i proizvodi od svinjskog mesa kao izvor patogene <i>Y. enterocolitica</i>	15
2.2.3.	Europsko zakonodavstvo u nadziranju patogene <i>Y. enterocolitica</i>	19
2.3.	Značaj dekontaminacije za higijenu i sigurnost mesa.....	23
2.4.	Kemijske metode dekontaminacije mesa organskim kiselinama.....	27
2.4.1.	Organske kiseline	27
2.4.1.1.	Mliječna kiselina	29
2.4.1.2.	Octena kiselina	30
2.4.2.	Dekontaminacijski učinak organskih kiselina na mesu	31
2.4.3.	Dekontaminacijski učinak organskih kiselina prema <i>Y. enterocolitica</i> na mesu	39
2.5.	Potencijalni rizici vezani uz dekontaminaciju mesa organskim kiselinama	40
2.5.1.	Razvoj acidorezistencije bakterija	40
2.5.2.	Povezanost acidorezistencije i antimikrobne rezistencije bakterija	43
2.5.3.	Utjecaj dekontaminacije mesa na njegova organoleptička svojstva	44
2.6.	Znanstveno mišljenje o sigurnosti i učinku primjene organskih kiselina u dekontaminaciji trupova svinja	46
3.	OBRAZLOŽENJE TEME	49
4.	MATERIJALI I METODE	50
4.1.	Plan eksperimenta	50
4.2.	Priprema sojeva <i>Y. enterocolitica</i>	51
4.3.	Priprema otopina organskih kiselina	53
4.4.	Postupak dekontaminacije mesa otopinama organskih kiselina i vodom	53
4.5.	Testiranje osjetljivosti sojeva <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 na otopine organskih kiselina	57
4.6.	Testiranje osjetljivosti sojeva <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 na antibiotike	59

4.7.	Organoleptička pretraga mesa tretiranog otopinama organskih kiselina	61
4.8.	Statistička obrada podataka	62
5.	REZULTATI	63
5.1.	Optimizacija eksperimentalnih uvjeta	63
5.2.	Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	63
5.2.1.	Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline	64
5.2.2.	Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline	68
5.2.3.	Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s vodom.....	72
5.3.	Rezultati skupnih redukcija broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola	73
5.4.	Usporedba razina primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola s organskim kiselinama na redukciju broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3.....	78
5.4.1.	Značajnost primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola na redukciju broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3.....	84
5.5.	Usporedba razina primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola s vodom na redukciju broja <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3.....	85
5.6.	Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola s otopinama organskih kiselina i dekontaminacijskih protokola s vodom	86
5.7.	Utjecaj dekontaminacije na promjene pH vrijednosti mesa	89
5.8.	Preživljavanje sojeva <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 nakon stresiranja organskim kiselinama u tekućem mediju	92
5.9.	Promjene u osjetljivosti sojeva <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 na antibiotike nakon izlaganja organskim kiselina	98
5.10.	Usporedba dekontaminacijskog učinka otopina organskih kiselina prema nestresiranim i stresiranim sojevima <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	101
5.11.	Organoleptička ocjena mesa po završetku dekontaminacijskih protokola.....	105
5.12.	Analiza utjecaja provedenih dekontaminacijskih protokola na organoleptička svojstva mesa	118
6.	RASPRAVA	122

7.	ZAKLJUČCI	141
8.	POPIS LITERATURE	142
9.	ŽIVOTOPIS AUTORICE S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	183

1. UVOD

Zakonodavstvo Europske unije u području higijene hrane oduvijek je bilo usmjereno ka prepoznavanju potencijalnih javno-zdravstvenih rizika za zdravlje potrošača te sukladno tome, propisivanju kontrolnih mjera duž cijelog proizvodnog lanca. Unatoč tome i uvažavanju postulata dobre higijenske prakse (DHP) kao i načela HACCP (engl. *Hazard Analysis Critical Control Point*) sustava, mikrobiološko onečišćenje ulaznih sirovina kao i gotovih proizvoda ponekad je neizbježno. Radi smanjivanja takvog potencijalno prisutnog onečišćenja, odnosno rizika pristupa se i dodatnim alatima i tehnikama, poput primjerice dekontaminacije mesa odobrenim dekontaminacijskim sredstvima i u uvjetima potpuno integriranog programa kontrole tog sredstva u cijelom proizvodnom lancu. Prema Uredbi (EZ) br. 853/2004 (ANONIMNO, 2004.b), spomenuto odobrenje nije potrebno jedino za vodu za piće kojom se uklanja površinsko onečišćenje proizvoda životinjskog podrijetla. Za primjenu svih drugih potencijalnih dekontaminacijskih sredstava ili tvari u Europskoj uniji je potrebno ishoditi odobrenje Europske komisije. U svakom slučaju, bitno je naglasiti kako bi dekontaminacijske metode u proizvodnji mesa trebale služiti isključivo kao dodatna krajnja mjera u postizanju ciljeva odnosno kriterija procesne higijene (PO, engl. *Performance Objectives*) i ciljeva sigurnosti hrane (FSO, engl. *Food Safety Objectives*), a nikako kao zamjena temeljnih postulata dobre higijenske prakse (HUGAS i TSIGARIDA, 2008.; NKOSI i sur., 2021.).

Primjena organskih kiselina u dekontaminaciji klaonički obrađenih trupova te porcioniranog mesa već je dugi niz godina predmet brojnih istraživanja (STIVARIUS i sur., 2002.; THERON i LUES, 2007.; HAN i sur., 2020.) te razmatrana kao opcija podizanja higijenske dispozicije trupova, ali i sigurnosti mesa, imajući na umu antimikrobni učinak na patogene mikroorganizme (HUGAS i TSIGARIDA, 2008.). Organske kiseline korištene u dekontaminaciji su slabe kiseline koje otapanjem u vodi ne disociraju što im pruža jači antimikrobni učinak u odnosu na anorganske kiseline (HASTAOĞLU i sur., 2022.). Mliječna kiselina i octena kiselina pripadaju skupini dosad najviše istraženih organskih kiselina (THERON i LUES, 2007.; MANI-LÓPEZ i sur., 2012.; VAN BA i sur., 2018.) obzirom na njihovu široku prisutnost u prirodi, kao i upotrebu u industriji hrane (NKOSI i sur., 2021.). Kako navode ROSSI i sur. (2023.), njihov dekontaminacijski potencijal ovisi o četiri skupine čimbenika vezane uz: način primjene (metoda, količina otapala, broj aplikacija, kombinacije s ostalim metodama), dekontaminacijsko sredstvo (vrsta kiseline, koncentracija, pH vrijednost), razina onečišćenja (vrsta i broj mikroorganizma, osjetljivost na kiseline) te karakteristike mesa (sastav, dijelovi trupa).

Svi ti čimbenici će doprinositi učinkovitosti dekontaminacijskog sredstva koja se očituje statistički značajno većom redukcijom broja patogenih mikroorganizama u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (EFSA BIOHAZ Panel, 2010.). Pritom je kontrolni uzorak tretiran vodom ili nije tretiran uopće, a konačna redukcija patogene mikrobiote mesa mora imati pozitivan utjecaj na javno zdravlje. Pored istraživanja učinka dekontaminacijskog sredstva na higijensku dispoziciju trupa i sigurnost mesa, neophodno je razmotriti i njihov potencijalno negativni utjecaj na organoleptička svojstva (DAN i sur., 2017.; YANG i sur., 2017.). Unatoč primjeni relativno niskih koncentracija kiselina (2-4 %) u dekontaminaciji mesa, učinak na organoleptička svojstva mesa nije jednoznačan. Iako većina autora zaključuje kako nema razlike u organoleptičkim pokazateljima kontrolnih i tretiranih uzoraka (THOMAS i sur., 2019.; ABD ELLATIF i sur., 2020.; MANZOOR i sur., 2020.), neka istraživanja ukazuju na negativan učinak dekontaminacije na boju (HARRIS i sur., 2012.), miris (STIVARIUS i sur., 2002.) ili teksturu mesa (GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.).

Nadalje, izlaganje bakterija subletalnim koncentracijama kiselina nameće pitanje njihove prilagodljivosti novonastalim kiselim uvjetima te posljedične smanjene osjetljivosti na kiseline (VAN NETTEN i sur., 1998.; BERRY i CUTTER, 2000.; MANI-LÓPEZ i sur., 2012.). S tim u vezi, potrebno je razmotriti povezanost otpornosti na kiseline i antimikrobne tvari, odnosno postoji li vjerojatnost od stjecanja antimikrobne rezistencije (AMR) nakon izlaganja bakterija otopinama organskih kiselina. Temeljem velike raširenosti kiselina u životinjskim i biljnim tkivima te okolišu općenito, takav rizik je zanemariv (EFSA BIOHAZ Panel, 2010.), iako i u ovom slučaju u literaturi postoje oprečna mišljenja (McMAHON i sur., 2007.). U konačnici, kako bi dekontaminacijska metoda bila prihvatljiva i korisna, pored svih prethodno navedenih uvjeta, poželjno je isključiti njezin negativni utjecaj na okoliš kao i ekonomsku isplativost (BLAŽEVIĆ i sur., 2023.).

Većina dosadašnjih provedenih istraživanja bila su usmjerena na ispitavanje dekontaminacijskog učinka mliječne kiseline, ponajviše na mesu goveda. Temeljem afirmativnog znanstvenog mišljenja EFSA-e (EFSA BIOHAZ Panel, 2010.) o procjeni sigurnosti i djelotvornosti mliječne kiseline za odstranjivanje površinskog mikrobiološkog onečišćenja sa trupova goveda, odobrena je njezina upotreba u dekontaminaciji trupova goveda na liniji klanja kroz Uredbu (EZ) br. 101/2013. Taj se pristup temeljio na dokazanoj učinkovitosti otopina mliječne kiseline prema bakterijama roda *Salmonella* kao i prema ukupnoj populaciji bakterija na trupovima goveda.

Istraživanja dekontaminacije svinjskog mesa također su bila usmjerena na salmonelu, međutim ne i na patogenu *Yersinia enterocolitica* koja je općenito zanemareni patogen u

veterinarskom javnom zdravstvu, ali i kontrolnim programima u klaonicama svinja. Svinjsko meso, odnosno konzumacija sirovog ili nedovoljno toplinski obrađenog svinjskog mesa navodi se kao čimbenik rizika pojave jersinioze ljudi, uzrokovane patogenim bioserotipom *Y. enterocolitica* 4/O:3 (EFSA i ECDC, 2024.). Jersinioza je u Europskoj uniji posljednjih godina kontinuirano treća zoonoza po učestalosti, ali i u uzlaznom trendu. Svinje su prirodni nosioci patogenih bioserotipova bakterije, primarno u tonzilama koje time predstavljaju glavni izvor onečišćenja prilikom klaoničke obrade trupova (ZDOLEC i KIŠ, 2021.). Kako bi se smanjio rizik onečišćenja svinjskog mesa patogenom *Y. enterocolitica*, nužno je poduzeti preventivne mjere još na razini farme, kao i na liniji klanja. Pored standardnih operativnih postupaka u klaoničkoj obradi poput podvezivanja rektuma, sanitacije opreme pri rasijecanju trupa i glave, ili odvajanja glave prije rasijecanja, moguće je razmotriti i primjenu dekontaminacije otopinama organskih kiselina kao dodatnu metodu smanjenja rizika prijenosa *Y. enterocolitica* u lancu mesa. Takva dekontaminacija na svinjskom mesu je, u odnosu na goveđe, tek u razmatranju. Naime, prije nekoliko godina EFSA je dobila zahtjev za izradom znanstvenog mišljenja o sigurnosti i učinkovitosti korištenja mliječne i octene kiseline za odstranjivanje površinskog mikrobiološkog onečišćenja sa trupova svinja (EFSA, 2018.). Prema dostupnim podacima iz literature zaključeno je kako primjena mliječne kiseline nema štetnih utjecaja, no nije bilo moguće utvrditi da li je i učinkovitija od primjene vode u istovjetnim fazama klaoničke obrade. S druge strane, za octenu kiselinu ne postoji dovoljno podataka kojima bi se potkrijepila njezina upotreba u iste svrhe te su potrebna dodatna istraživanja. Uzimajući u obzir bakterijske vrste obuhvaćene provedenim istraživanjima, kao i kod goveda, većina njih je ispitivala dekontaminacijski učinak prema *Salmonella* spp., ili pak općoj mikrobnj populaciji. Nažalost, broj i opseg takvih istraživanja je malen, a dosad nije provedeno ni jedno kojim bi se utvrdio dekontaminacijski potencijal organskih kiselina samo prema patogenoj *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu.

S tim u vezi, cilj ovog istraživanja je utvrditi dekontaminacijski učinak organskih kiselina na svinjskom mesu inokuliranom različitim sojevima bakterije *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 u laboratorijskim uvjetima, ispitati njihov utjecaj na organoleptička svojstva mesa te istražiti povezanost otpornosti *Y. enterocolitica* 4/O:3 na antibiotike i na organske kiseline.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Enteropatogena *Yersinia* spp.

2.1.1. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica već je desetljećima poznata kao jedan o najčešćih hranom prenosivih uzročnika gastrointestinalnih oboljenja ljudi. Tek nedavno provedenom komparativnom genomskom analizom reda *Enterobacteriales* (ADEOLU i sur., 2016.), reklasificirana je u zasebnu porodicu *Yersiniaceae*, rod *Yersinia*. Unutar navedenog roda se, pored *Yersinia enterocolitica*, nalaze još dvije vrste: *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia pestis*, obje također patogene za čovjeka (SABINA i sur., 2011., BANCERZ-KISIEL i sur., 2019.). Prema NEUBAUERU i sur. (2000.), a temeljem prisutnosti različitih gena 16S rRNA sekvence, vrsta *Y. enterocolitica* dijeli se u dvije podvrste: *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* i *Y. enterocolitica* subsp. *paleoartica*. Morfološki, odnosno sukladno biokemijskim karakteristikama to su Gram negativne, štapičaste, pokretne, asporogene, fakultativno anaerobne, oksidaza negativne, a katalaza pozitivne bakterije koje karakterizira psihrotrofnost, odnosno sposobnost rasta na uobičajenim temperaturama hlađenja (BARI i sur, 2011.; LEON-VELARDE i sur., 2019.), dok u zamrznutoj hrani mogu preživjeti kroz dulji period (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2012.; RIAHI i sur., 2021.). Pored navedenoga, sposobne su preživjeti u relativno kiselim uvjetima (minimalni pH 4,2) kao i pri većim koncentracijama soli (7 % NaCl). Za razliku od niskih temperatura, osjetljive su na toplinu pa ih tako uobičajene temperature pastemizacije inaktiviraju u roku od 1-3 minute (MANCINI i sur., 2022.).

Patogenost sojeva *Y. enterocolitica* uvjetovana je podjelom na 6 biotipova (1A, 1B, 2, 3, 4, i 5) koji se temeljem razlika u površinskim O antigenima razgraničuju na više od 70 serotipova. Obzirom da su pojedini serotipovi prisutni i kod patogenih i nepatogenih sojeva, informacija o pripadnosti pojedinom biotipu ključna je za određivanje stupnja patogenosti soja kao i za razumijevanje epidemiologije humane jersinioze (EFSA, 2007.). Naime, biotipovi se prema patogenosti svrstavaju u tri skupine: visoko patogeni (biotip 1B), umjereno patogeni (biotipovi 2-5) i nepatogeni (1A). Općenito, patogenost sojeva vezana je uz sposobnost bakterijske stanice da prolazi kroz gastrointestinalnu sluznicu, prijanja i prodire u enterocite te proizvede yst enterotoksin (engl. *Yersinia* stable toxin) odgovoran za pojavu gastrointestinalnih poremetnji (PRIMAVILLA i sur., 2023.). Da bi sojevi ispoljili virulentnost, neophodna je prisutnost nekoliko invazivnih čimbenika (GUPTA i sur., 2014.) od kojih je virulentni plazmid

(pYV – engl. *plasmid for Yersinia virulence*) najvažniji za njihovo umnažanje u limfatičnom tkivu i unutarnjim organima (BONARDI i sur., 2016.; BANCERZ-KISIEL i sur., 2018.), a posjeduju ga svi patogeni biotipovi bakterije (FABREGA i VILA, 2012.).

Plazmidi su odgovorni za sintezu adhezivnih proteina kojima se olakšava ulazak bakterije u stanicu domaćina (YadA – engl. *Yersinia adhesin A*) te citotoksičnih proteina (YopE – engl. *Yersinia outer protein*) s antifagocitnom aktivnošću (MILNE-DAVIES i sur., 2019.) koje bakterijama omogućuju međustaničnu proliferaciju (PLATT-SAMORAJ, 2022.). Tako sojevi biotipa 1A koji se načelno smatraju nepatogenima (BONARDI i sur., 2016.; RIAHI i sur., 2021.), ne posjeduju plazmide, no unatoč tome neki od njih imaju sposobnost ulaska u stanice domaćina što dokazuje da plazmidi nisu jedini dokaz virulencije soja (REVELL i MILLER, 2001.). Osim toga, pojedina istraživanja dokazuju da i sojevi biotipa 1A uzrokuju gastrointestinalna oboljenja slična onima uzrokovanim patogenim biotipovima (SINGH i VIRDI, 2004.; PLATT-SAMORAJ i sur., 2006.), što ukazuje na prisutnost drugih virulentnih faktora ključnih u patogenezi jersinioze (BOLTON i sur., 2013.; BANCERZ-KISIEL i sur., 2018.). S tim u vezi, u novije vrijeme sve se više preispituje njegova uloga u razvoju humane jersinioze (PALAU i sur., 2024.).

Prema BANCERZ-KISIEL i sur. (2018.), najznačajniji pokazatelji virulencije (Tablica 1) u determinaciji stupnja patogenosti pojedinog soja su *ail* gen (engl. *attachment invasion locus*), *inv* gen (engl. *invasion*) i *yst* gen (engl. *Yersinia – stable toxin*). *Ail* gen zadužen je za kodiranje proteina vanjske membrane koji pridonosi adhezivnosti, invazivnosti i otpornosti na komplementom posredovanu lizu stanica i jedan je od najčešće ispitivanih gena prilikom identifikacije patogenih sojeva *Y. enterocolitica* (RAHMAN i sur., 2011.). *Inv* gen kodira protein potreban za učinkovitu translokaciju bakterijskih stanica kroz crijevni epitel, a *yst* gen je odgovoran za proizvodnju termostabilnog enterotoksina ključnog u patogenezi dijareje (SINGH i VIRDI, 2004.; GNANASEKARAN i sur., 2018.). Regulacija ekspresije *yst* gena regulirana je *Yersinia* modulirajućim proteinom (YmoA – engl. *Yersinia modulating protein*), odnosno *ymoA* kromosomskim genom (BANCERZ-KISIEL i sur., 2012.; MORKA i sur., 2021.) pa je tako odsustvo enterotoksogenog učinka *yst*-pozitivnih sojeva *Y. enterocolitica* posljedica inhibitornog učinka *ymoA* gena na ekspresiju *yst* gena (STARKE i FUCHS, 2014.).

Tablica 1. Najznačajniji pokazatelji virulencije bakterije *Yersinia enterocolitica* (BANCERZ-KISIEL i sur., 2018.)

Gen	Genetski produkt	Lokacija
<i>myfA</i>	<i>Yersinia</i> mukoidni faktor (MyfA – engl. mucoid <i>Yersinia</i> factor)	kromosom
<i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhezin (YadA – engl. <i>Yersinia</i> adhesin)	plazmid
<i>invA</i>	Invazin (InvA – engl. Invasin)	kromosom
<i>ail</i>	Prijanjajuće invazivni protein lokusa (Ail – engl. attachment-invasion locus protein)	kromosom
<i>yop</i>	Protein vanjske membrane (Yops – engl. <i>Yersinia</i> outer membrane protein)	plazmid
<i>yst</i>	<i>Yersinia</i> stabilni toksin (Yst – engl. <i>Yersinia</i> stable toxin)	kromosom
<i>virF</i>	Virulentni regulon (VirF – engl. virulence regulon)	plazmid
<i>ymoA</i>	<i>Yersinia</i> modulator (YmoA – engl. <i>Yersinia</i> modulator)	kromosom

Serotipovi O:3, O:8, O:9 i O:5,27 se najčešće povezuje s infekcijama ljudi (BOTTONE, 2015.; SHOAIB i sur., 2019.), a prema EFSA-i i ECDC-u (2024.) najučestaliji bioserotipovi u Europi su 4/O:3 (86,9 %) i 2/O:9 (10,7 %), dok je 1B/O:8 najpatogeniji (PLATT-SAMORAJ, 2022.), iako rijetko prisutan u Europi. Patogenost sojeva biotipa 1B uvjetovana je prisutnošću tzv. yersiniabaktina – siderofore esencijalne za rast bakterijske stanice čija sinteza je regulirana unutar visoko patogene regije kromosoma (HPI – engl. *High pathogenicity island*) karakteristične za virulentne sojeve (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Obzirom da je rijetko izoliran iz ljudi, rezervoari navedenog bioserotipa su i dalje nepoznati. Iako je uglavnom prisutan u Sjevernoj Americi i Japanu (ZADERNOWSKA i sur., 2013.; ODA i sur., 2015.), novija istraživanja ukazuju na moguć prijenos sojeva biotipa 1B između Sjeverne Amerike i Europe (SAVIN i sur., 2018.). Sojevi biotipa 3 i 5 se također rijetko izoliraju, a uglavnom su vezani uz serotip O:3 pa je tako u nedavnom istraživanju u Finskoj bioserotip 5/O:3 prvi put izoliran iz ovce (JOUTSEN i sur., 2016.b), dok je u istraživanju KAMEYAMA i sur. (2016.) bioserotip 3/O:3 prvi put dokazan u hrčaka kao kućnih ljubimaca. Kao što je prethodno spomenuto, sojevi bioserotipova 4/O:3 i 2/O:9 su najčešći uzročnici yersinioze u Europi, od kojih 4/O:3 prevladava, a u brojnim zemljama je i dalje daleko vodeći bioserotip po učestalosti izolacije iz svinja (RÅSBÄCK i sur., 2018.; SACCHINI i sur., 2018.; KOSKINEN i sur., 2019; TERENTJEVA i sur., 2022.) pa tako i u Hrvatskoj (PAŽIN, 2021.). S druge strane, bioserotip

2/O:9 je rjeđe zastupljen, iako nedavno istraživanje u Argentini ukazuje na njegovu veću prevalenciju u odnosu na bioserotip 4/O:3 (ESTRADA i sur., 2019.), dok se primjerice na Novom Zelandu navodi kao glavni uzročnik jersinioze (STRYDOM i sur., 2019.).

Svinje se smatraju glavnim rezervoarima patogenih sojeva *Y. enterocolitica*, posebno bioserotipa 4/O:3, koji primarno koloniziraju tonzile i limfatično tkivo crijeva. Obzirom da su asimptomatski nosioci patogenih sojeva, kliničke manifestacije infekcije su rijetke (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2015.), i tek ponekad se mogu javiti kod mladih životinja nerazvijenog imuniteta (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Iako znatno rjeđe, domaći i divlji preživači, perad, glodavci, ali i kućni ljubimci mogu predstavljati izvor zaraze za ljude pa je tako njihova uloga u nastanku jersinioze u posljednje vrijeme predmet brojnih istraživanja (ZHICHAO i sur., 2019.; ARDEN i sur., 2022.; NASSER i sur., 2023.).

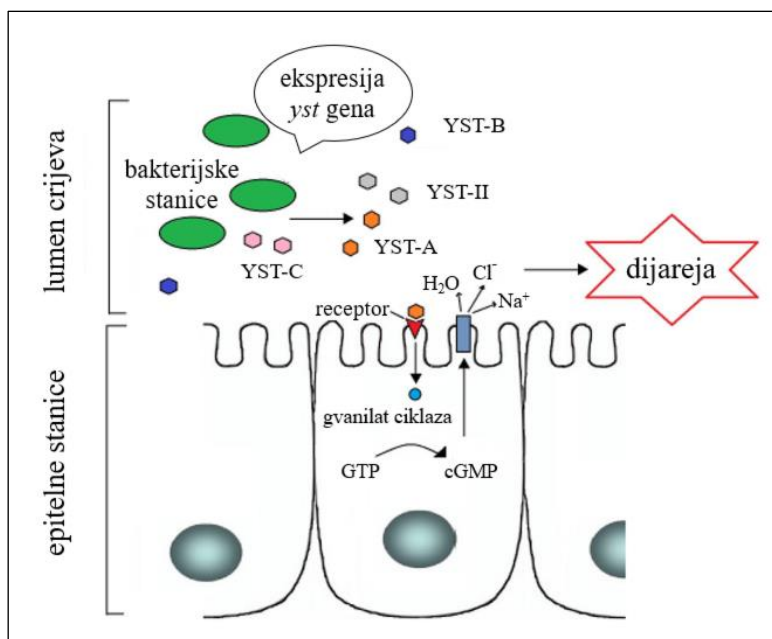
2.1.2. Jersinioza ljudi

Infekcija patogenom *Y. enterocolitica* najčešće nastaje konzumacijom kontaminirane hrane ili vode (BARI i sur., 2011.; GUPTA i sur., 2014.; FREEDRIKSSON-AHOMAA, 2015.), a vrlo rijetko direktnim kontaktom između zaraženih ljudi ili životinja i ljudi. Ipak, zabilježeni su i takvi slučajevi, a nastaju kao posljedica loših higijenskih navika, primarno nepranja ruku (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Pored mesa i mesnih proizvoda, mlijeko, voće i povrće te gotova hrana mogu predstavljati izvor infekcije za ljude, no smatra se da je konzumacija termički nedovoljno obrađene svinjetine ili proizvoda od svinjetine glavni rizični faktor u nastanku humane jersinioze (GUILLIER i sur., 2021.). Prema istoimenom autoru, vjerojatnost nastanka infekcije u tom slučaju je čak četiri puta veća (OR=4,215; CI 95 %). Ipak, vrsta hrane/proizvoda kao izvora infekcije u najvećem broju slučajeva ostane nepoznata. Primarni razlog za to je činjenica što praćenje ili nadziranje *Y. enterocolitica* nije zakonski regulirano, a s druge strane njezino izdvajanje iz hrane je dugotrajno i otežano, djelomično zbog prisutnosti pozadinske mikroflore, ali i inicijalno malog broja patogenih sojeva (PAŽIN, 2021.).

Infekcija patogenom *Y. enterocolitica* očituje se akutnim gastroenteritisom s uobičajenim simptomima povišene tjelesne temperature, mučnine, povraćanja i proljeva (RAKIN i sur., 2015.). Iako intenzitet simptoma ovisi o dobi, imunom statusu osobe, ali i patogenosti soja, u većini slučajeva oboljenja su samoograničavajuća i ne zahtijevaju antimikrobnu terapiju osim u slučaju razvoja sistemskih infekcija (JOUTSEN i FREEDRIKSSON-AHOMAA, 2016.a). Eventualne komplikacije uključuju sekundarne imunoposredovane reakcije poput reaktivnog artritisa, glomerulonefritisa, endokarditisa ili eritema, posebno kod osoba pozitivnih na HLA-B27 leukocitni antigen (RAKIN i sur., 2015.). U pravilu, prvi simptomi se javljaju nakon 24-48 sati i traju 3-14 dana dok u kroničnom obliku bolest može potrajati mjesecima. Pretpostavlja se da infektivna doza za čovjeka iznosi od 10^4 - 10^6 bakterijskih stanica, a uvjetovana je prije svega patogenošću soja te imunosnim statusom pojedinca (BONARDI i sur., 2010.).

Nakon peroralnog unosa, *Y. enterocolitica* kolonizira crijeva, primarno terminalni ileum i proksimalni kolon koji se smatraju predilekcijskim mjestima. Virulentni plazmidi olakšavaju prihvatanje i prolazak bakterijskih stanica kroz crijevni epitel, vezanje za M stanice Payerovih ploča i na taj način ulazak u limfatički sustav. Unutar M stanica, bakterije su okružene vakuolama koje im omogućuju preživljavanje, ali ne i razmnožavanje (REIS i HORN, 2010.). Nakon translokacije vakuola s apikalnog dijela stanice, dolazi do otpuštanja bakterijskih stanica koje su potom izložene gustoј populaciji dendritičkih stanica, makrofaga i limfocita. Kako bi se obranili od imunosnog sustava domaćina, virulentni plazmidi aktivacijom Ysc-Yop tip III sekrecijskog sustava (T3SS – engl. *type III secretion system*) kodiraju proizvodnju citotoksičnih proteina pomoću kojih bakterije preživljavaju fagocitozu (RAKIN i sur., 2015.; MILNE-DAVIES i sur., 2019.), razmnožavaju se unutar fagocita te transportiraju do mezenterijalnih limfnih čvorova (FABREGA i VILA, 2012.).

Pored mogućnosti brzog umnažanja unutar stanica domaćina, stvaranje stabilnog enterotoksina (Yst) ima ključnu ulogu u patogenezi jersinioze i razvoju simptoma infekcije (Slika 1). Naime, pod utjecajem visokog osmolariteta, niske pH vrijednosti te temperature od 37 °C, dolazi do aktivacije ekspresije kromosomskog *yst* gena (MIKULSKIS i sur., 1994.) te nastanka stabilnog enterotoksina i njegovog lučenja u lumen crijeva (GIERCZYNSKI, 2012.). Enterotoksini stimuliraju aktivaciju gvanilat ciklaze koja pak povećava koncentraciju cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP – engl. *cyclic guanosine monophosphate*) u epitelnim stanicama što dovodi do translokacije tekućine u lumen crijeva (PLATT-SAMORAJ, 2022.). Na taj način enterotoksini uzrokuju proljev, koji je glavni simptom jersinioze (SINGH i VIRDI, 2004.; HUOVINEN i sur., 2010.).



Slika 1. Aktivacija *Yersinia* stabilnog enterotoksina u inficiranom domaćinu (PLATT-SAMORAJ, 2022.).

2.2. Važnost patogene *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje svinjskog mesa

2.2.1. Uloga klaoničke obrade svinja u kontaminaciji mesa

Svinje su glavni asimptomatski nosioci patogenih bioserotipova *Y. enterocolitica*, posebice 4/O:3 (MORKA i sur., 2021.; ZDOLEC i KIŠ, 2021.; YUE i sur., 2023.), čime se objašnjava povezanost konzumacije svinjskog mesa i jersinioze ljudi (BONARDI i sur., 2013.; VILAR i sur., 2015.). Nalaze se u tonzilama, jeziku, submandibularnim limfnim čvorovima, crijevima i fecesu (MOREIRA i sur., 2019.), iako je učestalost izolacije iz tonzila i submandibularnih čvorova daleko veća od one iz fekalnog materijala (BARI i sur., 2011.; FOIS i sur., 2018.). Ipak, prevalencija je varijabilna i ovisi o nekoliko čimbenika kao što su način uzgoja svinja i biosigurnosne mjere na farmi, dob životinje, ali i način izolacije iz pretraživanog materijala (LAUKKANEN-NINIOS i sur., 2014.). U literaturi postoje oprečna mišljenja o utjecaju različitog sustava držanja na prevalenciju *Y. enterocolitica* u populaciji svinja. Dok neki autori ukazuju na značajno veću prevalenciju patogene *Y. enterocolitica* u intenzivnim uvjetima držanja svinja u odnosu na organske sustave (NOWAK i sur., 2006.; VON ALTROCK i sur., 2006.; LAUKKANEN i sur., 2009.), istraživanje u Hrvatskoj (PAŽIN, 2021.) pokazalo je suprotno. Naime, veća prevalencija dokazana je u tonzilama svinja s obiteljskih

poljoprivrednih gospodarstava, a najmanja u svinja s velikih integriranih farmi što je zabilježeno i u nedavnom istraživanju ARSIĆA i sur. (2022.) u Srbiji. Pri tome su loše poduzete biosigurnosne mjere uvjetovale veću prevalenciju na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. S druge strane, RÅSBÄCK i sur. (2018.) zaključuju kako faktori poput veličine farme, načina hranidbe, pristupa otvorenim prostorima te prisutnosti ostalih vrsta životinja ne utječu na prevalenciju *Y. enterocolitica* u takvoj populaciji svinja.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da je nalaz patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama najveći u tovljenika, iako prevalencija dosta varira (6-95 %) među zemljama EU (MARTINEZ i sur., 2011.; VAN DAMME i sur., 2015.; SACCHINI i sur., 2018.; TERENTJEVA i sur., 2022.). KOSKINEN i sur. (2019.) navode da je ona nešto niža pretraživanjem fecesa (0,5-76 %), obzirom da je vrhunac izlučivanja u dobi od dva do pet mjeseci, nakon čega postupno opada. U svakom slučaju, visoka prevalencija *Y. enterocolitica* u svinja na razini farme je predisponirajući čimbenik za kontaminaciju trupova tijekom klaoničke obrade (FREDRIKSSON-AHOMA, 2017.). Obzirom da se prisutnost *Y. enterocolitica* ne može dokazati uobičajenim metodama inspekcije mesa, nužno je pridržavati se mjera sprječavanja fekalne kontaminacije počevši od farme, transporta svinja, njihovog smještaja u obore pa sve do klaoničke obrade (ARSIĆ i sur., 2023.). Učinkovitost primjene navedenih mjera je prije svega osigurana pridržavanjem postulata dobre higijenske prakse (DHP) te uspostavom sustava temeljenog na analizi opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (HACCP) tijekom svih faza proizvodnje (BLAGOJEVIĆ i sur., 2021.). U svakom slučaju, prisutnost patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama i crijevima je glavni rizični čimbenik koji povećava izgleda za kontaminaciju trupa pri klaoničkoj obradi (MARTINS i sur., 2018.).

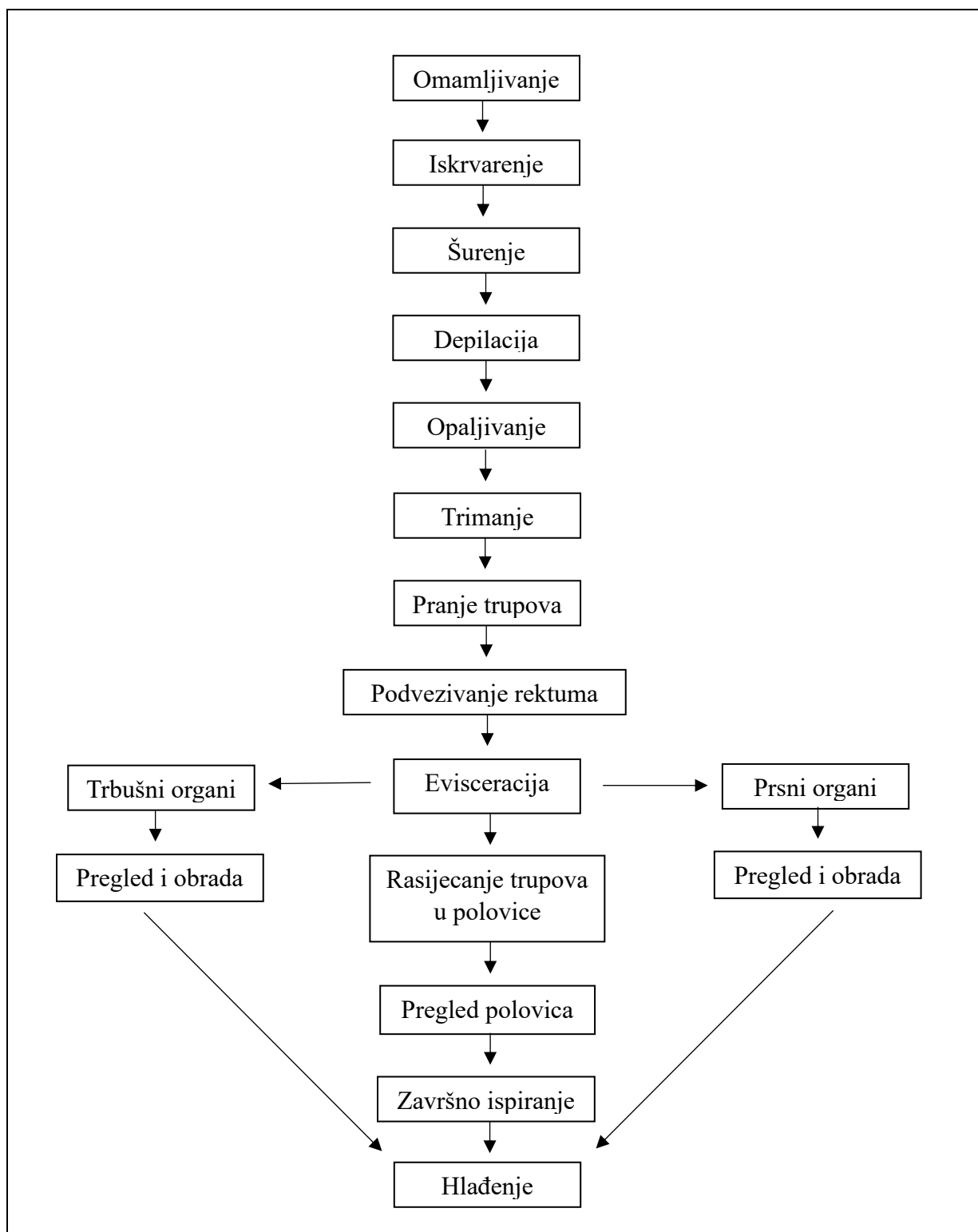
Brojni autori određivali su prevalenciju patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama zdravih svinja s ciljem procjene rizika od njenog ulaska u lanac proizvodnje hrane. Kao što je već prethodno spomenuto, rezultati su dosta varijabilni među članicama EU pa čak i unutar istih zemalja tijekom različitih vremenskih razdoblja. U istraživanju VAN DAMME i sur. (2015.) kojim je pretraženo više od 2000 uzoraka tonzila, fecesa i brisova trupova utvrđena je prevalencija patogene *Y. enterocolitica* od čak 63,1 % pri čemu je u više od 50 % uzoraka tonzila izoliran patogeni serovar O:3. Nešto niža prevalencija (35 %) nedavno je utvrđena u Latviji (TERENTJEVA i sur., 2022.), a autori su istu zabilježili i 12 godina ranije provedbom sličnog istraživanja (TERENTJEVA i BERZINŠ, 2010.). U Italiji je pak u istom vremenskom razmaku dokazan manji broj pozitivnih uzoraka (9,31 %) u odnosu na prethodno razdoblje (32 %) (CENTORAME i sur., 2017.), a podjednaku prevalenciju su potvrdili i SACCHINI i sur. (2018.). Jedan od mogućih razloga znatne širine raspona prevalencije patogene *Y. enterocolitica*

u pretraživanim uzorcima su zasigurno različite metode izolacije u predmetnim istraživanjima. Naime, poznato je da su molekularne metode puno osjetljivije u odnosu na klasične mikrobiološke pa će tako primjena PCR metode u detekciji uzročnika smanjiti vjerojatnost dobivanja lažno negativnih rezultata u slučaju prisustva mrtvih bakterijskih stanica u uzorku (MAZZETTE i sur., 2015.). U pojedinim radovima to dokazuju mali udjeli pozitivnih uzoraka od 3,2 % (FOIS i sur., 2018.) i 6,7 % (ANGELOVSKA i sur., 2023.) proizašlih iz istraživanja u kojima su korištene kulturelne metode izdvajanja. S druge strane, daleko veća prevalencija od 60 % (IBANEZ i sur., 2016.), 88 % (FREDRIKSSON-AHOMA i sur., 2007.) ili čak 93 % (MARTINEZ i sur., 2011.) dokazana je primjenom molekularnih metode izolacije (PCR). Stoga je usporedba prevalencija vrlo ograničavajuća u slučaju korištenja različitih metoda izolacije i detekcije *Y. enterocolitica* u usporednim istraživanjima. Ipak, u našem nedavno provedenom istraživanju u Hrvatskoj (ZDOLEC i sur., 2022.), patogena *Y. enterocolitica* je pronađena u čak 101 od 234 (43,16 %) pretraženih uzoraka tonzila svinja, iako je način dokazivanja uključivao samo primjenu kulturelnih metoda prema ISO 10273:2017. Moguće je da se veća osjetljivost metode postigla primjenom kromogene hranjive podloge, uz standardni CIN agar. Bitno je naglasiti da su sva prethodno navedena istraživanja dokazala pripadnost izoliranih sojeva *Y. enterocolitica* patogenom bioserotipu 4/O:3 i to u više od 90 % slučajeva, a u ponekima i 100 %. Takav podatak je glavni dokaz važnosti uloge svinja u širenju patogena kroz lanac proizvodnje svinjskog mesa, a time i u epidemiologiji jersinioze ljudi.

Visoka prevalencija patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama svakako je predisponirajući faktor za kontaminaciju mesa tijekom klaoničke obrade i često je u pozitivnoj korelaciji sa učestalošću pronalaska patogena iz obrisaka trupova svinja. Relativno visoku prevalenciju patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama i na trupovima (55,1 %; 39,1 %) dokazali su VAN DAMME i sur. (2015.) analizom više od 2000 uzoraka prikupljenih od 360 svinja. U istraživanju TERENCEVA i sur. (2022.), gdje je prevalencija patogena u tonzilama iznosila 35 %, *Y. enterocolitica* je izolirana iz trećine uzoraka obrisaka trupova (13 %). S druge strane, FOIS i sur. (2018.) su izolirali patogenu *Y. enterocolitica* iz 3,2 % uzoraka tonzila, no svi su uzorci obrisaka s trupova bili negativni. Slične rezultate potvrdili su i MARTINS i sur. (2018.), čime naglašavaju ulogu tonzila kao ključnog izvora širenja ovog patogena kroz lanac hrane. MAZZETTE i sur. (2015.) su pak, dokazali jednaku prevalenciju patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama i na trupovima (5,3 %), iako je njihov broj na trupovima bio manji za 1-2 log₁₀ CFU u odnosu na tonzile. Unatoč navedenim podacima, prisutnost patogene *Y. enterocolitica* na trupu čak i u malim brojevima predstavlja rizični čimbenik za potrošača imajući na umu njezinu

sposobnost preživljavanja pri uobičajenim temperaturama hlađenja mesa (ZDOLEC i KIŠ, 2021.).

Prilikom procjene prevalencije patogene *Y. enterocolitica* na trupovima, pored već spomenute metode izolacije, važno je razmotriti koji dio regije trupa uzorkovati kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati. Naime, kontaminacija trupa u načelu nije ujednačena, već je uvjetovana lokalizacijom uzročnika (tonzile) pa su tako područja oko glave i prsne kosti mjesta na kojima se može očekivati najveći broj bakterija (LAUKKANEN i sur., 2010.; VAN DAMME i sur., 2015.). Tako su VAN DAMME i sur. (2015.) utvrdili da je u najvećem broju slučajeva patogena *Y. enterocolitica* izolirana s područja mandibularne regije (28,9 %), a značajno manje s područja zdjelične regije (7,8 %). S tim u vezi, faze klaoničke obrade u kojima oprema i ljudi dolaze u kontakt sa tonzilama ili fekalnim sadržajem, kao što su evisceracija ili rasijecanje trupa, smatraju se ključnima u kontaminaciji mesa trupa (Slika 2).



Slika 2. Faze klaoničke obrade svinja

Pravilno zatvaranje rektuma plastičnom vrećicom ili automatskim uređajem značajno smanjuje rizik od kontaminacije mesa u klaonicama (LAUKKANEN-NINIOS i sur., 2014.; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Pored toga, posebnu pažnju treba posvetiti uklanjanju tonzila obzirom da eventualni preostali dijelovi limfatičnog tkiva mogu biti izvor širenja bakterija na okolno mišićno tkivo, posebice tijekom rasijecanja polovica. Osim trupa, još većem riziku od križne kontaminacije su podložni organi (srce, pluća, jetra) i to putem izravnog kontakta s tonzilama ili posredno kontaminiranim priborom (VAN DAMME i sur., 2015.; VILAR i sur., 2015.). Iz tog razloga, brojni autori predlažu odvajanje glave zajedno s jezikom i tonzilama radi minimaliziranja kontaminacije organa (DENIS i sur., 2012.; VAN DAMME i sur., 2015.; VILAR i sur., 2015.; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Ipak, u literaturi zasad ne postoji puno podataka o utjecaju parcijalne evisceracije na kontaminaciju trupa, organa ili radne okoline klaonice. Tek nedavno su BIASINO i sur. (2018.) ispitivali njezin utjecaj na higijenu trupa i to u pogledu brojnosti bakterija indikatora higijene (ukupni broj bakterija, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*) kao i prisutnosti *Salmonella* spp. i patogene *Y. enterocolitica*. Dakle, primjenjenom metodom su se uklanjali samo pluća, srce i jetra, dok je najkontaminiraniji dio (tonzile, jezik) ostao intaktan unutar glave. Takav način evisceracije rezultirao je značajno manjim brojem indikatorskih bakterija na ždrijelu i trupu generalno, no nije utvrđena razlika u prisutnosti patogenih bakterija u odnosu na standardno izvedenu evisceraciju. MARTINS i sur. (2018.) su glavu svinja odvajali u početnom dijelu linije klanja što je vjerojatno rezultiralo odsustvom *Y. enterocolitica* u pretraživanim obriscima korištenog pribora.

Bitno je naglasiti da će učinkovitost navedenih intervencija u smanjenju kontaminacije mesa biti postignuta samo u slučaju pridržavanja propisanih sanitacijskih postupaka tijekom klaoničke obrade. To se najviše odnosi na održavanje čistoće korištenog pribora, njegovu pravilnu sterilizaciju kao i osobnu higijenu ljudi koji dolaze u kontakt s mesom. Primjena metode dva noža, u kojoj je za vrijeme upotrebe jednog, drugi u sterilizatoru s vrućom vodom od minimalno 82 °C, smatra se ključnom u postupku odvajanja tonzila odnosno uklanjanja prsnih organa (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2017.). Isto vrijedi i za fazu rasijecanja trupa tijekom koje je važno adekvatno sterilizirati opremu između pojedine primjene, a navedeno je svakako preporučljivo napraviti nakon svake nečiste operacije, neovisno o fazi klaoničke obrade.

2.2.2. Svinjsko meso i proizvodi od svinjskog mesa kao izvor patogene *Y. enterocolitica*

Meso i mesni proizvodi smatraju se najvažnijim izvorom zaraze patogenom *Y. enterocolitica*, pri čemu svinjsko meso dominira. Promjene u mesnoj industriji kojima se proizvodnja iz malih klaonica s ograničenim kapacitetom distribucije preusmjerila u velike objekte koji prerađuju po nekoliko stotina ili tisuća svinja dnevno i plasiraju proizvode na domaće i inozemno tržište zasigurno su doprinijele pojavnosti jersinioze u posljednjih nekoliko desetljeća. S tim u vezi, napredak u tehnologiji prerade i pakiranja mesa omogućile su industrijama i potrošačima očuvanje proizvoda kroz dulji period, čime je patogenima poput *Y. enterocolitica* pospješena prilagodba na uvjete hlađenja u produženim rokovima trajanja. Prema posljednjem izvješću EFSE i ECDC-a (2024.), 10,2 % pretraženih uzoraka hrane iz kategorije mesa i mesnih proizvoda bilo je pozitivno na *Yersinia*. Najveći postotak pozitivnih uzoraka (12,6 %) pripadao je kategoriji svježeg svinjskog mesa dok u proizvodima spremnima za konzumaciju (RTE – engl. ready-to-eat) *Yersinia* nije pronađena. Obzirom na psihrotrofnost bakterije *Y. enterocolitica*, visoka učestalost njezine izolacije iz svježeg svinjskog mesa nije iznenađujuća. Naime, pri uobičajenim temperaturama hlađenja patogeni sojevi bakterije pokazuju relativno visoku stopu umnažanja, veću i od *Listeria monocytogenes* (BHADURI, 2005.). Smatra se da u hrani neutralne pH vrijednosti, koja je pohranjena na temperaturi od 5 °C, broj bakterijskih stanice unutar 5 dana poraste sa 10 CFU/mL na $2,8 \times 10^7$ CFU/mL (PLATT-SAMORAJ, 2022.). Sposobnost razmnožavanja pri takvoj temperaturi pogoduje održavanju i širenju patogena kroz proizvodni sustav što je posebno bitno još na početku hladnog lanca, odnosno tijekom hlađenja polovica. Naime, trupovi se po završetku klanja smještaju u rashladne komore u kojima ostaju i do nekoliko dana prije daljnjeg rascijecanja i pakiranja što ostavlja dovoljno vremena za porast inicijalne populacije *Y. enterocolitica* na mesu čak i ako je prisutna u malom broju. Razmnožavanje dakako uvjetuje istovremena prisutnost drugih vrsta psihrotrofnih bakterija na mesu, no kompetitivnost *Y. enterocolitica* dodatno ovisi o ostalim karakteristikama hrane poput pH vrijednosti, temperature pohrane ili načina pakiranja (BARI i sur., 2011.). Primjerice, u istraživanju CONTE-JUNIOR i sur. (2010.), rast *Y. enterocolitica* u vakuum pakiranju pohranjenom pri različitim temperaturama bio je jednak ili čak veći u odnosu na ostalu mikrofloru prisutnu na mesu. Isti autori su dokazali kako je rast *Y. enterocolitica* bio gotovo potpuno inhibiran u mesu pohranjenom na 4 °C, a pakiranom u modificiranoj atmosferi sa 60 % CO₂ i 0,4 % CO, dok je u uzorcima pakiranim sa većom koncentracijom kisika (70 % O₂/30 % CO₂) njihov broj pri istoj temperaturi porastao sa 5×10^2 CFU/g na 10^4 CFU/g.

Sirovo, odnosno termički nedovoljno obrađeno svinjsko meso smatra se glavnim rizičnim faktorom u nastanku humane jersinioze (LIANG i sur., 2012.; GUILLIER i sur., 2021.). Ipak, konzumacija sirove svinjetine je u tek malom broju slučajeva stvarni razlog oboljenja obzirom na uvriježene prehrambene navike potrošača pri kojima se zahtjeva obavezna termička obrada takvog proizvoda. Tako je u većini slučajeva glavni izvor zaraze termički nedovoljno obrađeno meso, ili još češće, nepridržanje higijenskih navika tokom pripreme hrane, odnosno rekontaminacija nakon termičke obrade. *Y. enterocolitica* u najvećem broju slučajeva u meso dopijeva kontaminacijom svinjskih polovica još na liniji klanja, odakle se kroz daljnji lanac proizvodnje i distribucije svježih svinjskih proizvoda prenosi do potrošača. U tom kontekstu, prodajna mjesta poput mesnica imaju važnu ulogu u širenju patogena putem kontaminiranih radnih površina s kojima meso dolazi u izravan dodir, što je slučaj kod svih onih s nezadovoljavajućom higijenskom praksom (LAUKKANEN-NINIOS i sur., 2014.; MANCINI i sur., 2022.). U kućanstvima pak, takva hrana može biti izvor daljnje kontaminacije tijekom neprikladne pohrane, prilikom koje se patogen može prenijeti na unutarnje površine hladnjaka ili na hranu koja je spremna za konzumaciju, što predstavlja još veći rizik (TAN i sur., 2014.).

Brojni autori ispitivali su prevalenciju *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje svinjskog mesa, no rezultati tih studija su često neusporedivi zbog primjene različitih metodologija istraživanja. Primarno se to odnosi na vrstu uzorka, fazu uzorkovanja u tijeku proizvodnje, mjesto prodaje, a ponajviše način dokazivanja odnosno osjetljivost ili specifičnost primjenjene metode izolacije i dokazivanja. U nedavnom istraživanju, FERL i sur. (2020.) su bakteriju *Y. enterocolitica* izolirali iz 22,6 % uzoraka svježeg mesa namijenjenog proizvodnji mljevenog mesa te iz čak 11,5 % gotovih proizvoda od sirove usitnjene svinjetine (engl. RTE – ready-to-eat). Iz većine uzoraka (84,8 %) izolirani sojevi pripadali su patogenom bioserotipu 4/O:3. Prethodno su slične rezultate dobili WICKE i sur. (2018.) gdje je učestalost izolacije *Y. enterocolitica* u svježem mesu (16,2 %) bila veća u odnosu na mljeveno meso (5,7 %). Takve nalaze FERL i sur. (2020.) obrazlažu sastavom mikrobiote prisutne tijekom proizvodnje mljevenog mesa koja zbog jake kompetitivnosti potiskuje populaciju *Y. enterocolitica* pa je njezina detekcija u konačnom proizvodu vrlo otežana. S druge strane, isti autor navodi kako je u njegovom istraživanju primjena real-time PCR-a u kombinaciji sa hladnim obogaćivanjem u trajanju od pet dana zasigurno doprinijela većoj osjetljivosti metode detekcije. Naime, obzirom da je *Y. enterocolitica* pri tako niskim temperaturama sposobna nadvladati rast ostalih prisutnih enterobakterija, velika gustoća populacije po završetku inkubacije olakšava njezinu detekciju (PETSIS i sur., 2016.).

Prednost molekularnih metoda u detekciji *Y. enterocolitica* dokazali su i TAN i sur. (2014.) prilikom dokazivanja njezine prevalencije u svježim uzorcima svinjetine u Maleziji. U istraživanju su koristili standardne kulturelne metode, ali i PCR po završetku obogaćivanja pomoću kojeg je ustanovljena daleko veća prevalencija (60,3 %) u odnosu na klasičnu metodu izolacije (12,1 %). Najveća je iznosila u uzorcima svježeg mesa (23,8 %), zatim u jetri (20 %) te u crijevima (12,5 %), a 88 % izolata pripadalo je patogenim bioserotipovima (1B/O:8; 3/O:3). Osim toga, autori ističu kako je visoki postotak pozadinske mikrobiote u takvim uzorcima otežao izdvajanje *Y. enterocolitica*, obzirom da selektivni medij podupire rast većine populacije te kolonije takvih bakterija morfološki izgledaju vrlo slično onima roda *Yersinia*.

Ipak, standardne kulturelne metode i dalje su zlatni standard u izolaciji *Y. enterocolitica*, a po potrebi se nadopunjuju sa sofisticiranim molekularnim metodama koje olakšavaju izdvajanje i karakterizaciju patogenih sojeva. Nedavno istraživanje u Latviji (TERENTJEVA i sur., 2022.) obuhvatilo je ukupno 180 uzoraka svinjskih odrezaka, mljevenog mesa i iznutrica te 150 uzoraka goveđeg mesa koji su pretraženi na prisustvo *Y. enterocolitica* standardnom ISO metodom 10273:2017. Rezultati su pokazali kako je prevalencija *Y. enterocolitica* u svinjetini (24 %, 44/180) bila značajno veća ($p < 0,05$) nego u goveđem mesu (13 %, 19/150). Svi izolati izdvojeni iz uzoraka goveđeg mesa pripadali su nepatogenom biotipu 1A, dok su patogeni bioserotipovi 4/O:3 i 2/O:9 potvrđeni isključivo iz uzoraka svinjskog mesa, s 3 % pozitivnih na *ail* gen. Nešto veću prevalenciju *Y. enterocolitica* (28,38 %, 18,13-38,67, 95 % CI) u uzorcima svježeg svinjskog mesa izvjestili su PRIMAVILLA i sur. (2023.) nedavno provedenim retrospektivnim istraživanjem u središnjoj Italiji. Iako je kao i u prethodnom istraživanju statistički veća prevalencija zabilježena u svježem svinjskom mesu u odnosu na goveđe ($p < 0,001$), ovdje su svi izolati pripadali nepatogenom biotipu 1A i bili negativni na *ail* gen. Za razliku od svježeg svinjskog mesa, svi pretraženi uzorci fermentiranih mesnih proizvoda bili su negativni na prisutnost *Y. enterocolitica*, no takve rezultate trebalo bi uzeti s dozom opreza obzirom na znatno manji broj uzoraka uključenih u istraživanje (N=9). WANG i sur. (2021.a) pretražili su 1588 uzoraka različitih vrsta hrane od kojih 240 uzoraka svježeg mesa, a 268 tzv. brzo smrznute hrane uglavnom sačinjene od mesa. Ustanovljena prevalencija *Y. enterocolitica* u svježem mesu bila je značajno manja (4,58 %) nego u brzo smrznutim proizvodima (6,72 %) što ukazuje na dodatni rizik jer se u Kini oni tek blago podgrijavaju prije konzumacije. U sličnom istraživanju provedenom također u Kini (LÜ i sur., 2022.), autori su utvrdili nešto veću prevalenciju *Y. enterocolitica* u svježoj svinjetini (8 %), dok je u mljevenom mesu ona iznosila 8,7 %, a u medaljonima od svinjskog mesa 7,3 %. Pritom nije ustanovljena značajna razlika u učestalosti izolacije patogena iz mljevenog mesa i svinjskih medaljona pa autori zaključuju

kako je mogući razlog tome križna kontaminacija nastala zbog nepridržavanja higijenskih mjera prilikom usitnjavanja i oblikovanja mesa (upotreba istog kontaminiranog pribora i radnih površina).

Pored već spomenute uloge svježeg mesa u širenju jersinioze, predmet brojnih ispitivanja su i proizvodi spremni za konzumaciju (RTE – engl. ready-to-eat), od kojih su u kontekstu istraživanja prevalencije *Y. enterocolitica* najčešće fermentirane kobasice. U odnosu na svježe meso, rizik od pronalaska *Y. enterocolitica* u takvim proizvodima je daleko manji, imajući na umu uvjete koji tijekom faze fermentacije odnosno zrenja otežavaju preživljavanje i održivost patogena u završnom proizvodu (PERUZY i sur., 2020.). Ipak, sporadični nalaz je zabilježen pa su tako u Egiptu YOUNIS i sur. (2019.) izolirali *Y. enterocolitica* iz 10 % pretraženih uzoraka kobasica, pri čemu je čak 70 % izolata stvaralo biofilm *in vitro*. S tim u vezi, kod takvih izolata je tvorba biofilma bila u pozitivnoj korelaciji sa stupnjem rezistencije na beta laktamske antibiotike kao i posjedovanjem virulentnih gena (*ail* i *yst*). Niža prevalencija *Y. enterocolitica* u takvim proizvodima u odnosu na svježe meso dokazana je i u Argentini (LUCERO-ESTRADA i sur., 2015.) i Njemačkoj (FERL i sur., 2020.). Tako su LUCERO-ESTRADA i sur. (2015.) izolirali *Y. enterocolitica* iz svega jednog uzorka kobasice od 74 ispitana, a prevalencija u mljevenom mesu iznosila je 14,7 %. FERL i sur. (2020.) dokazali su prevalenciju *Y. enterocolitica* od 1,9 % (2/104) u brzo fermentirajućim kobasicama s lukom te su oba izolata pripadala patogenom bioserotipu 4/O:3 dok su ostali uzorci svježih i trajnih kobasica bili negativni (N=43). Kako autori navode, sporadični nalaz patogene *Y. enterocolitica* u takvim kobasicama nije iznenađujući obzirom na relativno kratak period fermentacije kojima su podvrgnuti, a koji na kraju rezultira proizvodom s prosječnom pH vrijednosti od 5,61-5,80.

U pravilu, proces fermentacije odnosno zrenja trajnih kobasica u kojemu konačni proizvod dostigne ciljne vrijednosti pH i aktiviteta vode, smatra se učinkovitim u inaktivaciji patogene *Y. enterocolitica*. IVANOVIĆ i sur. (2015.) istraživali su utjecaj tijeka fermentacije u kobasicama s dodatkom starter kultura (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*) na preživljavanje inokulirane populacije *Y. enterocolitica*. U kobasicama bez dodatka starter kultura, broj *Y. enterocolitica* se tijekom prvih 15 dana smanjio sa početnih $5,85 \pm 0,15 \log_{10}$ CFU/g na $5,63 \pm 0,46 \log_{10}$ CFU/g dok se uz utjecaj starter kultura inokulirana populacija *Y. enterocolitica* 15. dana reducirala na $4,40 \pm 0,06 \log_{10}$ CFU/g. Nakon 15 dana, *Y. enterocolitica* više nije izolirana niti iz jedne ispitivane skupine. Ove činjenice govore u prilog rezultatima istraživanja koja nisu dokazala prisutnost *Y. enterocolitica* u sličnim proizvodima (ZADERNOWSKA i CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, 2016.; LATHA i sur., 2017.; FERL i sur., 2020.; MANCINI i sur., 2022.) iako neki od ovih autora ukazuju kako zbog

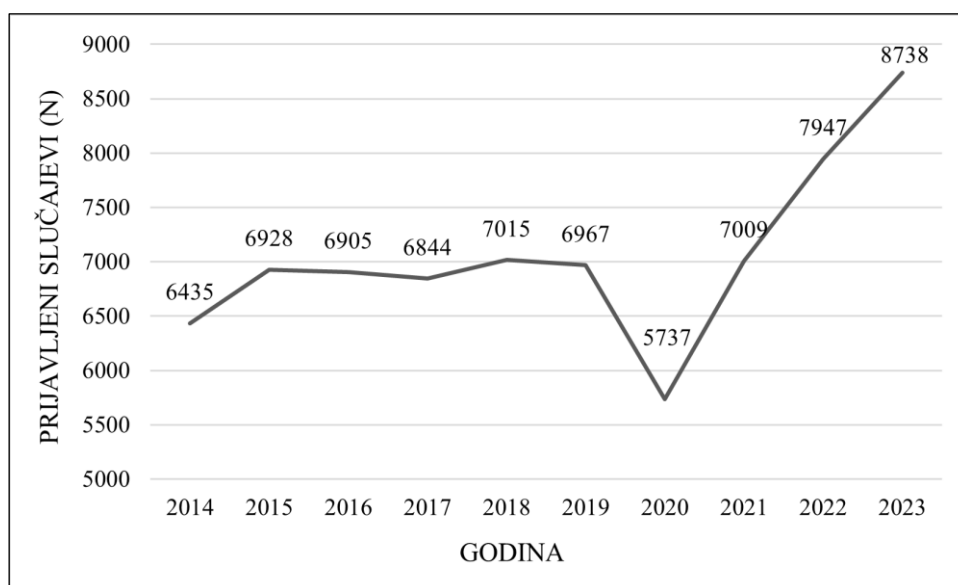
nereprezentativnog broja uzoraka korištenih u pojedinim istraživanjima ne treba isključiti mogućnost prisustva patogene *Y. enterocolitica*. Da fermentirani proizvodi ipak mogu biti izvor patogene *Y. enterocolitica* dokazali su YAGÜE-MUÑOZ i sur. (2019.) koji su proveli opsežno osmogodišnje istraživanje o epidemiologiji jersinioze u Castellon regiji Španjolske. Naime, rezultati su pokazali kako je čak 50 % prijavljenih slučajeva oboljenja bilo uzrokovano konzumacijom trajne kobasice karakteristične za to područje, a koja je proizvedena uglavnom od svinjetine. U više od 90 % slučajeva izolati su pripadali patogenom bioserotipu 4/O:3.

U Hrvatskoj su ZDOLEC i sur. (2017.) s ciljem pronalaska patogene *Y. enterocolitica*, u razdoblju od 2014.-2017. godine pretraživali uzorke fermentiranih i toplinski obrađenih mesnih proizvoda (N=91), te svježeg mesa i mesnih pripravaka (N=32). Mesni proizvodi su bili negativni, no bakterija je pronađena u 6,27 % uzoraka svježeg mesa s tržišta. Nešto kasnije, PAŽIN (2021.) je nakon ustanovljene visoke prevalencije (43 %) patogene *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja pretraživao uzorke porcioniranog i mljevenog mesa istih proizvođača u čijim klaonicama su uzrokovane tonzile, a s ciljem utvrđivanja mogućnosti širenja patogena kroz lanac proizvodnje svinjskog mesa. Svi komadi uzorkovanog mesa (N=92) su bili negativni, što upućuje na visoku razinu primjenjene higijene u toku proizvodnje.

2.2.3. Europsko zakonodavstvo u nadziranju patogene *Y. enterocolitica*

Prema podacima Europske komisije, Europska unija je drugi najveći svjetski proizvođač svinjskog mesa i najveći izvoznik proizvoda od svinjskog mesa. Obzirom na tu činjenicu, razumljiva je visoka razina odgovornosti nadležnih tijela u pogledu zaštite zdravlja potrošača. Ona se u najvećoj mjeri postiže donošenjem niza Uredbi i implementacijom njihovih odredbi u nacionalne pravilnike država članica. U pogledu bioloških opasnosti, propisi koje donosi nadležno tijelo često su otvoreni za razmatranje zbog promjenjivih epidemioloških situacija koje od znanstvenih institucija zahtijevaju dodatna istraživanja i preporuke. Zakonodavstvo koje se odnosi na mikrobiološke kriterije za hranu često se revidira u svjetlu nedavnih znanstvenih otkrića, posebno u pogledu zoonoza. Prema posljednjem izvješću Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA i ECDC, 2024.), jersinioza je četvrta najčešće prijavljena zoonoza u EU sa čak 8738 slučajeva godišnje. Kako izvješće navodi, to je povećanje od 13,5 % u odnosu na 2022. godinu, a ujedno i najveći broj prijavljenih slučajeva oboljenja u posljednjih 10 godina (Slika 3). Ipak, za pretpostaviti je da je taj broj i veći, obzirom da većina europskih zemalja nemaju razvijen sustav nadziranja patogene *Y. enterocolitica*, a u pojedinima se prijava bolesti temelji isključivo na dobrovoljnom prijavljivanju. Ista je situacija i na razini

primarne proizvodnje, odnosno farme, a time i hrane životinjskog podrijetla što rezultira malom količinom podataka koje države članice prijavljuju EFSA-i. Unatoč tome, države članice mogu uspostaviti sustav nadziranja za patogenu *Y. enterocolitica* i prije nego bi li on postao obavezan prema Direktivi 2003/99 EZ (ANONIMNO, 2003.). Trenutno je u prilogu iste Direktive jersinioza svrstana na popis zoonoza i uzročnika zoonoza koje treba pratiti sukladno trenutnoj epidemiološkoj situaciji.



Slika 3. Broj prijavljenih slučajeva jersinioze u Europskoj uniji tijekom posljednjih 10 godina
(izvor: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>)

U kontekstu svinja odnosno svinjskog mesa kao glavnog rizičnog faktora u nastanku jersinioze, praćenje ili nadziranje patogene *Y. enterocolitica* zasigurno treba biti usmjereno ka sprječavanju širenja patogena od primarne proizvodnje do potrošača. Vodeći se odredbama europskog Zakona o hrani (ANONIMNO, 2002.) prema kojima je sigurna hrana jedan od glavnih preduvjeta zaštite javnog zdravlja, zakonska regulativa je još prije dva desetljeća napravila pomak u smislu osiguranja odgovarajućih uvjeta za njezinu sigurnu proizvodnju kroz koncept poznat kao „higijenski paket“. Što se tiče bioloških opasnosti, Uredba (EZ) br. 852/2004 (ANONIMNO, 2004.a) kao osnova za osiguranje higijenski ispravne hrane u EU, između ostalog navodi da subjekti u poslovanju s hranom moraju usvojiti posebne higijenske mjere kao što je „usklađenost s mikrobiološkim kriterijima za hranu“. Kako Uredba navodi, ove mjere postavlja Komisija, ali tek nakon konzultacija s Europskom agencijom za sigurnost hrane.

Pored toga, odredbe ove Uredbe dopunjene su puno detaljnijim Uredbom (EZ) br. 853/2004 (ANONIMNO, 2004.b) o posebnim higijenskim pravilima za hranu životinjskog podrijetla. S ciljem sprječavanja kontaminacije mesa tijekom klanja, a što je posebno važno u slučaju patogene *Y. enterocolitica*, Uredba propisuje niz higijenskih mjera koje je potrebno poduzeti tijekom klanja, rasijecanja i otkoštavanja mesa. Tako su neki od zahtjeva da klaonice moraju imati opremu za dezinfekciju pribora s vrućom vodom temperature od najmanje 82 °C. Također, evisceracija i uklanjanje tonzila se moraju provesti na higijenski način, odnosno da se izbjegne bilo kakva kontaminacija mesa. Što se tiče skladištenje i transporta, subjekt u poslovanju s hranom je obavezan ispuniti zahtjeve vezane uz održavanje tzv. hladnog lanca u pogledu temperature mesa. Ipak, s obzirom na činjenicu da je *Y. enterocolitica* psihrotrofna bakterija i sposobna preživjeti ili se čak razmnožavati na temperaturi hlađenja, izbjegavanje kontaminacije mesa gore navedenim postupcima smatra se najvažnijim korakom u smanjenju ovog rizika. Prema Zakonu o hrani, države članice moraju provjeravati ispunjavaju li subjekti u poslovanju s hranom odgovarajuće zahtjeve prethodno spomenutih Uredbi te s tim ciljem održavaju sustav službenih kontrola.

Posebna pravila vezana uz službene kontrole i radnje koje poduzimaju nadležna tijela u vezi s proizvodnjom hrane životinjskog podrijetla navedena su u Uredbi (EZ) br. 2017/625 (ANONIMNO, 2017.) dok Provedbena uredba komisije (EZ) br. 2019/627 (ANONIMNO, 2019.) podrobnije regulira pravila za provođenje takvih kontrola u pogledu životinjskih vrsta, a posebno svježeg svinjskog mesa. Uredbom je detaljno objašnjen način provođenja post mortem pregleda svinjskih trupova, koji je uglavnom ograničen na vizualni pregled uz izuzetak primjene postupka palpacije i incizije onda kada postoje naznake mogućeg rizika za zdravlje ljudi, zdravlje životinja ili dobrobit životinja. To je ujedno i jedna od važnijih odredbi zakonodavstva po pitanju patogene *Y. enterocolitica* koja je zasigurno doprinijela smanjenoj kontaminaciji trupova tijekom post mortem pregleda. Naime, tijekom uvođenja higijenskog paketa, pravila post morem pregleda regulirana unutar Uredbe (EZ) 854/2004 (ANONIMNO, 2004.c) uključivala su obavezni vizualni pregled uz palpaciju i zarezivanje određenih organa ili dijelova tijela, čak i ako nije bilo mogućeg rizika za ljudsko zdravlje. Osnova za trenutačne odredbe započela je 2011. nakon izvješća EFSA-e (EFSA, 2011.) u kojem je zaključeno kako su primjenjene tehnike irelevantne za zaštitu javnog zdravlja, a s druge strane mogu predstavljati rizik od križne kontaminacije te ih treba izostaviti. Iz tog razloga, odredbe su izmijenjene Uredbom Komisije (EZ) br. 219/2014 (ANONIMNO, 2014.) te su do danas zadržane u okviru Uredbe (EZ) br. 2019/627 (ANONIMNO, 2019.).

Sve ove propisane mjere, ako se provode na pravilan način, trebale bi rezultirati što je moguće čistim trupom namijenjenim prodaji i daljnjoj preradi. S ciljem provjere njihove učinkovitosti, odnosno sprječavanja prisutnosti mikroorganizama u hrani i kontrole njihovog broja u hrani, uvedena su zakonska ograničenja i metode kojima se provjerava usklađenost s njima, a sve temeljem znanstvenih mišljenja. Većina ovih odredbi uvedena je Uredbom (EZ) br. 2073/2005 (ANONIMNO, 2005.b) kojom se utvrđuju mikrobiološki kriteriji za određene mikroorganizme te pravila kojih se subjekti u poslovanju s hranom moraju pridržavati pri provođenju općih i posebnih higijenskih mjera iz Uredbe (EZ) br. 852/2004.

Prema ovoj Uredbi propisane su dvije vrste mikrobioloških kriterija: kriteriji sigurnosti hrane i kriteriji higijene procesa. Što se tiče svinjskog mesa, nekoliko patogenih i nepatogenih bakterija navedeno je u oba kriterija, no ne i *Y. enterocolitica*. Neizravan način dokazivanja njezine moguće prisutnosti je temeljem određivanja broja enterobakterija na trupovima svinja prilikom validacije sukladnosti s kriterijima higijene procesa, iako to može biti izazovno obzirom na veličinu porodice *Enterobacteriaceae* koja je sačinjena od velikog broja bakterijskih rodova i vrsta. Uredba je dakako podložna reviziji, uzimajući u obzir prevalenciju patogenih mikroorganizama u hrani te procjenjeni rizik od nastanka oboljenja nakon konzumacije takve hrane, no kriteriji za patogenu *Y. enterocolitica* još uvijek nisu propisani. Što se tiče Hrvatske, odredbe prethodno navedene Uredbe implemetirane su kroz Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN, br. 83/2022), a od strane nadležnog ministarstva je još 2011. godine izdan Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. U njemu je *Y. enterocolitica* navedena kao potencijalni rizik ukoliko se pronađe u 25 g uzorka hrane, no nije specificirana i točna razina. Dakako, njezino pretraživanje u hrani navedeno je samo kao preporuka subjektu u poslovanju s hranom tijekom revizije svojih sustava samokontrole prema HACCP načelima.

Temeljem gore navedenih činjenica, čini se opravdanim uvrstiti praćenje patogene *Y. enterocolitica* kroz Uredbu (EZ) br. 2073/2005, u okviru ispitivanja sukladnosti s kriterijima higijene procesa. Kako SPIROVSKA VASKOSKA (2020.) navodi, postoje četiri faze tijekom uspostavljanja mikrobioloških kriterija: odabir patogena, kategorije hrane i njihove povezanosti; postavljanje mikrobiološke granice; odabir plana uzorkovanja te odabir metode ispitivanja i korektivnih radnji. Što se tiče plana uzorkovanja, pretraživanje je moguće učiniti prilikom uzorkovanja na *Salmonella* spp., kao što je trenutno praksa pri pretraživanju trupova na broj aerobnih mezofilnih bakterija i enterobakterija. Pritom za uzorkovanje treba razmotriti ona mjesta na trupu koja imaju veću vjerojatnost kontaminacije (EFSA, 2007.). Međutim, mikrobiološke granice tek treba utvrditi obzirom da do danas još uvijek nema toliko saznanja o

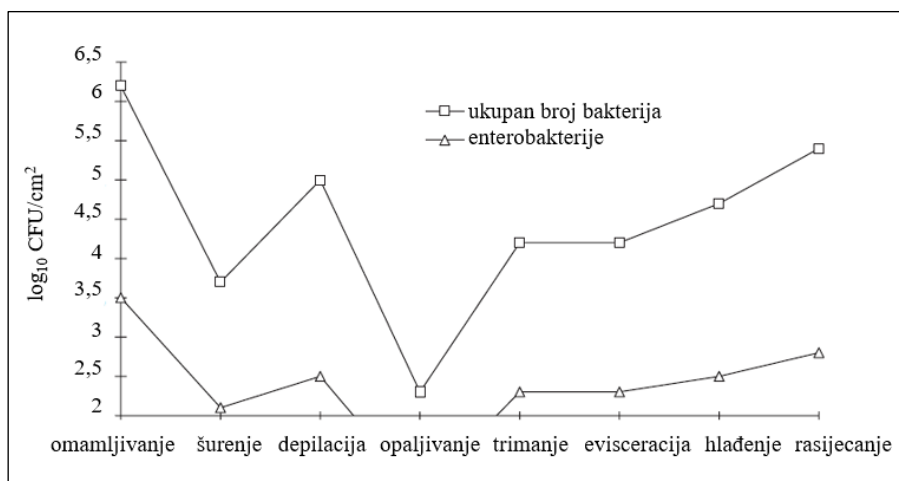
minimalnoj infektivnoj dozi. U znanstvenoj literaturi se mogu pronaći različite vrijednosti, koje se kreću od 4-9 log₁₀ CFU, no pretpostavka je kako ona prvenstveno ovisi o imunološkom sustavu pojedinca. Trenutna referentna analitička metoda (HRN EN ISO 10273:2017) za detekciju patogene *Y. enterocolitica* preporučuje se kao metoda izbora pri provođenju analiza. Ipak, brojni nedostaci ove metode odnose se na dugotrajne korake obogaćivanja koji često završavaju izolacijom nepatogenih sojeva pa BIOHAZ Panel (EFSA, 2007.) ukazuje kako bi trebalo uložiti napore na razini EU da se poboljšaju trenutne metode izolacije. Faza u kojem se ovaj kriterij može primijeniti je isti kao i za druge mikroorganizme: nakon obrade, ali prije hlađenja kako bi se analizirala razina primijenjene higijene klanja.

Y. enterocolitica kao uzročnik bolesti koji se prenosi hranom može predstavljati ozbiljan problem za potrošače, ali još uvijek nije dovoljno učinjeno po pitanju njezine zakonske regulative. Nedostatak usporedivih podataka o prevalenciji kod ljudi, izvoru infekcije, ciljnoj životinjskoj vrsti, vrsti hrane, analitičkoj metodi ili karakterizaciji soja samo su neki od primjera koji bi se trebali regulirati na nacionalnoj razini kako bi se osigurali znanstveni dokazi koji će nadležnim institucijama dati osnovu za monitoring ili nadziranje patogene *Y. enterocolitica*.

2.3. Značaj dekontaminacije za higijenu i sigurnost mesa

Svježe meso kao namirnica predstavlja idealni medij za rast i razmnožavanje patogenih bakterija, a mikrobiološke opasnosti potječu od živih životinja kao i kontaminiranog okoliša. Kontrola takvih opasnosti kod živih životinja nije uvijek jednako učinkovita na razini farme pa one predstavljaju važan izvor kontaminacije po dolasku u klaonicu, najčešće u formi asimptomatskih nositelja. Unatoč brojnim dostignućima u tehnologiji klanja, mikrobiološka kontaminacija trupa je i dalje prisutna te može narušiti higijensku dispoziciju trupa, u većoj ili manjoj mjeri. Dakako, taj stupanj kontaminacije trupa kao i važnost pojedinih izvora kontaminacije ovisi o brojnim čimbenicima poput čistoće životinja po dolasku u klaonicu, načinu izgradnje klaonice (primjer odvajanja čistog od nečistog dijela), tehnologiji klanja te ponajprije primjenjenoj higijeni tijekom klaoničke obrade životinja (ZWEIFEL i STEPHAN, 2014.). Postoji nekoliko načina kojima nastaje bakterijska kontaminacija trupa. Prvi je direktnim prijenosom bakterija iz krvi ili unutarnjih organa na trup tijekom klanja. Drugi, a ujedno i najčešći prijenos, događa se pri nehigijenskoj obradi trupa (kontaminacija fekalnim sadržajem, preko nesteriliziranog pribora itd.). Treći je način kontaminacije posljedica nehigijenskog postupanja s mesom nakon klanja (obrada mesa na kontaminiranim površinama, prijenos bakterija s kontaminiranog pribora ili ruku zaposlenika). U slučaju klaoničke obrade

svinja, inicijalna mikrobiološka kontaminacija trupova značajno se smanjuje tijekom faze šurenja, odnosno opaljivanja, dok se nakon evisceracije te tijekom obrade polovica njezina razina progresivno povećava (Slika 4). Temeljem navedenog, razvidna je važnost primjenjenih standardnih higijenskih postupaka tijekom svih faza proizvodnje mesa (higijena mesa), što i definiramo kao skup mjera poduzetih s ciljem eliminacije svih potencijalnih rizika koji se mogu pojaviti u takvom sustavu (HASTAOĞLU i sur., 2022.).



Slika 4. Razina mikrobiološke kontaminacije trupova svinja tijekom klaoničke obrade (PAULSEN i SMULDERS, 2004.)

Ipak, unatoč usvajanju postulata dobre higijenske prakse tijekom proizvodnje, prevencija mikrobiološke kontaminacije primarne sirovine često nije dovoljna u osiguravanju proizvodnje zdravstveno ispravnog proizvoda. S tim u vezi, posljednjih desetaka godina javlja se potreba za razvojem novih tehnologija koje bi primarno unaprijedile sigurnost proizvoda, ali i povećale njegovu održivost. Takve antimikrobne intervencije idu u smjeru redukcije inicijalne bakterijske populacije prisutne na trupu te ograničavanja odnosno usporavanja njezinog rasta. Naime, mikroorganizmi koji neposredno nakon klanja kontaminiraju površinu trupa, s vremenom prodiru u dublje slojeve mesa pa se primjenom metoda dekontaminacije u tako ranoj fazi onemogućuje njihovo preživljavanje odnosno širenje kroz daljnji lanac proizvodnje mesa (HASTAOĞLU i sur., 2022.). Dekontaminacijski postupci uključuju brojne fizikalne, biološke ili kemijske metode koje se primjenjuju zasebno ili u kombinaciji.

Fizikalne metode imaju za cilj mehanički odstraniti nečistoće s površine životinje odnosno trupa, kao i smanjiti bakterijsku populaciju. Većina njih je uključena u standardni klaonički proces poput pranja životinja prije klanja, šurenja i skidanja dlake (depilacija) svinja odnosno čerupanja peradi, zatim opaljivanja, izrezivanja dijelova trupa (trimanje) te ispiranja trupova vodom. Ostale dekontaminacijske metode primjenjuju se ciljano u pojedinim fazama klaoničke obrade, a najvažnije uključuju primjenu vruće vode odnosno vodene pare, zračenja ili „hladne pasterizacije“, hlađenja, ultraljubičastog zračenja te vakumiranja pomoću vodene pare (SKANDAMIS i sur., 2010.; ZWEIFEL i STEPHAN, 2014.). Unatoč jednostavnosti, brzini i potencijalnoj širokoj primjenjivosti u lancu proizvodnje, rijetko su prisutne u dekontaminaciji trupova, već najčešće u dekontaminaciji komadnog mesa, preradi mesa i predpakiranju (BLAŽEVIĆ i sur., 2023.). Od gore navedenih, metode bazirane na primjeni vode svakako dominiraju u upotrebi te je njihov učinak dosad najbolje istražen. U najvećoj mjeri razlog tome je činjenica što je u Europskoj uniji voda još uvijek jedino odobreno fizikalno sredstvo za dekontaminaciju hrane (ANONIMNO, 2004.b). U opsežnim pregledima dosadašnjih istraživanja (SOHAIB i sur., 2016.; ALBERT i sur., 2021.) dekontaminacijskog učinka netermalnih tehnologija (zračenje, ultrazvuk, hladna atmosferska plazma, pakiranje pod visokim tlakom ili ultraljubičasto zračenje), autori ističu njihove ekološke prednosti, budući da ne sadrže kemikalije, ne ostavljaju rezidue te su time minimalno štetni za okoliš. Ipak, još uvijek je nedovoljno podataka o njihovom antimikrobnom učinku kao i utjecaju na organoleptička svojstva mesa te pokazatelje kvalitete proizvoda.

Biološki postupci podrazumijevaju primjenu bakteriofaga ili kompetitivnih bakterijskih kultura u vidu bakteriocina, no njihov dekontaminacijski potencijal je još nedovoljno istražen (BUNČIĆ i SOFOS, 2012.). Prednost primjene bakteriofaga je zasigurno njihova visoka specifičnost prema ciljnim bakterijskim vrstama pa se ne očekuje interakcija s pozadinskom mikrobiotom (GREER, 2005.). S druge strane, isti autor navodi kako njihov uski spektar djelovanja ponekad može rezultirati nedovoljnim dekontaminacijskim učinkom, a ispoljavanje nepoželjnih karakteristika poput prijenosa virulentnih gena ili razvoja rezistencije, predstavljaju dodatna ograničenja za njihovu primjenu. Slična zapažanja uočena su i kod bakteriocina. Nizin, najpoznatiji i jedini odobreni bakteriocin za konzerviranje hrane, svoj antimikrobni učinak iskazuje većinom prema gram pozitivnim bakterijama. S tim u vezi, njegova primjena u dekontaminacijske svrhe je ograničena, dodatno i zbog nedostatne sinteze *in vivo*, moguće inaktivacije uslijed interakcije s ostalim komponentama hrane te potencijalnog razvoja rezistencije (HUGAS i TSIGARIDA, 2008.).

U posljednje vrijeme sve se više pažnje posvećuje kemijskoj dekontaminaciji klaonički obrađenih trupova za koju postoji niz sredstava poput klornih, sulfatnih ili fosfatnih, otopina organskih (octena, mliječna, limunska) kiselina, elektrolizirane ili ozonirane vode, vodikovog peroksida i natrijevog hidroksida (ACUFF, 2005.; ALONSO-HERNANDO i sur., 2013.). Većina dosadašnjih istraživanja usmjerena je na ispitivanje dekontaminacijskog potencijala organskih kiselina, pogotovo mliječne kiseline. Za razliku od Europske unije, kemijska dekontaminacija je u širokoj upotrebi u Sjedinjenim Američkim Državama i Kanadi, posebno na goveđim i pilećim trupovima. Ipak, Europska unija je 2013. godine odobrila njezinu upotrebu u svrhu smanjenja površinskog mikrobiološkog onečišćenja goveđih trupova (ANONIMNO, 2013.), dok je kod svinja ona tek u razmatranju.

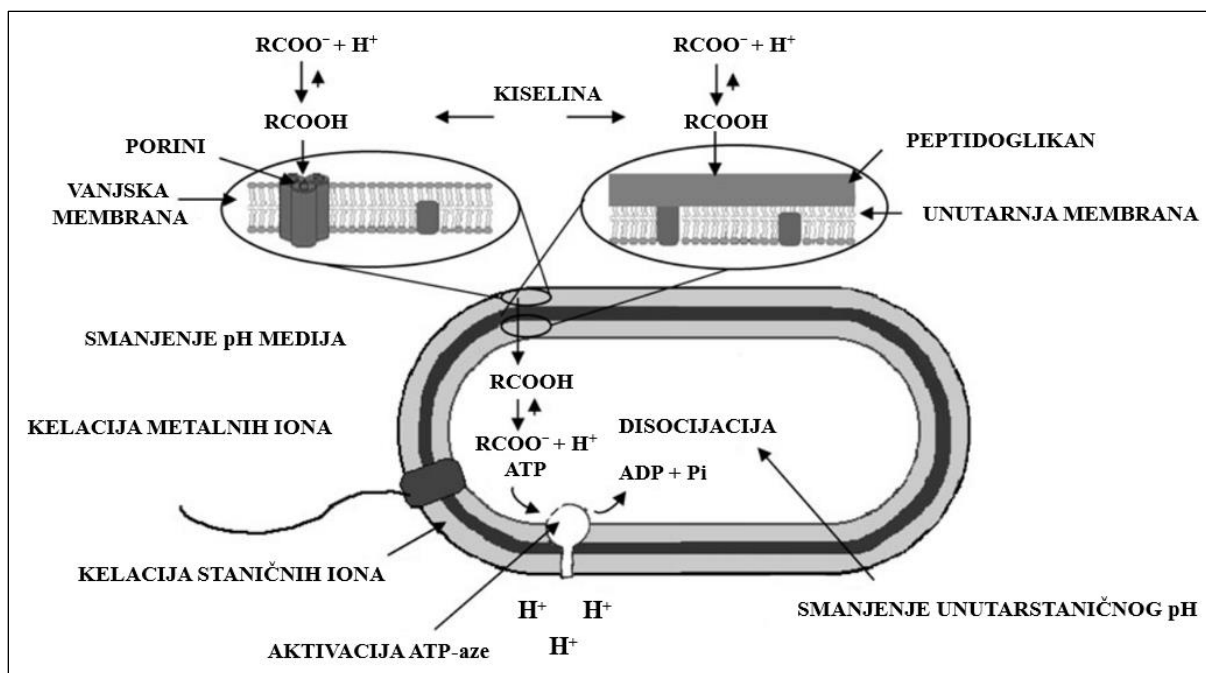
Postoje brojni zahtjevi koje prethodno navedene metode moraju ispunjavati kako bi se opravdala njihova upotreba u dekontaminaciji mesa. Pored toga što moraju biti sigurne za zdravlje ljudi te težiti unaprijeđenju sigurnosti proizvoda, ne smiju imati negativan utjecaj na njegova organoleptička svojstva kao ni nutritivnu vrijednost. Poželjno bi bilo da su ekonomski isplative te da ih je jednostavno implementirati unutar proizvodnog procesa. Procjene ukupnih učinaka takvih intervencija su često otežane obzirom na manjkavost podataka proizašlih iz istraživanja na razini industrije, dok je s druge strane predikcija eksperimentalnih rezultata u praksi još teža (ZWEIFEL i STEPHAN, 2014.). U industriji proizvodnje svinjskog mesa su takve procjene još teže, imajući na umu da je većina dosadašnjih istraživanja vezanih uz dekontaminaciju mesa provedena na modelu goveđeg i pilećeg mesa. Bitno je naglasiti kako dekontaminacijske metode moraju biti dio integriranog sustava sigurnosti hrane, a nikako zamjena za dobru higijensku odnosno proizvođačku praksu (BUNČIĆ i SOFOS, 2012.). Na taj način, smanjuju se eventualni mikrobiološki rizici u slučaju kada standardne operativne mjere preduvjetnih programa i HACCP sustava ne daju zadovoljavajuće rezultate (BLAŽEVIĆ i sur., 2023.).

2.4. Kemijske metode dekontaminacije mesa organskim kiselinama

2.4.1. Organske kiseline

Organske kiseline su kemijski spojevi široko rasprostranjeni u prirodi kao sastavni dio biljnih i životinjskih tkiva (BONETTI i sur., 2020.). U svojoj strukturi sadrže ugljik, a sintetiziraju ih brojni mikroorganizmi, primarno bakterije mliječne kiseline (ROSSI i sur., 2023.). Obzirom da su prirodno prisutne u hrani, organske kiseline odnosno njihove soli su kao potencijalni konzervansi već dugi niz godina predmet brojnih istraživanja. Pored ispoljavanja antimikrobne aktivnosti prema uzročnicima kvarenja hrane te patogenim bakterijama, u hrani imaju ulogu stabilizatora boje, regulatora kiselosti te razvoja karakterističnih okusa čime unaprijeđuju senzorička svojstva proizvoda (JAMILAH i sur., 2008.; HAUSER i sur., 2016.). U principu, organske kiseline su slabe kiseline i ne disociraju u potpunosti u vodi čime postižu jači antimikrobni učinak od anorganskih kiselina. Naime, HASTAOĞLU i sur. (2022.) navode kako je bakteriostatski odnosno baktericidni učinak nedisociranih oblika kiselina oko 10-600 puta jači od disociranih. One niske molekularne mase poput mliječne i octene su dobro topive u vodi, za razliku od visokomolekularnih koje su netopive (BEN BRAÏEK i SMAOUI, 2021.). Dolaze u formi čistih organskih kiselina (mliječna, octena, limunska i benzojeva) ili puferiranih kao kalcijeve i natrijeve soli spomenutih kiselina (THERON i LUES, 2007.). Razlike u njihovoj strukturi uvjetovane su brojem i položajem gradivnih elemenata (ugljika, vodika i kisika).

Organske kiseline se tradicionalno koriste u prehrambenim proizvodima gdje smanjivanjem pH vrijednosti inhibiraju rast bakterija te time produljuju rok trajanja proizvoda. Kao i većina mikroorganizama, bakterije preferiraju neutralne pH vrijednosti (6,5-7,5) iako raspon vrijednosti za njihovo preživljavanje može biti znatno širi (4,0-9,0). Sposobnost smanjenja pH vrijednosti ovisi o kemijskim svojstvima organskih kiselina poput konstante kiseline (pK_a), konstante disocijacije (K_a), koncentracije nedisociranih oblika kao i koncentracije organske kiseline (HAUSER i sur., 2016.) pa se ovisno o tome one nalaze u ravnoteži između disociranih i nedisociranih oblika (THERON i LUES, 2007.). Nedisocirane molekule organskih kiselina su najvažnije za ispoljavanje antimikrobne aktivnosti obzirom da se njihova koncentracija povećava pri niskoj pH vrijednosti. U takvom obliku, olakšan im je prijenos kroz lipidni sloj membrane bakterijske stanice i ulazak u citoplazmu (HAUSER i sur., 2016.). Slika 5 prikazuje antimikrobni učinak organskih kiselina prema bakterijskoj stanici.



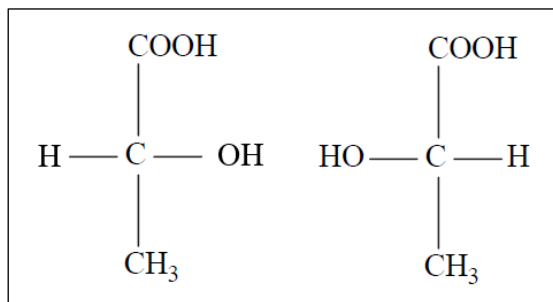
Slika 5. Mehanizam djelovanja organskih kiselina na bakterijsku stanicu (RAYBAUDI-MASSILIA i sur., 2009.).

Jednom kad se organske kiseline nađu unutar stanice, uslijed povišenog intracelularnog pH, disociraju na anione i protone koji više nisu sposobni difundirati kroz membranu stanice što dovodi do pada pH vrijednosti te njihove akumulacije unutar stanice (BRUL i COOTE, 1999.). Kako bi se spriječile konformacijske promjene enzima, strukturnih proteina, fosfolipida i nukleinskih kiselina, generirani protoni se izbacuju iz stanice pomoću adenozintrifosfataze što zbog utroška ATP-a dovodi do velike potrošnje stanične energije (DAVIDSON i TAYLOR, 2001.). Istovremeno, nagomilavanje protona i aniona unutar stanice uzrokuje inhibiciju enzimske aktivnosti, staničnog signaliziranja te aktivnog transporta (STRATFORD i EKLUND, 2003.). Uslijed povećanja osmotskog tlaka citoplazme dolazi do oštećenja staničnih proteina i DNA te u konačnici stanične smrti (RICKE, 2003.; ANYASI i sur., 2020.). Pored toga, organske kiseline s višestrukim karboksilnim skupinama imaju sposobnost keliranja metalnih iona medija i stanične stijenke pa nastali kompleksi rezultiraju njezinim oštećenjem (STIJN, 2017.). U konačnici, zbog razaranja proton-motorne sile (engl. PMF – *proton motive force*) na površini bakterijske stanice, s vremenom dovodi do stvaranja nepovoljnih uvjeta za preživljavanje bakterija (NKOSI i sur., 2021.). Za pretpostaviti je da bi ovakav antimikrobni učinak organskih kiselina mogao rezultirati željenim smanjenjem bakterijske populacije prisutne na trupu u trenutku provedbe dekontaminacijskog postupka.

Ipak, prije primjene bilo kakvih kemijskih sredstava u dekontaminaciji mesa, pa tako i organskih kiselina, bitno je da nadležno tijelo odobri njihovu upotrebu temeljem razmatranja statusa sigurnosti (engl. GRAS – *Generally Recognized As Safe*), potencijalnih problema pri deklariranju te znanstvenih istraživanja koja podupiru njihovu učinkovitost (BLAŽEVIĆ i sur., 2023.). Od prethodno navedenih kriterija, antimikrobna djelotvornost je svakako glavni čimbenik obzirom na njihov potvrđeni GRAS status te prirodnu prisutnost u ljudskim i životinjskim tkivima. Ipak, pojedina pitanja poput utjecaja dekontaminacije na razvoj rezistencije bakterija, očekivanu senzoriku mesa te eventualnu kontaminaciju okoliša, još uvijek su predmet razmatranja. Prema ROSSI i sur. (2023.), mliječna i octena kiselina su u kontekstu konzerviranja hrane dosad najčešće primjenjivane i proučavane organske kiseline pa je opravdano i razmatranje njihove primjene u dekontaminacijske svrhe.

2.4.1.1. Mliječna kiselina

Mliječna kiselina je organska kiselina s dugom tradicijom primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji. Prirodno ju nalazimo u mikroorganizmima, biljnim i životinjskim tkivima, a industrijski se proizvodi kemijskom sintezom iz ugljena dok prirodna sinteza nastaje fermentacijom ugljikohidrata (KOMESU i sur., 2017.). Obzirom na brojne prednosti prirodne sinteze poput dobivanja čistih izomera i korištenja obnovljivih izvora fermentacije, smatra se da 90 % ukupno proizvedene mliječne kiseline nastaje bakterijskom fermentacijom (HOFVENDAHL i HAHN-HÄGERDAL, 2000.), primarno pomoću bakterija mliječne kiseline (NURYANA i sur., 2019.). Dolazi u dva aktivna oblika: L (+) mliječna kiselina i D (–) mliječna kiselina (Slika 6) ili u njihovoj međusobnoj kombinaciji. Oba izomera imaju ista kemijska i fizikalna svojstva (točka tališta, topljivost, gustoća, konstanta disocijacije) osim u reakciji s drugim prisutnim komponentama (KOMESU i sur., 2017.).

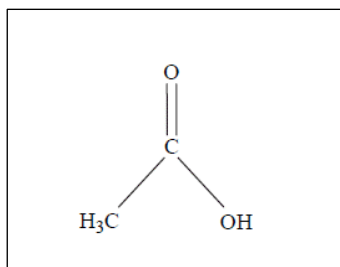


Slika 6. Izomeri (D i L oblik) mliječne kiseline

Obzirom da nastaje kao krajnji produkt postmortalne glikolize, ne smatra se škodljivom za zdravlje ljudi (PIPEK i sur., 2005.; MANI-LÓPEZ i sur., 2012.). Procjenjuje se da je njezina koncentracija u mesu 10 mg/kg što u konačnici doprinosi i okusu mesa (HASTAOĞLU i sur., 2022.). Dekontaminacijske metode otopinama mliječne kiseline smatraju se brzim, jednostavnima i učinkovitima. Antimikrobni potencijal mliječne kiseline možda je najučinkovitiji u odnosu na ostale organske kiseline. Naime, pored već spomenutih načina inaktivacije bakterija, uzrokuju izravna oštećenja stanične membrane što rezultira bržim slabljenjem permeabilne funkcije i gubitkom staničnog integriteta (WANG i sur., 2015.). Dobro se otapa u vodi pa se može primjenjivati u kombinaciji s hladnom, toplom ili vrućom vodom. Preporučene koncentracije pri korištenju su od 1,5-2,5 %, a smatra se da najbolji učinak postižu na toplim trupovima, odnosno nakon uklanjanja organa, ali prije hlađenja (HASTAOĞLU i sur., 2022.). Takva je primjena mliječne kiseline u Europskoj uniji regulirana za dekontaminaciju trupova goveda (ANONIMNO, 2013.) temeljem znanstvenog mišljenja o procjeni sigurnosti i djelotvornosti mliječne kiseline za odstranjivanje površinskog mikrobiološkog onečišćenja s trupova goveda. To je u Europskoj uniji dosad ujedno i jedino odobreno kemijsko sredstvo za primjenu u dekontaminaciji klaonički obrađenih trupova.

2.4.1.2. Octena kiselina

Octena kiselina je još jedna dobro poznata organska kiselina široko primjenjiva u prehrambenoj industriji. Prirodno nastaje aerobnom fermentacijom voća i žitarica pomoću bakterije *Acetobacter* (THERON i LUES, 2007.), iako se najveći dio proizvodi sintetskim putem i to etilenskom oksidacijom ili reakcijom metanola i ugljikovog monoksida (EFSA, 2018.). Kao i mliječna kiselina, odobreni je dodatak hrani u različitim proizvodima u *quantum satis* (ANONIMNO, 2008.). To je relativno slaba kiselina s tek neznatnom sposobnošću disocijacije koja dolazi u obliku bezbojne tekućine karakterističnog mirisa. Obično je proizvedena u koncentriranom obliku (>99.8 %) pa se pomoću vode razrijedi do željene koncentracije. Kemijska struktura molekule octene kiseline prikazana je na Slici 7.



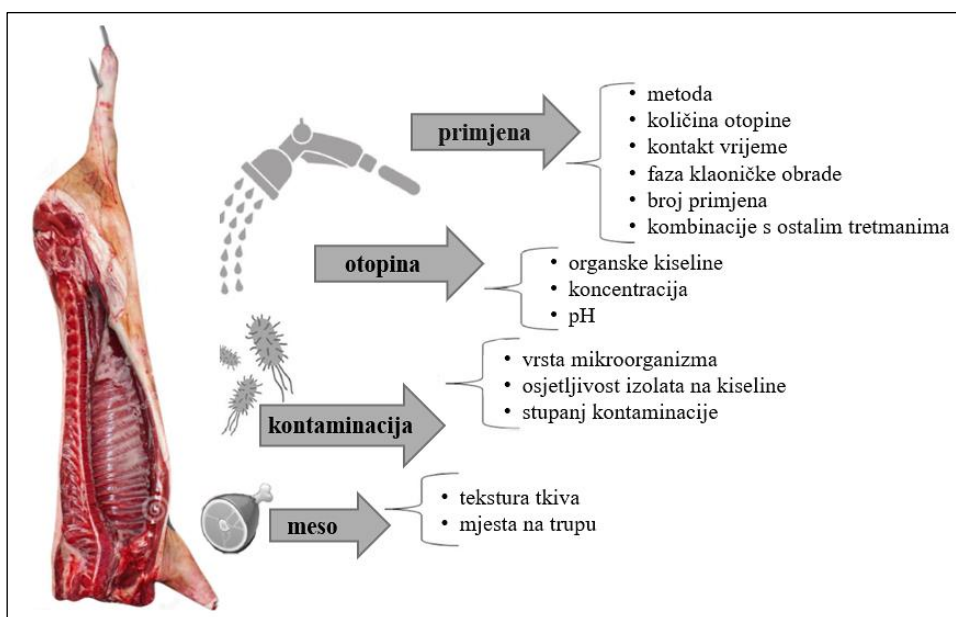
Slika 7. Kemijska struktura molekule octene kiseline

Za razliku od mliječne kiseline, dosadašnja istraživanja o dekontaminacijskom potencijalu octene kiseline su oskudna. Unatoč dobrom antimikrobnom učinku, njezina primjena na trupovima je još uvijek upitna obzirom na snažan opori miris koji ostavlja na mesu (NKOSI i sur., 2021.). Jedna od preporuka za prevladavanje tog negativnog učinka je njezino raspršivanje samo na najkontaminiranim dijelovima trupa poput vratnog područja oko ubodne rane ili središnjoj liniji otvaranja trupa (USDAS, 2020.). Ipak, u posljednje vrijeme sve se više preispituje upotreba octene kiseline, čak iz ekonomskih razloga, obzirom da je znatno jeftinija od mliječne kiseline (WANG i sur., 2021.b).

2.4.2. Dekontaminacijski učinak organskih kiselina na mesu

Kontaminacija životinjskih trupova (ne)patogenim bakterijama neizbježan je proces tijekom klaoničke obrade, iako njezina razina odnosno intenzitet pojavnosti na pojedinim dijelovima trupa može biti varijabilan. S tim u vezi, dekontaminacijski postupak bi trebalo primijeniti na svim površinama trupa u jednakom intenzitetu kako bi njegov učinak rezultirao očekivanim smanjenjem bakterijske populacije. Pritom se u kontekstu bakterijske populacije primarno referiramo na patogene bakterije, odnosno one čije je uklanjanje iz lanca proizvodnje hrane od najvažnijeg značaja za zdravlje ljudi. Primjena dekontaminacijskih postupaka u kontroli patogena unutar HACCP sustava svakako zahtjeva prethodnu validaciju odnosno verifikaciju uspostavljene metode. Obzirom da je za prethodno navedeno neophodno stvoriti realne uvjete kontaminacije patogenim bakterijama na razini proizvodnje, a što svakako nije preporučljivo, većina dosadašnjih istraživanja provedena je *in vitro*. To je ono što dodatno otežava procjenu prednosti primjene dekontaminacije jer laboratorijski uvjeti teško mogu odraziti one stvarne na liniji klanja.

U svakom slučaju, u literaturi je dostupno mnogo podataka o čimbenicima koji su ključni pri razmatranju dekontaminacijskog učinka organskih kiselina na mesu, a koji su proizašli iz takvih istraživanja. U nedavno objavljenom preglednom radu, ROSSI i sur. (2023.) su ih saželi na četiri osnovna: način primjene dekontaminacijskog sredstva, vrstu otopine, razinu kontaminacije trupa te karakteristike površine koja se tretira (Slika 8).



Slika 8. Faktori utjecaja na učinkovitost aplikacije organskih kiselina na trupu (Prema ROSSI i sur., 2023.)

Dekontaminacijski postupak pomoću otopina organskih kiselina uključuje primjenu prskanjem ili uranjanjem mesa u otopine, a njihova učinkovitost uvelike ovisi o temperaturi otopine, tlaku primjene te vremenu izloženosti (HASTAOĞLU i sur., 2022.). U usporedbi sa metodom uranjanja, prskanje trupova je lakše uklopiti unutar linije klanja, sprječava pretjeranu potrošnju vode te mogući negativni utjecaj na organoleptička svojstva mesa uslijed dugotrajnog izlaganja (WOLF i sur., 2012.). Osim toga, ima daleko širu primjenjivost u odnosu na uranjanje koje je iz tehničkih razloga ograničeno na pileće trupove ili eventualno rasjeke crvenog mesa. Time je i većina istraživanja za usporedbu jedne i druge metode provedena na modelu pilećeg mesa, a rezultati dosta variraju. Uspoređujući učinkovitost organskih kiselina prema *Campylobacter* spp. na mesu peradi, MEREDITH i sur. (2013.) dokazali su kako je uranjanje mesa u 5 %-tnu otopinu mliječne i octene kiseline rezultiralo statistički značajno većom redukcijom broja *Campylobacter* spp. od 2,5-3 log₁₀ CFU/cm² u odnosu na prskanje koje se

pokazalo neučinkovitim. Bolju djelotvornost metode uranjanja su potvrdili i WOLF i sur. (2012.) primjenom 4,4 %-tne otopine mliječne kiseline na goveđim obrescima kojom je postignuto veće smanjenje broja *E. coli* i *Salmonella* nego nakon prskanja otopinama iste kiseline. Kako autori navode, prednost metode uranjanja je ta što meso tijekom izlaganja apsorbira određenu količinu otopine pa je i njezina izloženost patogenu veća, što na kraju omogućuju bolji antimikrobni učinak. Prskanje se pokazao manje učinkovitom metodom i u istraživanju LAURY i sur. (2009.) gdje se uranjanjem pilećih trupova u otopinu kiselina postigla za 1 log₁₀ CFU/mL veća redukcija *Salmonella* ($p < 0,05$). S druge strane, KUMAR i sur. (2020.) dokazali su podjednaku učinkovitost obiju metoda prema *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. na filetima pilećeg mesa. SIGNORINI i sur. (2018.) su pak uspoređivali dekontaminacijski potencijal organskih kiselina prema shiga-toxin producirajućoj *Escherichia coli* na trupovima goveda primjenom ručne ili automatizirane prskalice. Utvrdili su kako je automatizirana primjena bila značajno učinkovitija od ručne, vjerojatno uslijed homogene aplikacije otopine u prikladnim volumenima. Ipak, autori ističu kako je za procjenu učinkovitosti ovakvih metoda bitno ukladiti ostale varijable poput duljine izlaganja, temperature otopine, njezine koncentracije, tlaka primjene, broja ponavljanja te faze klaoničke obrade u kojoj se primjenjuju. To potvrđuju i ostali autori (EDWARDS i FUNG, 2006.; NKOSI i sur., 2021.; ROSSI i sur., 2023.) obzirom da su se u navedenim istraživanjima takve varijable uglavnom razlikovale.

Za pretpostaviti je kako će primjena duljeg izlaganja mesa otopinama organskih kiselina rezultirati većim smanjenjem broja bakterija na njegovoj površini. S tim u vezi, HASTAOĞLU i sur. (2022.) navode kako bi s ciljem dobivanja očekivanog učinka dekontaminacije duljina primjene dekontaminacijskog protokola trebala biti između 15 i 300 sekundi, a većina autora je u svojim istraživanjima primjenjivala kraće vrijeme izlaganja od 15 sekundi, pa i manje (FABRIZIO i CUTTER, 2004.; CHRISTIANSEN i sur., 2009.; SMULDERS i sur., 2012.; BRUSTOLIN i sur., 2014.). Istražujući utjecaj primjene peroksioktene kiseline u dekontaminaciji pilećih trupova, VADDU i sur. (2021.) su ustanovili značajnu razliku u smanjivanju broja *Salmonella*, *E. coli* i *Campylobacter* populacije pri duljem izlaganja, iako su takvi rezultati i očekivani obzirom na veliku razliku trajanja dekontaminacije (10 sekundi i 60 minuta). Ipak, i u značajno kraćim intervalima primjene (5 i 10 sekundi) 1 %-tne otopine mliječne kiseline na trupovima svinja, CHRISTIANSEN i sur. (2009.) utvrdili su značajno veće smanjenje broja *Salmonella* (0,5 log₁₀ CFU/cm²), *E. coli* (0,8 log₁₀ CFU/cm²) i *Y. enterocolitica* (0,7 log₁₀ CFU/cm²) prilikom duljeg izlaganja od 10 sekundi. Suprotno od toga, istraživanje LAURY i sur. (2009.) u kojem je ispitivan utjecaj primjene otopina mliječne i limunske kiseline

na trupovima pilića pokazalo je kako nije bilo razlike u smanjenju broja *Salmonella* nakon izlaganja otopinama u trajanju od 5, 10 i 20 sekundi.

Temperatura otopina organskih kiselina koje se primjenjuju u dekontaminaciji mesa još je jedna varijabla koja može utjecati na njihovu učinkovitost, no i ovdje rezultati variraju među istraživanjima. Tako su u počecima istraživanja kemijske dekontaminacije mesa ANDERSON i MARSHALL (1990.) utvrđivali antimikrobni potencijal otopina mliječne, octene, limunske i askorbinske kiseline prema umjetno inokuliranoj mikrobioti na goveđem mesu. Temperature primjenjenih otopina bile su od 20 °C do 70 °C, a autori su zaključili kako je u svakoj promatranoj mikrobnj populaciji (aerobne mezofilne bakterije, enterobakterije, *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium) smanjenje broja bakterija bilo značajno veće povećanjem temperature otopina. Slično su dokazali i CHRISTIANSEN i sur. (2009.) na trupovima svinja nakon primjene 1 %-tne otopine mliječne kiseline pri 80 °C kojom je postignuto značajno veće smanjenje populacija u odnosu na otopinu temperature 55 °C, i to za 1,2-1,9 log₁₀ CFU/cm² (*E. coli*), 1,7-1,8 log₁₀ CFU/cm² (*Salmonella* Typhimurium) te 1,0-1,3 log₁₀ CFU/cm² (*Y. enterocolitica*), uzimajući u obzir dva vremenska intervala primjene. U istraživanju DEGEER i sur. (2016.) ispitivan je učinak otopina mliječne kiseline temperatura 4 °C, 25 °C i 60 °C prema *E. coli*, *Salmonella* i *L. monocytogenes* inokuliranih na goveđe i svinjsko meso, no ovdje autori nisu utvrdili značajan učinak temperature na indikatorske bakterije. Utjecaj temperature nije se pokazao značajnim ni u istraživanju KING i sur. (2005.) u kojem je peroksioctena kiselina temperature 45 °C i 55 °C korištena kao dekontaminacijsko sredstvo u prskanju goveđih trupova. Ipak, u ovom slučaju možemo zaključiti kako su takvi rezultati očekivani obzirom na mali raspon korištene temperature od koje gornja ni nije na razini letalnosti za tretiranu bakterijsku populaciju. Autori čak i navode kako primjenjene temperature nisu dovele do značajne razlike u povećanju temperature površine mesa, vjerojatno uslijed brzog hlađenja otopina tijekom prskanja.

Što se tiče koncentracije otopina organskih kiselina korištenih u dekontaminaciji, preporuka je da se njihove vrijednosti kreću u rasponu od 1,5 %-2,5 % (USDAS, 1996.). Prema podacima iz literature, čini se kako ta varijabla ima značajniju važnost u postizanju dekontaminacijskog učinka od prethodno navedenih, temperature otopine i trajanja izlaganja. Brojni autori dokazali su kako povećanje koncentracije otopine organskih kiselina dovodi do izraženijeg smanjenja broja promatrane bakterijske populacije na mesu goveda, svinja i pilića (VAN NETTEN i sur., 1997.a; CHRISTIANSEN i sur., 2009.; YODER i sur., 2012.; MENCONI i sur., 2013.; KASSEM i sur., 2017.; VADDU i sur., 2021.). BRUSTOLIN i sur. (2014.) utvrdili su kako je koncentracija otopine mliječne kiseline bila značajniji faktor za

smanjenje broja enterobakterija na trupovima svinja od primijenjenog tlaka pri dekontaminaciji. Usporedbom učinkovitosti 1 %- i 2,5 %-tne otopine mliječne kiseline na inokuliranu mikrobiotu, CHRISTIANSEN i sur. (2009.) preporučuju 2,5 %-tnu otopinu zagrijanu na 80 °C koja rezultira većim smanjenjem broja *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* i *Y. enterocolitica* na mesu i koži svinja u odnosu na 55 °C. Nešto veće koncentracije otopina mliječne kiseline (2,5 % i 5 %) koristili su EASTWOOD i sur. (2021.) s ciljem utvrđivanja učinkovitosti u smanjenju broja *Salmonella enterica*, *E. coli*, shiga-toxin producirajuće *E. coli* i *Campylobacter* na površini mesa i kože svinja prije i nakon hlađenja. Iako su autori utvrdili najveće smanjenje primjenom 5 %-tne otopine mliječne kiseline, nije utvrđena i značajna razlika između protokola s 2,5 %-tnom otopinom, uzevši u obzir sve prethodno navedene parametre promatranja poput hlađenja mesa te površine tretiranja. Slične raspone koncentracija otopina mliječnih kiselina (2 %, 3 %, 4 % i 5 %) koristili su i RODRIGUEZ-MELCON i sur. (2017.) prilikom prskanja govedih trupova kako bi utvrdili dekontaminacijski učinak prema populaciji aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija te psihrotrofnih bakterija na površini trupa. Zanimljivo je kako nisu utvrđene značajne razlike u dekontaminacijskom učinku nakon primjene različitih koncentracija otopina, s iznimkom psihrotrofnih bakterija koje su bile najosjetljivije na 5 %-tnu otopinu mliječne kiseline. Kako autori navode, mogući razlog za to su velika odstupanja između pojedinačnih dobivenih vrijednosti koje na kraju rezultiraju podjednakim srednjim vrijednostima čime razlike nisu značajne.

Kako smo već naveli, još jedan čimbenik koji može utjecati na učinkovitost dekontaminacijskog postupka organskim kiselinama je odabir vrste kiseline, ali i njihova istovremena kombinacija sa ostalim kemijskim, biološkim ili fizikalnim metodama. U prethodno navedenim istraživanjima većinski provedenima na goveđem i pilećem mesu, dosad najbolje istražene su mliječna i octena kiselina, od kojih mliječna kiselina dominira. U većini onih koja su uspoređivala njihov antimikrobni učinak, mliječna kiselina se pokazala kao bolji izbor (HARDIN i sur., 1995.; EL-TABIY i SOLIMAN, 2011.; COSANSU i AYHAN, 2012.; YODER i sur., 2012.; VAN BA i sur., 2018.; SALLAM i sur., 2020.). Ipak, pojedini autori tvrde kako nema razlike u njihovoj djelotvornosti (CHOI i sur., 2009.), dok su neki dokazali kako učinak ovisi o vrsti mikrobne populacije koja se tretira (DAN i sur., 2007.). U novije vrijeme sve se više istražuje i učinak manje poznatih organskih kiselina kao što je limunska, jabučna, propionska, fumarna, kaprinska, kaprilna, levulinska, glukonska ili pirogroždana (MENCONI i sur., 2013.; MOHAN i POHLMAN, 2016., FERNANDEZ i sur., 2021.). Ovi autori ističu kako su se navedene kiseline pokazale učinkovitima u inhibiciji bakterijskog rasta uz istovremeno minimalni utjecaj na senzoričku mesu čime ostvaruju potencijal primjene u dekontaminaciji.

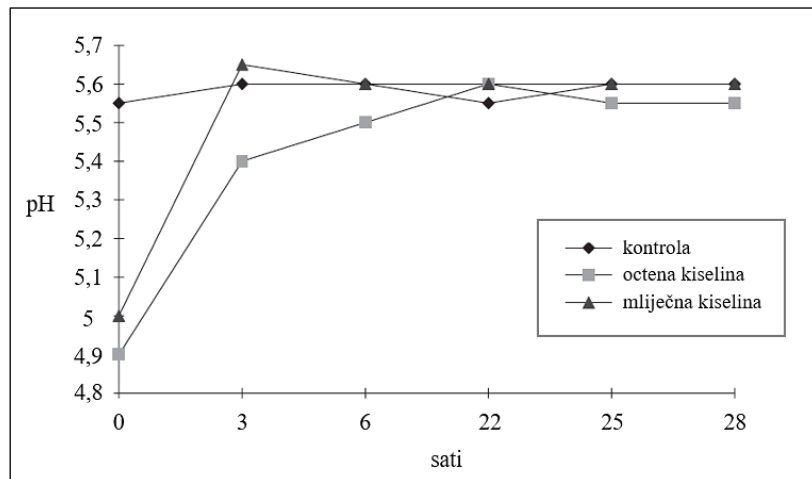
Brojne druge metode su također predmet razmatranja za primjenu u kombinaciji sa organskim kiselinama, poput: antioksidansa (DJENANE i sur., 2003.), UV zračenja (KOLLER i sur., 2021.), bakteriofaga (YEH i sur., 2018.), superkritičnog ugljikovog dioksida (CHOI i sur., 2009.), hladne plazme (CHAPLOT i sur., 2019.), elektrolizirane vode (TANGO i sur., 2014.), ozona (MEGAHED i sur., 2020.) ili vodene pare (SMULDERS i sur., 2011.). Ipak, dosad je najviše istraživanja posvećeno ispitivanju učinka primjene otopina organskih kiselina u kombinaciji s vodom, najčešće zagrijanom. Tako su ÖZDEMİR i sur. (2006.) ispitivali učinak istovremene primjene 1 %- i 2 %-tne otopine mliječne kiseline i vruće vode prema populaciji *Salmonella* Typhimurium i *L. monocytogenes* inokuliranoj na *M. longissimus dorsi* goveda i utvrdili izraženije smanjenje populacija u odnosu na samostalnu primjenu otopine mliječne kiseline ($p < 0,05$). EGGENBERGER-SOLORZANO i sur. (2002.) su slično dokazali na trupovima svinja nakon prskanja tople do vruće vode temperature od 25 °C do 80 °C, koji su potom isprani 2 %-tnom otopinom octene kiseline tijekom 5 sekundi. Najveće smanjenje broja aerobnih mezofilnih bakterija postignuto je nakon kombiniranog protokola s vrućom vodom i otopinom octene kiseline ($p < 0,05$). Navedena kombinacija nije dovela do značajne razlike u broju enterobakterija, koliformnih bakterija i *E. coli* u odnosu na djelovanje vruće vode same. Osim dokazane učinkovitosti istovremene primjene vruće vode i otopine organske kiseline, njihov redoslijed primjene također ima utjecaja na stupanj smanjenja promatrane bakterijske populacije. Naime, KOUTSOUMANIS i sur. (2004.) istraživali su učinak primjene vruće vode i otopine mliječne kiseline na rast i preživljavanje *L. monocytogenes* na svježem goveđem mesu pohranjenom pri 4 °C, 10 °C i 25 °C. U istraživanju su ukupno koristili četiri dekontaminacijska postupka koja su uključivala primjenu: vruće vode (75 °C), 2 %-tne otopine mliječne kiseline (55 °C), vruće vode nakon koje je meso tretirano otopinom mliječne kiseline te primjenu otopine mliječne kiseline nakon tretiranja mesa vodom. U načelu, zadnja dva protokola rezultirala su većim antilisterijskim učinkom u odnosu na zasebnu primjenu vode ili otopine mliječne kiseline. Najučinkovitiji je bio postupak primjene prvo vruće vode pa potom otopine mliječne kiseline. Autori takve rezultate objašnjavaju činjenicom kako vrućom vodom oštećene bakterijske stanice postanu osjetljivije na rezidualni utjecaj kiselina na mesu ($\text{pH}=4,99$) koji pak u drugom slučaju izostane obzirom na utjecaj ispiranja vodom nakon kiseline ($\text{pH}=5,55$).

Faza klaoničke obrade u kojoj se primjenjuje dekontaminacija može imati utjecaj na krajnji učinak. Iako pojedina starija istraživanja (BRACKETT i sur., 1994.; HARDIN i sur., 1995.) sugeriraju kako su otopine organskih kiselina najučinkovitije nakon primjene na trupovima koji su još uvijek topli, pojedini autori su istraživali njihov dekontaminacijski potencijal na trupovima u tijeku i nakon hlađenja (CASTILLO i sur., 2001.; KING i sur., 2005.;

KOCHARUNCHITT i sur., 2020.). Tako su CASTILLO i sur. (2001.) utvrdili kako je tretiranje hladnog goveđeg mesa 4 %-tnom otopinom mliječne kiseline (uz prethodnu primjenu na trupovima prije hlađenja) dovelo do dodatnog smanjenja broja *E. coli* O157:H7 ($2,0-2,4 \log_{10}$ CFU/cm²) i *Salmonella* ($1,6-1,9 \log_{10}$ CFU/cm²). Prskanje goveđih trupova tijekom hlađenja peroksiocetnom kiselinom pokazalo se učinkovitijom metodom i u istraživanju KOCHARUNCHITT i sur. (2020.). Autori navode kako je primjena višestrukih ciklusa prskanja tijekom hlađenja inhibirala rast *E. coli* i *Salmonella enterica* što je rezultiralo smanjenjem broja za $4 \log_{10}$ CFU/cm² nakon hlađenja mesa. Slične rezultate potvrđuju i HAN i sur. (2020.) u čijem istraživanju je primjena 3 %-tne otopine mliječne kiseline 45 minuta, 9 sati te 23 sata nakon klanja goveda dovela do značajnog smanjenja broja aerobnih mezofilnih bakterija na trupovima ($<2 \log_{10}$ CFU/cm²). Prednost takvih ponavljajućih tretiranja je prolongirani antimikrobni učinak uslijed rezidualnog djelovanja kiselina na mesu i snižavanja njegove pH vrijednosti (CASTILLO i sur., 2001.; CARPENTER i sur., 2011.). U slučaju da se dekontaminacija provodi prije hlađenja, a nakon završnog ispiranja trupova, za učinkovitost same metode bitno je ostaviti dovoljno vremena da se omogući cijedenje trupova jer u protivnome preostali sloj vode razrijedi primijenjenu kiselinu i time smanji njezinu učinkovitost (ANONIMNO, 2005.a).

Brojna istraživanja također ukazuju kako pri procjeni učinka pojedinog dekontaminacijskog postupka treba uzeti u obzir regiju na trupu koja se tretira kao i teksturu odnosno karakteristike njezine površine. Što se tiče mjesta na trupu, mogući nezadovoljavajući dekontaminacijski učinak vezan je uz ona područja koja su podložnija kontaminaciji što na kraju dovodi do neistovjetnih rezultata u odnosu na manje kontaminirane dijelove trupa. S tim u vezi, SALLAM i sur. (2020.) utvrdili su kako se dekontaminacijski učinak prskanja otopinama organskih kiselina razlikovao ovisno o mjestima uzorkovanja goveđih trupova. Naime, izraženija kontaminacija zabilježena je u području lopatice u odnosu na bedreno područje, vjerojatno uslijed olakšanog kontakta sa radnim površinama klaonice, a time i križne kontaminacije. Posljedično, nakon dekontaminacije takvog trupa, na tim je mjestima utvrđen veći broj aerobnih mezofilnih bakterija, odnosno slabiji dekontaminacijski učinak. U nešto ranije provedenom istraživanju, HARDIN i sur. (1995.) potvrdili su kako su unutarnje površine goveđih trupova bile najizazovnije za dekontaminaciju. Kako autori objašnjavaju, otežana obrada takvih područja prije dekontaminacije u startu pogoduje križnoj kontaminaciji, a znatna količina ostataka mišićnog tkiva sa masnim tkivom na njegovim rubnim dijelovima olakšava prijanjanje i zadržavanje bakterija između mišićnih vlakana. ACUFF (2005.) navodi kako položaj bakterijskih stanica u takvim pukotinama mišićnih vlakana onemogućuje njihovo

izlaganje otopinama organskih kiselina prilikom dekontaminacije pa je i njezin učinak slabiji. Osim toga, pojedini autori (MORILD i sur., 2001.) dokazali su kako takve površine nakon dekontaminacije postaju pogodnije za prijanjanje i zadržavanje bakterijskih stanica što može olakšati križnu kontaminaciju tijekom daljnje prerade mesa. Da tekstura tretirane površine ima utjecaj na ishod dekontaminacije potvrđuje i istraživanje YOUSSEF i sur. (2012.) koji su uvidjeli kako je učinak dekontaminacije s 5 %-tnom otopinom mliječne kiseline bio znatno slabiji na površini goveđih odrezaka u odnosu na površine mesa prekrivene fascijom. S tim u vezi, i drugim istraživanjima je dokazano kako se nakon primjene dekontaminacijskog sredstva jači antimikrobni učinak postiže na površinama s teksturom kompaktnijom od one na mesu, poput kože (CHRISTIANSEN i sur., 2009.) ili masnog tkiva (KOCHARUNCHITT i sur., 2020.). Jedan od razloga tome može biti činjenica što je na takvim površinama učinak "ispiranja" veći nego na mesu. Pored toga, ulogu u tome svakako ima i rezidualni pH koji se uslijed njihove oslabljene puferske sposobnosti puno sporije vraća početnoj vrijednosti (GREER i DILTS, 1995.; PAULSEN i SMULDERS, 2004.), za razliku od mesa gdje se to dogodi već nakon 3-5 sati od izlaganja kiselinama (Slika 9).



Slika 9. pH vrijednost površine svinjskog *M. longissimus dorsi* nakon izlaganja otopinama octene i mliječne kiseline (ROHRBACHER, 2001.)

2.4.3. Dekontaminacijski učinak organskih kiselina prema *Y. enterocolitica* na mesu

Zastupljenost *Y. enterocolitica* u istraživanjima dekontaminacijskog učinka organskih kiselina daleko je manja u odnosu na ostale patogene bakterije poput *Salmonella enterica*, *E. coli* ili *L. monocytogenes*, a većina njih ispitivala je učinak mliječne kiseline dok podataka za octenu kiselinu gotovo ni nema. CHRISTIANSEN i sur. (2009.) istraživali su utjecaj primjene otopine mliječne kiseline različitih koncentracija (1 % i 2,5 %), temperatura (55 °C i 80 °C) te vremena izlaganja (5 i 15 sekundi) na populaciju *Y. enterocolitica* inkuliranu na svinjsko meso.

Rezultati su pokazali kako se povećanjem vrijednosti navedenih varijabli povećava i antimikrobni učinak, a najveći je postignut nakon primjene otopine zagrijane na 80 °C tijekom 15 sekundi (3,2-3,4 log₁₀ CFU/cm²). Slično su dokazali DAN i sur. (2017.) prilikom istraživanja dekontaminacijskog učinka različitih koncentracija otopina mliječne i octene kiseline (1-3 %) prema *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu. Smanjenje populacije *Y. enterocolitica* bilo je veće djelovanjem mliječne kiseline. Dekontaminacijski učinak obiju kiselina se proporcionalno povećavao s podizanjem koncentracije od 1 % (1,73 log₁₀ CFU/g; 1,39 log₁₀ CFU/g), 2 % (2,33 log₁₀ CFU/g; 1,66 log₁₀ CFU/g) do 3 % (3,55 log₁₀ CFU/g; 2,75 log₁₀ CFU/g). Učinkovitost navedenih kiselina je pored *Y. enterocolitica* ispitivana i prema drugim patogenim bakterijama pri čemu je *Y. enterocolitica* uz *Campylobacter* pokazala najveći stupanj osjetljivosti, u odnosu na *E. coli* koja je bila najotpornija, što potvrđuju i drugi autori (SMULDERS i GREER, 1998.).

KING i sur. (2012.) su ispitivali dekontaminacijski učinak 2 %-tne otopine mliječne kiseline (45 °C; 10 sekundi) u kombinaciji s ispiranjem vodom, hlađenjem i zamrzavanjem na populaciju *Y. enterocolitica* inokuliranu na uzorke probavnih organa (jetra, želudac, crijeva). Autori su dokazali statistički značajno veće smanjenje populacije *Y. enterocolitica* (>0,5 log₁₀ CFU/g) primjenom mliječne kiseline, što je zabilježeno i u slučaju *Salmonella* spp. U nešto starijem istraživanju GREER i DILTS (1995.) istražen je antimikrobni potencijal 3 %-tne otopine mliječne kiseline prema populaciji *Y. enterocolitica* na svinjskom mišićnom i masnom tkivu tijekom 15 dana pohrane pri 4 °C. Odmah po tretiranju na mišićnom tkivu uočeno je smanjenje broja za 1 log₁₀ CFU/cm² koji se potom postupno povećavao te je sedmi dan dosegnuo maksimalnih 3,5 log₁₀ CFU/cm² u odnosu na kontrolni uzorak. Za razliku od toga, veće smanjenje broja *Y. enterocolitica* zabilježeno je na masnom tkivu; za 2 log₁₀ CFU/cm² nultoga dana, a nakon četvrtog dana broj je bio ispod razine detekcije metode (<10 CFU/cm²). Kako autori navode, izraženiji baktericidni učinak postignut na masnom tkivu posljedica je značajnijeg pada pH vrijednosti njegove površine odnosno slabije puferske sposobnosti koja je pak u slučaju mesa višestruko izraženija (GREER, 1993.).

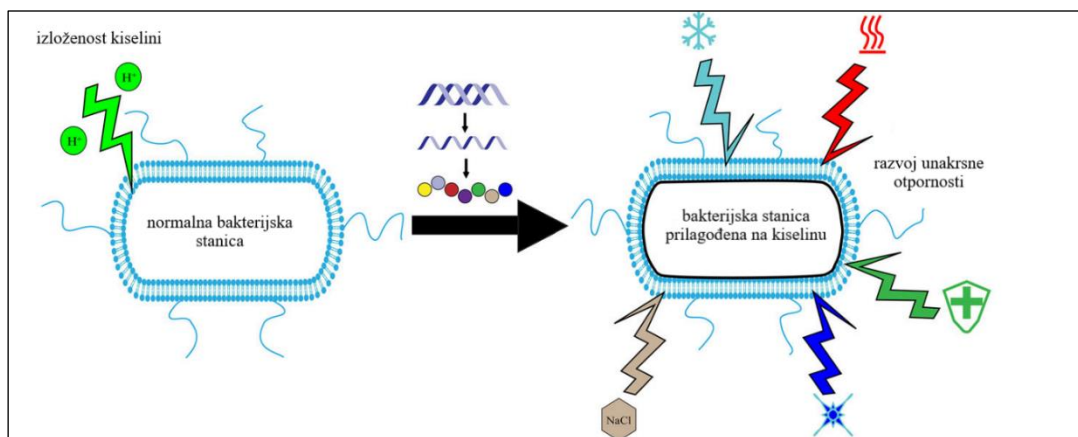
Sukladno oskudnim literaturnim podacima o antimikrobnoj učinkovitosti pojedinih organskih kiselina prema *Y. enterocolitica*, spoznaje o utjecaju dekontaminacije organskim kiselinama na razvoj njezine acidorezistencije su još uvijek nedostatne. Tek su VAN NETTEN i sur. (1997.b) provodili prilagodbu *Y. enterocolitica* na kisele uvjete te ju potom inokulirali na svinjsku kožu prethodno tretiranu različitim koncentracijama otopina mliječne kiseline (1-5 %) s ciljem utvrđivanja razlike u preživljavanju. Temeljem dobivenih rezultata, autori su zaključili kako na kiselinu prilagođena *Y. enterocolitica* ipak otežano preživljava u takvim uvjetima, ali i da će kisela sredina s vremenom podržavati njezino preživljavanje i rast, uzevši u obzir i smanjenu aktivnost kompetitivne mikrobiote. Što se tiče pak spoznaja o utjecaju acidorezistencije na potencijalni razvoj antimikrobne rezistencije kod *Y. enterocolitica*, u literaturi još uvijek ne postoje podaci kojima bi se takva tvrdnja potvrdila ili opovrgnula obzirom da takva istraživanja dosad nisu provedena.

2.5. Potencijalni rizici vezani uz dekontaminaciju mesa organskim kiselinama

2.5.1. Razvoj acidorezistencije bakterija

Jedan od važnijih rizika povezanih s primjenom organskih kiselina u dekontaminacijske svrhe je moguća selekcija bakterijskih sojeva prilagodljivih na novonastale kisele uvjete te posljedični razvoj acidorezistencije (SKANDAMIS i sur., 2010.). Takvi sojevi preživljavaju dekontaminaciju te koloniziraju radne površine klaonice čime se olakšava križna kontaminacija rezistentnih sojeva na trupove (SAMELIS, 2005.). Sposobnost preživljavanja unutar niskih granica pH omogućava preživljavanje bakterijskih stanica u hrani, a time i unutar probavnog sustava potrošača, što je posebno važno u slučaju patogenih bakterija (LEE i KIM, 2017.). Ono što je još posebno od važnosti je i mogućnost širenja takve rezistencije na sojeve istih ili različitih bakterijskih vrsta putem genetskog materijala poput plazmida ili transposona (THERON i LUES, 2007.). Prema CHENG i sur. (2003.), bakterijske stanice izložene djelovanju kiselina imaju sposobnost indukcije metaboličkog odgovora na kisele uvjete (engl. ATR – *acid tolerance response*) što ih čini prilagodljivijima na stres, a time i manje osjetljivima u odnosu na neizložene stanice. Reakcija prilagodbe na kisele uvjete, osim otpornosti na niski pH, može inducirati razvoj niza fizioloških i genetskih mehanizama otpornosti za bakterijsku stanicu (WANG i sur., 2019.). WU i sur. (2021.) navode kako postoje dokazi da stečena rezistencija na kiseline može dovesti do razvoja križne otpornosti bakterija prema nepovoljnim

uvjetima (visoka i niska temperatura, osmotski stres, visoki hidrostatski tlak, ultraljubičasto zračenje, primjena antibiotika) što predstavlja rizik za sigurnost hrane (Slika 10).



Slika 10. Pregled križne otpornosti bakterija izazvane prilagodbom na kiselinu (WU i sur., 2021.)

Urođena, tj. ne stečena osjetljivost patogenih bakterija prenosivih hranom prema kiselinama primarno je uvjetovana njihovom građom, odnosno strukturom stanične stijenke. Tako su gram pozitivne bakterije načelno slabo rezistentne obzirom da u staničnoj strukturi ne posjeduju vanjsku membranu čime je metabolitima olakšan nesmetani prolaz kroz stanicu. S druge strane, stanica gram negativnih bakterija okružena je unutarnjom i vanjskom membranom između kojih je i gusti sloj peptidoglikana koji također ima ulogu u zaštiti stanice od vanjskih utjecaja. Ipak, stečena rezistencija je daleko važnija u obrambenoj sposobnosti stanice, a u literaturi su opisani brojni mehanizmi njezinog stjecanja koji su ključni u patogenezi obje grupe bakterija (AUDIA i sur., 2001.; COTTER i HILL, 2003.). Neki od mehanizama su: izravno uklanjanje protona iz stanice pomoću protonske pumpe, promjene u sastavu stanične membrane (npr. blokiranje porina vanjske membrane vezanjem polifosfata ili kadaverina), alkalizacija vanjskog okruženja razgradnjom izvora ugljika različitih od glukoze (riboza, arabinoza i fruktoza), izravna potrošnja unutarstaničnih protona te proizvodnja šok proteina i šaperona (EFSA, 2018.). U načelu, gram negativne bakterije su osjetljivije na djelovanje organskih kiselina pa je nakon dekontaminacije preostala bakterijska populaciju na mesu u većini slučajeva sačinjena od gram pozitivnih bakterija (ACUFF i sur., 2005.). Nakon provedenih tretiranja otopinama organskih kiselina, preživjele bakterijske stanice su uslijed puferskog kapaciteta mesa izložene blago kiselim uvjetima koji im dalje omogućavaju prilagodbu i razmnožavanje. Ishod takve prilagodbe je uglavnom vrsno specifičan, a primarno ovisi o razini

urođene rezistencije kao i uvjetima kojima je bakterijska stanica izložena tijekom nje (SAMELIS, 2005.).

Primjerice, u istraživanju VAN NETTEN i sur. (1997.b) dokazano je kako su nakon tretiranja kože svinja 2-5 %-tnom otopinom mliječne kiseline stvoreni prethodno navedeni uvjeti, no oni ipak nisu utjecali na rast *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* unatoč tome što su prije inokulacije na kožu obje vrste izložene i prilagođene kiselim uvjetima. Nešto kasnije su IKEDA i sur. (2003.) provodili slično istraživanje na goveđem mesu gdje je također potvrđeno kako nije bilo razlike u preživljavanju i rastu između *L. monocytogenes* prethodno izložene kiselim uvjetima u odnosu na one neizložene. THERON i LUES (2007.) navode kako je kod *L. monocytogenes* nakon izlaganja slabo kiselim uvjetima inducirana tolerancija na niski pH (≈ 3), no još uvijek nije potvrđeno da li bi se ona mogla razviti i nakon primjene slabih kiselina pri dekontaminaciji. Pri istraživanju prilagodbe *Salmonella enterica* na dekontaminacijska sredstva koje se primjenjuju na pilećim trupovima, ALONSO-HERNANDO i sur. (2009.) su temeljem dobivenih rezultata zaključili kako nema opasnosti od razvoja rezistencije odnosno prilagodljivosti sve dok su sredstva primjenjena u optimalnoj koncentraciji, dok suboptimalne koncentracije dekontaminanata mogu inducirati smanjenu osjetljivost patogena. U nešto novijem istraživanju, GAVRIIL i sur. (2020.) su istraživali utjecaj nedisociranog oblika octene kiseline na razvoj acidorezistencije *Salmonella* Enteritidis. Povećavanjem koncentracija pripremljenih otopina octene kiseline do subletalnih granica (pH=5,5-6,0) zabilježen je progresivniji rast *Salmonella*, no isti protokoli prilagodbe nisu rezultirali i većom stopom preživljavanja patogena u uzorcima zakiseljene hrane. Suprotno je dokazano na kiselini prilagođenoj *E. coli* O157:H7 čiji rast je zabilježen u vakuumiranoj govedini pohranjenoj na 4 °C i prethodno tretiranoj 2 %-tnom otopinom octene kiseline (BERRY i CUTTER, 2000.), a slično je dokazano i u istraživanju STOPFORTH i sur. (2004.). Navedeno ide u prilog činjenici o urođenoj acidorezistenciji koja je posebno istražena i dokazana u slučaju *E. coli* O157:H7 (THERON i LUES, 2007.). Iz prethodno navedenih istraživanja razvidno je kako su adaptibilne sposobnosti na kisele uvjete najbolje istražene kod patogenih bakterija poput *Salmonella*, *E. coli* i *L. monocytogenes*, dok se u slučaju *Y. enterocolitica* još uvijek malo toga zna, a većina rezultata veže se uz njezinu prilagodbu na niske temperature.

2.5.2. Povezanost acidorezistencije i antimikrobne rezistencije bakterija

Izlaganje bakterija potencijalno letalnim pH vrijednostima nedvojbeno je dovelo do razvoja složenih adaptivnih mehanizama na molekularnoj razini koje stanici omogućavaju popravak nastalih oštećenja i u konačnici njezino preživljavanje. Prilagodba takvim nepovoljnim uvjetima s vremenom je potaknula pitanje moguće povezanosti otpornosti bakterija na kiseline s razvojem antimikrobne rezistencije. Naime, brojni okolišni okidači stresa sposobni su za indukciju *mar* (engl. *mar* – *multiple antibiotic resistance*) operona (McMAHON i sur., 2007.) koji pak regulira ekspresiju velikog broja gena, uključujući onih koji kodiraju aktivaciju efluks pumpe (engl. *efflux pump*), čija ekspresija je dominantna u stresnim uvjetima (MA i sur., 1995.). Time se u direktnu vezu dovodi utjecaj stresnih čimbenika, u ovom slučaju organskih kiselina, sa mogućim razvojem antimikrobne rezistencije bakterija (FOSTER, 2000.; GILBERT i McBAIN, 2003.). Dosadašnjim istraživanjima koja su ispitivala sposobnost induciranja otpornosti na antimikrobne lijekove uglavnom su obuhvaćene najznačajnije hranom prenosive patogene bakterije poput *Salmonella* spp., *E. coli* i *L. monocytogenes*, dok za patogenu *Y. enterocolitica* takvih istraživanja nema.

AL-NABULSI i sur. (2015.) su na izolatima *L. monocytogenes* dokazali razvoj rezistencije na niz antibiotika (streptomycin, gentamicin, ampicilin, penicilin, tetraciklin, doksiciklin, vankomicin, ciprofloksacin, enrofloksacin) nakon prethodne indukcije prilagodljivosti na mliječnu kiselinu (pH=5). Spomenuta prilagodljivost rezultirala je povećanjem minimalnih inhibicijskih vrijednosti od 0,5 – >4, iako su one varirale među izolatima što autori pripisuju njihovim različitim fenotipskim karakteristikama obzirom da svi nisu ni pripadali istom izvoru hrane. Nešto ranije su isti autori (AL-NABULSI i sur., 2011.) dokazali razvoj rezistencije na enrofloksacin, ampicilin i amoksisilin kod *Cronobacter sakazakii* nakon prilagodbe u fosfatnom puferu zakiseljenom pomoću mliječne kiseline (pH=3,5). Indukciju tolerancije na kiselinu na modelu *L. monocytogenes* istraživali su i BONNET i MONTVILLE (2005.) s ciljem utvrđivanja perzistencije patogena kultiviranog zajedno sa nizin producirajućom starter kulturom. Za prilagodbu na kisele uvjete koristili su klorovodičnu, octenu i mliječnu kiselinu koje su razrijedili do optimalne koncentracije, a rezultati su pokazali kako je razvoj rezistencije na nizin zabilježen samo kod izolata adaptiranih pomoću mliječne kiseline (pH=5,5). KOMORA i sur. (2017.) navode kako kod *L. monocytogenes* postoji povezanost između kiselinom induciranog osmotskog stresa i rezistencije na antibiotike, no potrebna su daljnja istraživanja na većem broj izolata kako bi se mogao donijeti ispravan zaključak.

Slična istraživanja provedena na *Salmonella* spp. dovela su do nešto drugačijih zaključaka. BACON i sur. (2003.) procjenjivali su razlike u otpornosti na kiseline između sojeva *Salmonella* osjetljivih i višestruko otpornih na antimikrobne lijekove (antibiotika), sa ili bez prethodne prilagodbe na niski pH. Rezultati su pokazali kako je u pojedinim sojeva indukcija tolerancije na niski pH dovela do povećane otpornosti na kiseline, no ona je bila neovisna o prethodno utvrđenoj razini osjetljivosti sojeva na antibiotike. Nešto kasnije su HUGHES i sur. (2010.) uspoređivali preživljavanje osjetljivih i multirezistentnih sojeva *Salmonella* inokuliranih u goveđe mljeveno meso koje je potom podvrgnuto djelovanju nekoliko dekontaminacijskih sredstava, između ostalog i 3 %-tnoj otopini mliječne kiseline temperature od 51 °C i 53 °C. Autori su dokazali kako nije bilo značajne razlike u preživljavanju osjetljivih i rezistentnih sojeva te time zaključili kako se obje varijante ponašaju slično pri odgovoru na antagonističko djelovanje antimikrobnih sredstava. Suprotno su dokazali McMAHON i sur. (2007.) uspoređujući antimikrobnu osjetljivost *Salmonella enterica*, *E. coli* i *Staphylococcus aureus* nakon njihovog izlaganja subletalnim pH vrijednostima (5,5; 5,0; 4,5; 4,0 i 3,5) u zakiseljenim tekućim hranilištima. Minimalne inhibicijske koncentracije koje su nakon spomenutog izlaganja bile veće u odnosu na početno testiranje uključivale su antibiotike: amikacin, ceftriakson, nalidiksičnu kiselinu (*E. coli*) te gentamicin i eritromicin (*S. aureus*) dok su u slučaju *Salmonella enterica* one bile iste ili čak manje nakon testiranja. Autori su utvrdili kako je kod promatranih sojeva smanjena osjetljivost još neko vrijeme zadržana čak i nakon uklanjanja stresnih faktora, s iznimkom *S. enterica* što dodatno doprinosi razvoju i održavanju antimikrobne rezistencije.

2.5.3. Utjecaj dekontaminacije mesa na njegova organoleptička svojstva

Za očekivati je kako primjena otopina organskih kiselina na mesu može, pored željenog smanjivanja bakterijske populacije, dovesti do manje poželjnih promjena organoleptičkih svojstava koje time narušavaju izgled i kvalitetu konačnog proizvoda. Brojni autori su se bavili tom problematikom pa je tako u pogledu organoleptičkih svojstava mesa dosad najviše istražen utjecaj dekontaminacije na njegovu boju (STIVARIUS i sur., 2002.; HECER i ULUSOY SÖZEN, 2011.; HARRIS i sur., 2012.; MEREDITH i sur., 2013.; MANZOOR i sur., 2020.; EASTWOOD i sur., 2021.), ali i miris (SMULDERS i sur., 2011.; MEREDITH i sur., 2013.), okus (CAP i sur., 2019.; FERNANDEZ i sur., 2021.), održivost (RODRIGUEZ-MELCON i sur., 2020.; HAN i sur., 2021.) te ukupnu prihvatljivost (CHRISTIANSEN i sur., 2009.;

SKŘIVANOVÁ i sur., 2011.). Bitno je naglasiti kako je većina rezultata ovih istraživanja vezana uz mliječnu kiselinu, obzirom da je dosad najčešće i istraživana njezin dekontaminacijski potencijal.

Što se tiče boje mesa kao najvažnijeg promatranog parametra senzoričke, autori su dolazili do različitih zaključaka, no jasno je kako oni uvelike ovise o uvjetima postavljenog pokusa (vrsta kiseline, koncentracija, pH i temperatura otopine, trajanje prskanja, vrsta mesa) pa i njihovoj interpretaciji treba pristupiti kritički. STIVARIUS i sur. (2002.) utvrdili su kako je boja goveđih odrezaka bila svjetlija i imala manju količinu oksimioglobina ($p < 0,05$) nakon tretiranja mesa 5 %-tnom otopinom mliječne kiseline, a zanimljivo je kako isto nije zamijećeno nakon dekontaminacije vrućom vodom (82 °C). CHRISTIANSEN i sur. (2009.) pak navode kako je primjena 2,5 %-tne otopine mliječne kiseline pri 80 °C dovela do negativnih učinaka na boju svinjskog mesa. Učinak primjene značajno niže koncentracije (0,5 %) otopine mliječne kiseline na boju pilećeg mesa ispitali su HECER i ULUSOY SÖZEN (2011.) te utvrdili kako je boja mesa postala značajno ($p < 0,05$) svjetlija u odnosu na kontrolni uzorak. Osim toga, boja mesa nakon primjene nešto nižih koncentracija (0,2 %; 0,3 %) otopina mliječne kiseline ocijenjena je znatno lošije od boje mesa tretiranog otopinama octene kiseline istih koncentracija. Suprotno je dokazano u istraživanju HARRIS i sur. (2012.) gdje nakon primjene 2 %- i 5 %-tnih otopina mliječne i octene kiseline nisu utvrđene značajne razlike u boji goveđeg mesa u odnosu na kontrolu, a tijekom dva intervala mjerenja (6. i 24. sat). Isto su potvrdili RODRIGUEZ-MELCON i sur. (2017.) nakon tretiranja goveđeg mesa sa 2 %- do 4 %-tnom otopinom mliječne kiseline, a pojedine zanemarive razlike između uzoraka autori pripisuju subjektivnom dojmu ocjenjivača koji nisu bili educirani u tu svrhu. MANZOOR i sur. (2020.) su dokazali kako je tek primjena 6 %-tne otopine mliječne kiseline dovela do pojave tamnih tragova na površini goveđih trupova. Iznenadjujući su i rezultati EASTWOOD i sur. (2021.) koji su nakon primjene hladnih i vrućih 2 % - 5 %-tnih otopina mliječne kiseline na komadima svinjskog mesa uočili tek minimalne negativne učinke na boju mesa.

Karakteristični kiseli miris mesa u najvećem broju slučajeva pojavljuje se nakon primjene octene kiseline, za razliku od mliječne kiseline (SMULDERS i sur., 2012.). Ovi autori navode kako se u njihovom istraživanju kiseli miris mesa razvio nakon primjene obje vrste kiseline, no u slučaju octene kiseline je bio puno intenzivniji te se 24 sata nakon primjene zadržao u 60 % uzoraka mesa. Ti rezultati su u skladu s onima HECER i ULUSOY SÖZEN (2011.) gdje su pri evaluaciji parametra mirisa pilećeg mesa nakon uranjanja u otopine mliječne i octene kiseline (0,2-0,3 %), uzorci mesa tretirani otopinom octene kiseline ocijenjeni značajno manjim brojem bodova (4,8-5,0) u odnosu na one tretirane otopinama mliječne kiseline istih

koncentracija (7,7-7,8). Ipak, ZAKI i sur. (2015.) uočili su kratkotrajan kiseliji miris kuhanog pilećeg mesa nakon prethodnog uranjanja u otopinu mliječne kiseline, dok u slučaju octene kiseline nije zamijećen. Slično su dokazali i GULMEZ i sur. (2006.) na pilećim krilcima uz pojavu blijedoružičaste boje mesa.

FERNANDEZ i sur. (2021.) provodili su potapanje pilećih prsa u 3 %-tnu otopinu mliječne kiseline tijekom 15 sekundi, a rezultati su pokazali kako pored boje nije bilo razlike ni u okusu kuhanog mesa testnih i kontrolnih uzoraka koji su tretirani vodom. Pri evaluaciji okusa svinjskog mesa tretiranog otopinama mliječne kiseline,iskusni panelisti navode kako je okus svinjetine bio bolji kako su koncentracija (1 % i 3 %) i vrijeme izloženosti kiselini (1 i 3 minute) bili veći te nije bio nimalo neugodan (GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.). Ipak, da primjena mliječne kiseline može utjecati na razvoj neugodnih okusa mesa potvrđuju CAP i sur. (2019.) koji su okus goveđeg mesa tretiranog 2 %-tnom otopinom mliječne kiseline usporedili s onima po ribi, maslinama ili čak svinjskom mesu.

Pojedini autori (HECER i ULUSOY SÖZEN, 2011.; ZAKI i sur., 2015.) su također dokazali kako primjena otopina mliječna i octene kiseline nije utjecala na parametar sočnosti pilećeg mesa odmah po tretiranju što je dodatno izjednačilo cjelokupnu senzoričku ocjenu sa kontrolnim uzorcima, s iznimkom onih u istraživanju HECER i ULUSOY SÖZEN (2011.) kojima je primjena octene kiseline narušila parametar mirisa. EL-TABIY i SOLIMAN (2011.) potvrđuju kako je s mikrobiološke i senzoričke strane održivost svježeg goveđeg mesa tretiranog 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline produljena na 7-9 dana u odnosu na kontrolni uzorak, dok je primjena koncentracija od 4 % negativno utjecala na boju i miris mesa.

2.6. Znanstveno mišljenje o sigurnosti i učinku primjene organskih kiselina u dekontaminaciji trupova svinja

Kao što je već prethodno spomenuto, voda za piće je trenutno jedino odobreno dekontaminacijsko sredstvo za primjenu na klaonički obrađenim trupovima životinja (ANONIMNO, 2004.b) u EU, barem što se tiče svinja. Primjena svih drugih potencijalnih tvari u dekontaminacijske svrhe zahtjeva prethodno odobrenje Europske komisije. S tim u vezi, EFSA je na zahtjev Komisije 2018. godine zatražena za znanstveno mišljenje (EFSA, 2018.) o sigurnosti i učinkovitosti mliječne i octene kiseline za primjenu u svrhu smanjivanja površinskih mikrobioloških onečišćenja na trupovima svinja i komadima svinjskog mesa. Dekontaminacijom bi se smanjio broj patogenih bakterija na svinjskom mesu, a time i na proizvodima od svinjskog mesa što bi rezultiralo manjom incidencijom bolesti prenosivih

hranom. Kako stoji u mišljenju, patogene bakterije od interesa u proizvodnji svinjskog mesa su: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas hydrophilia* i *S. aureus*. Pored toga, predloženim dekontaminacijskim metodama također bi se reducirao broj enterobakterija koje se smatraju indikatorima higijene, kao i broj ukupne populacije aerobnih mezofilnih bakterija. Mišljenje je uključivalo procjenu:

- toksikološke sigurnosti obje vrste kiselina;
- njihove učinkovitosti u smanjenju razine mikrobiološke kontaminacije na trupovima svinja
- moguću pojavu smanjene osjetljivosti na biocide i/ili rezistencije na terapiju antimikrobnim sredstvima
- rizika povezanog s otpuštanjem otpadnih voda nakon njihove upotrebe u okoliš

Procjena navedenih čimbenika donesena je temeljem sistematičnog pregleda relevantne znanstvene literature, a u skladu sa smjernicama za obradu podataka o ocjeni sigurnosti i učinkovitosti primjene takvih tvari u svrhu uklanjanja površinskog mikrobiološkog onečišćenja hrane životinjskog podrijetla (EFSA BIOHAZ Panel, 2010.). Što se tiče toksikološke sigurnosti mliječne i octene kiseline za ljude, Odbor je zaključio kako nema opasnosti od njihove primjene, pod uvjetom da su korištene tvari u skladu s specifikacijom Europske unije (EU) za prehrambene aditive. Zaključak se ponajprije temelji na činjenici da su obje tvari odobreni dodaci hrani u *quantum satis*, a njihov unos iz uobičajene prehrane uvelike nadmašuje izloženost uslijed namjeravane upotrebe u dekontaminaciji. Prskanje svinjskih trupova mliječnom kiselinom prije hlađenja pokazalo se učinkovitijim u usporedbi s netretiranim uzorcima. Ipak, na temelju dostupnih podataka Odbor nije mogao zaključiti da li je takvo prskanje bilo i učinkovitije od tretiranja vodom u istoj fazi klaoničke obrade svinja. Naime, u većini istraživanja dekontaminacijski učinak mliječne kiseline je u najmanju ruku bio jednako učinkovit kao i prskanje vodom dok je u tek 30 % usporedbi on bio statistički značajno djelotvorniji. S druge strane, Odbor navodi kako nije mogao donijeti zaključak o učinkovitosti primjene octene kiseline na svinjskim trupovima prije hlađenja i/ili komadima svinjskog mesa nakon hlađenja obzirom na nedovoljan broj dostupnih znanstvenih istraživanja (N=3). Što se tiče mogućnosti smanjene osjetljivosti na biocide i/ili terapiju antimikrobnim sredstvima,

Odbor je zaključio kako ne postoje dokazi koji upućuju na promicanje horizontalno prenosive rezistencije na mliječnu ili octenu kiseline u izlaganih bakterija. Uzimajući pak u obzir njihovu proširenost u okolišu, te hrani biljnog i životinjskog podrijetla, mogućnost razvoja rezistencije na terapijske antimikrobne lijekove vjerojatno neće postati značajan javnozdravstveni problem. Isto tako, njihovo otpuštanje u okoliš nije zabrinjavajuće, pod prepostavkom da bi se otpadne vode po ispuštanju iz klaonice podvrgnule dodatnom pročišćavanju s ciljem neutralizacije kiselog medija.

U zaključku predmetnog mišljenja stoji kako su potrebna dodatna istraživanja za procjenu učinkovitosti organskih kiselina na svinjskim trupovima, posebno u slučaju octene kiseline. Kako bi se spriječila prilagodba i otpornost patogenih bakterija na kiseline, za koju svakako postoji znanstvena osnova, predloženi dekontaminacijski postupak treba biti dostatan (u smislu načina primjene, koncentracije, temperature, trajanja i ponavljanja) za inaktivaciju ciljnih bakterija. Pri tome granice svakog od navedenih parametara treba detaljnije istražiti kako bi se raspolagalo sa podacima podrobnijima za donošenje znanstveno utemeljenih zaključaka. Naime, uloga dekontaminacije organskim kiselinama u adaptaciji bakterija na kisele uvjete te posljedično tome, potencijalnom razvoju otpornosti na kiselinu i/ili antimikrobna sredstva, još nije razjašnjena obzirom na mali broj utvrđenih znanstvenih dokaza kojima bi se potvrdile ili opovrgnule prethodno navedene tvrdnje.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Yersinia enterocolitica pripada skupini najznačajnijih patogenih bakterija u inspekciji mesa svinja koje se ujedno smatra i najvažnijim izvorom infekcije za ljude. Obzirom da klaonička obrada predstavlja glavno mjesto kontaminacije mesa u proizvodnom lancu, dekontaminacija trupova organskim kiselinama razmatra se kao metoda smanjenja rizika.

U odnosu na ostale patogene bakterije u higijeni mesa, dosadašnja istraživanja ukazuju na oskudne podatke o dekontaminacijskom učinku organskih kiselina prema populaciji *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu, dok ista ne uzimaju u obzir problematiku potencijalnih negativnih učinaka dekontaminacije. S tim u vezi, ciljevi ovog istraživanja su:

- utvrditi dekontaminacijski učinak otopina organskih kiselina na svinjskom mesu inokuliranom različitim sojevima bakterije *Y. enterocolitica* 4/O:3
- usporediti međusobni učinak obzirom na njihovu vrstu, koncentraciju i uvjete primjene u odnosu na standardne metode dekontaminacije mesa vodom
- utvrditi utjecaj primjene organskih kiselina na organoleptička svojstva mesa te istražiti povezanost otpornosti *Y. enterocolitica* 4/O:3 na antimikrobne lijekove i na organske kiseline

Temeljem kompleksnosti metodologije istraživanja u klaoničkim uvjetima, ali i nedovoljnih spoznaja o dekontaminacijskom potencijalu organskih kiselina, cijelo istraživanje provedeno je u laboratorijskim uvjetima. Pretpostavka istraživanja je da otopine organskih kiselina reduciraju brojnost inokuliranih populacija bakterije *Y. enterocolitica* 4/O:3 na površini svinjskog mesa, a njihov učinak razlikuje se ovisno o vrsti, koncentraciji te uvjetima primjene. Pretpostavlja se da ne postoji povezanost stupnja otpornosti na otopine organskih kiselina i na antimikrobne lijekove. Također, ne očekuje se da primjenjeni dekontaminacijski protokoli mijenjaju organoleptička svojstva svinjskog mesa.

Dobivenim rezultatima procijenit će se učinkovitost postupaka dekontaminacije u redukciji patogene *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu kao glavnom izvoru infekcije za ljude. Pored toga, istraživanje će doprinijeti razjašnjavanju povezanosti stupnja otpornosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na antimikrobne lijekove i na otopine organskih kiselina, a time i procjeni sigurnosti njihove upotrebe. Dokazano najučinkovitiji dekontaminacijski protokol potencijalno će biti primjenjiv u praksi s ciljem smanjivanja rizika od *Y. enterocolitica* 4/O:3 u okviru revizije HACCP programa u klaonicama i preradama mesa svinja.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Plan eksperimenta

Sukladno prvotnom cilju istraživanja kojim se željelo utvrditi utjecaj dekontaminacije na redukciju broja inokuliranih bakterijskih stanica, a ovisno o odabranim faktorima (vrsta organske kiseline, koncentracija kiseline, temperatura otopine te vrijeme tretiranja), korišten je faktorski dizajn kojim je određen minimalan broj pokusa po soju *Y. enterocolitica*. Obzirom na 4 uvjeta sa po dvije razine, korišten je dizajn 2x2x2x2, što čini ukupno 16 protokola, kojima su pridodana 4 u kojima je korištena voda, pri dvije temperature i dva perioda izlaganja (dizajn 2x2). Time je ukupan broj protokola iznosio 20 (Tablica 2). Provjera redukcije broja *Y. enterocolitica* provedena je u dva mjerenja (0. i 24. sat), u triplikatu. Uzimajući u obzir sve navedeno, ukupan broj mikrobioloških analiza po jednom soju izračunali smo prema formuli:

$$n_{analiza} = n_{sojevi} \cdot n_{protokoli} \cdot n_{mjerenje} \cdot n_{ponavljanje}$$

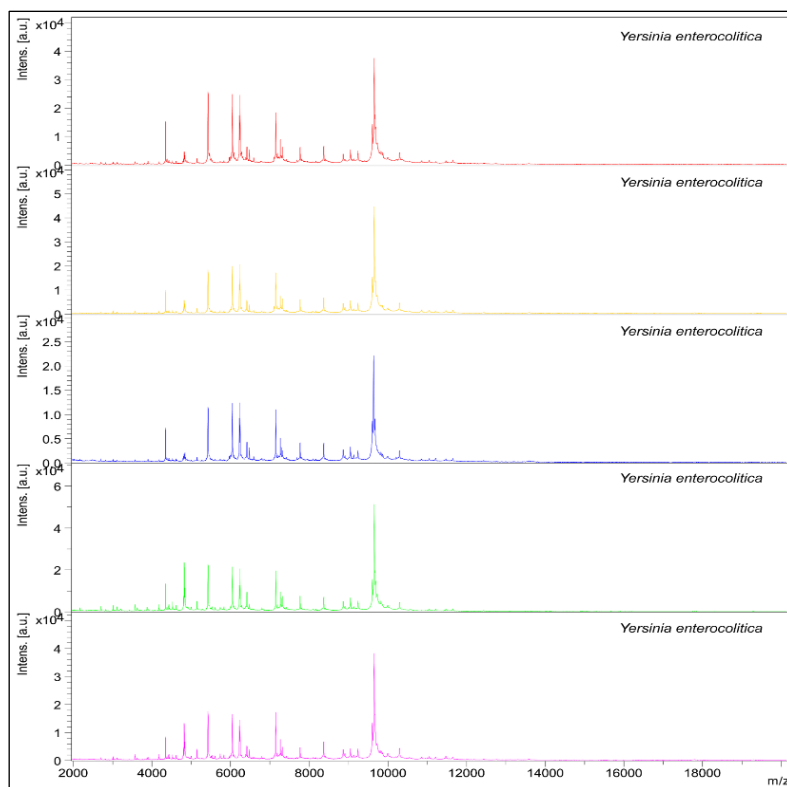
pri čemu je broj analiza po jednom soju *Y. enterocolitica* iznosio 120, a broj korištenih sojeva *Y. enterocolitica* je obzirom na zahtjevnost istraživanja te resurse ograničen na 10.

Tablica 2. Oznake dekontaminacijskih protokola korištenih u postupcima dekontaminacije svinjskog mesa

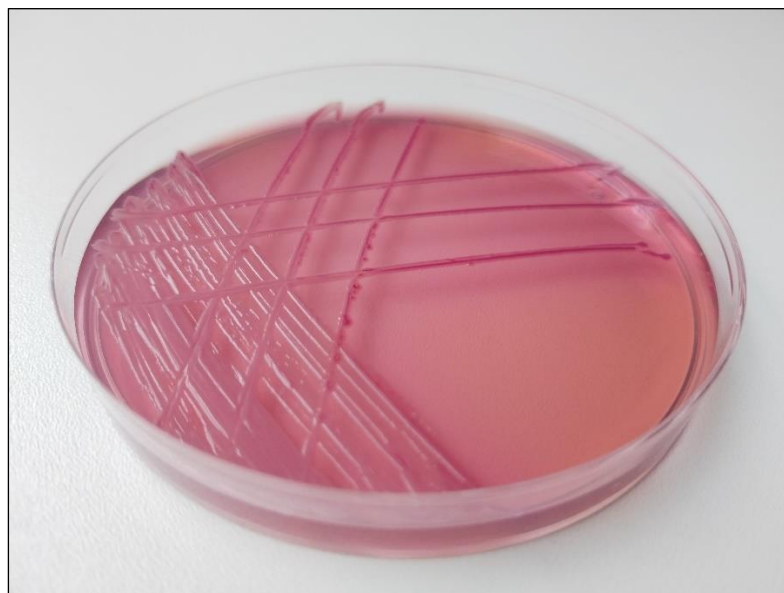
Oznaka protokola	Opis
1.	2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi
2.	4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi
3.	2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi
4.	4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi
5.	2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi
6.	4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi
7.	2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi
8.	4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi
9.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi
10.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi
11.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi
12.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi
13.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi
14.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi
15.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi
16.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi
17.	Voda; 25 °C; 10 sekundi
18.	Voda; 25 °C; 30 sekundi
19.	Voda; 80 °C; 10 sekundi
20.	Voda; 80 °C; 30 sekundi

4.2. Priprema sojeva *Y. enterocolitica*

Sojevi *Y. enterocolitica* (N=10) korišteni u pokusu prikupljeni su tijekom prijašnjeg istraživanja (PAŽIN, 2021.) te su do testiranja bili pohranjeni u microbank sustavu za krioprezervaciju (Deltalab, Barcelona, Španjolska) na -80 °C. Prethodno su identificirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom u Institutu Ruđer Bošković, Zagreb (Slika 11). Neposredno prije inokulacije na meso kao i prije testiranja osjetljivosti na otopine organskih kiselina i antibiotike, sojevi su namnažani u PSB tekućem hranilištu (*Peptone, Sorbitol and Bile salts*, PSB, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) te kultivirani naciepljivanjem na selektivni agar (*Cefsulodin, IrgasanTM and novobiocin*, CIN, Merck, Darmstadt, Njemačka) tijekom 24 sata pri 30 °C (Slika 12). Kako bi se odredio broj bakterijskih stanica u mililitru PSB tekućeg hranilišta (CFU/mL) i temeljem toga izračunala završna koncentracija po gramu mesa (CFU/g) nakon inokulacije, nakon 24-satne inkubacije napravljena su serijska decimalna razrjeđenja PSB tekućeg hranilišta te je 0,1 mL najoptimalnijeg razrjeđenja površinski inokuliran na CIN selektivni medij i inkubiran tijekom 24 sata pri 30 °C.



Slika 11. Prikaz spektra masa *Y. enterocolitica* na MALDI-TOF MS (PAŽIN, 2021.)



Slika 12. Izgled kolonija *Y. enterocolitica* 4/O:3 na CIN agaru (Veterinarski fakultet, Zagreb)

4.3. Priprema otopina organskih kiselina

Otopine za dekontaminaciju pripremljene su razrjeđivanjem tekuće koncentrirane (90 %-99,5 %) mliječne i octene kiseline (Merck, Darmstadt, Njemačka) pomoću destilirane vode. Do korištenja su uskladištene na sobnoj temperaturi, a pripremljene su neposredno prije provedbe testiranja te im je potom izmjeren pH (pH metar, Testo, Lenzkirch, Njemačka). Kako bi se pripremle 2 %- i 4 %-tne otopine, potreban volumen kiselina i vode izračunat je prema formuli:

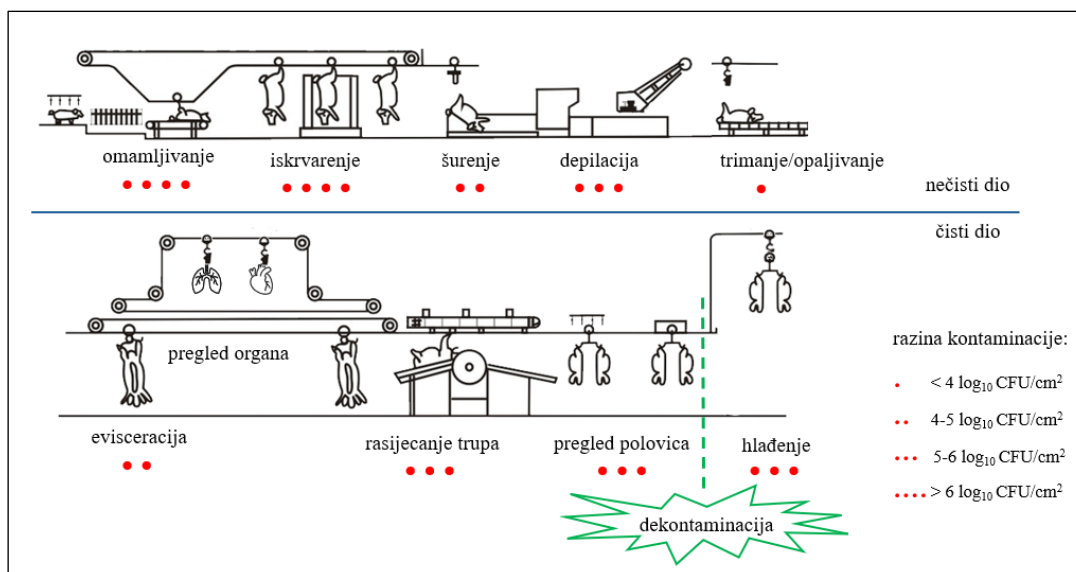
$$\text{početni volumen} \times \text{početna koncentracija} = \text{konačni volumen} \times \text{konačna koncentracija}$$

odnosno

$$\text{početni volumen} = \frac{\text{konačni volumen} \times \text{konačna koncentracija}}{\text{početna koncentracija}}$$

4.4. Postupak dekontaminacije mesa otopinama organskih kiselina i vodom

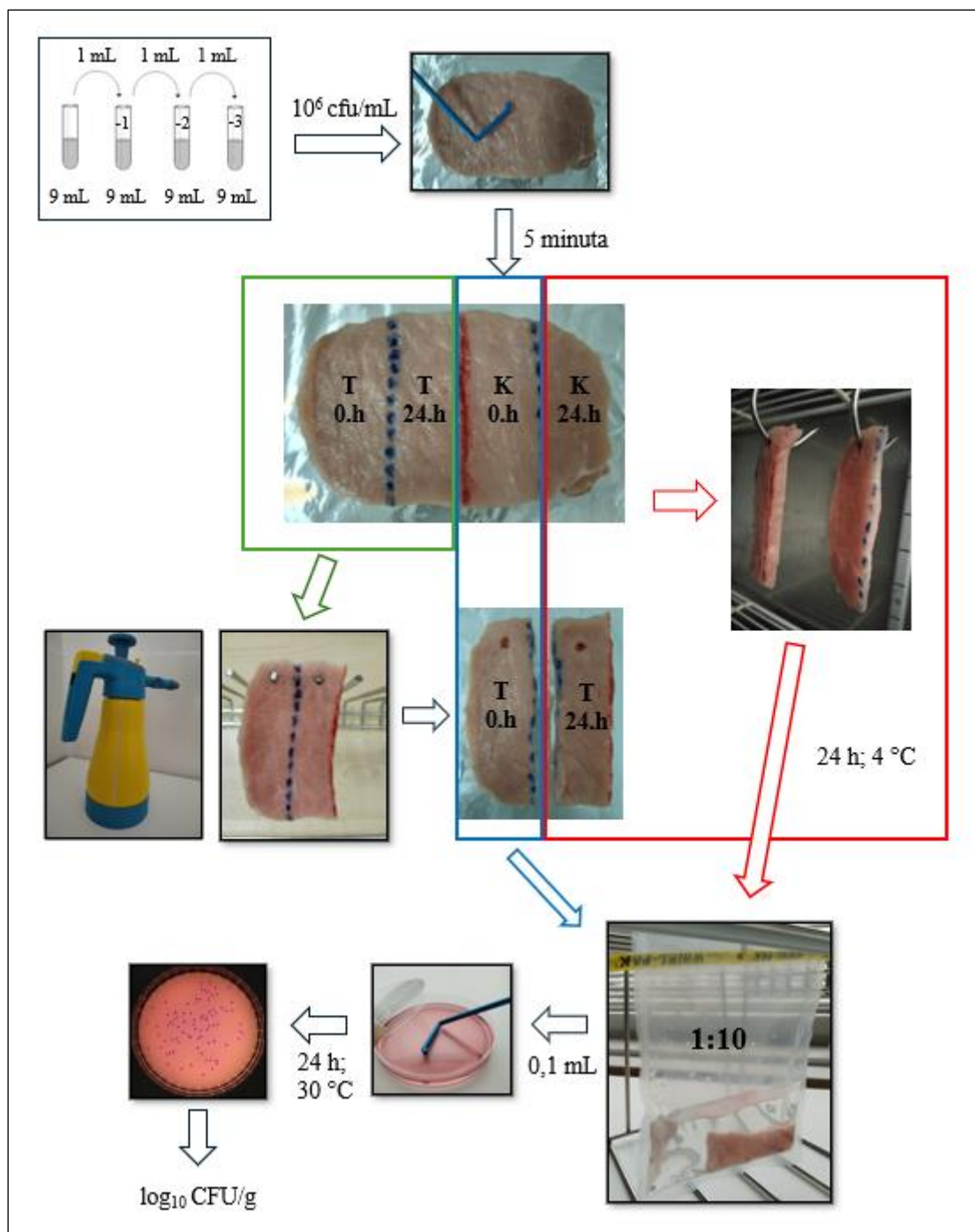
Dekontaminacija se provodila na svježem svinjskom mesu iz maloprodaje (*M. longissimus dorsi*), a za svaki pojedinačni protokol korišten je komad mesa prosječne mase od 100 grama, jednake veličine i debljine, na kojem je prije inokulacije bakterija izmjerena pH vrijednost. Meso je prije inokulacije temperirano na sobnu temperaturu. PSB bujoni s namnoženim sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 su nakon 24-satne inkubacije pri 30 °C serijski razrijeđeni u omjeru 1:9 te je 1 mL odgovarajućeg razrjeđenja ravnomjerno inokuliran sterilnim štapićem po površini mesa čime je postignuta prosječna kontaminacija mesa od 4 log₁₀ CFU/g (kontrola). S ciljem simuliranja klaoničkih uvjeta kontaminacije na liniji klanja, protokoli dekontaminacije su započeti 5 minuta nakon inokulacije bakterija na meso (adhezija stanica). Na slici 13 prikazan je primjer pozicioniranja faze dekontaminacije prije hlađenja trupova.



Slika 13. Primjena dekontaminacije na liniji klaoničke obrade svinja sukladno razini mikrobiološke kontaminacije tijekom pojedinih faza (Prema <http://slaughterline.com/1-pig-slaughter-line.html>)

Pripremljene otopine organskih kiselina koncentracije 2 % i 4 % i vode su se pri različitoj temperaturi (25 °C i 80 °C) i duljini izloženosti (10 i 30 sekundi) primjenjivali na prethodno kontaminirano meso metodom prskanja pomoću automatizirane prskalice pod tlakom od 3 bara na udaljenosti od 10 cm. Pet minuta nakon inokulacije bakterija na meso, a prije početka dekontaminacije, meso je prerezano u dva jednaka dijela pri čemu se jedna polovina koristila kao pozitivna kontrola, a ostatak namijenjen dekontaminaciji je ovješeno na odgovarajući stalak te je odmah započeto prskanje otopinama kiselina. Obje polovine mesa (tretirana i netretirana) podijeljene su također u dva dijela od čega je jedna mikrobiološki pretražena 0. sat, dok je druga podvrgnuta hlađenju na 4 °C te pretražena nakon 24 sata. Pomoću gravimetrijskog dilutora (DiluFlow, Interscience, Cantal, Francuska) uzorci su odvagani u sterilnu vrećicu u koju je potom dodana fiziološka otopina u omjeru 1:10. Nakon homogenizacije u trajanju od 1 minute (BagMixer, Interscience, Cantal, Francuska), 0,1 mL površinski je inokuliran na CIN selektivni agar propisan normom HRN EN ISO 10273:2017.

Nakon inkubacije tijekom 24 sata pri 30 °C, broj poraslih kolonija određivao se pomoću automatiziranog uređaja za brojanje kolonija (Scan 1200, Interscience, Cantal, Francuska) te rezultat izražavao kao $\log_{10}$ CFU/g (Slika 14). Isti postupak proveden je i na hlađenim uzorcima nakon 24 sata. Logaritamske vrijednosti broja *Y. enterocolitica* nakon pojedinog dekontaminacijskog protokola oduzete su od vrijednosti pozitivnih kontrola te su prikazane kao redukcija broja *Y. enterocolitica* po gramu mesa (R; $\log_{10}$). Pored navedenoga, kako bi se isključila moguća prisutnost *Y. enterocolitica* u mesu nastala kao posljedica kontaminacije tijekom proizvodnje, na svakom pojedinačnom pakiranju mesa provedena je mikrobiološka pretraga skupnog uzorka prethodno opisanom metodom. Kako bi se utvrdile promjene pH vrijednosti površine mesa nakon dekontaminacije, po završenoj homogenizaciji svakog pojedinog uzoraka, izmjerena je pH vrijednost otapala kontrolnih i testnih uzorka 0. i 24. sat. Sva mjerenja provedena su u triplikatima, a rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.



Slika 14. Postupak dekontaminacije mesa otopinama organskih kiselina i vodom

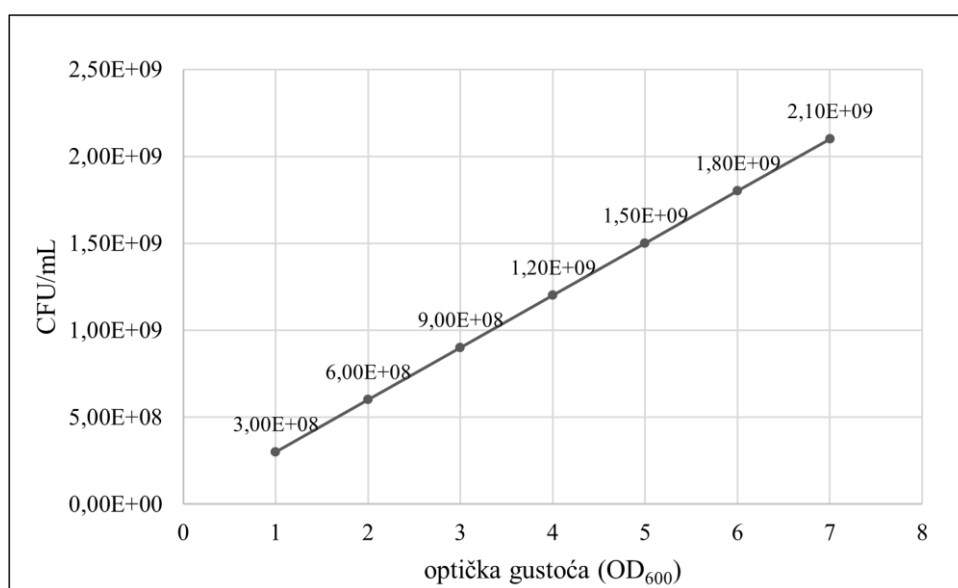
4.5. Testiranje osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na otopine organskih kiselina

Kako bi se utvrdilo uzrokuje li izlaganje *Y. enterocolitica* 4/O:3 otopinama organskih kiselina stjecanje acidorezistencije te posljedičnu neučinkovitost dekontaminacijskih postupaka, provedeno je ponavljajuće izlaganje sojeva 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline. S ciljem utvrđivanja inicijalnih razlika u otpornosti među sojevima i odabira najotpornijih za daljnje analize, svih 10 sojeva podvrgnuto je testiranju preživljavanja u kiselom mediju tijekom istog vremenskog perioda. Za pripremu kiselih otopina korišten je TSB tekući hranjivi medij (*Tryptic Soy Broth*, TSB, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) kojemu je dodan određeni volumen svake kiseline prema već spomenutoj formuli kako bi se dobile 2 %-tne otopine mliječne i octene kiseline u TSB-u. Sojevi *Y. enterocolitica* 4/O:3 su nakon 24-satne inkubacije u TSB bujonu homogenizirani vorteksom te je 0,5 mL pojedinog dodano u svaku zasebno pripremljenu otopinu kiseline u omjeru 1:1 te izlagani 60 sekundi. Istovremeno, isti je postupak proveden u TSB bujonu neutralne pH vrijednosti (kontrola). Potom su napravljena serijska decimalna razrjeđenja te je 0,1 mL površinski inokuliran na CIN agar. Po završetku 24-satne inkubacije pri 30 °C, broj poraslih kolonija određivao se pomoću automatiziranog uređaja za brojanje kolonija te rezultat izražavao kao log₁₀ CFU/mL otopine. Postotak preživljavanja stanica (%) u kiselim otopinama za svaki pojedini soj izračunat je prema formuli:

$$\text{postotak oštećenih stanica (\%)} = \frac{\text{broj netretiranih} - \text{broj tretiranih}}{\text{broj netretiranih}} \times 100$$

Sojevi koji su pokazali najveći postotak preživljavanja (<50 % oštećenih stanica) podvrgnuti su daljnjim izlaganjima u istim otopinama organskih kiselina (2 %-tna mliječna i octena kiselina) s ciljem utvrđivanja mogućnosti povećanja otpornosti na otopine kiselina, kao i posljedične smanjene osjetljivosti na antibiotike. Nakon početnog miješanja 0,5 mL TSB bujona s prednamnoženim sojem i 2 %-tne otopine organske kiseline u omjeru 1:1 tijekom 60 sekundi, cjelokupni sadržaj pomiješan je s TSB bujonom u omjeru 1:5 za uzorke tretirane mliječnom kiselinom, odnosno 1:8 za uzorke tretirane octenom kiselinom. Navedeni omjeri za pojedinu kiselinu odabrani su nakon provedenih analiza mjerenja pH vrijednosti kako bi se dobili približni uvjeti kiselosti kao pri dekontaminaciji i hlađenju mesa (pH 4,2 – 5,2).

Neposredno prije inkubacije, iz svake je otopine inokulum površinski naciepljen na CIN selektivni agar kako bi se utvrdilo preživljavanje soja. Također, nakon 24-satne inkubacije pri 30 °C, izmjerena je pH vrijednost i optička gustoća bakterijske suspenzije (Densimat, BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) s ciljem utvrđivanja dinamike rasta sojeva (Slika 15) te je ponovljen prethodni opisani postupak izlaganja organskim kiselinama. Ukupno je provedeno 15 uzastopnih stresiranja kiselinama. Na kiselinu adaptirani sojevi *Y. enterocolitica* su potom inokulirani na meso te je ponovljena dekontaminacija 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline, s ciljem usporedbe redukcije broja stresiranih i nestresiranih sojeva.

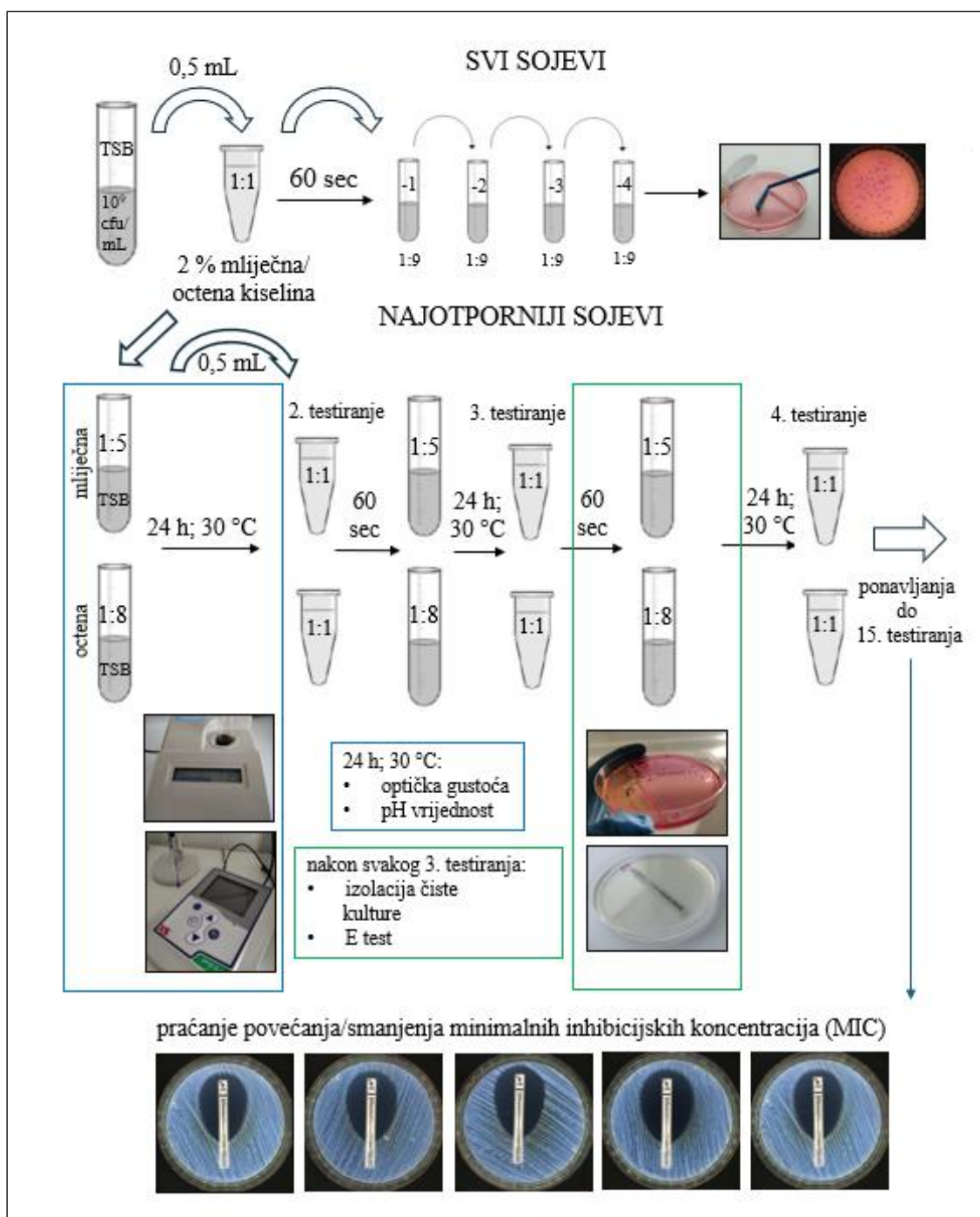


Slika 15. Standardna krivulja ovisnosti optičke gustoće (600 nm) o broju bakterijskih stanica (CFU/mL)

4.6. Testiranje osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na antibiotike

Kao što je prethodno navedeno, najotporniji sojevi *Y. enterocolitica* 4/O:3 odabrani za višestruka izlaganja otopinama octene i mliječne kiseline podvrgnuti su ispitivanju osjetljivosti na antibiotike primjenom E testa (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Francuska). Testiranja su provedena nakon 3., 6., 9., 12. i 15. izlaganja otopinama kiselina, a prilikom svakoga je korišteno ukupno 5 antibiotika: ceftazidim (256 TZ), cefotaksim (32 CTL), tetraciklin (256 TC), gentamicin (256 GM) i ciprofloksacin (32 CI).

Kako bi se pripremila optimalna gustoća bakterijske suspenzije od 0,5 McFarlanda, sterilnim brisom uzeto je nekoliko bakterijskih kolonija nakon svakog izlaganja te su otopljene u 2 mL fiziološke otopine. Novim sterilnim brisom otopina je nanescena troslojno u tri smjera na površinu Mueller-Hinton agara (Biolife, Milano, Italija). Nakon kratkotrajnog sušenja, na svaku zasebnu hranjivu podlogu je postavljena trakica pojedinog antibiotika te je provedena inkubacija pri 30 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije očitane su minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika (MIC) te su vrijednosti unutar istog antibiotika međusobno uspoređene ovisno o broju prethodno provedenih izlaganja kiselinama. Početne minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika izmjerene su na istim sojevima i prije izlaganja kiselinama. Postupak ispitivanja osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na otopine organskih kiselina i antibiotike prikazan je na Slici 16.



Slika 16. Testiranje osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na otopine organskih kiselina i antibiotike

4.7. Organoleptička pretraga mesa tretiranog otopinama organskih kiselina

Organoleptička pretraga uzoraka mesa na kojima su provedeni dekontaminacijski protokoli (N=20) provedena je 24 sata nakon završetka protokola, a tijekom kojih je meso bilo podvrgnuto hlađenju na 4 °C. U evaluaciji je sudjelovao tim od pet ocjenjivača. Organoleptička ocjena uzoraka mesa iz svih 20 dekontaminacijskih protokola u usporedbi s netretiranim uzorkom (kontrola) uključivala je parametar boje, mirisa, teksture, okusa (kuhani uzorci) te cjelokupnog dojma, odnosno kombinacije svih parametara (Tablica 3). Prije kuhanja, uzorci su izrezani na komade veličine 5x5x1 cm te podvrgnuti temperaturi kuhanja od 100 °C tijekom 30 minuta. Prije ocjenjivanja, unutarnja temperatura uzoraka bila je 35 °C. Za svako promatrano svojstvo dodjeljivale su se ocjene u rasponu od 1 do 5, a opis kriterija za pojedinu ocjenu prikazan je u tablici 4. Skupni rezultati svih ocjenjivača za svaki pojedinačni protokol prikazani su u formi tzv. "paukove mreže" pri čemu svaki od pet krakova dijagrama predstavlja jedno promatrano svojstvo, a linije između krakova intenzitet promjena odnosno ocjenu.

Tablica 3. Opis obilježja za svježe svinjsko meso

Promatrani parametar	Opis
Boja	Svijetloružičasta do ružičasta
Miris	Specifičan po svježem svinjskom mesu, neutralan, bez stranih primjesa
Tekstura (izgled površine)	Glatka, sjajna, kompaktna
Okus (kuhani uzorak)	Svojstven kuhanom mesu, blag, bez stranog okusa
Ukupni dojam	Kombinacija svih promatranih svojstava

Tablica 4. Ocjene s opisom zahtjeva

Ocjena	Opis zahtjeva
5	Nema odstupanja u promatranim svojstvima u odnosu na kontrolni uzorak
4	Jedva primjetni nedostaci, gotovo istovjetan kontrolnom uzorku
3	Uzorak ima uočljive manjkavosti, osrednje prihvatljivosti
2	Izraženi nedostaci, uvjetno prihvatljiv
1	Vrlo izražena odstupanja, neprihvatljiv uzorak

4.8. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike (Statistica 13.5, TIBCO Software) i prikazani kao srednje vrijednosti triju mjerenja uz standardnu devijaciju ($\bar{x} \pm SD$). Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između kvantitativnih podataka korišten je Studentov t-test za pokazatelje koji su slijedili normalnu raspodjelu, odnosno Mann-Whitney-ev U-test kod pokazatelja koji nisu slijedili normalnu raspodjelu. Na isti način je pri usporedbi više nezavisnih uzoraka korištena jednosmjerna analiza varijance (One-Way ANOVA) odnosno Kruskal-Wallis-ova analiza varijance, a razlike između pojedinih skupina utvrđene su post-hoc analizom. Statistička značajnost promatrana je na razini 0,05. Povezanost između pada pH vrijednosti mesa nakon dekontaminacije sa njegovim porastom nakon 24 sata provjerena je testom korelacije (r). Za kvalitativnu obradu podataka korišteni su alati multivarijantne analize pa je tako za ispitivanje utjecaja nezavisnih varijabli (faktora) na zavisnu varijablu (redukciju broja *Y. enterocolitica* 4/O:3) korištena Faktorska analiza varijance (engl. *Factorial ANOVA*) kojom se dokazuje utjecaj pojedinačne nezavisne varijable na zavisnu, ali i njihovo međudjelovanje (interakcije). Za analizu linearne povezanosti primjenjenih dekontaminacijskih protokola sa procjenjenim organoleptičkim svojstvima mesa nakon takvih protokola primjenjena je analiza glavnih komponenata (engl. PCA – *principal component analysis*) u računalnom programu XLSTAT (2018.5, Addinsoft). Rezultati su prikazani grafički kao projekcija uzoraka u prostor određen glavnim komponentama F-1 i F-2. S ciljem dodatne vizualizacije podataka, korišten je prikaz toplinske mape (eng. *heatmap*) kojim se promatra odnos pokazatelja bojama u dvije dimenzije, a varijacije u intenzitetu boja ukazuju na grupaciju promatranog svojstva u prostoru.

5. REZULTATI

5.1. Optimizacija eksperimentalnih uvjeta

Prosječan broj bakterijskih stanica u PSB tekućem hranilištu nakon 24-satne inkubacije pri 30 °C iznosio je 9 log₁₀ CFU/mL, bez većih odstupanja između promatranih sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3. Daljnim serijskim razrjeđenjima u omjeru 1:9 postignuta je optimalna koncentracija bakterija za inokulaciju na meso (1:1000; 6 log₁₀ CFU/mL) što je rezultiralo prosječnom kontaminacijom mesa od 4 log₁₀ CFU/g (kontrola). Prosječne izmjerene pH vrijednosti pripremljenih otopina mliječne i octene kiseline pri 25 °C prikazane su u tablici 5. Zagrijavanjem otopina na 80 °C vrijednosti pH su se smanjivale do 0,2 jedinice pH.

Tablica 5. pH vrijednosti 2 %- i 4 %-tnih otopina mliječne i octene kiseline pri 25 °C (x±SD)

Vrsta i koncentracija organske kiseline	pH vrijednost
2 % mliječna kiselina	2,15±0,01
4 % mliječna kiselina	1,97±0,01
2 % octena kiselina	2,78±0,01
4 % octena kiselina	2,63±0,01

5.2. Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3

U tablicama 6a-9b prikazani su pojedinačni rezultati dekontaminacijskog učinka otopina organskih kiselina na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 u oba mjerenja (0. i 24. sat), a oznake sojeva (N=10) bile su: 22, 29, 34, 36, 40, 41, 45, 52, 54 i 77. Kod svakog od testiranih sojeva u pojedinom dekontaminacijskom protokolu prikazan je broj *Y. enterocolitica* (log₁₀ CFU/g) kontrolnog uzorka (K), testnog uzorka (T) te razlika u brojnosti populacije (T-K) označena kao redukcija (R). Na isti način, u tablici 10 prikazani su rezultati dekontaminacijskog učinka vode na (ne)kontaminiranom svinjskom mesu.

5.2.1. Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline

Tablica 6a. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*			
		1	2	3	4
22	0. h	K	3,97 $\pm$ 0,02	4,03 $\pm$ 0,03	4,01 $\pm$ 0,01
		T	3,52 $\pm$ 0,06	3,62 $\pm$ 0,13	3,55 $\pm$ 0,10
		R	0,45	0,41	0,46
	24. h	K	3,96 $\pm$ 0,06	3,93 $\pm$ 0,07	3,95 $\pm$ 0,00
		T	2,74 $\pm$ 0,12	3,36 $\pm$ 0,04	3,78 $\pm$ 0,06
		R	1,22	0,57	0,17
29	0. h	K	3,82 $\pm$ 0,04	3,97 $\pm$ 0,06	3,60 $\pm$ 0,00
		T	3,60 $\pm$ 0,02	3,46 $\pm$ 0,07	3,57 $\pm$ 0,01
		R	0,22	0,51	0,03
	24. h	K	4,02 $\pm$ 0,69	3,4 $\pm$ 0,00	4,11 $\pm$ 0,04
		T	3,22 $\pm$ 0,09	3,04 $\pm$ 0,07	3,52 $\pm$ 0,02
		R	0,31	0,36	0,59
34	0. h	K	3,99 $\pm$ 0,04	3,49 $\pm$ 0,04	3,89 $\pm$ 0,01
		T	3,60 $\pm$ 0,12	3,38 $\pm$ 0,05	3,51 $\pm$ 0,00
		R	0,39	0,11	0,38
	24. h	K	4,03 $\pm$ 0,04	3,79 $\pm$ 0,00	4,20 $\pm$ 0,04
		T	3,38 $\pm$ 0,21	3,30 $\pm$ 0,05	3,09 $\pm$ 0,09
		R	0,65	0,49	1,11
36	0. h	K	4,07 $\pm$ 0,07	3,84 $\pm$ 0,09	4,06 $\pm$ 0,02
		T	3,36 $\pm$ 0,08	3,75 $\pm$ 0,05	3,68 $\pm$ 0,07
		R	0,71	0,09	0,38
	24. h	K	3,95 $\pm$ 0,04	4,29 $\pm$ 0,02	4,44 $\pm$ 0,05
		T	3,24 $\pm$ 0,14	3,33 $\pm$ 0,04	3,73 $\pm$ 0,06
		R	0,71	0,96	0,71
40	0. h	K	3,95 $\pm$ 0,05	4,03 $\pm$ 0,02	4,08 $\pm$ 0,02
		T	3,21 $\pm$ 0,06	3,65 $\pm$ 0,08	3,39 $\pm$ 0,04
		R	0,74	0,38	0,69
	24. h	K	3,94 $\pm$ 0,02	3,98 $\pm$ 0,02	4,25 $\pm$ 0,04
		T	2,78 $\pm$ 0,16	2,93 $\pm$ 0,12	3,02 $\pm$ 0,10
		R	1,16	1,05	1,23

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi

Tablica 6b. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		5	6	7	8	
22	0. h	K	4,12±0,02	4,21±0,05	4,25±0,00	4,25±0,01
		T	3,84±0,07	3,57±0,11	3,61±0,01	3,37±0,09
		R	0,28	0,64	0,64	0,88
	24. h	K	4,45±0,06	3,84±0,04	4,14±0,09	4,26±0,01
		T	3,58±0,16	3,18±0,06	3,28±0,14	3,31±0,01
		R	0,37	0,66	0,86	0,95
29	0. h	K	4,13±0,10	3,71±0,01	3,98±0,05	3,92±0,08
		T	3,32±0,05	3,25±0,13	3,01±0,14	3,41±0,01
		R	0,81	0,46	0,97	0,51
	24. h	K	3,97±0,03	3,75±0,01	4,42±0,07	4,02±0,04
		T	3,59±0,04	3,18±0,02	2,91±0,24	3,11±0,16
		R	0,38	0,57	1,51	0,91
34	0. h	K	3,86±0,05	4,44±0,01	4,26±0,02	4,37±0,01
		T	3,49±0,03	3,61±0,04	3,21±0,11	3,26±0,13
		R	0,37	0,83	1,05	1,11
	24. h	K	4,24±0,06	4,36±0,01	3,92±0,07	4,24±0,01
		T	3,66±0,07	3,73±0,02	3,28±0,02	3,27±0,10
		R	0,58	0,63	0,64	0,97
36	0.h	K	4,23±0,00	4,31±0,03	3,94±0,02	4,39±0,02
		T	3,79±0,02	3,95±0,02	3,05±0,08	3,73±0,07
		R	0,44	0,36	0,89	0,66
	24. h	K	3,98±0,03	4,40±0,05	3,49±0,14	4,16±0,07
		T	3,85±0,09	2,89±0,36	2,77±0,14	3,27±0,01
		R	0,13	0,51	0,72	0,89
40	0. h	K	4,3±0,05	4,21±0,00	4,22±0,04	4,24±0,02
		T	3,93±0,02	3,90±0,01	3,01±0,20	3,22±0,03
		R	0,37	0,31	1,21	1,02
	24. h	K	4,39±0,06	4,03±0,04	4,06±0,04	4,29±0,01
		T	3,58±0,12	3,60±0,08	3,54±0,02	3,38±0,13
		R	0,81	0,43	0,52	0,91

*5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 7a. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		1	2	3	4	
41	0. h	K	3,82±0,05	3,46±0,00	4,27±0,04	3,95±0,06
		T	3,39±0,18	3,10±0,07	3,58±0,11	3,76±0,07
		R	0,43	0,36	0,69	0,19
	24. h	K	3,85±0,03	3,76±0,00	4,55±0,01	4,44±0,01
		T	3,35±0,04	2,65±0,15	3,55±0,01	3,64±0,08
		R	0,50	1,11	1,00	0,80
45	0. h	K	3,71±0,00	3,98±0,09	3,75±0,02	3,89±0,03
		T	3,64±0,11	3,25±0,16	3,37±0,11	3,67±0,08
		R	0,07	0,73	0,38	0,22
	24. h	K	3,78±0,07	4,03±0,00	4,20±0,01	4,31±0,02
		T	3,16±0,08	3,14±0,06	3,40±0,07	3,38±0,10
		R	0,62	0,89	0,80	0,93
52	0. h	K	3,77±0,09	4,28±0,02	4,28±0,04	4,18±0,02
		T	3,69±0,10	3,60±0,05	3,72±0,06	3,48±0,07
		R	0,08	0,68	0,56	0,70
	24. h	K	4,10±0,02	4,52±0,08	4,37±0,05	4,24±0,06
		T	3,47±0,06	3,51±0,05	3,51±0,09	3,46±0,08
		R	0,63	1,01	0,86	0,78
54	0. h	K	3,81±0,03	3,91±0,09	4,08±0,02	4,05±0,00
		T	3,63±0,13	3,83±0,11	3,33±0,20	3,50±0,02
		R	0,18	0,08	0,75	0,55
	24. h	K	4,03±0,03	3,99±0,02	4,21±0,06	4,00±0,07
		T	3,43±0,05	3,49±0,13	3,05±0,05	2,92±0,22
		R	0,60	0,50	1,16	1,08
77	0. h	K	3,74±0,03	3,97±0,07	4,11±0,09	4,07±0,02
		T	3,67±0,03	3,54±0,05	3,39±0,07	3,64±0,08
		R	0,07	0,43	0,72	0,43
	24. h	K	3,77±0,03	3,67±0,07	4,11±0,06	3,99±0,02
		T	3,52±0,02	3,24±0,12	3,41±0,18	3,21±0,04
		R	0,25	0,43	0,70	0,78

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi

Tablica 7b. Dekontaminacijski učinak otopina octene kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		5	6	7	8	
41	0. h	K	4,10±0,03	4,42±0,04	4,53±0,00	4,19±0,02
		T	3,58±0,05	3,73±0,08	4,13±0,06	3,43±0,12
		R	0,52	0,69	0,40	0,76
	24. h	K	4,11±0,10	4,42±0,02	4,35±0,04	4,29±0,09
		T	3,75±0,02	3,35±0,04	3,50±0,05	3,44±0,07
		R	0,36	1,07	0,80	0,85
45	0. h	K	4,24±0,04	4,17±0,00	4,47±0,02	4,33±0,04
		T	3,76±0,07	3,89±0,09	3,79±0,06	3,51±0,00
		R	0,48	0,28	0,68	0,82
	24. h	K	4,24±0,05	4,02±0,02	4,54±0,03	4,07±0,04
		T	3,57±0,08	3,66±0,08	3,27±0,07	2,90±0,17
		R	0,67	0,36	1,27	1,17
52	0. h	K	4,23±0,06	4,45±0,00	4,70±0,03	4,23±0,01
		T	3,36±0,04	3,84±0,03	3,16±0,22	3,65±0,05
		R	0,87	0,61	1,54	0,58
	24. h	K	4,08±0,02	4,33±0,01	4,09±0,05	4,31±0,00
		T	3,71±0,06	3,65±0,05	3,16±0,06	2,97±0,16
		R	0,37	0,68	0,93	1,34
54	0. h	K	4,10±0,01	4,18±0,07	4,24±0,04	4,38±0,00
		T	3,45±0,15	3,68±0,14	3,82±0,04	2,64±0,29
		R	0,65	0,50	0,42	1,74
	24. h	K	4,09±0,04	3,87±0,04	4,25±0,09	4,03±0,02
		T	3,08±0,07	3,41±0,12	2,16±0,27	1,33±1,15
		R	1,01	0,46	2,09	2,70
77	0. h	K	4,00±0,12	4,11±0,02	4,39±0,03	4,08±0,01
		T	3,53±0,10	3,66±0,06	3,11±0,08	3,21±0,06
		R	0,47	0,45	1,28	0,87
	24. h	K	3,95±0,04	3,81±0,04	4,31±0,04	4,05±0,01
		T	3,13±0,11	3,17±0,13	3,02±0,11	2,82±0,18
		R	0,82	0,64	1,29	1,23

*5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi

5.2.2. Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline

Tablica 8a. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		9	10	11	12	
22	0. h	K	4,38±0,01	4,21±0,07	4,40±0,02	4,13±0,04
		T	3,56±0,03	3,61±0,04	3,34±0,14	3,49±0,05
		R	0,82	0,60	1,06	0,64
	24. h	K	4,25±0,49	4,30±0,04	4,44±0,02	4,05±0,03
		T	3,40±0,04	3,84±0,06	3,31±0,18	3,48±0,04
		R	0,85	0,46	1,13	0,57
29	0. h	K	4,02±0,05	4,17±0,14	4,33±0,02	4,31±0,02
		T	3,02±0,06	3,50±0,07	3,06±0,09	3,13±0,25
		R	1,00	0,67	1,27	1,18
	24. h	K	4,00±0,02	3,89±0,00	3,98±0,02	3,65±0,10
		T	3,03±0,02	3,51±0,02	3,19±0,07	3,36±0,11
		R	0,97	0,38	0,79	0,29
34	0. h	K	4,46±0,09	4,31±0,01	4,25±0,02	4,62±0,04
		T	3,45±0,02	3,66±0,15	3,49±0,09	3,66±0,05
		R	1,01	0,65	0,76	0,96
	24. h	K	4,62±0,00	4,19±0,01	4,59±0,06	4,33±0,12
		T	3,73±0,02	3,33±0,09	3,51±0,04	3,39±0,01
		R	0,89	0,86	1,08	0,94
36	0. h	K	4,46±0,12	4,53±0,01	4,60±0,01	4,40±0,00
		T	4,10±0,06	3,82±0,05	3,77±0,06	3,81±0,12
		R	0,36	0,71	0,83	0,59
	24. h	K	4,41±0,02	4,28±0,05	4,02±0,03	4,38±0,02
		T	3,89±0,13	3,64±0,01	3,49±0,22	3,49±0,03
		R	0,52	0,64	0,53	0,89
40	0. h	K	4,06±0,06	4,35±0,02	4,22±0,00	4,26±0,00
		T	3,65±0,06	3,56±0,03	3,70±0,17	3,36±0,13
		R	0,41	0,79	0,52	0,90
	24. h	K	4,38±0,03	4,30±0,04	4,31±0,05	4,37±0,04
		T	3,47±0,05	3,51±0,04	3,30±0,10	3,36±0,08
		R	0,91	0,79	1,01	1,01

*9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi

Tablica 8b. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-40 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		13	14	15	16	
22	0. h	K	4,13±0,07	4,38±0,06	4,21±0,04	4,08±0,01
		T	3,55±0,11	3,59±0,09	3,35±0,11	2,83±0,12
		R	0,58	0,79	0,86	1,25
	24. h	K	4,39±0,06	4,01±0,00	4,21±0,02	4,17±0,01
		T	3,29±0,04	3,24±0,08	2,98±0,10	2,59±0,25
		R	1,10	0,77	1,23	1,58
29	0. h	K	4,05±0,04	3,91±0,02	4,11±0,00	3,95±0,05
		T	2,86±0,08	3,40±0,06	2,93±0,12	2,62±0,27
		R	1,19	0,51	1,18	1,33
	24. h	K	3,98±0,04	3,67±0,03	3,72±0,10	3,70±0,05
		T	2,86±0,30	3,21±0,10	2,90±0,17	2,83±0,04
		R	1,12	0,46	0,82	0,87
34	0. h	K	4,33±0,04	4,34±0,02	4,33±0,02	4,31±0,00
		T	3,48±0,08	3,49±0,09	3,27±0,01	2,88±0,08
		R	0,85	0,85	1,06	1,43
	24. h	K	4,20±0,02	3,82±0,04	4,03±0,10	4,28±0,02
		T	3,34±0,09	2,85±0,20	3,37±0,16	2,52±0,24
		R	0,86	0,97	0,66	1,76
36	0. h	K	4,46±0,04	4,21±0,02	4,43±0,06	4,32±0,02
		T	3,86±0,05	3,39±0,03	3,14±0,08	2,50±0,17
		R	0,60	0,82	1,29	1,82
	24. h	K	4,67±0,03	4,45±0,04	4,24±0,04	3,68±0,11
		T	3,47±0,06	3,25±0,06	3,20±0,07	3,14±0,18
		R	1,20	1,20	1,04	0,54
40	0. h	K	4,33±0,04	3,93±0,04	4,29±0,06	3,76±0,03
		T	3,43±0,04	3,06±0,10	2,84±0,06	3,39±0,05
		R	0,90	0,87	1,45	0,37
	24. h	K	4,53±0,02	4,04±0,05	4,15±0,03	3,50±0,02
		T	3,54±0,09	2,87±0,02	2,91±0,13	2,72±0,21
		R	0,99	1,17	1,24	0,78

13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 9a. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 (log₁₀ CFU/g; x±SD)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		9	10	11	12	
41	0. h	K	4,25±0,04	4,22±0,00	4,47±0,06	4,32±0,03
		T	3,80±0,04	3,69±0,07	3,72±0,11	3,41±0,06
		R	0,45	0,53	0,75	0,91
	24. h	K	4,20±0,00	4,28±0,01	4,55±0,02	4,33±0,04
		T	3,91±0,04	3,68±0,05	3,72±0,04	3,70±0,00
		R	0,29	0,60	0,83	0,63
45	0. h	K	4,33±0,02	4,40±0,04	4,21±0,07	4,11±0,10
		T	3,77±0,04	3,71±0,05	3,85±0,05	3,76±0,05
		R	0,56	0,69	0,36	0,35
	24. h	K	4,19±0,00	4,21±0,04	4,35±0,03	4,16±0,07
		T	3,40±0,07	3,31±0,15	3,45±0,12	3,47±0,06
		R	0,79	0,90	0,90	0,69
52	0. h	K	4,25±0,00	4,28±0,04	4,61±0,02	4,33±0,06
		T	3,61±0,02	3,44±0,07	3,50±0,14	3,28±0,09
		R	0,64	0,84	1,11	1,05
	24. h	K	4,38±0,03	3,58±0,05	4,23±0,01	4,28±0,01
		T	3,54±0,05	2,98±0,07	3,27±0,07	2,99±0,08
		R	0,84	0,60	0,96	1,29
54	0. h	K	4,34±0,02	4,29±0,00	4,44±0,02	4,08±0,01
		T	5,35±0,10	3,65±0,05	3,75±0,08	3,18±0,11
		R	0,99	0,64	0,69	0,90
	24. h	K	3,98±0,07	3,84±0,00	4,17±0,02	3,95±0,10
		T	3,44±0,18	3,56±0,03	3,77±0,05	2,84±0,06
		R	0,54	0,28	0,40	1,11
77	0. h	K	3,92±0,02	4,02±0,05	3,94±0,09	4,26±0,06
		T	3,23±0,06	3,27±0,04	3,33±0,05	3,08±0,12
		R	0,69	0,75	0,61	1,18
	24. h	K	4,24±0,00	3,47±0,01	3,92±0,02	4,01±0,04
		T	3,29±0,08	3,20±0,17	3,08±0,07	2,83±0,04
		R	0,95	0,27	0,84	1,18

*9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi

Tablica 9b. Dekontaminacijski učinak otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 41-77 (log₁₀ CFU/g; x±SD)

soj/vrijeme		Dekontaminacijski protokol*				
		13	14	15	16	
41	0. h	K	4,21±0,05	4,15±0,04	4,43±0,04	4,29±0,04
		T	3,97±0,07	3,69±0,02	3,30±0,16	3,52±0,06
		R	0,24	0,46	1,13	0,77
	24. h	K	3,89±0,04	4,17±0,05	4,51±0,04	3,99±0,01
		T	3,77±0,10	2,73±0,23	3,22±0,08	3,34±0,05
		R	0,12	1,44	1,29	0,65
45	0. h	K	4,18±0,01	4,33±0,04	4,35±0,00	4,15±0,04
		T	3,67±0,04	3,05±0,20	3,10±0,09	3,01±0,02
		R	0,51	1,28	1,25	1,14
	24. h	K	4,04±0,00	4,22±0,06	4,55±0,00	4,18±0,02
		T	3,46±0,04	2,65±0,15	3,01±0,06	3,38±0,06
		R	0,58	1,57	1,54	0,80
52	0. h	K	4,33±0,01	4,10±0,05	4,35±0,02	4,08±0,00
		T	3,51±0,07	3,09±0,16	2,98±0,24	2,88±0,16
		R	0,82	1,01	1,37	1,20
	24. h	K	3,83±0,12	4,04±0,09	4,29±0,05	4,14±0,04
		T	3,23±0,11	2,88±0,19	3,18±0,11	2,82±0,24
		R	0,60	1,16	1,11	1,32
54	0. h	K	3,94±0,05	3,93±0,04	4,37±0,02	4,03±0,03
		T	3,33±0,03	2,98±0,18	3,02±0,20	2,30±0,30
		R	0,61	0,95	1,35	1,73
	24. h	K	3,66±0,71	3,84±0,18	4,05±0,04	3,77±0,05
		T	3,09±0,16	2,99±0,24	2,82±0,18	2,92±0,13
		R	0,57	0,85	1,23	0,85
77	0. h	K	3,78±0,08	3,69±0,04	4,20±0,02	4,02±0,02
		T	3,05±0,05	3,25±0,25	2,82±0,10	2,71±0,37
		R	0,73	0,44	1,38	1,31
	24. h	K	3,84±0,03	3,87±0,02	4,08±0,02	4,08±0,06
		T	3,08±0,03	3,07±0,11	2,67±0,05	2,52±0,06
		R	0,76	0,80	1,41	1,56

13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi

5.2.3. Rezultati pojedinačnih vrijednosti redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s vodom

Tablica 10. Dekontaminacijski učinak vode na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 22-77 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Protokol*		sojevi										
		22	29	34	36	40	41	45	52	54	77	
17	0. h	K	4,25±0,01	4,10±0,02	4,14±0,04	4,30±0,03	4,12±0,11	4,35±0,04	4,01±0,03	4,06±0,02	4,17±0,00	3,90±0,13
		T	3,76±0,01	3,77±0,05	3,93±0,06	3,95±0,04	3,69±0,08	3,67±0,08	3,63±0,06	3,79±0,07	3,86±0,02	3,29±0,13
		R	0,49	0,33	0,21	0,35	0,43	0,68	0,38	0,27	0,31	0,61
	24. h	K	4,20±0,02	4,01±0,04	4,15±0,01	4,25±0,05	4,38±0,02	4,14±0,01	4,19±0,04	4,17±0,04	4,13±0,04	3,80±0,02
		T	3,58±0,04	3,37±0,05	3,56±0,04	3,84±0,02	3,60±0,01	3,63±0,03	3,60±0,08	3,59±0,05	3,35±0,09	3,60±0,06
		R	0,62	0,64	0,59	0,41	0,78	0,52	0,59	0,59	0,78	0,20
18	0. h	K	4,27±0,06	4,09±0,04	4,12±0,05	4,25±0,00	3,96±0,15	4,32±0,08	3,97±0,12	4,01±0,07	3,84±0,01	3,89±0,04
		T	3,77±0,13	3,37±0,10	3,78±0,02	3,61±0,04	3,16±0,14	3,77±0,07	3,60±0,06	3,40±0,11	3,17±0,15	3,42±0,04
		R	0,50	0,72	0,34	0,64	0,80	0,55	0,37	0,69	0,67	0,47
	24. h	K	4,29±0,03	3,83±0,09	4,23±0,09	4,29±0,01	4,37±0,01	4,29±0,01	3,99±0,12	4,04±0,07	4,01±0,10	4,08±0,04
		T	3,34±0,09	3,26±0,03	3,45±0,04	3,34±0,11	3,19±0,01	3,55±0,13	3,41±0,08	3,39±0,12	3,25±0,06	3,25±0,05
		R	0,95	0,57	0,78	0,95	1,18	0,74	0,58	0,65	0,76	0,83
19	0. h	K	4,14±0,02	4,07±0,04	4,31±0,03	4,25±0,00	3,56±0,09	4,20±0,03	4,20±0,03	3,98±0,00	3,97±0,07	4,00±0,14
		T	3,69±0,07	3,26±0,16	3,47±0,05	3,67±0,11	3,22±0,06	3,77±0,05	3,75±0,07	3,33±0,07	3,56±0,04	3,55±0,03
		R	0,45	0,81	0,84	0,58	0,34	0,43	0,45	0,65	0,41	0,45
	24. h	K	3,78±0,00	3,92±0,01	4,07±0,10	3,85±0,08	3,62±0,11	4,23±0,04	4,22±0,13	4,26±0,07	4,13±0,09	3,98±0,09
		T	3,20±0,11	2,85±0,29	2,84±0,09	2,78±0,16	2,30±0,00	3,68±0,19	3,32±0,14	2,93±0,07	3,29±0,11	3,51±0,04
		R	0,58	1,07	1,23	1,07	1,32	0,55	0,9	1,33	0,84	0,47
20	0. h	K	4,26±0,01	4,25±0,04	4,26±0,02	4,06±0,07	4,29±0,01	4,13±0,10	4,35±0,07	4,18±0,02	4,27±0,00	3,76±0,02
		T	3,48±0,11	3,39±0,07	3,65±0,06	3,26±0,10	3,35±0,08	3,10±0,16	3,52±0,11	3,40±0,05	3,53±0,04	2,98±0,18
		R	0,78	0,86	0,61	0,80	0,94	1,03	0,83	0,78	0,74	0,78
	24. h	K	4,12±0,04	3,79±0,15	4,23±0,09	4,29±0,01	4,37±0,01	4,21±0,04	4,21±0,00	4,18±0,00	4,44±0,04	3,96±0,00
		T	2,96±0,11	2,95±0,17	3,45±0,04	3,34±0,11	3,19±0,01	3,23±0,08	3,29±0,09	3,36±0,07	3,41±0,01	2,84±0,24
		R	1,16	0,84	0,78	0,95	1,18	0,98	0,92	0,82	1,03	1,12

*17. 25 °C; 10 sekundi; 18. 25 °C; 30 sekundi; 19. 80 °C; 10 sekundi; 20. 80 °C; 30 sekundi

U tablicama 6a-9b prikazani su rezultati dekontaminacijskih učinaka otopina kiselina prema svim pojedinačnim sojevima, u odnosu na kontrolne inokulirane uzorke mesa i to nakon inicijalne dekontaminacije (0. sat) te nakon hlađenja dekontaminiranih uzoraka mesa tijekom 24 sata pri 4 °C. Zapaženo je kako se u kontrolnim (bez dekontaminacije) uzorcima inokulirana populacija *Y. enterocolitica* 4/O:3 hlađenjem mesa smanjivala u 10 slučajeva (od 16 protokola s kiselinama; 63 %), a u 6 slučajeva se broj čak povećavao (37 %). S druge strane, dekontaminacija otopinama kiselina rezultirala je smanjivanjem inokulirane populacije u gotovo svim kombinacijama koncentracija kiselina, temperature otopine i trajanja dekontaminacije (15 od 16 protokola, 94 %). Tablicom 10 isto je prikazano za dekontaminacijske protokole vodom (protokoli 17-20). Ovdje je utvrđeno da se u kontrolnim (bez dekontaminacije) uzorcima inokulirana populacija *Y. enterocolitica* 4/O:3 hlađenjem mesa smanjivala samo u slučaju jednog protokola (25 %), dok je u ostalima ona stagnirala ili rasla (3 od 4 protokola; 75%). Suprotno tome, prskanje vodom rezultiralo je smanjenjem inokulirane populacije u svim kombinacijama korištenih temperatura i trajanja (4 protokola; 100%).

5.3. Rezultati skupnih redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon provedbe dekontaminacijskih protokola

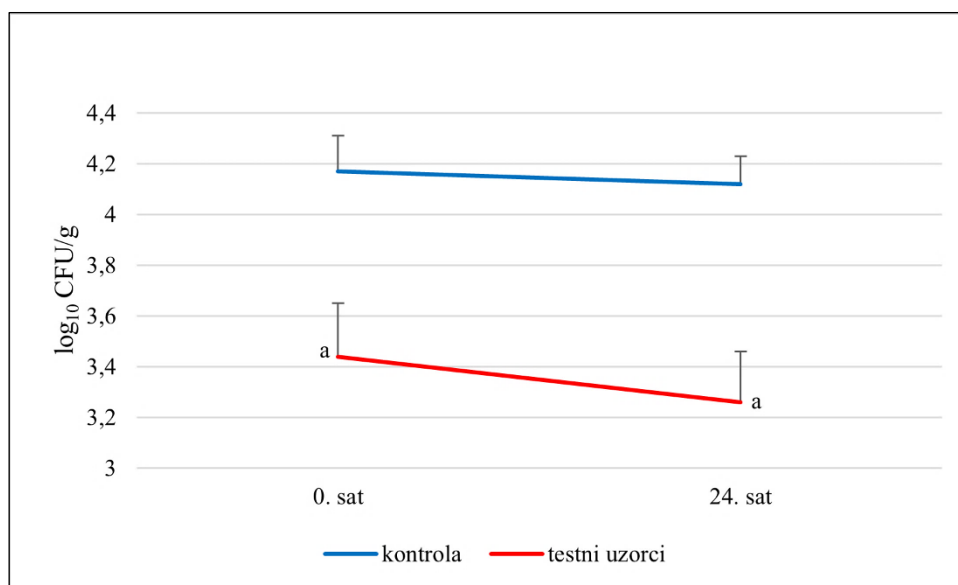
Tablica 11. Skupni dekontaminacijski učinak provedenih protokola na svinjskom mesu prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $x \pm SD$)

Protokol br.		0. h	24. h	Razlika u brojnosti
1-16	kontrola	4,17 $\pm$ 0,14	4,12 $\pm$ 0,11	0,05
	test	3,44 $\pm$ 0,21 ^a	3,26 $\pm$ 0,20 ^a	0,18
	redukcija	0,73$\pm$0,26	0,86$\pm$0,18	0,13
17-20	kontrola	4,11 $\pm$ 0,05	4,11 $\pm$ 0,07	0,00
	test	3,54 $\pm$ 0,14	3,30 $\pm$ 0,21	0,24
	redukcija	0,57$\pm$0,16	0,81$\pm$0,18	0,24

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05

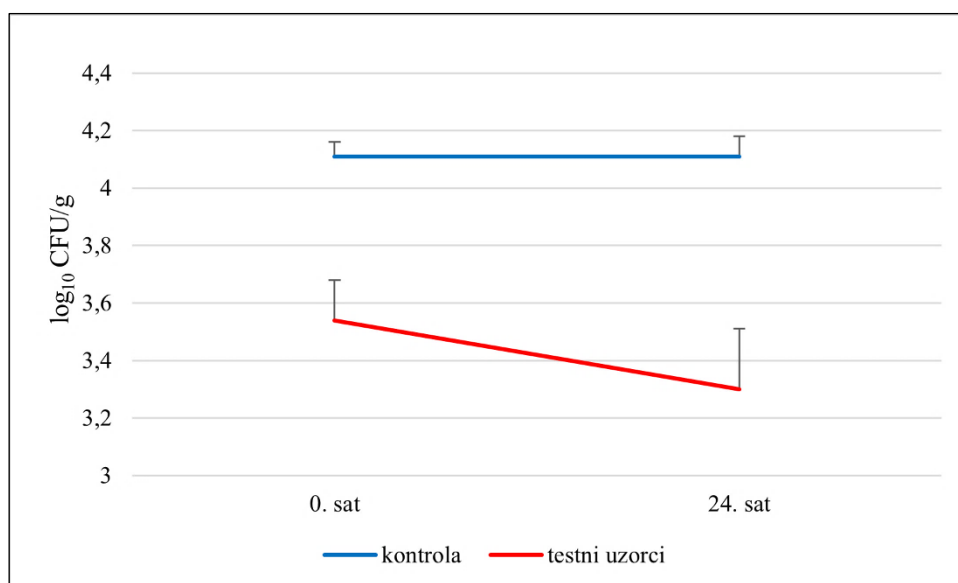
Rezultati su sumirani i prikazani skupno prema satima promatranja populacije *Y. enterocolitica* 4/O:3 na mesu (Tablica 11). Takvim prikazom rezultata vidljivo je kako se u kontrolnim uzorcima inokulirana populacija *Y. enterocolitica* ne mijenja značajno ($p > 0.05$) tijekom hlađenja, dok je primjenom otopina organskih kiselina nastupila redukcija populacije od 0,73 log nakon inicijalne dekontaminacije, da bi se hlađenjem još dodatno smanjila za 0,13

log te iznosila 0,86 log ($p < 0,05$). Iz tablice 11 također je vidljivo kako se isti trend kretanja broja inokulirane populacije pojavio i u protokolima dekontaminacije mesa vodom, no bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između tretiranih populacija 0. i 24. sat. Rezultati su i grafički prikazani Slikama 17 i 18. pri čemu su uočljive razlike broja bakterija 0. sata rezultat trenutnog djelovanja dekontaminacije.



Slika 17. Broj *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina (N=16) 0. i 24. sat (log₁₀ CFU/g; $\bar{x} \pm SD$)

*vrijednosti unutar iste grupe uzoraka označene istim malim slovom statistički se razlikuju na razini 0,05



Slika 18. Broj *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola vodom (N=4) 0. i 24. sat (log₁₀ CFU/g; $\bar{x} \pm SD$)

Tablica 12. Prikaz početne (0. sat) prosječne redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu s obzirom na primijenjeni dekontaminacijski protokol i inokulirani soj ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

0.h		Sojevi <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3										
		22	29	34	36	40	41	45	52	54	77	x±SD
Dekontaminacijski protokol	1	0,45	0,22 ^A	0,39	0,71	0,74 ^{ab}	0,43	0,07 ^{aAB}	0,08 ^{AB}	0,18 ^A	0,07 ^{bAB}	0,33±0,25
	2	0,41	0,51	0,11 ^{AB}	0,09 ^{bAB}	0,38	0,36	0,73 ^{ab}	0,68 ^c	0,08 ^{acBC}	0,43 ^C	0,38±0,23
	3	0,46	0,03 ^{abBC}	0,38	0,38	0,69	0,69	0,38	0,56	0,75 ^a	0,72 ^b	0,50±0,22
	4	0,21 ^{AB}	0,77 ^a	0,69	0,77 ^b	0,57	0,19 ^{abAB}	0,22 ^C	0,70	0,55	0,43 ^D	0,51±0,23
	5	0,28 ^{abC}	0,81 ^a	0,37	0,44	0,37	0,52	0,48	0,87 ^b	0,65	0,47	0,52±0,19
	6	0,64	0,46	0,83 ^{ab}	0,36	0,31 ^{bAB}	0,69 ^c	0,28 ^{ac}	0,61	0,50	0,45	0,50±0,18
	7	0,64	0,97	1,05	0,89	1,21 ^A	0,40 ^{ab}	0,68	1,54 ^{acAC}	0,42 ^c	1,28 ^b	0,91±0,38
	8	0,88	0,51 ^{ab}	1,11 ^{aA}	0,66	1,02	0,76	0,82	0,58 ^c	1,74 ^{bcAB}	0,87	0,90±0,35
	0,56±0,21 ^A											
	9	0,82	1,00 ^a	1,01 ^{bc}	0,36 ^{ab}	0,41 ^c	0,45	0,56	0,64	0,99	0,69	0,70±0,25
	10	0,60 ^a	0,67	0,65	0,71	0,79 ^b	0,53 ^{bc}	0,69	0,84 ^{ac}	0,64	0,75	0,69±0,09
	11	1,06 ^A	1,27 ^{abB}	0,76	0,83	0,52 ^a	0,75	0,36 ^{bc}	1,11 ^c	0,69	0,61	0,80±0,28
	12	0,64	1,18 ^a	0,96	0,59	0,90	0,91	0,35 ^{ab}	1,05	0,90	1,18 ^b	0,86±0,27
	13	0,58	1,19 ^{ab}	0,85	0,60	0,90 ^c	0,24 ^{acC}	0,51 ^b	0,82	0,61	0,73	0,70±0,26
	14	0,79	0,51	0,85	0,82	0,87	0,46 ^a	1,28 ^{abAC}	1,01 ^c	0,95	0,44 ^{bc}	0,80±0,27
	15	0,86 ^{ab}	1,18	1,06 ^c	1,29 ^A	1,45 ^{acBC}	1,13 ^{AC}	1,25 ^B	1,37 ^B	1,35	1,38 ^{bACD}	1,21±0,18
	16	1,25 ^{BC}	1,33 ^{AC}	1,43 ^{BC}	1,82 ^{abBC}	0,37 ^{ac}	0,77 ^b	1,14	1,20	1,73 ^{cC}	1,31 ^B	1,24±0,42
	0,87±0,22 ^{AB}											
	17	0,49	0,33	0,21 ^{abC}	0,35 ^C	0,43	0,68 ^{ac}	0,38	0,27 ^{cC}	0,31	0,61 ^b	0,41±0,15
	18	0,50	0,72 ^a	0,34 ^{ab}	0,64	0,80 ^{bc}	0,55	0,37 ^c	0,69	0,67	0,47	0,56±0,15
19	0,45	0,81 ^a	0,84 ^{bc}	0,58	0,34 ^{abC}	0,43	0,45	0,65	0,41 ^c	0,45	0,54±0,17	
20	0,79	0,86	0,61 ^{ab}	0,80	0,94 ^a	1,03 ^{bcB}	0,83	0,78	0,74 ^c	0,78	0,81±0,11	
0,58±0,16 ^B												
x±SD		0,64±0,25	0,77±0,36	0,73±0,34	0,68±0,37	0,70±0,31	0,60±0,24 ^a	0,60±0,33 ^b	0,80±0,34 ^{ab}	0,74±0,44	0,71±0,34	

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istoj koloni statistički se razlikuju na razini 0,05

Tablica 13. Prikaz prosječne redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu nakon hlađenja 24 sata pri 4 °C s obzirom na primijenjeni dekontaminacijski protokol i tretirani soj ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

24.h		Sojevi <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3										
		22	29	34	36	40	41	45	52	54	77	x±SD
Dekontaminacijski protokol	1	1,22 ^{ab}	0,31 ^{aA}	0,65	0,71	1,16 ^c	0,50	0,63	0,62	0,60	0,25 ^{bcA}	0,71±0,31
	2	0,57	0,36 ^{ab}	0,49 ^{AB}	0,82	1,05 ^a	1,11 ^{bc}	0,89	1,01	0,50	0,43 ^c	0,73±0,28
	3	0,17 ^{acAB}	0,59 ^b	1,11	0,71	1,23 ^{ab}	1,00	0,80	0,86	1,16 ^c	0,70	0,83±0,23
	4	0,67 ^a	0,74	0,56 ^{bcC}	0,96 ^b	0,89	0,80	0,93	0,78	1,08 ^{ac}	0,78	0,82±0,15
	5	0,37 ^C	0,38	0,58	0,13 ^{abAB}	0,81	0,36 ^c	0,67	0,37 ^{AB}	1,01 ^{ac}	0,82 ^b	0,60±0,27
	6	0,66	0,57	0,63	0,51	0,43 ^{aAB}	1,07 ^{ab}	0,36 ^{bcAB}	0,68 ^c	0,46	0,64	0,70±0,20
	7	0,86	1,18 ^{AB}	0,64 ^a	0,72	0,52 ^{bcC}	0,80	1,27	0,93	2,09 ^{abA}	1,29 ^c	1,04±0,46
	8	0,95	0,91	0,97	0,89 ^a	0,91	0,85 ^{bc}	1,17	1,34 ^{bAC}	2,70 ^{acBC}	1,23	1,19±0,56
												0,82±0,19
	9	0,85	0,97 ^{ab}	0,89	0,52 ^a	0,91	0,29 ^{bcA}	0,79	0,84	0,54	0,95 ^c	0,76±0,23
	10	0,46	0,38	0,86 ^a	0,64	0,79	0,60	0,90 ^{bc}	0,60	0,28 ^{bAB}	0,27 ^{ac}	0,57±0,23
	11	1,13 ^{ab}	0,79	1,08 ^c	0,53 ^a	1,01	0,83	0,90	0,96	0,40 ^{bcC}	0,84	0,85±0,23
	12	0,57 ^a	0,29 ^{bcBC}	0,94	0,89	1,01	0,63	0,69	1,29 ^{ab}	1,11	1,18 ^c	0,86±0,31
	13	1,10	1,12 ^{aC}	0,86	1,2 ^{bcAC}	0,99	0,12 ^{abBC}	0,58 ^C	0,60	0,57 ^c	0,76	0,79±0,33
	14	0,77 ^a	0,46 ^{bc}	0,97	1,2 ^{BD}	1,17	1,44 ^{bAB}	1,57 ^{acACD}	1,16	0,85	0,80	1,04±0,33
	15	1,23 ^A	0,82 ^a	0,66 ^{bc}	1,04	1,24 ^A	1,29 ^C	1,54 ^{abB}	1,11	1,23	1,41 ^{cB}	1,15±0,26
	16	1,58 ^{aBC}	0,87	1,76 ^{bcAC}	0,54 ^{ab}	0,78	0,65 ^c	0,80	1,32	0,85	1,56 ^{AC}	1,07±0,44
												0,88±0,19
	17	0,62	0,64	0,59	0,41 ^{CD}	0,78 ^a	0,52	0,59	0,59 ^C	0,78 ^b	0,20 ^{abBC}	0,57±0,17
	18	0,95	0,57 ^a	0,78	0,95	1,18 ^{ab}	0,74	0,58 ^{bD}	0,65	0,76	0,83	0,80±0,19
19	0,58	1,07	1,23 ^B	1,07	1,32 ^{aBC}	0,55 ^b	0,90	1,33 ^{bcB}	0,84	0,47 ^{ac}	0,94±0,32	
20	1,16 ^a	0,84	0,78 ^{ab}	0,95	1,18 ^{bc}	0,98	0,92	0,82 ^c	1,03	1,12	0,98±0,14	
											0,82±0,18	
x±SD	0,82±0,34	0,70±0,28 ^{ab}	0,85±0,30	0,77±0,28	0,97±0,23 ^{ac}	0,76±0,33 ^c	0,87±0,31	0,89±0,29	0,94±0,57 ^b	0,83±0,39		

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istoj koloni statistički se razlikuju na razini 0,05

U tablici 12 prikazani su skupni rezultati prosječne redukcije populacije inokuliranih sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu nakon primjene svih dekontaminacijskih protokola (0. sat). S obzirom na promatrani inokulirani soj, zabilježena je prosječna redukcija od $0,60 \pm 0,24 \log_{10}$ CFU/g do $0,80 \pm 0,34 \log_{10}$ CFU/g, pri čemu je najosjetljiviji bio soj br. 52 ($p < 0,05$), a najotporniji sojevi br. 41 i 45 ($p < 0,05$). Promatrajući razlike dekontaminacijskog učinka korištenih protokola, a neovisno o inokuliranom soju, razvidna je najveća redukcija *Y. enterocolitica* 4/O:3 prskanjem svinjskog mesa vrućom 4 %-tnom otopinom mliječne kiseline tijekom 30 sekundi ($1,24 \pm 0,42$), a najmanja ($0,33 \pm 0,25$) prskanjem hladne 2 %-tne otopine octene kiseline tijekom 10 sekundi. Odstupanja od prosječnih vrijednosti redukcija unutar istog protokola (između različitih sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3) bila su značajno manja u odnosu na ista unutar jednog promatranog soja *Y. enterocolitica* 4/O:3 (između različitih protokola). Uspoređujući rezultate dekontaminacije mesa primjenom osam protokola octenom kiselinom, prosječne su vrijednosti redukcije prije hlađenja mesa bile od $0,33 \pm 0,25$ do $0,91 \pm 0,38 \log_{10}$ CFU/g, dok su nakon primjene mliječne kiseline iznosile od $0,69 \pm 0,09$ do $1,24 \pm 0,42 \log_{10}$ CFU/g ($p < 0,05$). Vrijednosti redukcija postignute dekontaminacijom vodom bile su statistički značajno manje u odnosu na one postignute mliječnom kiselinom ($p < 0,05$), a kretale su se od $0,41 \pm 0,15$ do $0,81 \pm 0,11 \log_{10}$ CFU/g, dok u usporedbi s octenom nije bilo značajne razlike ($p > 0,05$).

Nadalje, tablicom 13 prikazane su prosječne redukcije populacija inokuliranih sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon hlađenja dekontaminiranog svinjskog mesa tijekom 24 sata pri 4 °C. U odnosu na promatrani inokulirani soj *Y. enterocolitica* 4/O:3 izmjerena je prosječna redukcija od $0,70 \pm 0,28 \log_{10}$ CFU/g (soj br. 29; najotporniji) do $0,97 \pm 0,23 \log_{10}$ CFU/g (soj br. 40; najosjetljiviji). Uspoređujući dekontaminacijski učinak primijenjenih protokola na mesu (0. sat) i na mesu nakon hlađenja (24. sat) uočava se dodatno smanjenje populacije *Y. enterocolitica* uz primjenu otopina octene kiseline, dok je na hlađenom mesu prskanom otopinama mliječne kiseline populacija stagnirala. Također, uočena su manja odstupanja od srednjih vrijednosti redukcija između pojedinih protokola, posebno u slučaju octene kiseline gdje se redukcija povećala, a kretala se od $0,70 \pm 0,20$ do $1,19 \pm 0,56 \log_{10}$ CFU/g. U protokolima s mliječnom kiselinom vrijednosti redukcija kretale su se od $0,57 \pm 0,23$ do $1,15 \pm 0,26 \log_{10}$ CFU/g pa se zbog prethodno navedenog nije značajno razlikovala od redukcija postignutih octenom kiselinom, za razliku od 0. sata. Vrijednosti redukcija postignutih dekontaminacijom vodom također su bile veće nakon 24 sata, a iznosile su od $0,57 \pm 0,17$ do $0,98 \pm 0,14 \log_{10}$ CFU/g.

5.4. Usporedba razina primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola s organskim kiselinama na redukciju broja *Y. enterocolitica* 4/O:3

U tablici 14 prikazana je usporedba dekontaminacijskog učinka različitih vrsta organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat. Uspoređujući razlike istovjetnih dekontaminacijskih protokola mliječne naspram octene kiseline, 0. sat dokazana je značajnija učinkovitost mliječne kiseline ($p < 0,05$) u svim slučajevima osim pri primjeni 2 %-tnih otopina vrućih kiselina tijekom 10 sekundi te 4 %-tnih otopina vrućih kiselina tijekom 30 sekundi. Redukcija je i tada bila veća prilikom primjene mliječne kiseline, no bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

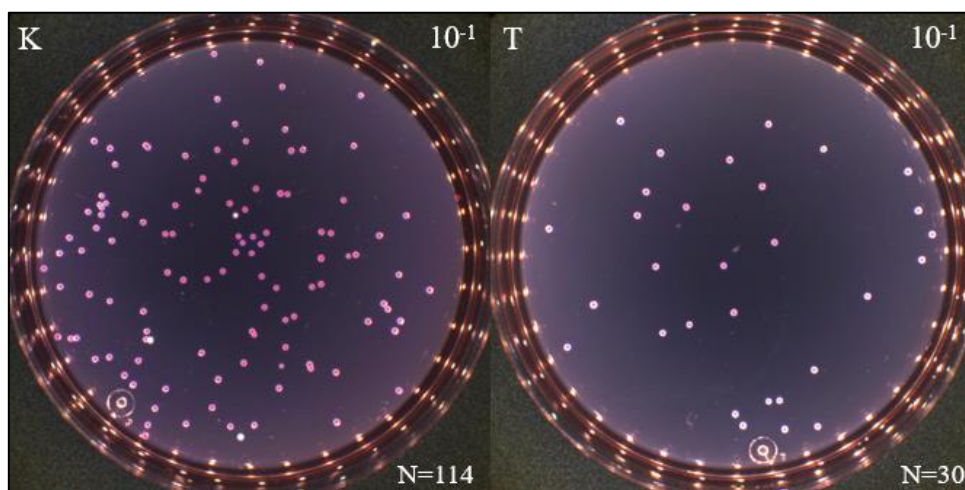
Tablica 14. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih vrsta organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

		redukcija	
Dekontaminacijski protokol		0.h	24.h
1.	2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,33±0,25 ^{aA}	0,71±0,31 ^A
9.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,70±0,25 ^a	0,76±0,23
2.	4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,38±0,20 ^{bB}	0,73±0,28 ^B
10.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,69±0,09 ^b	0,57±0,23
3.	2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,50±0,22 ^{cC}	0,83±0,23 ^C
11.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,80±0,28 ^c	0,85±0,23
4.	4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,51±0,23 ^{dD}	0,82±0,15 ^D
12.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,86±0,27 ^d	0,86±0,31
5.	2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,52±0,19	0,60±0,27
13.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,70±0,26	0,79±0,33
6.	4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,50±0,18 ^e	0,70±0,20 ^g
14.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,80±0,27 ^e	1,04±0,33 ^g
7.	2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,91±0,38 ^f	1,04±0,46
15.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,21±0,18 ^f	1,15±0,26
8.	4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,90±0,35	1,19±0,56
16.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,24±0,42	1,07±0,44

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05

Sukladno prethodnim rezultatima, vrijednosti redukcija nakon 24 sata se nisu značajno razlikovale između promatranih protokola ($p>0,05$) osim kod primjene 4 %-tnih otopina vrućih kiselina tijekom 10 sekundi gdje je mliječna kiselina bila učinkovitija ($p<0,05$).

Tablicom 15 prikazana je usporedba dekontaminacijskog učinka otopina organskih kiselina različitih koncentracija prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x}\pm\text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat. Iz rezultata je vidljivo da nema statistički značajne razlike ($p>0,05$) u redukciji patogena primjenom različitih koncentracija octene kiseline ili mliječne kiseline pri jednakom trajanju izloženosti i temperaturama otopine. Utjecaj koncentracije mliječne kiseline na populaciju *Y. enterocolitica* nije se promijenio nakon hlađenja dekontaminiranog mesa. Na slici 19 prikazan je primjer očitavanja rezultata redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon dekontaminacije.



Slika 19. Primjer redukcije broja *Y. enterocolitica* od 0,58 $\log_{10}$ CFU/g nakon provedbe dekontaminacijskog protokola sa 4 %-tnom otopinom octene kiseline temperature 80 °C tijekom 30 sekundi (lijevo-pozitivna kontrola; desno-testni uzorak)

Tablica 15. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih koncentracija organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

		redukcija	
Dekontaminacijski protokol		0.h	24.h
1.	2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,33±0,25 ^A	0,71±0,31 ^A
2.	4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,38±0,20 ^B	0,73±0,28 ^B
3.	2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,50±0,22 ^C	0,83±0,23 ^C
4.	4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,51±0,23 ^D	0,82±0,15 ^D
5.	2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,52±0,19	0,60±0,27
6.	4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,50±0,18	0,70±0,20
7.	2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,91±0,38	1,04±0,46
8.	4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,90±0,35	1,19±0,56
9.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,70±0,25	0,76±0,23
10.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,69±0,09	0,57±0,23
11.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,80±0,28	0,85±0,23
12.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,86±0,27	0,86±0,31
13.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,70±0,26	0,79±0,33
14.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,80±0,27	1,04±0,33
15.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,21±0,18	1,15±0,26
16.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,24±0,42	1,07±0,44

*vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05

Tablicom 16 prikazana je usporedba dekontaminacijskog učinka organskih kiselina različitih temperatura prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat. Statistički znatno veće ($p < 0,05$) redukcije postignute su primjenom vrućih otopina kiseline, ali jedino tijekom dužeg izlaganja od 30 sekundi. Spomenute razlike uočene su i 24 sata nakon hlađenja mesa, s iznimkom protokola u kojima su korištene 2 %-tne otopine octene kiseline i 4 %-tne otopine mliječne kiseline.

Tablica 16. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih temperatura organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

Dekontaminacijski protokol		redukcija	
		0.h	24.h
1.	2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,33±0,25 ^A	0,71±0,31 ^A
5.	2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,52±0,19	0,60±0,27
2.	4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,38±0,20 ^B	0,73±0,28 ^B
6.	4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,50±0,18	0,70±0,20
3.	2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,50±0,22 ^{aC}	0,83±0,23 ^C
7.	2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,91±0,38 ^a	1,04±0,46
4.	4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,51±0,23 ^{bD}	0,82±0,15 ^{eD}
8.	4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,90±0,35 ^b	1,19±0,56 ^e
9.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,70±0,25	0,76±0,23
13.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,70±0,26	0,79±0,33
10.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,69±0,09	0,57±0,23 ^f
14.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,80±0,27	1,04±0,33 ^f
11.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,80±0,28 ^c	0,85±0,23 ^g
15.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,21±0,18 ^c	1,15±0,26 ^g
12.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,86±0,27 ^d	0,86±0,31
16.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,24±0,42 ^d	1,07±0,44

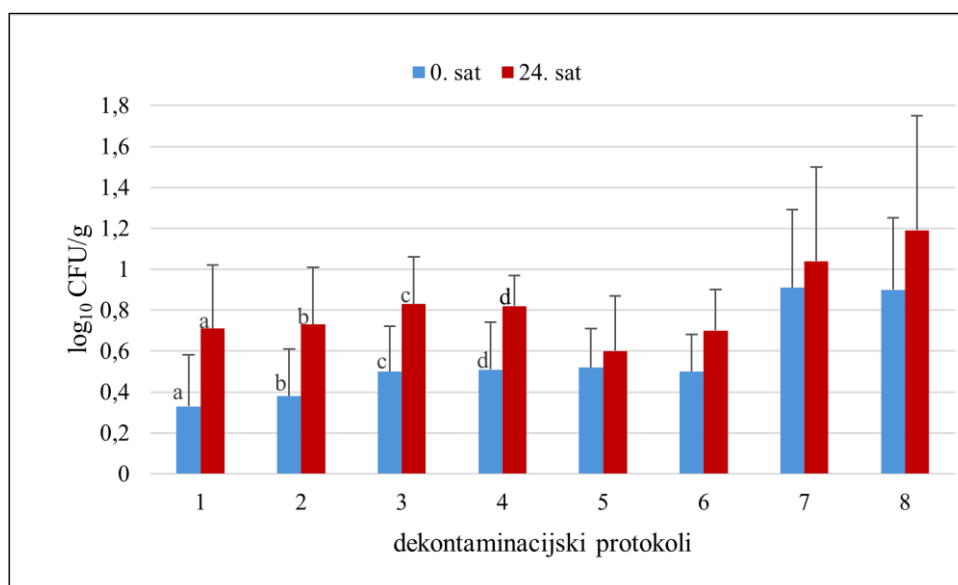
*vrijednosti označene istim malim slovima u istoj koloni statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05

S tim u vezi, izlaganje u vremenskom periodu od 30 sekundi značajno je utjecalo ($p<0,05$) na veću redukciju populacije *Y. enterocolitica* u odnosu na kraće izlaganje od 10 sekundi, no samo u slučaju primjene vrućih otopina jednakih koncentracija (Tablica 17). Utjecaj duljine trajanja izloženosti otopinama na redukciju *Y. enterocolitica* nakon 24 sata istovjetan je onome dokazanome tijekom početnog mjerenja, s iznimkom protokola u kojemu je primjenjena 4 %-tna vruća otopina mliječne kiseline ($p>0,05$). Na slikama 20 i 21 grafički su prikazane postignute redukcije nakon provedenih protokola otopinama octene i mliječne kiseline 0. i 24. sat.

Tablica 17. Usporedba dekontaminacijskog učinka organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x}\pm\text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat tijekom različitih vremenskih izlaganja

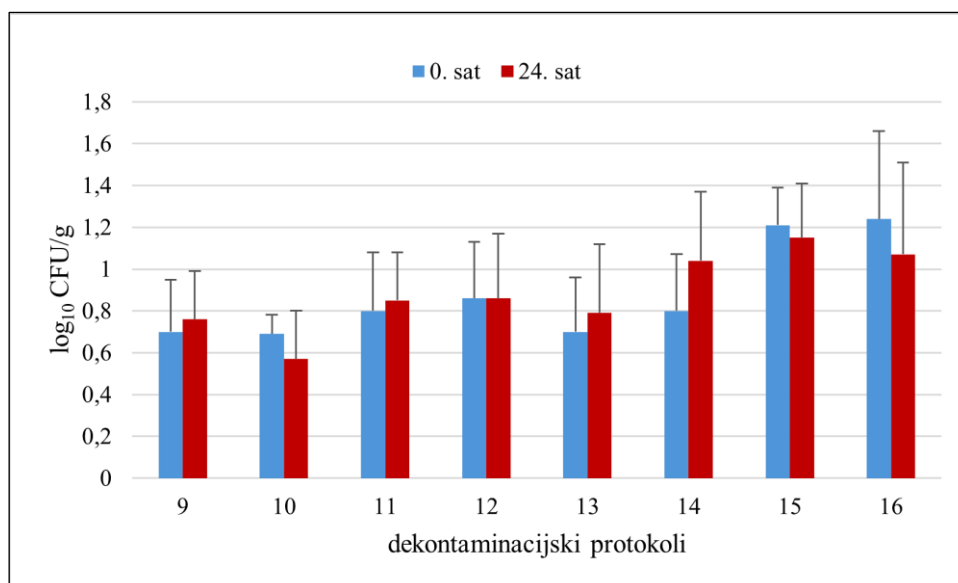
		redukcija	
Dekontaminacijski protokol		0.h	24.h
1.	2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,33±0,25 ^A	0,71±0,31 ^A
3.	2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,50±0,22 ^C	0,83±0,23 ^C
2.	4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,38±0,20 ^B	0,73±0,28 ^B
4.	4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,51±0,23 ^D	0,82±0,15 ^D
5.	2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,52±0,19 ^a	0,60±0,27 ^e
7.	2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,91±0,38 ^a	1,04±0,46 ^e
6.	4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,50±0,18 ^b	0,70±0,20 ^f
8.	4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,90±0,35 ^b	1,19±0,56 ^f
9.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,70±0,25	0,76±0,23
11.	2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,80±0,28	0,85±0,23
10.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,69±0,09	0,57±0,23 ^g
12.	4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,86±0,27	0,86±0,31 ^g
13.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,70±0,26 ^c	0,79±0,33 ^h
15.	2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,21±0,18 ^c	1,15±0,26 ^h
14.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,80±0,27 ^d	1,04±0,33
16.	4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,24±0,42 ^d	1,07±0,44

*vrijednosti označene istim malim slovima u istoj koloni statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05



Slika 20. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama octene kiseline (N=8) 0. i 24. sat (log₁₀ CFU/g; $\bar{x} \pm SD$)

*vrijednosti unutar istog protokola označene istim malim slovom statistički se razlikuju na razini 0,05



Slika 21. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama mliječne kiseline (N=8) 0. i 24. sat (log₁₀ CFU/g; $\bar{x} \pm SD$)

5.4.1. Značajnost primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola na redukciju broja *Y. enterocolitica* 4/O:3

Temeljem dobivenih rezultata, uočljiv je značajan utjecaj faktora primjenjene temperature otopina kiselina kao i duljine trajanja dekontaminacijskih protokola na redukciju broja *Y. enterocolitica* prilikom pojedinačnog testiranja, ali i njihove interakcije ($p < 0,05$). Za razliku od toga, utjecaj vrste primjenjene kiseline pokazao se kao manje značajan faktor, kao i njezine koncentracije koja je u odnosu na ostale promatrane pokazala najmanji utjecaj na redukciju broja bakterija ($p > 0,05$). Učinak pojedinačnih faktora na rezultat redukcije te njihovo interakcijsko djelovanje prikazani su u tablicama 18 i 19.

Tablica 18. Utjecaj glavnih faktora dekontaminacije na ishod redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon 24 sata

Faktori	Razine faktora	Značajnost
Kiselina	octena kiselina; mliječna kiselina	0,096
Koncentracija	2 %; 4 %	0,532
Temperatura	25 °C; 80 °C	0,001
Vrijeme	10 sekundi; 30 sekundi	0,000

Tablica 19. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta na ishod redukcije broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon 24 sata

Interakcije faktora	Značajnost
kiselina * koncentracija	0,529
kiselina * temperatura	0,096
kiselina * vrijeme	0,171
koncentracija * temperatura	0,227
koncentracija * vrijeme	0,796
temperatura * vrijeme	0,044
kiselina * koncentracija * temperatura	0,700
kiselina * koncentracija * vrijeme	0,653
kiselina * temperatura * vrijeme	0,058
koncentracija * temperatura * vrijeme	0,404
kiselina * koncentracija * temperatura * vrijeme	0,085

5.5. Usporedba razina primjenjenih faktora dekontaminacijskih protokola s vodom na redukciju broja *Y. enterocolitica* 4/O:3

Usporedba dekontaminacijskog učinka vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat tijekom različitih vremenskih izlaganja prikazana je u tablici 20. Statistički značajno veće redukcije ($p < 0,05$) postignute su tretiranjem od 30 sekundi, i kod primjene hladne, ali i vruće vode. Isto je zamijećeno i nakon 24 sata, osim u slučaju protokola s vrućom vodom. Uspoređujući pak temperaturu kao faktor (Tablica 21), statistički veće redukcije ($p < 0,05$) postignute su primjenom vruće vode, no samo u slučaju duljeg izlaganja od 30 sekundi. Iste razlike uočene su i nakon 24 sata, ali čak i nakon kraćeg izlaganja od 10 sekundi ($p < 0,05$). Također, nakon 24 sata hlađenja mesa redukcija se u sva četiri dekontaminacijska protokola vodom značajno povećala ($p < 0,05$) u odnosu na početne vrijednosti izmjerene 0. sat. Na slici 22 navedeni rezultati su i grafički prikazani.

Tablica 20. Usporedba dekontaminacijskog učinka vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat tijekom različitih vremenskih izlaganja

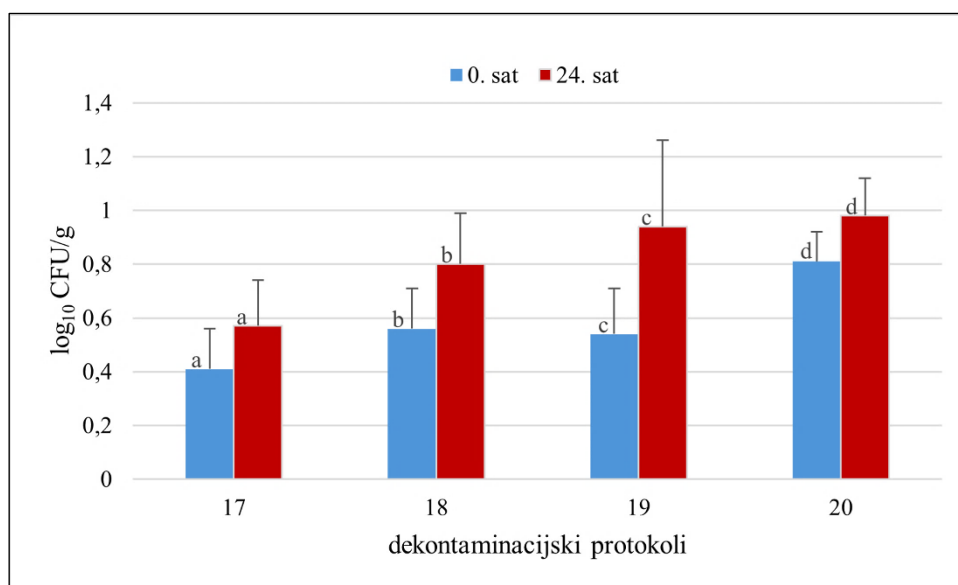
		redukcija	
	Dekontaminacijski protokol	0.h	24.h
17.	Voda; 25 °C; 10 sekundi	0,41±0,15 ^{aA}	0,57±0,17 ^{cA}
18.	Voda; 25 °C; 30 sekundi	0,56±0,15 ^{aB}	0,80±0,19 ^{cB}
19.	Voda; 80 °C; 10 sekundi	0,54±0,17 ^{bC}	0,94±0,32 ^C
20.	Voda; 80 °C; 30 sekundi	0,81±0,11 ^{bD}	0,98±0,14 ^D

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05

Tablica 21. Usporedba dekontaminacijskog učinka različitih temperatura vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

		redukcija	
	Dekontaminacijski protokol	0.h	24.h
17.	Voda; 25 °C; 10 sekundi	0,41±0,15 ^A	0,57±0,17 ^{bA}
19.	Voda; 80 °C; 10 sekundi	0,54±0,17 ^C	0,94±0,32 ^{bC}
18.	Voda; 25 °C; 30 sekundi	0,56±0,15 ^{aB}	0,80±0,19 ^{cB}
20.	Voda; 80 °C; 30 sekundi	0,81±0,11 ^{aD}	0,98±0,14 ^{cD}

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05; vrijednosti označene istim velikim slovima u istom redu statistički se razlikuju na razini 0,05



Slika 22. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola vodom (N=4) 0. i 24. sat (log₁₀ CFU/g; $\bar{x} \pm SD$)

*vrijednosti unutar istog protokola označene istim malim slovom statistički se razlikuju na razini 0,05

5.6. Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola s otopinama organskih kiselina i dekontaminacijskih protokola s vodom

Međusobne usporedbe istovjetnih dekontaminacijskih protokola (temperatura, trajanje) octenom i mliječnom kiselinom te vodom prikazane su u tablici 22. Vidljivo je da se početnom dekontaminacijom hladnim otopinama kiselina postigla značajno veća redukcija ($p < 0,05$) populacije *Y. enterocolitica* uvođenjem 2 %- i 4 %-tne otopine mliječne kiseline, i kraćim i dužim izlaganjem, u odnosu na dekontaminaciju hladnom vodom. Zagrijavanjem otopina također je zabilježena značajno veća redukcija ($p < 0,05$), i to primjenom vruće otopine 4 %-tne mliječne kiseline u oba vremenska okvira (10 i 30 sekundi), te vruće otopine 2 %-tne mliječne kiseline dužim izlaganjem, u odnosu na dekontaminaciju vrućom vodom.

Navedeno ukazuje kako se početne redukcije *Y. enterocolitica* otopinama octene kiseline nisu statistički razlikovale u odnosu na vodu jednake temperature i trajanja dekontaminacije ($p > 0,05$). Nadalje, primjenom vruće vode tijekom 10 sekundi je nakon 24 sata zamijećena značajno veća redukcija u odnosu na vruće otopine 2 %- i 4 %-tne octene kiseline ($p < 0,05$).

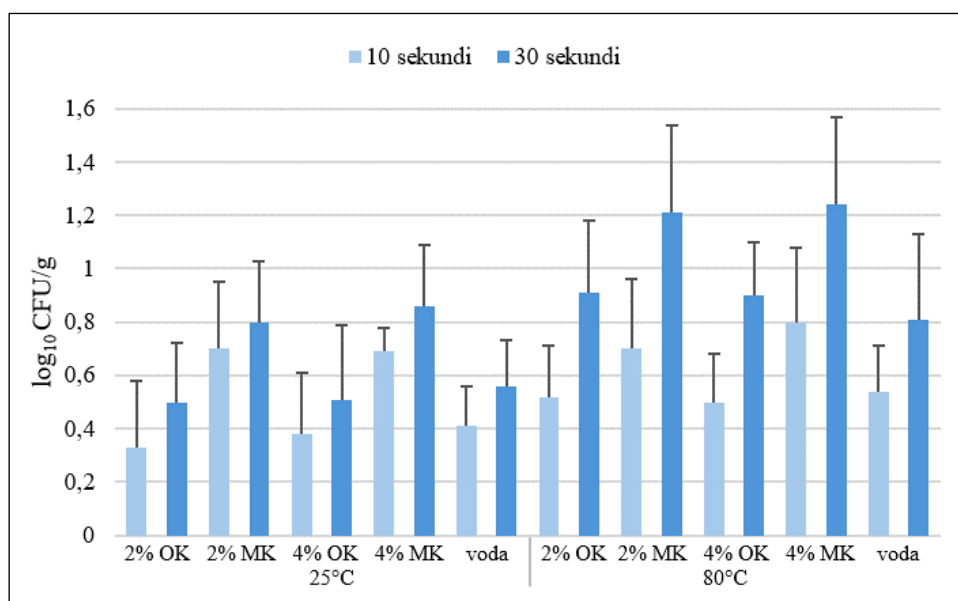
Kako je već naglašeno, za razliku od octene kiseline, protokoli s mliječnom kiselinom pokazali su značajniju učinkovitost u smanjenju inokulirane populacije *Y. enterocolitica* na mesu u odnosu na standardne protokole vodom. Tako je nultoga sata dokazana statistički veća redukcija ($p < 0,05$) kod svih protokola u kojima je korištena mliječna kiselina u odnosu na vodu, osim u protokolu br. 13 (vruća 2 %; 10 sekundi). U odnosu na 0. sat, nakon 24 sata nije bilo značajnih razlika u populaciji *Y. enterocolitica* dekontaminiranog mesa između promatranih protokola ($p > 0,05$). Rezultati su i grafički prikazani na slikama 23 i 24.

Tablica 22. Usporedba dekontaminacijskog učinka otopina octene kiseline, mliječne kiseline i vode prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu 0. i 24. sat

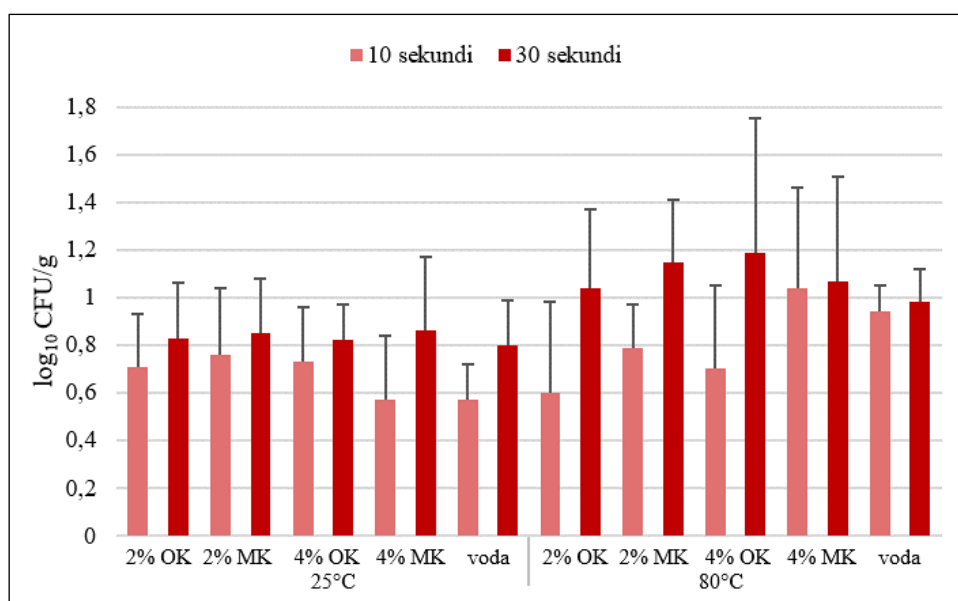
		redukcija	
Dekontaminacijski protokol		0.h	24.h
1.	2% octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,33±0,25	0,71±0,31
9.	2% mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,70±0,25 ^a	0,76±0,23
2.	4% octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,38±0,20	0,73±0,28
10.	4% mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi	0,69±0,09 ^b	0,57±0,23
17.	Voda; 25 °C; 10 sekundi	0,41±0,15 ^{ab}	0,57±0,17
3.	2% octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,50±0,22	0,83±0,23
11.	2% mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,80±0,28 ^c	0,85±0,23
4.	4% octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,51±0,23	0,82±0,15
12.	4% mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi	0,86±0,27 ^d	0,86±0,31
18.	Voda; 25 °C; 30 sekundi	0,56±0,15 ^{cd}	0,80±0,19
5.	2% octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,52±0,19	0,60±0,27 ^h
13.	2% mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,70±0,26	0,79±0,33
6.	4% octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,50±0,18	0,70±0,20 ⁱ
14.	4% mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi	0,80±0,27 ^e	1,04±0,33
19.	Voda; 80 °C; 10 sekundi	0,54±0,17 ^e	0,94±0,32 ^{hi}
7.	2% octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,91±0,38	1,04±0,46
15.	2% mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,21±0,18 ^f	1,15±0,26
8.	4% octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi	0,90±0,35	1,19±0,56
16.	4% mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi	1,24±0,42 ^g	1,07±0,44
20.	Voda; 80 °C; 30 sekundi	0,81±0,11 ^{fg}	0,98±0,14

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

** razlike između pojedinih protokola s octenom kiselinom i mliječnom kiselinom prikazane su u prethodnim tablicama



Slika 23. Usporedba redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20) 0. sat (log₁₀ CFU/g; x±SD)



Slika 24. Usporedba redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20) 24. sat (log₁₀ CFU/g; x±SD)

5.7. Utjecaj dekontaminacije na promjene pH vrijednosti mesa

Tablica 23. pH vrijednosti mesa prije i nakon provedenih dekontaminacija 0. i 24. sat (pH; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Dekontaminacijski protokol	0.h			24.h	
	kontrola	test	razlika	test	razlika
1.	5,85±0,13	5,12±0,14	0,73	5,58±0,15	0,46
2.	5,80±0,13	4,97±0,16	0,83	5,40±0,13	0,43
3.	5,97±0,13	5,15±0,18	0,79	5,76±0,24	0,61
4.	5,83±0,12	4,75±0,11	1,08**	5,35±0,14	0,60
5.	6,00±0,10	5,40±0,17	0,60	5,80±0,14	0,40
6.	5,88±0,12	5,02±0,26	0,86	5,50±0,13	0,48
7.	5,96±0,14	5,20±0,17	0,76	5,72±0,14	0,52
8.	5,90±0,06	4,79±0,11	1,11**	5,41±0,11	0,62
	5,89±0,07	5,05±0,21	0,84±0,17^{ab}	5,56±0,17	0,51±0,08^{ab}
9.	5,77±0,08	5,13±0,13	0,64	5,63±0,17	0,50
10.	5,84±0,16	4,58±0,20	1,26	5,56±0,18	0,98
11.	5,72±0,08	4,74±0,10	0,98	5,62±0,12	0,88
12.	5,72±0,10	4,39±0,18	1,33	5,46±0,11	1,07
13.	5,84±0,09	5,03±0,20	0,81	5,61±0,08	0,58
14.	5,81±0,13	4,59±0,24	1,22	5,58±0,14	0,99
15.	5,92±0,05	4,66±0,23	1,26	5,69±0,20	1,03
16.	5,92±0,07	4,23±0,18	1,69**	5,43±0,17	1,20
	5,81±0,07	4,66±0,30	1,14±0,32^{ac}	5,57±0,08	0,90±0,24^{ac}
17.	5,89±0,11	5,96±0,09	0,07	5,99±0,08	0,10
18.	5,84±0,05	5,89±0,07	0,05	5,95±0,13	0,11
19.	5,93±0,10	5,94±0,10	0,01	6,02±0,15	0,09
20.	5,94±0,12	5,99±0,12	0,05	6,10±0,20	0,16
	5,90±0,04	5,94±0,04	0,04±0,02^{bc}	6,01±0,06	0,11±0,03^{bc}

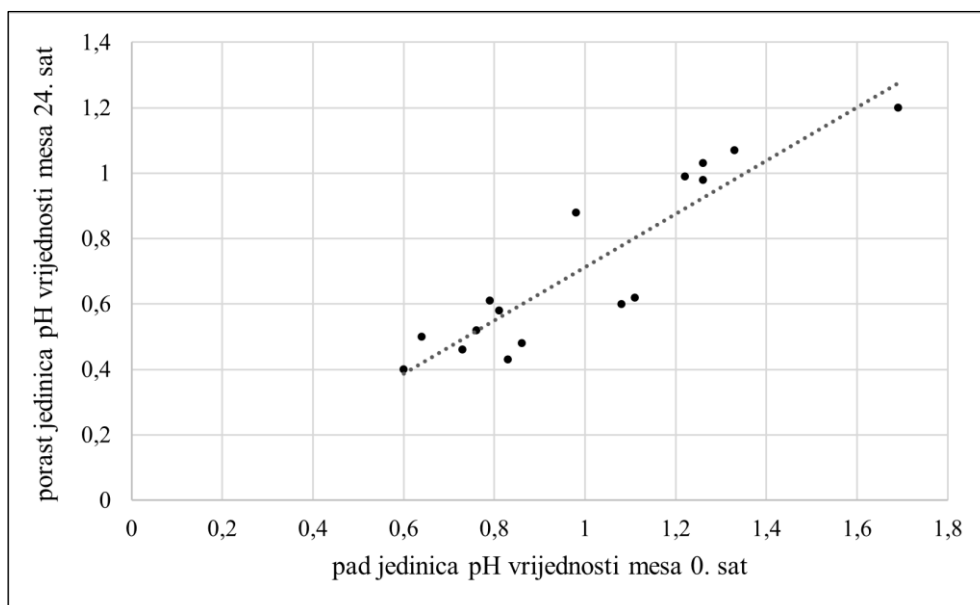
*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

** statistički značajno najveće razlike u padu pH vrijednosti unutar tretmana s pojedinom vrstom organske kiseline ($p < 0,05$)

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 17. voda; 25 °C; 10 sekundi; 18. voda; 25 °C; 30 sekundi; 19. voda; 80 °C; 10 sekundi; 20. voda; 80 °C; 30 sekundi

U tablici 23 prikazane su izmjerene pH vrijednosti mesa prije i nakon provedene dekontaminacije otopinama organskih kiselina i vodom. Vrijednosti pH mesa prije dekontaminacije kretale su se u rasponu od $5,72 \pm 0,10$ do $6,00 \pm 0,10$. Nakon provedenih dekontaminacija otopinama octene kiseline (1-8) pH se prosječno snizio za $0,84 \pm 0,17$, a najviše (za 1,11) vrućom 4 %-tnom otopinom nakon 30 sekundi izlaganja ($p < 0,05$).

Nakon 24 sata hlađenja dekontaminiranog mesa octenom kiselinom, pH se prosječno povećao za $0,51 \pm 0,08$ te su vrijednosti iznosile od $5,40 \pm 0,13$ do $5,80 \pm 0,14$. Dekontaminacija otopinama mliječne kiseline je, za razliku od octene kiseline, rezultirala većim padom pH mesa za $1,14 \pm 0,32$ ($p < 0,05$) pa su konačne vrijednosti bile u rasponu od $4,23 \pm 0,18$ do $5,13 \pm 0,13$. Kao i kod octene kiseline, dekontaminacija s 4 %-tnom vrućom otopinom mliječne kiseline u trajanju od 30 sekundi je najsnažnije reducirala pH mesa za 1,69 ($p < 0,05$). Nakon 24 sata hlađenja mesa dekontaminiranog otopinama mliječne kiseline, pH se značajnije povećao ($0,90 \pm 0,24$) u odnosu na protokole octenom kiselinom ($p < 0,05$), a vrijednosti su se, kao i u slučaju octene kiseline, kretale od $5,43 \pm 0,17$ do $5,69 \pm 0,20$. Kod obje kiseline, u svakom od protokola, pad pH mesa odmah po dekontaminaciji je bio u pozitivnoj korelaciji s njegovim porastom nakon 24 sata ($r = 0,91$) (Slika 25). Očekivano, protokoli s vodom nisu utjecali na promjenu pH vrijednosti mesa koje se nakon tretiranja nisu značajno razlikovale od fizioloških ($5,94 \pm 0,04$), za razliku od protokola s kiselinama ($p < 0,05$).



Slika 25. Dinamika promjene pH vrijednosti mesa nakon dekontaminacijskih protokola

(N=16)

Uspoređujući pad pH vrijednosti mesa nakon početne dekontaminacije sa vrijednostima redukcije populacija *Y. enterocolitica* na mesu, ustanovljeno je da je kod većine protokola smanjenje pH bilo u umjerenoj korelaciji sa stupnjem redukcije, odnosno niži pH mesa rezultirao je većom redukcijom populacije *Y. enterocolitica* ($r=-0,62$).

Naime, iako je utvrđeno da upotreba 4 %-tnih otopina kiselina (i mliječne i octene) značajnije snizi pH ($p<0,05$) od primjene 2 %-tnih otopina u svim dekontaminacijskim protokolima, kao što je već prethodno navedeno, između njih nisu zabilježene i značajne razlike ($p>0,05$) u redukciji broja bakterije na mesu. Nadalje, niži pH mesa zabilježen je u protokolima s duljim izlaganjem (30 sekundi) u odnosu na kraće (10 sekundi) ($p<0,05$), a veća redukcija *Y. enterocolitica* samo primjenom vrućih otopina kiselina.

Što se tiče temperature primjenjene otopine kiselina i utjecaja na pad pH vrijednosti mesa, dekontaminacija otopinama octene kiseline temperature 80 °C nisu značajnije snizili pH mesa u odnosu na hladne otopine ($p>0,05$), dok je kod mliječne kiseline potvrđeno suprotno ($p<0,05$). U oba slučaja je pak, statistički veća redukcija *Y. enterocolitica* dokazana samo duljim izlaganjem ($p<0,05$). Sumirajući rezultate, uočeno je da u više od 50 % slučajeva statistički značajniji pad pH vrijednosti dekontaminiranog mesa nije rezultirao i statistički većom redukcijom inokulirane populacije *Y. enterocolitica*.

5.8. Preživljavanje sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon stresiranja organskim kiselinama u tekućem mediju

Preživljavanje sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon stresiranja otopinama organskih kiselina prikazano je u tablici 24. Prosječan broj *Y. enterocolitica* je u kontrolnim uvjetima (kiselinama neizloženi namnoženi sojevi; u TSB-u neutralnog pH) iznosio $8,63 \pm 0,15 \log_{10}$ CFU/mL. Nakon izlaganja sojeva otopini 2 %-tne mliječne kiseline u trajanju od 60 sekundi, prosječan broj bakterija iznosio je $3,38 \pm 1,51 \log_{10}$ CFU/mL. Postotak oštećenih stanica se tako kretao od 39,75 do >88,46 %. Nakon izlaganja otopini 2 %-tne octene kiseline redukcije su bile nešto manje tako da se broj *Y. enterocolitica* kretao od $3,97$ - $7,71 \log_{10}$ CFU/mL, a postotak oštećenih stanica od 10,66 do >53,43 %. Obzirom da smo za daljnje testiranje predvidjeli najotpornije sojeve pri čemu smo granicu za postotak preživljenih stanica postavili na 50 % (± 10 %), u oba testiranja su sojevi broj 29, 36 i 40 pokazali najveću otpornost obzirom da im je postotak oštećenih stanica (10,66-17,48 % za octenu kiselinu te 39,75-50,51 % za mliječnu kiselinu) bio manji u odnosu na ostale sojeve. Kod svih 10 testiranih sojeva, postotak preživljavanja bakterijskih stanica izlaganih mliječnoj i octenoj kiselini bio je u visokoj korelaciji ($r=0,87$; $p<0,05$).

Tablica 24. Preživljavanje sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 nakon stresiranja otopinama organskih kiselina ($\log_{10}$ CFU/mL; $\bar{x} \pm \text{SD}$) u TSB-u

soj	2 % mliječna kiselina; pH=3,85±0,10				2 % octena kiselina; pH=4,31±0,02		
	kontrola	test	redukcija	% oštećenih stanica	test	redukcija	% oštećenih stanica
22	8,75±0,00	3,80±0,03	4,95	56,57	6,75±0,02	2,00	22,85
29	8,83±0,01	5,32±0,01	3,51	39,75	7,71±0,07	1,12	12,68
34	8,78±0,04	3,86±0,02	4,92	56,03	6,84±0,02	1,94	22,09
36	8,75±0,00	4,33±0,01	4,42	50,51	7,22±0,01	1,53	17,48
40	8,63±0,01	4,73±0,03	3,90	45,19	7,71±0,01	0,92	10,66
41	8,35±0,02	2,26±0,11	6,09	72,93	4,06±0,05	4,29	51,37
45	8,67±0,03	<1,00	>7,67	>88,46	5,68±0,02	2,99	>34,48
52	8,59±0,01	<1,00	>7,59	>88,35	<4,00	>4,59	>53,43
54	8,57±0,01	1,31±0,02	7,26	84,71	5,12±0,04	3,45	40,25
77	8,47±0,04	1,49±0,02	6,98	82,40	3,97±0,25	4,50	53,12

Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) tijekom 15 ponovljenih izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline u trajanju od 60 sekundi prikazan je u tablici 25. pH vrijednost TSB-a svih triju sojeva je tijekom 15 izlaganja bila postojana, a kretala se od $5,44 \pm 0,02$ (1. izlaganje) do $5,37 \pm 0,03$ (15. izlaganje). Promatrajući bakterijski rast mjerenjem optičke gustoće, skupne vrijednosti su 24 sata po izlaganju iznosile $2,13 \pm 0,15$ McF, a nakon 15 dana $2,66 \pm 0,47$, bez većih odstupanja tijekom razdoblja mjerenja. Uspoređujući rast među sojevima tijekom 15 dana, statistički najnižu optičku gustoću ($p < 0,05$) je pokazao soj br. 40 ($2,08 \pm 0,53$ McF) u odnosu na sojeve br. 29 ($2,64 \pm 0,73$ McF) i 36 ($2,36 \pm 0,55$ McF). Uspoređujući pH vrijednosti TSB-a s kulturom i izmjerenu optičku gustoću među sojevima, oučeno je da nisu u korelaciji (soj 29 $r = 0,16$; soj 36 $r = -0,16$; soj 40 $r = -0,48$). Grafički prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva u odnosu na izmjerenu pH vrijednost bujona prikazan je na Slici 26.

Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) tijekom 15 ponovljenih izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline u trajanju od 60 sekundi prikazan je u tablici 26. Kao i u slučaju mliječne kiseline, pH vrijednost TSB-a svih triju sojeva je tijekom 15 izlaganja bila uniformna, a kretala se od $5,58 \pm 0,08$ (1. izlaganje) do $5,46 \pm 0,13$ (15. izlaganje). 24 sata nakon izlaganja prosječna vrijednost optičke gustoće iznosila je $2,46 \pm 0,40$ McF, a nakon 15. izlaganja $2,63 \pm 0,22$ McF, također bez većih odstupanja između pojedinih mjerenja. Kao i kod mliječne kiseline, kod soja br. 40 je izmjerena statistički najniža ($p < 0,05$) optička gustoća ($2,36 \pm 0,67$ McF) u odnosu na soj 29 ($2,68 \pm 0,74$ McF) i 36 ($2,50 \pm 0,64$ McF). Za razliku od mliječne kiseline, zabilježena je umjerena korelacija pH vrijednosti TSB-a i optičke gustoće soja br. 29 ($r = 0,40$), 36 ($r = 0,50$), dok kod soja br. 40 nije uočena ($r = -0,03$). Grafički prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva u odnosu na izmjerenu pH vrijednost bujona prikazan je na Slici 27.

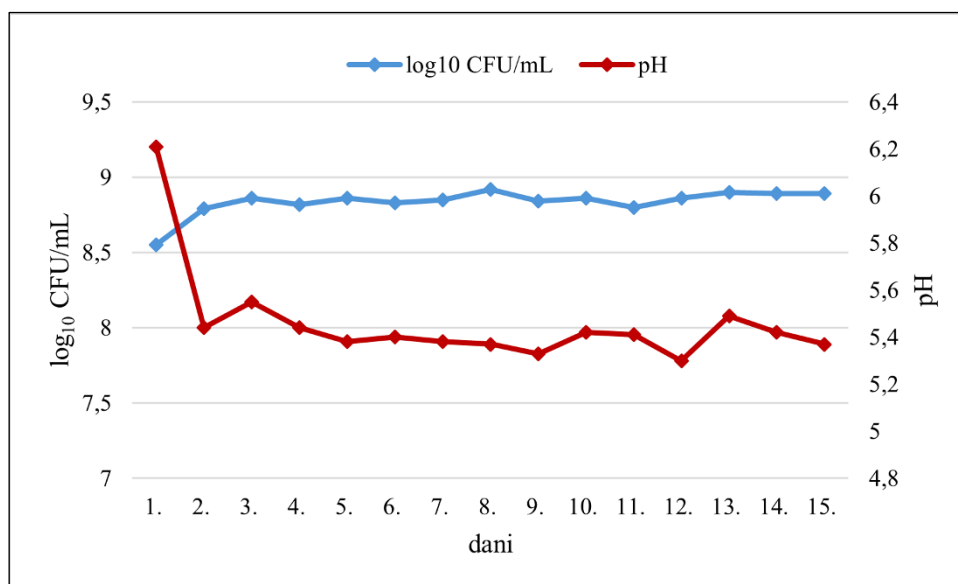
Iz rezultata je vidljiva adaptacija sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na novonastale kisele uvjete (Tablica 25 i 26) obzirom na visoki postotak preživljavanja tijekom uzastopnih izlaganja iznimno niskim pH vrijednostima (2,15-2,78) te oporavka takvih oštećenih stanica čiji je broj nakon svakog ciklusa izlaganja dosegao minimalno $8 \log_{10}$ CFU/mL.

Tablica 25. Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) u TSB-u tijekom 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline u trajanju od 60 sekundi

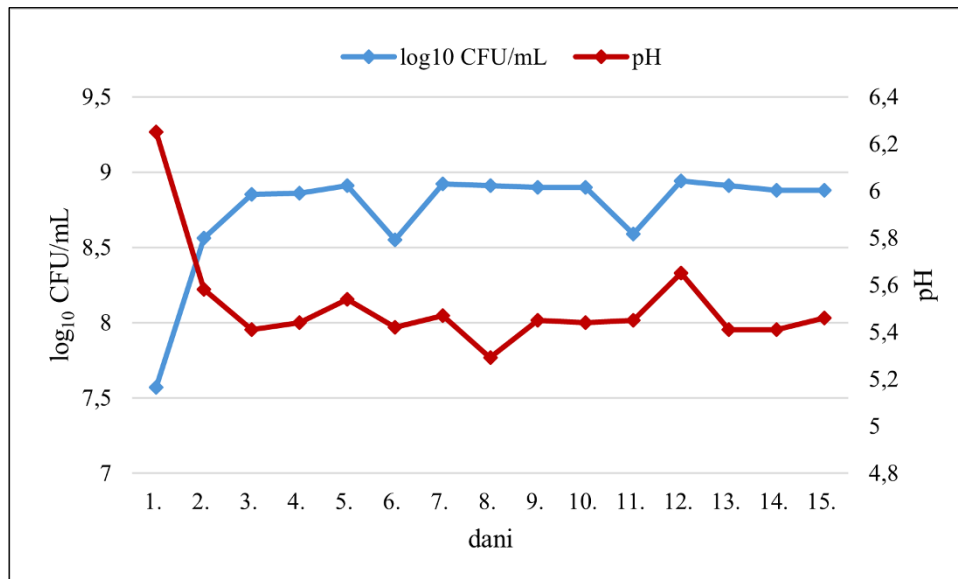
soj	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml
	1. dan			2. dan			3. dan			4. dan			5. dan		
29	6,26	0,90	8,43	5,46	2,10	8,79	5,78	2,80	8,92	5,46	2,40	8,85	5,42	2,20	8,81
36	6,34	0,50	9,17	5,45	2,30	8,83	5,45	2,50	8,87	5,46	2,60	8,89	5,41	2,80	8,92
40	6,05	0,40	8,07	5,42	2,00	8,77	5,42	2,20	8,81	5,42	1,80	8,73	5,32	2,50	8,87
	6. dan			7. dan			8. dan			9. dan			10. dan		
29	5,40	2,30	8,83	5,48	2,40	8,85	5,35	2,70	8,90	5,35	2,30	8,83	5,42	2,80	8,92
36	5,43	2,30	8,83	5,28	2,60	8,89	5,43	3,00	8,95	5,34	2,40	8,85	5,43	2,50	8,87
40	5,39	2,30	8,83	5,39	2,20	8,81	5,34	2,90	8,93	5,32	2,40	8,85	5,43	2,20	8,81
	11. dan			12. dan			13. dan			14. dan			15. dan		
29	5,40	2,50	8,87	5,20	3,50	9,00	5,67	4,00	9,07	5,51	3,50	9,00	5,34	3,20	8,98
36	5,47	2,10	8,79	5,37	2,30	8,83	5,44	2,40	8,85	5,37	2,60	8,89	5,39	2,50	8,87
40	5,36	1,90	8,75	5,35	2,00	8,77	5,36	2,10	8,79	5,39	2,10	8,79	5,40	2,30	8,83

Tablica 26. Rast sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) u TSB-u tijekom 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline u trajanju od 60 sekundi

soj	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml	pH	OD ₆₀₀	log ₁₀ CFU/ml
	1. dan			2. dan			3. dan			4. dan			5. dan		
29	6,03	0,10	7,47	5,60	2,70	8,90	5,40	2,60	8,89	5,46	2,40	8,85	5,70	3,10	8,96
36	6,60	0,20	7,77	5,66	2,70	8,90	5,32	2,50	8,87	5,46	2,60	8,89	5,62	2,80	8,92
40	6,12	0,10	7,47	5,50	2,00	8,77	5,52	2,10	8,79	5,42	2,40	8,85	5,30	2,50	8,87
	6. dan			7. dan			8. dan			9. dan			10. dan		
29	5,66	3,00	7,95	5,43	3,20	8,98	5,20	3,00	8,95	5,51	2,70	8,90	5,47	2,80	8,92
36	5,42	2,50	8,87	5,55	2,60	8,89	5,36	2,70	8,90	5,45	2,70	8,90	5,50	2,60	8,89
40	5,20	2,40	8,85	5,43	2,60	8,89	5,32	2,60	8,89	5,40	2,80	8,92	5,35	2,60	8,89
	11. dan			12. dan			13. dan			14. dan			15. dan		
29	5,56	3,00	7,95	5,82	3,20	8,98	5,64	2,70	8,92	5,38	2,70	8,90	5,62	2,80	8,92
36	5,40	2,80	8,93	5,55	2,90	8,93	5,20	2,60	8,89	5,30	2,50	8,87	5,39	2,60	8,89
40	5,40	2,70	8,90	5,60	2,80	8,92	5,40	2,80	8,92	5,55	2,60	8,89	5,37	2,40	8,85



Slika 26. Prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva *Y. enterocolitica* (N=3) u odnosu na izmjerene pH vrijednost bujona kroz 15 dana izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline (log₁₀ CFU/mL)



Slika 27. Prikaz prosječnog rasta izloženih sojeva *Y. enterocolitica* (N=3) u odnosu na izmjerene pH vrijednost bujona kroz 15 dana izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline (log₁₀ CFU/mL)

5.9. Promjene u osjetljivosti sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 na antibiotike nakon izlaganja organskim kiselinama

Tablica 27. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za pet antibiotika u sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline

antibiotik	soj	0. mic*	1. mic	2. mic	3. mic	4. mic	5. mic
ceftazdim S _≤ 1 R _{>} 4	29	0,064	0,047	0,047	0,016	0,016	0,023
	36	0,064	0,047	0,064	0,023	0,023	0,023
	40	0,047	0,032	0,032	0,016	0,023	0,016
cefotaksim S _≤ 1 R _{>} 2	29	0,023	0,016	0,016	0,012	0,006	0,016
	36	0,023	0,023	0,023	0,023	0,016	0,016
	40	0,016	0,012	0,016	0,012	0,023	0,008
tetraciklin 4 mg/L	29	1,5	0,75	0,75	0,75	0,75	1
	36	1	0,5	1,5	0,5	0,75	0,75
	40	1	0,5	0,5	0,75	0,5	0,5
gentamicin S _≤ 2 R _{>} 2	29	0,75	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5
	36	0,75	0,5	1	1	1,5	1
	40	0,75	0,5	0,5	1	0,5	1,5
ciprofloksacin S _≤ 0,25 R _{>} 0,5	29	0,047	0,047	0,047	0,064	0,064	0,047
	36	0,008	0,006	0,012	0,008	0,008	0,006
	40	0,004	0,003	0,004	0,006	0,094	0,004

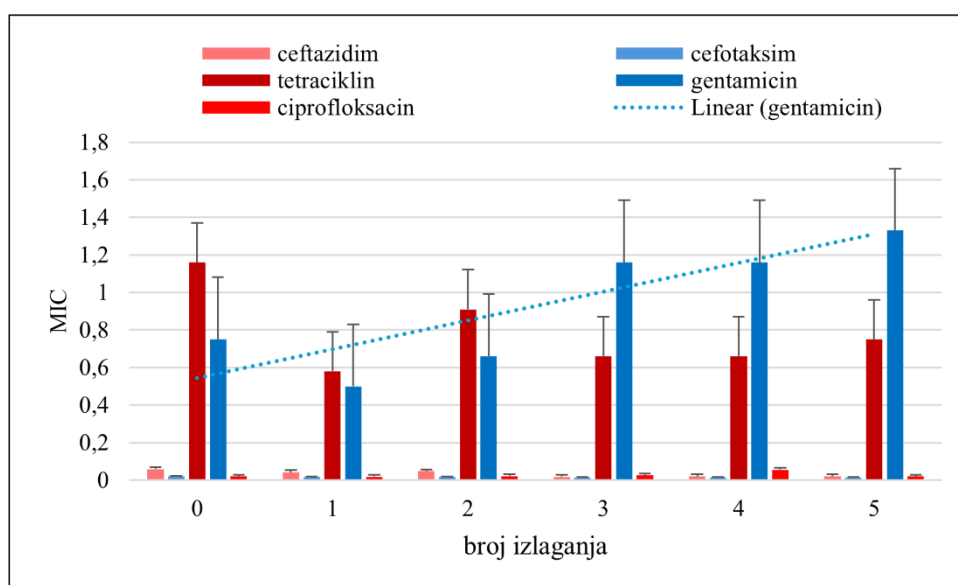
*MIC su određivani nakon svakog trećeg izlaganja kiselinu

Tablica 28. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) za pet antibiotika u sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline

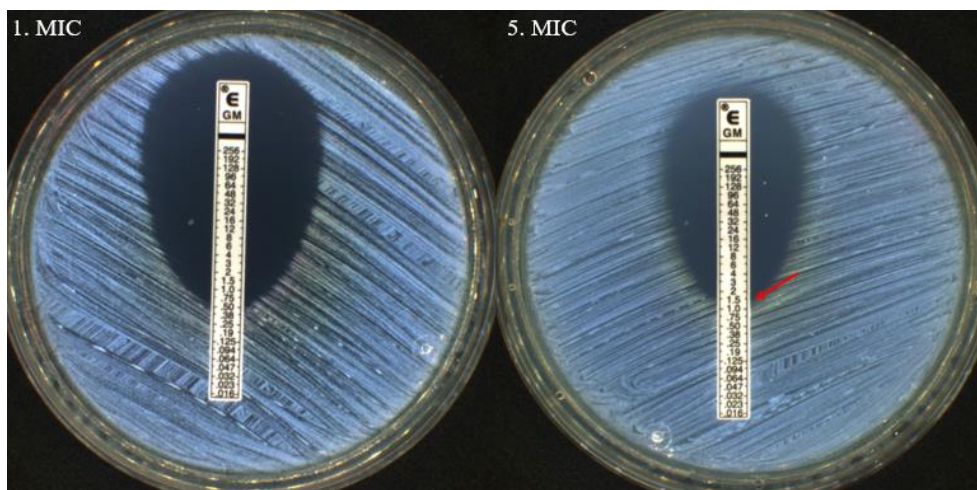
antibiotik	soj	0. mic*	1. mic	2. mic	3. mic	4. mic	5. mic
ceftazdim S _≤ 1 R _{>} 4	29	0,064	0,032	0,047	0,032	0,047	0,032
	36	0,064	0,047	0,047	0,032	0,064	0,047
	40	0,047	0,047	0,032	0,023	0,047	0,032
cefotaksim S _≤ 1 R _{>} 2	29	0,023	0,016	0,016	0,008	0,023	0,016
	36	0,023	0,032	0,032	0,023	0,032	0,023
	40	0,016	0,008	0,016	0,012	0,008	0,016
tetraciklin 4 mg/L	29	1,5	0,5	0,75	1	0,75	0,5
	36	1	1	1,5	0,75	1	1,5
	40	1	0,5	0,75	0,5	0,5	0,75
gentamicin S _≤ 2 R _{>} 2	29	0,75	0,5	0,5	1,5	0,75	0,75
	36	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75
	40	0,75	1	0,75	1,5	0,75	0,75
ciprofloksacin S _≤ 0,25 R _{>} 0,5	29	0,047	0,064	0,047	0,047	0,016	0,047
	36	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
	40	0,004	0,004	0,006	0,004	0,004	0,004

*MIC su određivani nakon svakog trećeg izlaganja kiselinu

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da ni jedan ispitivani soj nije stekao otpornost na antibiotike kao posljedica višekratnog izlaganja otopinama mliječne kiseline (Tablica 27). Dapače, u slučaju ponovljenih izlaganja mliječnoj kiselini, zabilježeno je neznatno smanjenje MIC-a za četiri antibiotika u odnosu na početne vrijednosti, što vodi pretpostavci da izlaganje kiselinama pospješuje učinkovitost tih antibiotika, ili u najmanju ruku ne vodi razvoju antimikrobne rezistencije (AMR). Ipak, to nije bio slučaj s gentamicinom čija se MIC povećala dvostruko, što naslućuje potencijalan rizik razvoja otpornosti na taj antibiotik u sojeva *Y. enterocolitica* izloženih otopinama mliječne kiseline (Slika 28 i 29). Nakon 15 izlaganja mliječnoj kiselini kritična MIC vrijednost od 2 mg/L, kada se bakterija smatra rezistentnom, nije bila dostignuta.

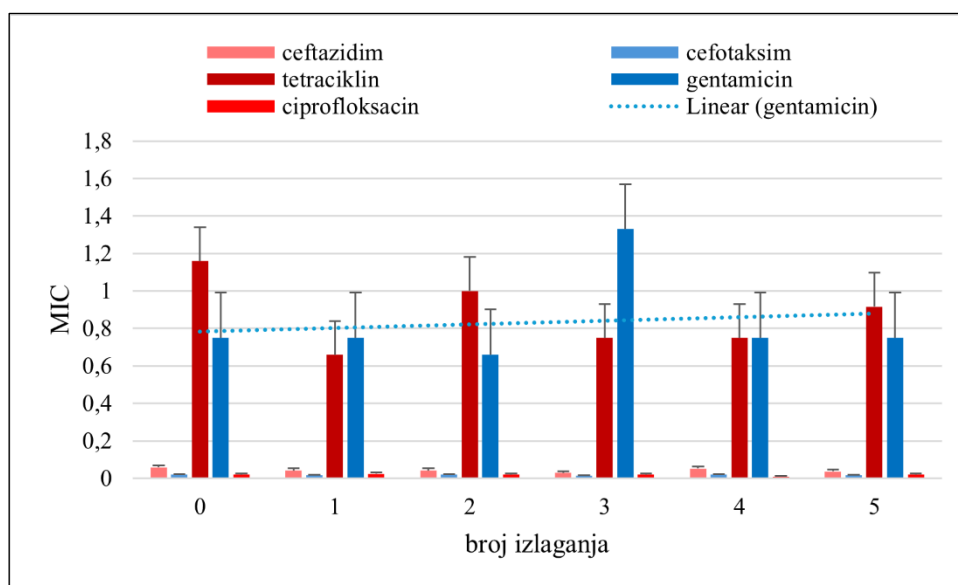


Slika 28. Prosječne vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) antibiotika (N=5) prema testiranim sojevima (N=3) nakon izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline ($\bar{x} \pm \text{SD}$)



Slika 29. Povećanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) od 0,5 (prvo testiranje; slika lijevo) do 1,5 (peto testiranje; slika desno) kod soja br. 40 nakon 15 izlaganja 2 %-tnoj otopini mliječne kiseline

Izlaganje sojeva 2 %-tnoj otopini octene kiseline kroz 15 ponavljanja nije dovelo do velikih odstupanja između izmjerenih MIC vrijednosti koje su se u slučaju svih pet antibiotika podjednako smanjivale/povećavale tijekom razdoblja mjerenja (Tablica 28). Za razliku od mliječne kiseline, u slučaju gentamicina nije zabilježeno povećanje krajnje MIC vrijednosti u odnosu na početnu (Slika 30).



Slika 30. Prosječne vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) antibiotika (N=5) prema testiranim sojevima (N=3) nakon izlaganja 2 %-tnoj otopini octene kiseline ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

5.10. Usporedba dekontaminacijskog učinka otopina organskih kiselina prema nestresiranim i stresiranim sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3

Tablicom 29 prikazan je usporedni učinak dekontaminacijskih protokola octenom i mliječnom kiselinom na odabrane sojeve *Y. enterocolitica* 4/O:3 (29, 36, 40) na svinjskom mesu (0. sat) nakon njihovog *in vitro* stresiranja 2 %-tnim otopinama istoimenih kiselina. U ponovljenom testiranju dekontaminacijskog učinka korišteni su protokoli koji su uključivali 2 % koncentraciju octene i mliječne kiseline (N=8) čime je ukupno provedeno 24 testiranja.

Tablica 29. Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola octenom i mliječnom kiselinom prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 (log₁₀ CFU/g; x±SD) na svinjskom mesu (0. sat) nakon prethodnog stresiranja 2 %-tnim otopinama navedenih kiselina *in vitro*

Dekontaminacijski protokol	Sojevi <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3			
	29	36	40	x±SD
1	K 4,06±0,07	4,20±0,00	4,17±0,01	
	T 3,85±0,00	3,89±0,04	4,11±0,01	
	R 0,21	0,31	0,06	0,19±0,12^a
3	K 4,06±0,07	4,20±0,00	4,17±0,01	
	T 3,75±0,00	3,58±0,09	3,59±0,08	
	R 0,31	0,62	0,58	0,50±0,16
5	K 4,11±0,00	4,23±0,00	4,16±0,04	
	T 3,55±0,12	3,75±0,05	3,57±0,09	
	R 0,56	0,48	0,59	0,54±0,05^a
7	K 4,11±0,00	4,22±0,00	4,16±0,04	
	T 3,34±0,02	3,61±0,02	2,92±0,11	
	R 0,77	0,61	1,24	0,87±0,32
9	K 3,96±0,00	4,08±0,03	4,10±0,07	
	T 3,74±0,04	3,47±0,05	3,86±0,09	
	R 0,22	0,61	0,24	0,35±0,21
11	K 4,34±0,01	4,08±0,03	4,10±0,07	
	T 3,32±0,09	3,41±0,02	3,64±0,02	
	R 1,02	0,67	0,46	0,71±0,28
13	K 4,01±0,06	4,26±0,00	4,31±0,01	
	T 3,66±0,02	3,71±0,03	3,63±0,04	
	R 0,35	0,55	0,68	0,52±0,16
15	K 4,01±0,06	4,26±0,00	4,31±0,01	
	T 3,58±0,02	3,44±0,04	2,90±0,03	
	R 0,43	0,82	1,41	0,88±0,49
x±SD	0,48±0,28	0,58±0,14	0,65±0,46	

*vrijednosti označene istim malim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

**usporedbe su provedene na istovjetnim protokolima koji su se razlikovali samo u jednom faktoru (vrsta kiseline; temperatura; vrijeme)

***1.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **3.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **5.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **7.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **9.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **11.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **13.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **15.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi

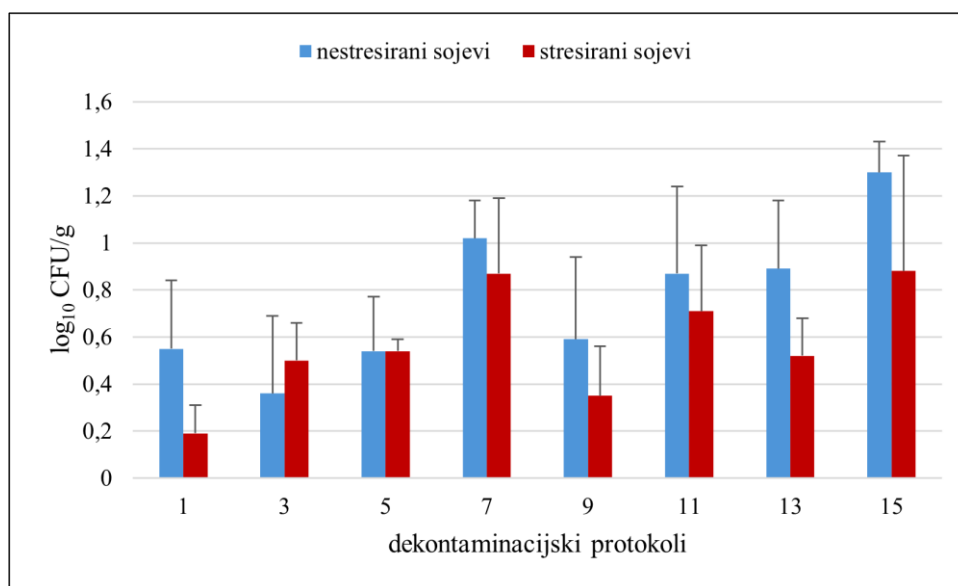
U više od 50 % provedenih testiranja (N=18), redukcija broja *Y. enterocolitica* 4/O:3 bila je manja u odnosu na redukcije dobivene istovjetnim dekontaminacijskim protokolima prilikom prve dekontaminacije (neadaptirani sojevi na kiseline), dok je kod 6 testiranja (25 %) bila veća od one dobivene nakon prvog pokusa (Tablica 30).

Tablica 30. Usporedba učinka dekontaminacijskih protokola octenom i mliječnom kiselinom (redukcije) prema nestresiranim i stresiranim sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$) na svinjskom mesu (0. sat)

Dekontaminacijski protokol	Sojevi <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3				
		29	36	40	x±SD
1	1. put	0,22	0,71	0,74	0,55±0,29
	2. put	0,21	0,31	0,06	0,19±0,12
	razlika	↓0,01	↓0,40	↓0,68	
3	1. put	0,03	0,38	0,69	0,36±0,33
	2. put	0,31	0,62	0,58	0,50±0,16
	razlika	↑0,28	↑0,24	↓0,11	
5	1. put	0,81	0,44	0,37	0,54±0,23
	2. put	0,56	0,48	0,59	0,54±0,05
	razlika	↓0,25	↑0,04	↑0,22	
7	1. put	0,97	0,89	1,21	1,02±0,16
	2. put	0,77	0,61	1,24	0,87±0,32
	razlika	↓0,20	↓0,28	↑0,03	
9	1. put	1,00	0,36	0,41	0,59±0,35
	2. put	0,22	0,61	0,24	0,35±0,21
	razlika	↓0,78	↑0,25	↓0,17	
11	1. put	1,27	0,83	0,52	0,87±0,37
	2. put	1,02	0,67	0,46	0,71±0,28
	razlika	↓0,25	↓0,16	↓0,06	
13	1. put	1,19	0,60	0,90	0,89±0,29
	2. put	0,35	0,55	0,68	0,52±0,16
	razlika	↓0,84	↓0,05	↓0,22	
15	1. put	1,18	1,29	1,45	1,30±0,13
	2. put	0,43	0,82	1,41	0,88±0,49
	razlika	↓0,75	↓0,47	↓0,04	

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi

Iz tablice 30 uočava se slabiji dekontaminacijski učinak protokola s kiselinama prema odabranim inokuliranim sojevima *Y. enterocolitica* koji su prethodno izlagani 2 %-tnim otopinama kiselina u tekućem hranilištu (adaptirani; stresirani), no bez statističke značajnosti ($p>0,05$) u odnosu na prvotnu dekontaminaciju mesa inokuliranog neadaptiranim sojevima. To je zabilježeno u 75 % protokola, dok je u 25 % ipak vidljiv bolji dekontaminacijski učinak prema predizlaganim sojevima (Slika 31). Kao i nakon prvog testiranja, nisu utvrđene statistički značajne razlike u redukciji među sojevima ($p>0,05$). Što se tiče razlika između pojedinih protokola, statistički veća redukcija ($p<0,05$) postignuta je primjenom vruće 2 %-tne otopine octene kiseline u trajanju od 10 sekundi u odnosu na primjenu hladne otopine pri istom vremenskom izlaganju (Tablica 29). Navedene razlike nisu bile značajne između navedenih protokola prilikom prvog testiranja. Isto tako, statistički veće redukcije postignute protokolima u kojima se koristila mliječna kiselina u odnosu na one s octenom kiselinom u ponovljenom testiranju nisu zabilježene ($p>0,05$). U više od 50 % slučajeva ($N=8$) razlike u redukcijama uočene prilikom prvog testiranja nisu bile zabilježene i ovim testiranjem na stresiranim sojevima.



Slika 31. Redukcije broja *Y. enterocolitica* nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline ($N=8$) na nestresiranim i stresiranim sojevima ($N=3$) ($\log_{10}$ CFU/g; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

5.11. Organoleptička ocjena mesa po završetku dekontaminacijskih protokola

Rezultati organoleptičke pretrage mesa nakon provedenih dekontaminacija otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode prikazani su u tablicama 31-35. Svi dekontaminacijski protokoli (N=20) ocijenjeni su od strane ocjenjivača ocjenama u rasponu od 1-5, a dodijeljeni bodovi zbrojeni te prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD, za svaki od ispitivanih parametara (boja, miris, tekstura, okus i cjelokupni dojam). Organoleptička ocjena mesa nakon dekontaminacijskih protokola uspoređena je s kontrolnim (netretiranim) uzorkom. Prosječne ocjene ispitivanih parametara ovisno o vrsti dekontaminacijskog sredstva prikazane su grafički u formi "paukove mreže" (Slika 32). Izgled tretiranog mesa prema pojedinim protokolima prikazan je na slikama 33a-35.

Tablica 31. Rezultati ocjene boje mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($\bar{x} \pm SD$)

Dekontaminacijski protokol	ocjenjivači					$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00 ^{ab}
1	5	5	3	5	4	4,40±0,89
2	4	3	2	4	4	3,40±0,89
3	4	4	3	4	4	3,80±0,44
4	4	4	3	4	4	3,80±0,44
5	3	4	2	3	4	3,20±0,83
6	3	3	2	3	4	3,00±0,70
7	3	3	2	3	3	2,80±0,44 ^a
8	2	2	1	1	3	1,80±0,83 ^b
$\bar{x} \pm SD$						3,27±0,78^A
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
9	5	5	5	5	5	5,00±0,00
10	5	5	5	5	5	5,00±0,00
11	5	5	5	5	5	5,00±0,00
12	4	4	5	4	5	4,40±0,54
13	3	4	5	3	4	3,80±0,83
14	3	4	5	3	4	3,80±0,83
15	2	4	3	3	3	3,00±0,70
16	2	4	4	3	3	3,20±0,83
$\bar{x} \pm SD$						4,15±0,81^A
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00 ^c
17	5	5	5	5	5	5,00±0,00
18	5	5	5	5	4	4,80±0,44
19	5	5	5	5	4	4,80±0,44
20	3	3	3	2	2	2,60±0,54 ^c
$\bar{x} \pm SD$						4,30±1,13

*vrijednosti označene istim malim i velikim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 17. voda; 25 °C; 10 sekundi; 18. voda; 25 °C; 30 sekundi; 19. voda; 80 °C; 10 sekundi; 20. voda; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 32. Rezultati ocjene mirisa mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($\bar{x} \pm SD$)

Dekontaminacijski protokol	ocjenjivači					$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00 ^{ab}
1	4	4	4	4	4	4,00±0,00
2	3	4	4	4	4	3,80±0,44
3	3	4	4	4	4	3,80±0,44
4	3	4	5	3	4	3,80±0,83
5	3	4	5	3	4	3,80±0,83
6	3	3	4	4	4	3,60±0,54
7	3	3	3	3	2	2,80±0,44 ^a
8	2	3	3	3	1	2,40±0,89 ^b
$\bar{x} \pm SD$						3,50±0,57^{AB}
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
9	5	5	5	5	5	5,00±0,00
10	5	5	4	5	5	4,80±0,44
11	5	5	5	5	5	5,00±0,00
12	4	5	4	4	5	4,40±0,54
13	3	4	4	4	4	3,80±0,44
14	3	4	4	3	4	3,60±0,54
15	2	4	5	4	4	3,80±1,09
16	2	4	5	3	3	3,40±1,14
$\bar{x} \pm SD$						4,22±0,65^A
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
17	5	5	5	5	5	5,00±0,00
18	5	5	5	5	4	4,80±0,44
19	5	5	5	5	4	4,80±0,44
20	5	5	5	5	4	4,80±0,44
$\bar{x} \pm SD$						4,85±0,10^B

*vrijednosti označene istim malim i velikim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 17. voda; 25 °C; 10 sekundi; 18. voda; 25 °C; 30 sekundi; 19. voda; 80 °C; 10 sekundi; 20. voda; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 33. Rezultati ocjene teksture mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($\bar{x} \pm SD$)

Dekontaminacijski protokol	ocjenjivači					$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
1	5	5	5	5	5	5,00±0,00
2	5	5	4	5	5	4,80±0,44
3	5	5	5	5	5	5,00±0,00
4	5	5	5	5	5	5,00±0,00
5	4	4	3	4	4	3,80±0,44
6	4	3	3	3	4	3,40±0,54
7	3	3	2	3	4	3,00±0,70
8	3	3	2	2	3	2,60±0,54
$\bar{x} \pm SD$						4,00±1,13
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
9	5	5	5	5	5	5,00±0,00
10	5	5	5	5	5	5,00±0,00
11	5	5	5	5	5	5,00±0,00
12	5	5	5	5	5	5,00±0,00
13	4	4	5	4	4	4,20±0,44
14	4	5	4	4	4	4,20±0,44
15	3	4	4	4	3	3,60±0,54
16	3	4	4	3	3	3,40±0,54
$\bar{x} \pm SD$						4,42±0,67
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
17	5	5	5	5	5	5,00±0,00
18	5	5	5	5	5	5,00±0,00
19	5	5	5	5	5	5,00±0,00
20	5	3	5	3	4	4,00±1,00
$\bar{x} \pm SD$						4,75±0,50

*1. 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 2. 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 3. 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 4. 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 5. 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 6. 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 7. 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 8. 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 9. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 10. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; 11. 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 12. 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; 13. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 14. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; 15. 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 16. 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; 17. voda; 25 °C; 10 sekundi; 18. voda; 25 °C; 30 sekundi; 19. voda; 80 °C; 10 sekundi; 20. voda; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 34. Rezultati ocjene okusa mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($\bar{x} \pm SD$)

Dekontaminacijski protokol	ocjenjivači					$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00 ^a
1	5	5	5	5	5	5,00±0,00
2	5	5	5	5	5	5,00±0,00
3	5	5	5	5	4	4,80±0,44
4	5	5	5	5	4	4,80±0,44
5	4	4	5	4	3	4,00±0,70
6	4	4	4	4	4	4,00±0,00
7	3	4	4	3	3	3,40±0,54
8	2	3	4	3	1	2,60±1,14 ^a
$\bar{x} \pm SD$						4,20±0,86
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
9	5	5	5	5	5	5,00±0,00
10	5	5	5	5	5	5,00±0,00
11	5	5	5	5	5	5,00±0,00
12	5	4	5	5	5	4,80±0,44
13	5	4	5	4	5	4,60±0,54
14	5	4	5	5	5	4,80±0,44
15	5	4	5	4	5	4,60±0,54
16	5	4	4	4	4	4,20±0,44
$\bar{x} \pm SD$						4,75±0,27
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
17	5	5	5	5	5	5,00±0,00
18	5	5	5	5	4	4,80±0,44
19	5	5	5	5	4	4,80±0,44
20	5	5	5	5	4	4,80±0,44
$\bar{x} \pm SD$						4,85±0,10

*vrijednosti označene istim malim i velikim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

***1.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **2.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **3.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **4.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **5.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **6.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **7.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **8.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **9.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **10.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **11.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **12.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **13.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **14.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **15.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **16.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **17.** voda; 25 °C; 10 sekundi; **18.** voda; 25 °C; 30 sekundi; **19.** voda; 80 °C; 10 sekundi; **20.** voda; 80 °C; 30 sekundi

Tablica 35. Rezultati ocjene ukupnog dojma mesa nakon provedene dekontaminacije otopinama mliječne kiseline, octene kiseline i vode ($\bar{x} \pm SD$)

Dekontaminacijski protokol	ocjenjivači					$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00 ^{ab}
1	5	5	4	5	5	4,80±0,44
2	4	4	4	4	5	3,80±0,44
3	4	4	5	4	4	3,80±0,44
4	4	4	4	4	4	4,00±0,00
5	4	4	3	4	4	3,80±0,44
6	4	3	3	3	4	3,40±0,54
7	3	3	3	3	3	3,00±0,00 ^a
8	2	2	3	3	2	2,40±0,54 ^b
$\bar{x} \pm SD$						3,62±0,71^A
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
9	5	5	5	5	5	5,00±0,00
10	5	5	5	5	5	5,00±0,00
11	5	5	5	5	5	5,00±0,00
12	5	5	5	5	5	5,00±0,00
13	4	4	5	4	4	3,80±0,44
14	4	4	4	4	4	4,00±0,00
15	3	4	4	3	4	3,60±0,54
16	3	4	4	3	3	3,40±0,54
$\bar{x} \pm SD$						4,35±0,71
kontrola	5	5	5	5	5	5,00±0,00
17	5	5	5	5	5	5,00±0,00
18	5	5	5	5	4	4,80±0,44
19	5	5	5	5	4	4,80±0,44
20	4	4	4	4	3	3,80±0,44
$\bar{x} \pm SD$						4,60±0,54^A

*vrijednosti označene istim malim i velikim slovima u istom stupcu statistički se razlikuju na razini 0,05

***1.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **2.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **3.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **4.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **5.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **6.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **7.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **8.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **9.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **10.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **11.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **12.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **13.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **14.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **15.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **16.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **17.** voda; 25 °C; 10 sekundi; **18.** voda; 25 °C; 30 sekundi; **19.** voda; 80 °C; 10 sekundi; **20.** voda; 80 °C; 30 sekundi

Uzimajući u obzir parametar boje mesa (Tablica 31) nakon dekontaminacijskih protokola octenom kiselinom, najmanji prosječni broj bodova ($1,80 \pm 0,83$) u odnosu na kontrolni uzorak dodijeljen je uzorku mesa tretiranom vrućom 4 %-tnom otopinom octene kiseline u trajanju od 30 sekundi ($p < 0,05$). Što se tiče protokola u kojima je korištena mliječna kiselina, senzorički najlošije ocjenjeno meso bilo je nakon provedenih dekontaminacija pomoću vrućih 2 %- i 4 %-tnih otopina kiseline tijekom duljeg izlaganja, no bez značajne razlike u odnosu na kontrolni uzorak ($p > 0,05$). Isto kao i kod octene kiseline, najlošije ocjenjena boja mesa ($2,60 \pm 0,54$) bila je kod uzorka tretiranog vrućom vodom u trajanju od 30 sekundi ($p < 0,05$). Promatrajući prosjek dobivenih ocjena za svaku kiselinu, protokoli s octenom kiselinom ocjenjeni su manjim brojem bodova ($3,27 \pm 0,78$) u odnosu na one s mliječnom kiselinom ($4,15 \pm 0,81$) ($p < 0,05$).

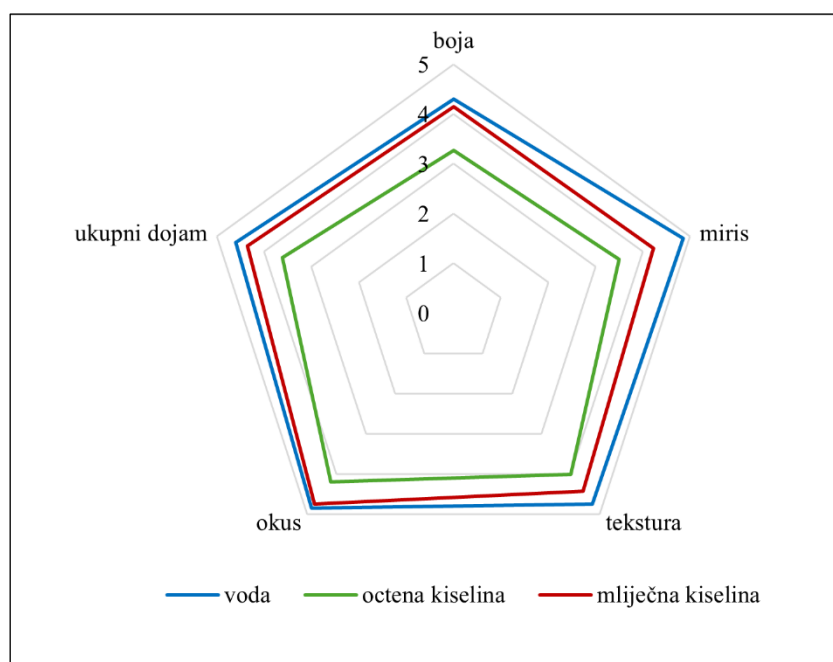
Ocjenjujući parametar mirisa (Tablica 32), najmanji prosječni broj bodova ($2,40 \pm 0,89$) dodijeljen je uzorku mesa tretiranom vrućom 4 %-tnom otopinom octene kiseline u trajanju od 30 sekundi ($p < 0,05$). Za razliku od toga, unutar dekontaminacijskih protokola pomoću mliječne kiseline i vode, miris testnih uzoraka mesa nije se značajno razlikovao od onoga procjenjenog na netretiranim uzorcima ($p > 0,05$). I u ovom slučaju su protokoli s octenom kiselinom najniže ocjenjeni u odnosu na protokole s mliječnom kiselinom i vodom ($p < 0,05$).

Pri evaluaciji teksture mesa nakon provedenih dekontaminacija octenom kiselinom (Tablica 33), i u ovom slučaju je najmanji broj bodova ($2,00 \pm 0,54$) dodjeljen uzorku mesa tretiranom vrućom 4 %-tnom otopinom octene kiseline u trajanju od 30 sekundi, no bez značajne razlike u odnosu na ostale uzorke ($p > 0,05$). U promatranom parametru nisu utvrđene značajne razlike ni nakon tretiranja mliječnom kiselinom kao ni vodom, iako su najniže ocjenjeni uzorci bili nakon dulje dekontaminacije vrućim otopinama.

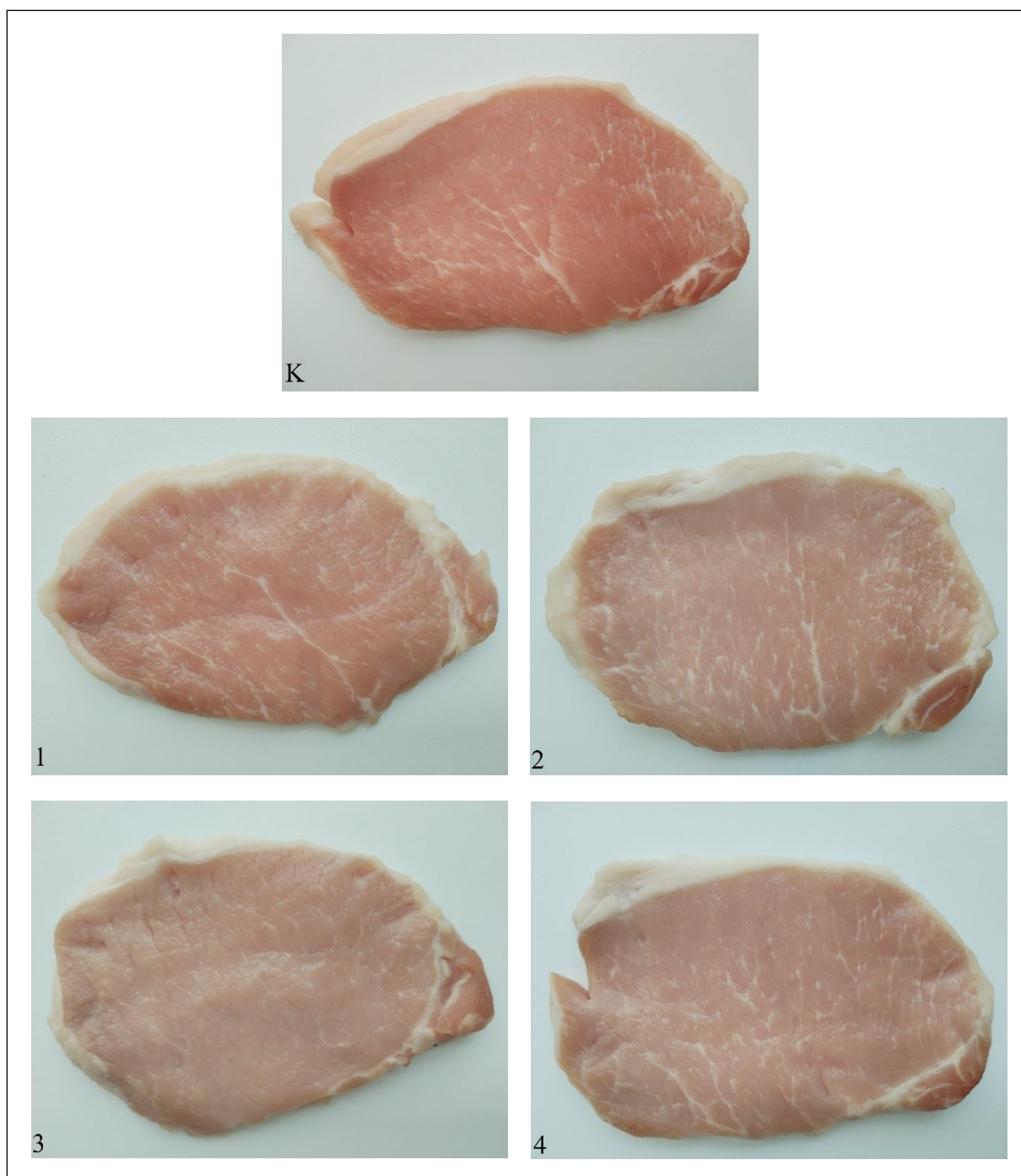
Što se tiče parametra okusa (Tablica 34), statistički značajne razlike su uočene na uzorcima mesa tretiranim otopinama octene kiseline i to nakon dekontaminacije vrućom 4 %-tnom otopinom octene kiseline u trajanju od 30 sekundi ($p < 0,05$) pri čemu je dominirao "kiseli/octeni" okus mesa. U slučaju mliječne kiseline i vode, dodjeljene ocjene su bile veće te nije uočena značajna razlika u okusu u odnosu na kontrolni uzorak ($p > 0,05$).

Ocjenjujući ukupni dojam mesa (Tablica 35) nakon provedenih dekontaminacija octenom kiselinom, a sukladno prethodnim rezultatima, najmanje su ocjene zabilježene nakon dekontaminacije vrućom 2 %- i 4 %-tnom otopinom octene kiseline u trajanju od 30 sekundi ($p < 0,05$), a isto je zabilježeno i u slučaju mliječne kiseline i vode, no bez značajne razlike u odnosu na kontrolni uzorak ($p > 0,05$).

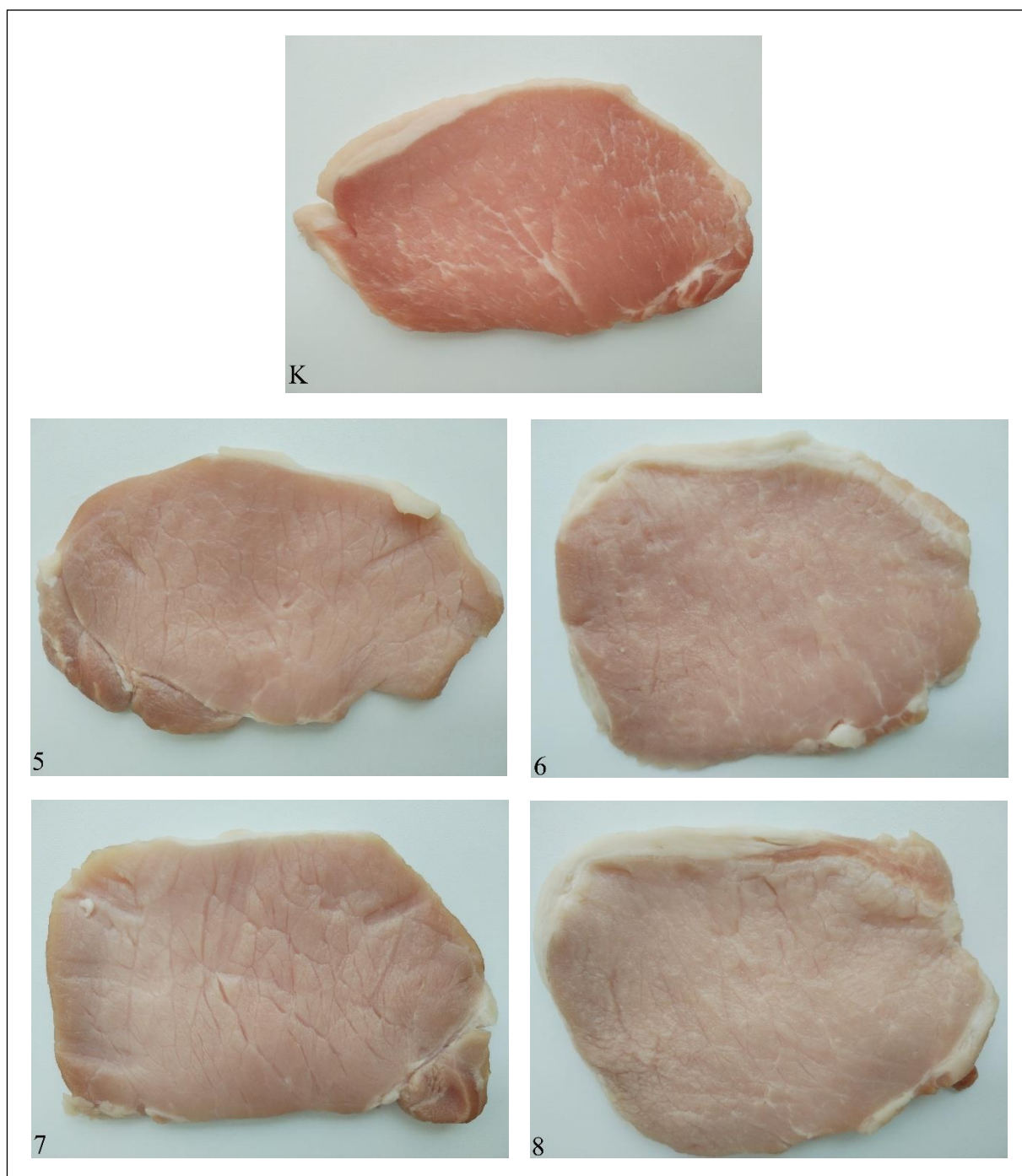
Najveći prosječni broj bodova dodjeljen je protokolima provedenim s vodom, dok je najmanji protokolima sa octenom kiselinom ($p < 0,05$).



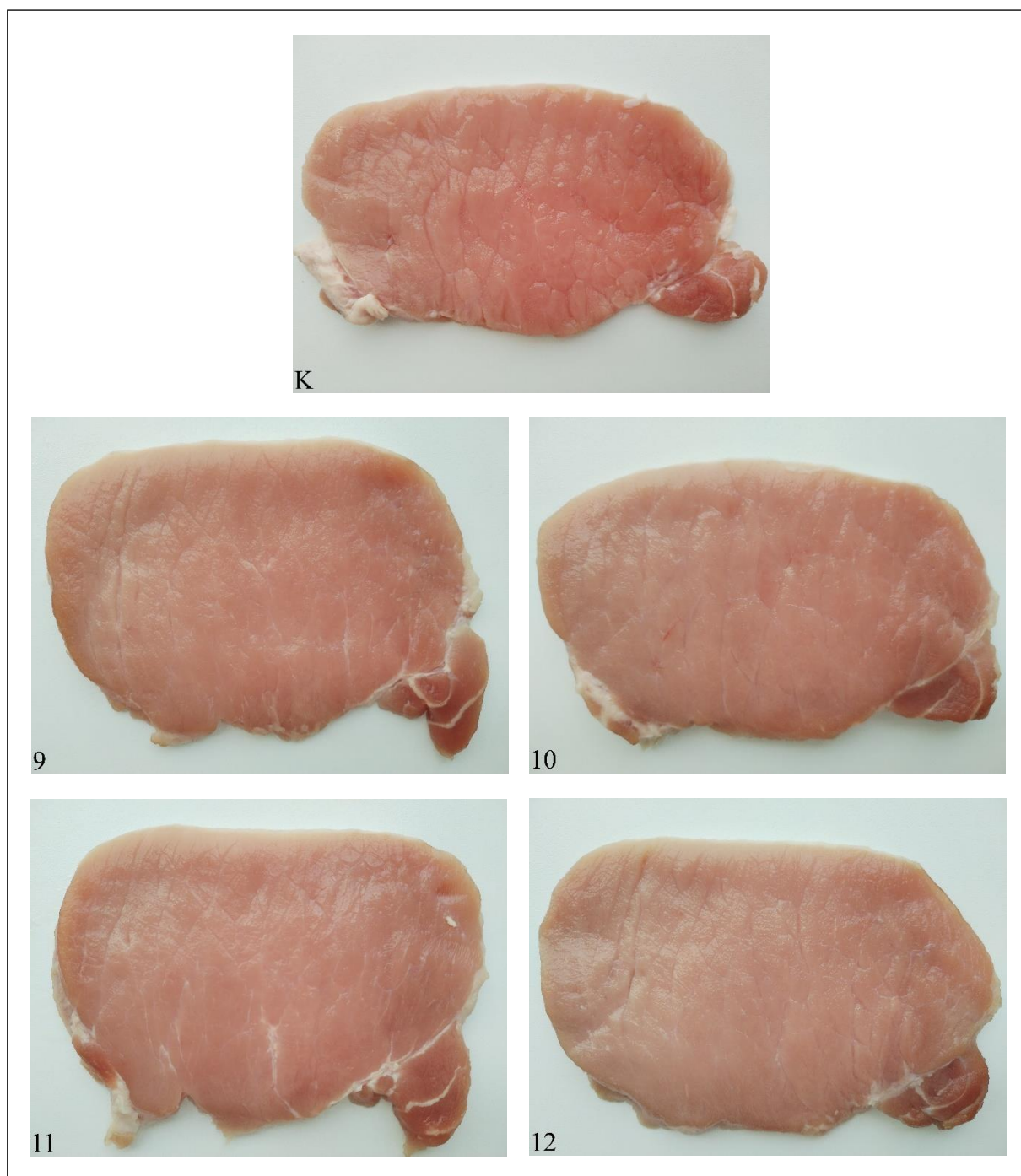
Slika 32. Grafički prikaz organoleptičke procjene mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola otopinama organskih kiselina i vodom (N=20)



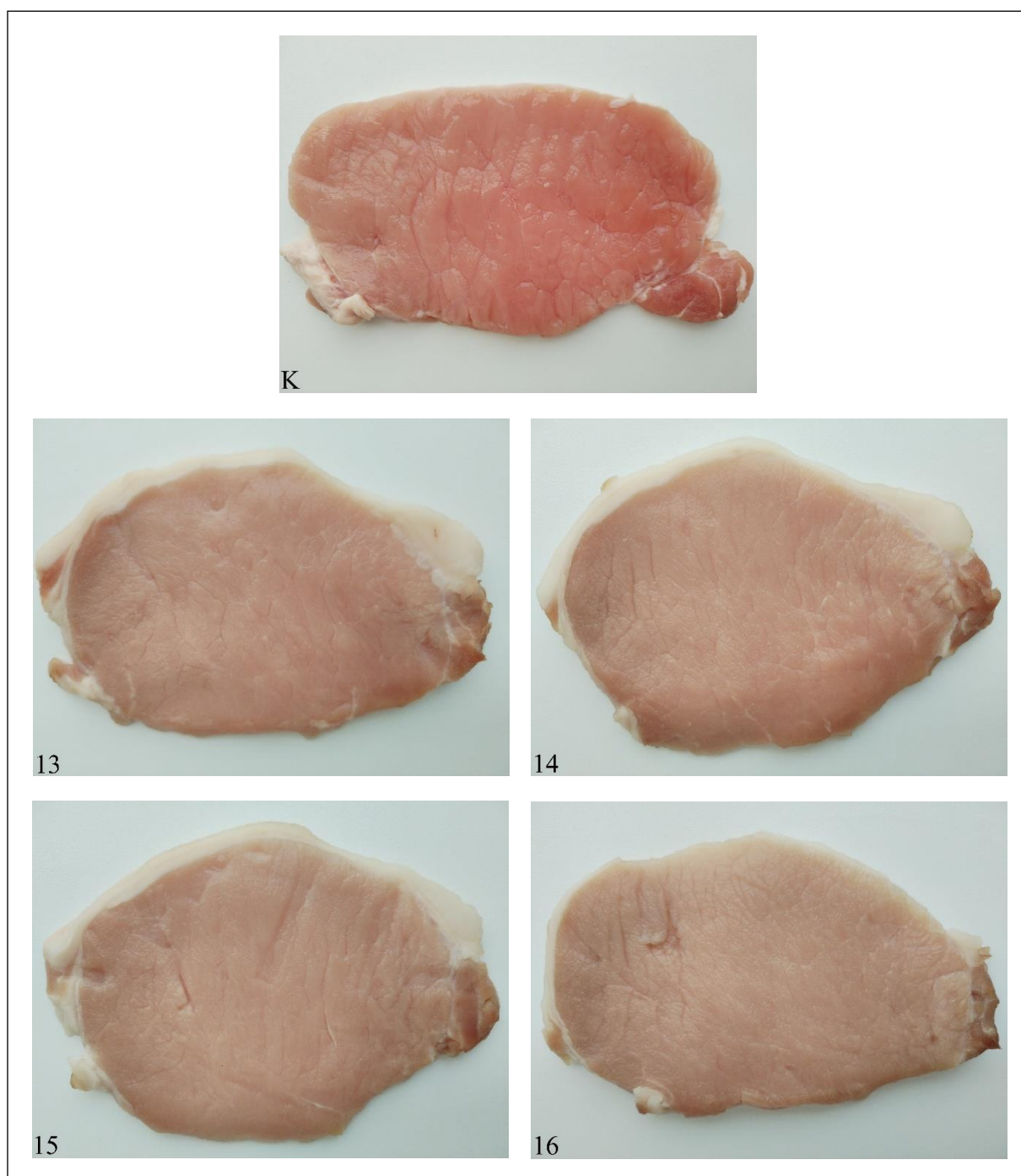
Slika 33a. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline (**K.** kontrola; **1.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **2.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **3.** 2 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **4.** 4 % octena kiselina; 25 °C; 30 sekundi)



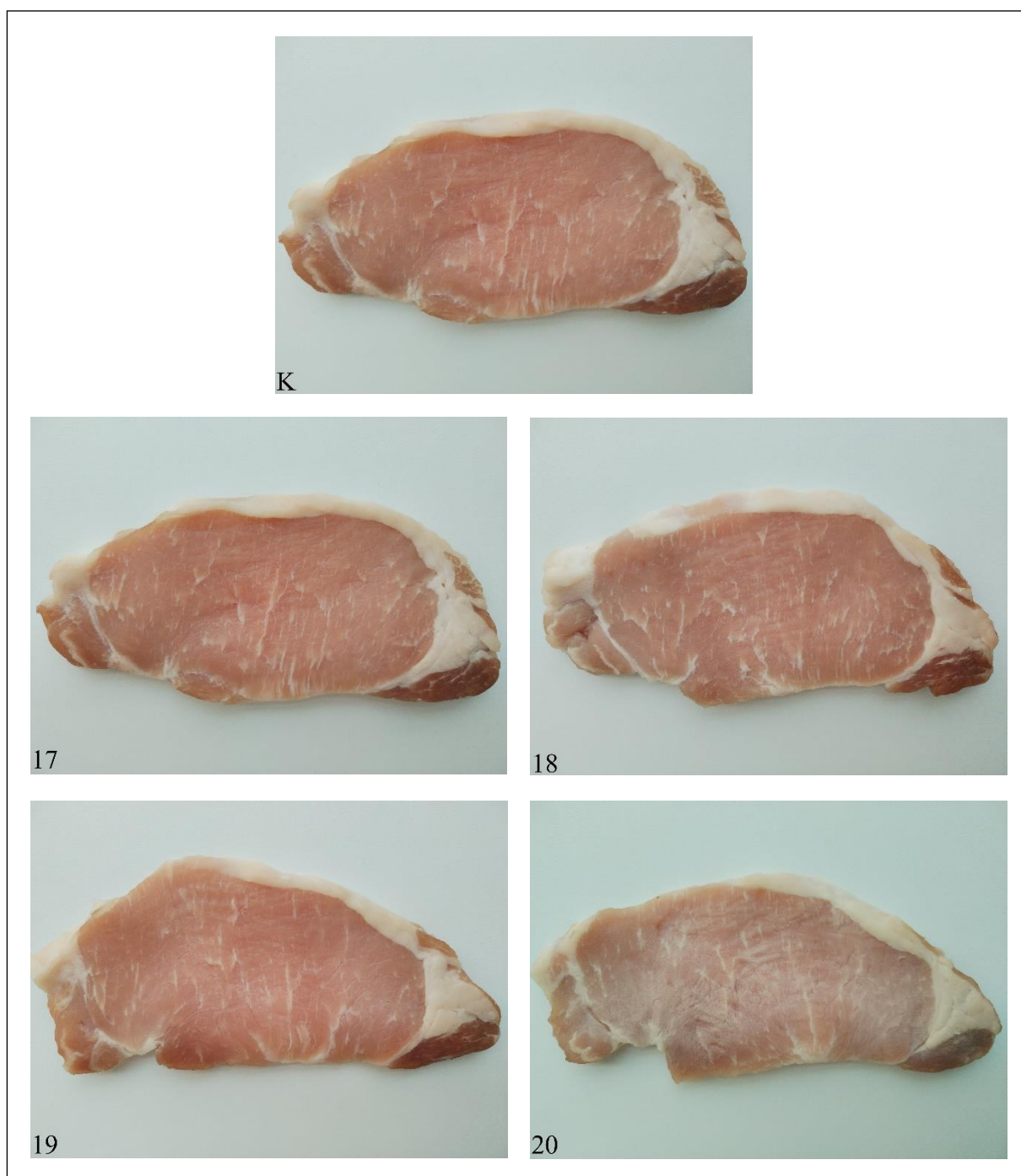
Slika 33b. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama octene kiseline (**K.** kontrola; **5.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **6.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **7.** 2 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **8.** 4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi)



Slika 34a. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline (**K.** kontrola; **9.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **10.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 10 sekundi; **11.** 2 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi; **12.** 4 % mliječna kiselina; 25 °C; 30 sekundi)

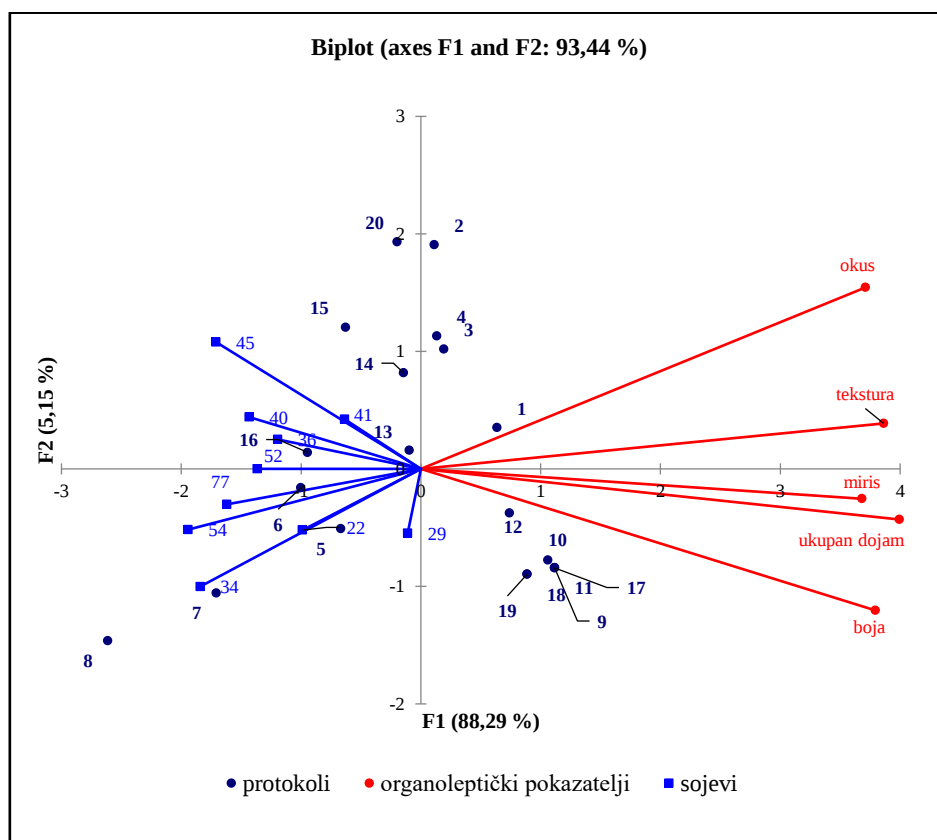


Slika 34b. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s otopinama mliječne kiseline (**K.** kontrola; **13.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **14.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 10 sekundi; **15.** 2 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi; **16.** 4 % mliječna kiselina; 80 °C; 30 sekundi)



Slika 35. Izgled tretiranog mesa nakon provedbe dekontaminacijskih protokola s vodom (**K.** kontrola; **17.** 25 °C; 10 sekundi; **18.** 25 °C; 30 sekundi; **19.** 80 °C; 10 sekundi; **20.** 80 °C; 30 sekundi)

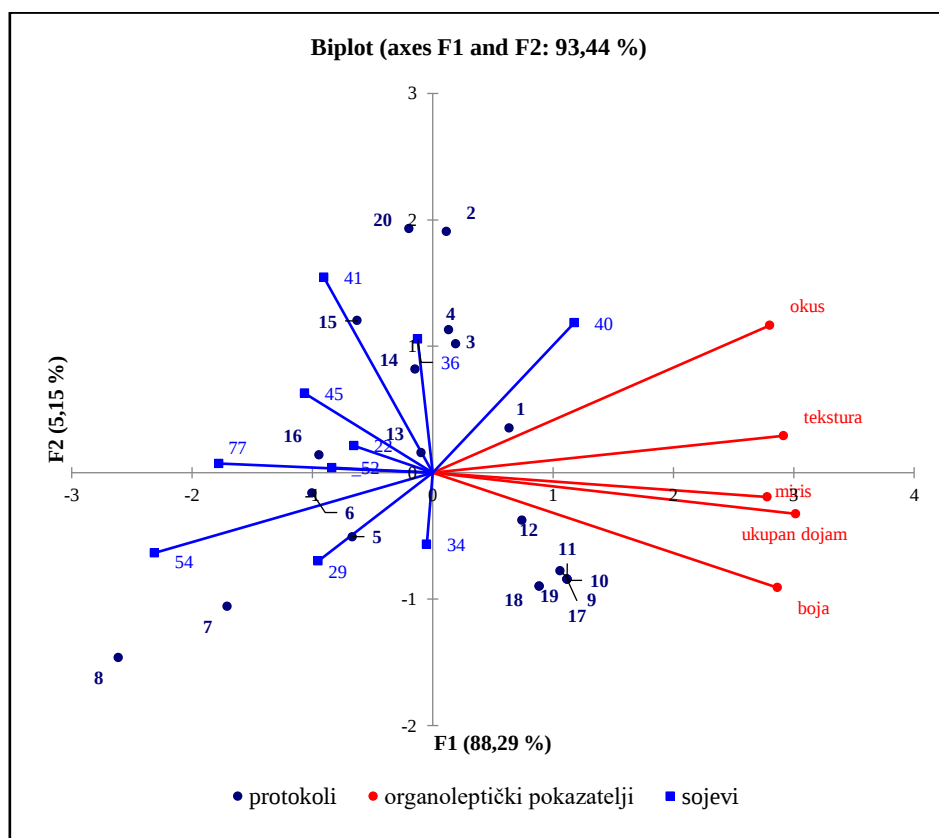
5.12. Analiza utjecaja provedenih dekontaminacijskih protokola na organoleptička svojstva mesa



Slika 36. Biplot dijagram PCA analize povezanosti dekontaminacijskih protokola (N=20) i organoleptičkih svojstava mesa 0. sat

Na slici 36. prikazana je projekcija protokola (redukcije 0. sat) u prostor određen prvim dvjema glavnim komponentama označenim na grafu s F1 i F2. Glavne komponente F1 i F2 objašnjavaju 93,44 % varijance između podataka za sve uzorke. Na dijagramu se primjećuje tendencija grupiranja protokola temeljem korištene vrste organske kiseline te temperature njezine primjene. Tako su protokoli u kojima su primjenjene vruće otopine temperature 80 °C grupirani unutar lijeve strane koordinatnog prikaza naglašavajući time najveći utjecaj na negativna organoleptička svojstva mesa. Pritom su protokoli s vrućom otopinom mliječne kiseline (oznake 13, 14, 15 i 16) smješteni u drugom kvadrantu zajedno sa protokolom br. 20 (primjena vruće vode u trajanju od 30 sekundi) dok su istovjetni s octenom kiselinom grupirani unutar trećeg kvadranta. Sukladno tome, protokoli u kojima su korištene hladne otopine organskih kiselina smješteni su u desnom dijelu prikaza pri čemu su na isti način prva četiri (primjena hladnih otopina octene kiseline) zauzeli prvi kvadrant dok su se istovjetni protokoli

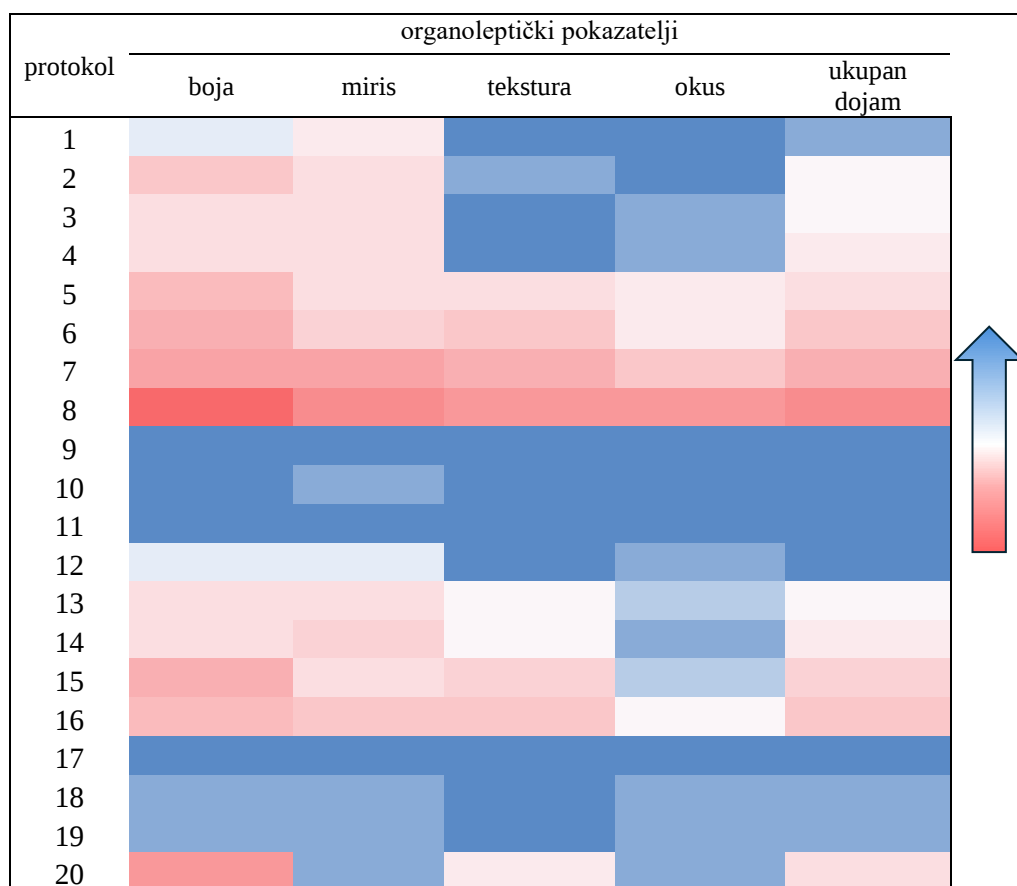
s mliječnom kiselinom grupirali unutar četvrtog kvadranta zajedno s preostalim protokolima u kojima je korištena voda (oznake 17, 18 i 19) čime su pokazali najmanji utjecaj na negativna organoleptička svojstva mesa. Na slici 37. prikazani su isti međuodnosi, no s podacima redukcija izmjerenima nakon 24 sata. Na dijagramu je vidljiv isti trend grupiranja protokola kao i na prethodnom grafu te je također obuhvaćen visoki postotak (93,44 %) varijance između podataka.



Slika 37. Biplot dijagram PCA analize povezanosti dekontaminacijskih protokola (N=20) i organoleptičkih svojstava hladenog mesa 24. sat

S ciljem vizualizacije sličnosti/razlika ocjenjenih organoleptičkih svojstava između pojedinih dekontaminacijskih protokola, na slici 38. prikazana je toplinska mapa (engl. *heatmap*) koja sličnosti odnosno razlike u ocjeni pojedinog organoleptičkog svojstva prikazuje varijacijama u intenzitetu boja pri čemu su najniže ocjene označene tamnocrvenom bojom, a gradacijom preko svjetlijih boja prikazuju se bolje ocjene sve do onih najviših (tamnoplava boja). Iz prikaza je vidljiva zastupljenost crvene boje unutar prvih osam protokola koji uključuju primjenu otopina octene kiseline, a nijanse postupno gradiraju pa je tako kod protokola br. 8 dominantna najtamnija boja u svim pokazateljima, a najviše kod parametra boja.

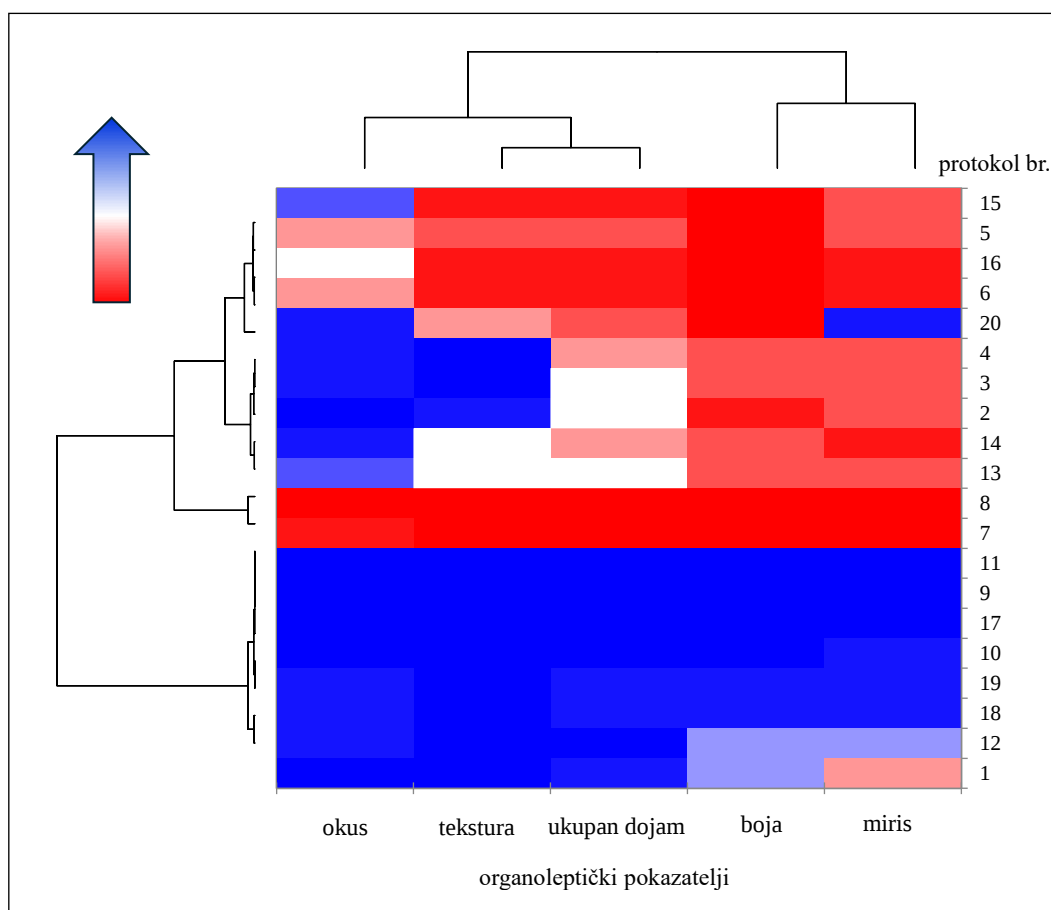
S druge strane, protokoli s mliječnom kiselinom (9-16) uključuju podjednaku zastupljenost obje boje od kojih kod prva četiri (primjena hladnih otopina) dominira plava boja. Za razliku od protokola br. 8 (4 % octena kiselina; 80 °C; 30 sekundi), u istovjetnom protokolu s mliječnom kiselinom (br. 16) prevladava svjetlija nijansa crvene boje. U protokolima s vodom uočljiva je zastupljenost plave nijanse s najvećim odstupanjima u slučaju primjene vruće vode tijekom duljeg izlaganja što je vidljivo i prikazom PCA analiza. Razmatrajući varijacije u nijansama između promatranih organoleptičkih svojstava, parametri boje i mirisa imali su veću ulogu u procjeni cjelokupnog utjecaja dekontaminacije, u odnosu na parametre teksture i okusa.



Slika 38. Toplinska mapa ocjena organoleptičkih svojstava mesa (N=5) ovisno o provedenom dekontaminacijskom protokolu (N=20)

Na slici 39 prikazan je dendrogram (grupiranje) dekontaminacijskih protokola ovisno o organoleptičkoj ocjeni mesa, a sličnost/razlike su vidljive na isti način kroz prikaz dvije boje, odnosno varijacije u njihovom intenzitetu. Sukladno prethodnoj PCA analizi, grupa protokola u kojima je dominantna crvena boja s pripadajućim nijansama obuhvaća one smještene na lijevoj strani koordinatnog prikaza koje su i imale najveći utjecaj na organoleptička svojstva.

Svi oni uključivali su primjenu vrućih otopina što upućuje na važnost temperature kao presudnog faktora u promatranom skupu. Što se tiče vrste kiseline, iz prikaza je jasan negativniji utjecaj octene kiseline u odnosu na mliječnu kiselinu. Većina protokola koja je PCA analizom grupirana na desnoj koordinatnog prikaza ovdje je označena plavom bojom i to najtamnijom nijansom čime ukazuju na minimalni utjecaj na promatrana svojstva. Temeljem sličnosti u pokazateljima, unutar obje skupine protokoli su grupirani (dendrogrami) ovisno o razini sličnosti pri čemu se dodatno uočava razlika između navedenih skupina. Isto je vidljivo i prilikom grupiranja organoleptičkih svojstava u kojima se parametri boje i mirisa izdvajaju od ostalih.



Slika 39. Toplinska mapa sa dendrogramima dekontaminacijskih protokola (N=20) temeljem organoleptičke ocjene dekontaminiranog mesa

6. RASPRAVA

Mikrobiološki status životinjskih trupova nakon klaoničke obrade, kao i porcioniranog mesa, jedan je od osnovnih preduvjeta osiguravanja zdravstveno ispravne sirovine. U kontekstu mikrobiološke ispravnosti, naglasak je primarno na patogenim bakterijama poput *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* te *E. coli* čija zastupljenost je ponajviše uvjetovana vrstom životinje, odnosno mesa. Tako se u inspekciji mesa svinja *Salmonella* spp. i *Y. enterocolitica* navode kao prioritetne biološke opasnosti, temeljem njihove pojavnosti u svinja, potvrđenih slučajeva oboljenja ljudi te provedenih epidemioloških studija (ALVSEIKE i sur., 2018.). Za razliku od *Salmonella* spp., za *Y. enterocolitica* u većini zemalja i dalje ne postoje nacionalni programi kontrole unatoč uzlaznom broju prijavljenih slučajeva jersinioze (EFSA i ECDC, 2024.). Svinje su među najučestalijim asimptomatskim nosiocima patogenih sojeva ove bakterije koji koloniziraju primarno tonzile, limfne čvorove te crijeva (FOIS i sur., 2018.; ANGELOVSKA i sur., 2023.; YUE i sur., 2023.). S tim u vezi, klaonička obrada svinja smatra se ključnom fazom u prevenciji kontaminacije trupa, a time i ulaska *Y. enterocolitica* u daljnji lanac proizvodnje svinjskog mesa koje se smatra glavnim izvorom infekcije za ljude. Dosadašnje intervencijske metode usmjerene na sprječavanje generalne kontaminacije trupa, a koje su svakako doprinijele nižoj prevalenciji *Y. enterocolitica* na mesu, uključivale su većinom postupke poput podvezivanja rektuma, vizualnog pregleda limfatičnog tkiva bez zarezivanja kao i odvajanja tonzila od ostatka trupa. Ipak, ni one zajedno najčešće nisu dovoljne za potpunu eliminaciju rizika, imajući na umu visoku prevalenciju *Y. enterocolitica* u tonzilama kao i psihrotrofnost bakterije koja joj i u uvjetima hlađenja omogućuje preživljavanje. Imajući na umu znanstveno mišljenje EFSE (EFSA, 2018.) u kojem se po uzoru na goveđe trupove (ANONIMNO, 2013.) preispituje dekontaminacijski potencijal organskih kiselina u smanjenju površinskog mikrobiološkog onečišćenja svinjskih trupova, svrha ovog istraživanja bila je ispitati učinkovitost organskih kiselina prema *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu s ciljem moguće primjene u praksi. Naime, u gore spomenutom mišljenju *Y. enterocolitica* je istaknuta kao patogena bakterija od interesa u inspekciji mesa svinja, dok je pretražena znanstvena literatura ukazala na manjkavost istraživanja kojima je ista obuhvaćena, za razliku od primjerice *Salmonella* spp.

U ovom istraživanju dekontaminacijski potencijal mliječne kiseline i octene kiseline ispitivan je prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 izoliranima iz tonzila svinja iz prethodnog istraživanja (PAŽIN, 2021.) koje je i potvrdilo visoku prevalenciju (>40 %) patogenih sojeva *Y. enterocolitica* u populaciji svinja u Hrvatskoj. Većina dosadašnjih istraživanja s tematikom

kemijske dekontaminacije trupova svinja obuhvaćala je u najvećoj mjeri primjenu otopina mliječne kiseline (CHRISTIANSEN i sur., 2009.; MORILD i sur., 2010.; GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.; BRUSTOLIN i sur., 2014.) ili kombinaciju s octenom kiselinom (DAN i sur., 2007.; BURIN i sur., 2014.), dok prema našem saznanju još uvijek nema onih u kojima je podrobnije istražen učinak octene kiseline. Dakako, u takvim i sličnim istraživanjima ispitivanje dekontaminacijskog učinka usmjereno je na smanjivanje ukupnog mikrobiološkog onečišćenja u vidu ukupne populacije bakterija ili enterobakterija, dok je u slučaju patogenih bakterija fokus stavljen na *Salmonella* spp., što je djelomično otežalo usporedbu dobivenih rezultata po pitanju *Y. enterocolitica*. Iako neki autori (SMULDERS i GREER, 1998.; HASTAOGLU i sur., 2022.) ističu kako je *Y. enterocolitica* generalno osjetljiva na djelovanje organskih kiselina, naši rezultati skupnih redukcija postignutih s obje vrste primjenjene kiseline ($0,33-1,24 \log_{10}$ CFU/g), ukazuju kako su sojevi *Y. enterocolitica* rezistentniji na djelovanje kiselina u odnosu na rezultate ostalih istraživanja (GREER i DILTS, 1995.; DAN i sur., 2007.; CHRISTIANSEN i sur., 2009.). Dakako, pri usporedbama takvih rezultata bitno je uzeti u obzir sve parametre korištene u pokusu, a koji su u manjoj ili većoj mjeri mogli utjecati na razlike u postignutim redukcijama. Oni se prvenstveno odnose na vrstu kiseline, njezinu koncentraciju, temperaturu i način primjene, duljinu izloženosti, kao i početni broj inokuliranih bakterijskih stanica, a kombinacije takvih varijabli su mnogobrojne pa i usporedba rezultata zahtjeva kritički pristup (ACUFF, 2005.).

Primjer toga je istraživanje GREER i DILTS (1995.) u kojem je početna redukcija broja *Y. enterocolitica* nakon izlaganja 3 %-tnoj otopini mliječne kiseline pri 55 °C tijekom 15 sekundi iznosila $1 \log_{10}$ CFU/cm² da bi se tijekom sljedećih 7 dana povećala čak trostruko u usporedbi s kontrolnim uzorkom. U našem istraživanju je prosječna redukcija broja *Y. enterocolitica* nakon protokola s otopinama mliječne kiseline iznosila $0,87 \pm 0,22 \log_{10}$ CFU/g te se nije mijenjala nakon 24 sata. Ipak, u oba ova istraživanja zajednički faktor je bila isključivo vrsta kiseline, dok su se koncentracija, temperatura primjene, vrijeme izlaganja, način tretiranja kao i početna koncentracija bakterija razlikovale. Pritom ne treba zanemariti ni uzorak mesa korištenog u pokusu, primarno u kontekstu teksture njegove površine, te fazi primjene dekontaminacije (u klaonici na trupu/u laboratoriju na komadnom mesu). Kompleksnost usporedbe takvih rezultata očituje se i na primjeru istraživanja CHRISTIANSEN i sur. (2009.) u kojemu su redukcije postignute nakon primjene 1 %-2,5 %-tnih otopina mliječne kiseline pri 80 °C bile gotovo trostruko veće ($3,2-3,4 \log_{10}$ CFU/cm²) u odnosu na naše unatoč tome što su neki od primjenjenih parametara išli u korist smanjenoj osjetljivosti odnosno slabijem inhibitornom učinku. Primjerice, koncentracija otopine mliječne kiseline bila je manja (2,5 %)

u odnosu na našu, vrijeme izlaganja kraće (15 sekundi), vrijeme prijanjanja bakterija znatno duže (30 minuta), a koncentracija bakterija po cm^2 je bila veća (10^7 CFU), uz napomenu da su pored *Y. enterocolitica* inokulirane i *Salmonella* spp. te *E. coli*. Što se tiče pak metode aplikacije, autori navode da su s ciljem simulacije dekontaminacije na liniji klanja, uzorci mesa postavljeni u vertikalni položaj tijekom kojega je meso prskano pripremljenim otopinama, no parametri poput tlaka primjene ili udaljenosti mesa od prskalice nisu navedeni. Pored nesrazmjera u vrijednostima redukcija, autori su utvrdili kako je povećanje koncentracije kiseline utjecalo na veću redukciju što nije bio slučaj i u našem istraživanju. Isto tako, bolji dekontaminacijski učinak postignut je duljim tretiranjem kao i većom temperaturom primjenjenih otopina dok je kod nas primjena duljeg izlaganja bila značajna samo tijekom primjene vrućih otopina i obrnuto. Sukladno značajno većim redukcijama postignutima djelovanjem kiseline, primjenom vruće vode od $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 sekundi autori su uvrđili tek neznatno slabiji inhibitorni učinak ($2 \log_{10} \text{CFU}/\text{cm}^2$) od onoga postignutog nakon primjene otopine mliječne kiseline iste temperature i duljine izlaganja, što je također više nego dvostruko veća redukcija od one u našem istraživanju. Autori time zaključuju kako pri usporedbi ta dva dekontaminacijska sredstva mliječna kiselina pokazuje veći potencijal čijom prilagodbom koncentracije se smanjuje vrijeme izlaganja.

Prilikom usporedbe oba istraživanja teško je otkriti moguće razloge navedenih nesrazmjera u vrijednostima redukcijama, no pažnju je potrebno usmjeriti na parametre s najvećom varijabilnošću, odnosno vjerojatnošću da unutar dva ista pokusa polučite različite rezultate. Jedan od tih je svakako vrsta uzorka, tj. površina koja se tretira, čija tekstura može utjecati na jače/slabije prijanjanje bakterijskih stanica, a time i na različiti dekontaminacijski učinak. Kada govorimo o mesu kao uzorku, za očekivati je kako će bolji dekontaminacijski učinak biti postignut na dijelovima mišića prekrivenim fascijom, u odnosu na rasiјеke u kojima su mišićna vlakna izložena te time podložnija formiranju pukotina pogodnih za zadržavanje bakterija. Tako su primjerice YOUSSEF i sur. (2012.) kod takva dva uzorka utvrdili razliku u redukciji broja *E. coli* od čak $2,5 \log_{10} \text{CFU}/\text{cm}^2$ nakon primjene 5 %-tne otopine mliječne kiseline. Slična istraživanja kojima bi se usporedio takav učinak i na primjeru *Y. enterocolitica* ne postoje, no MORILD i sur. (2011.) na nešto drugačijem modelu dokazuju kako ne postoje razlike u površinskom prijanjanju između *Y. enterocolitica*, *S. enterica* te *L. monocytogenes* čime upućuju na zanemarivu ulogu bakterijske vrste u navedenom, za razliku od karakteristika tretiranih površina. Sukladno tome, slični rezultati temeljeni na ostalim bakterijskim vrstama čine se opravdanim za usporedbu i donošenje zaključaka u slučaju *Y. enterocolitica*. Ipak, u pogledu istraživanja CHRISTIANSENA i sur. (2009.) ne možemo sa sigurnošću tvrditi kako je

prethodno navedeno razlog tako velikih odstupanja u vrijednostima redukcija obzirom da su autori za inokulaciju bakterija koristili svinjske obrazine koje su prema njihovim navodima izrezane s čeljusti te obrezane na odgovarajuće veličine. Ono što bi svakako potkrijepilo činjenicu o utjecaju izgleda površine na vrijednosti redukcija su pojedinačni podaci za svaki provedeni dekontaminacijski postupak koji u ovom radu nisu navedeni, a u našem istraživanju su baš oni pokazatelj izrazite varijabilnosti pogotovo kada se promatraju pojedinačne vrijednosti redukcija između sojeva *Y. enterocolitica*, a unutar istog dekontaminacijskog protokola. U teoriji, razlog takvih velikih odstupanja mogu biti urođene ili stečene različite razine acidorezistencije pojedinih sojeva *Y. enterocolitica*, no to nije i slučaj u našem istraživanju, pogotovo kada se naprave usporedbe sa ostalim dekontaminacijskim protokolima. Daleko vjerojatniji uzrok takvih odstupanja su već spomenute karakteristike mesa, odnosno njegove površine. Naime, to je jedini parametar kod kojega je bilo izazovno održati uniformnost bez obzira što su se pri svakom testiranju birali uzorci mesa istog proizvođača, istog načina pakiranja te jednake svježine odnosno roka trajanja. Obzirom da smo takve rezultate jednim dijelom i očekivali, važno je bilo provoditi testiranje na što većem broju bakterijskih sojeva kako bi skupni podaci ukazali na realne rezultate, što je u našem slučaju i potvrđeno.

Pored toga, temperatura takvih uzoraka prije inokulacije bakterija i tijekom provedbe dekontaminacije je dodatni faktor za kojeg se čini kako bi mogao imati veći utjecaj na prethodno navedene razlike, pa pojedini autori (HASTAOĞLU i sur., 2022.) navode kako su organske kiseline najučinkovitije kada se primjene na trupovima koji su još uvijek topli. Naime, u predmetnom istraživanju je cjelokupni pokus proveden na mesu prije hlađenja (uzorkovanje na liniji klanja) dok je u našem istraživanju meso nabavljano u maloprodaji. Obzirom da tijekom pohrane mesa dolazi do postepenog isparavanja vode, s vremenom površina takvog mesa poprima hrapaviju teksturu koja pogoduje zadržavanju inokuliranih bakterijskih stanica, a time i manjoj izloženosti prema dekontaminacijskim sredstvima što je mogući razlog slabijih redukcija u našem istraživanju, imajući na umu kratko vrijeme prijanjanja bakterijskih stanica (5 minuta). S tim u vezi opravdavaju se visoke vrijednosti redukcija postignute nakon dekontaminacije neohlađenog mesa (CHRISTIANSEN i sur., 2009.), a u prilog tome govore i rezultati istraživanja EASTWOOD i sur. (2021.) u kojemu su vrijednosti redukcija *S. Typhimurium* i *E. coli* nakon primjene 2,5 %- i 5 %-tnih otopina mliječne kiseline na svinjskom mesu prije hlađenja bile dvostruko veće od onih postignutih na ohlađenom mesu. Pritom je početni broj inokuliranih bakterijskih stanica ($8,7 \log_{10}$ CFU/mL) bio jednak za obje skupine uzoraka kao i vrijeme njihovog prijanjanja (30 minuta).

Pored utjecaja vrste tretirane površine te njezine temperature, tlak primjene dekontaminacijskog sredstva je zasigurno još jedan faktor značajan za varijabilnost rezultata, kada govorimo o prskanju kao metodi dekontaminacije. Naime, u većini istraživanja to je podatak koji je najčešće zanemaren, a navodi se uglavnom uz primjenu vode kao dekontaminacijskog sredstva, no ne i kiselina (CASTILLO i sur., 2001.; SMULDERS i sur., 2012.; BRUSTOLIN i sur., 2014.). Pojedini autori doduše (EGGENBERGER-SOLORZANO i sur., 2002.) navode takve podatke i prilikom primjene kiselina u dekontaminaciji, no ne u svrhu ispitivanja utjecaja njihovih različitih vrijednosti na redukciju broja bakterija pa je time i teško donositi zaključke o učinku istoga. Ipak, primjena većeg tlaka svakako ima osnovu za postizanje jačeg dekontaminacijskog učinka obzirom da se na taj način primarno ostvaruje mehanički učinak "ispiranja" bakterija s tretirane površine, a rezidualni kemijski učinak dodano djeluje na njihovu inhibiciju rasta. U našem istraživanju otopine organskih kiselina primjenjene su pri tlaku od 3 bara, no kao što smo već spomenuli, zbog nedostatnih informacija teško je napraviti usporedbu s ostalim istraživanjima i utvrditi značaj tlaka prskanja na redukciju broja *Y. enterocolitica*. Primjerice, EASTWOOD i sur. (2021.) su meso prskali otopinama mliječne kiseline tijekom 3-5 sekundi (ovisno o veličini uzorka) čime su utrošili približno 15-25 mL otopine. Obzirom da je u našem istraživanju tijekom istog vremena utrošena barem pet puta manja količina otopine, možemo zaključiti kako je tlak primjene otopina mliječne kiseline u njihovom istraživanju bio daleko veći čime su i opravdane nešto veće vrijednosti redukcije postignute u njihovom istraživanju posebno ako se uzme u obzir znatno kraće vrijeme trajanja dekontaminacije. Dakako, navedene usporedbe temeljene su na redukcijama broja *Salmonella* spp. i *E. coli*. Sami autori (EASTWOOD i sur., 2021.) također pojedine nelogičnosti pri usporedbama svojih rezultata s drugim istraživanjima pripisuju utjecaju korištenja različitih vrsta prskalica pa sukladno tome i primjeni različitih tlakova pri prskanju.

Jedan od prvih ciljeva u našem istraživanju bio je usporediti dekontaminacijski učinak mliječne kiseline i octene kiseline prema *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu. Kao što je već navedeno, broj sličnih istraživanja dekontaminacije objim kiselinama daleko je manji od onih koji se fokusiraju na zasebni učinak mliječne kiseline, no u većini njih (EL-TABIY i SOLIMAN, 2011.; COSANSU i AYHAN, 2012.; YODER i sur., 2012.; VAN BA i sur., 2018.; SALLAM i sur., 2020.) autori zaključuju kako mliječna kiselina ostvaruje bolje rezultate. Naše istraživanje rezultiralo je istim zaključkom, barem što se tiče vrijednosti redukcija postignutih neposredno nakon dekontaminacije. Ipak, uzimajući u obzir vrijednosti nakon 24 sata, uočava se gotovo podjednak učinak obje vrste kiseline obzirom da su se vrijednosti redukcija u većini protokola s octenom kiselinom povećale tijekom vremena promatranja, a u pojedinima i

udvostručile. Razlog za navedeno može se pripisati izraženijem rezidualnom učinku octene kiseline na mesu koji unatoč slabijem djelovanju 0. sat preostalim živim, ali oštećenim bakterijskim stanicama uvelike otežava rast i preživljavanje, posebno ako se rast usporedi sa netretiranim bakterijskim stanicama iz kontrolnih uzoraka. Do istih zaključaka došli su i DAN i sur. (2007.) koji su utvrdili bolju učinkovitost 3 %-5 %-tnih otopina octene kiseline u redukciji broja *Yersinia* spp. S tim u vezi, zamjetne razlike u slučaju mliječne kiseline nisu oučene zbog inicijalno boljeg antimikrobnog učinka 0. sat što ipak potkrijepljuje prethodno navedene zaključke većine autora.

Što se pak tiče koncentracije primjenjenih kiselina, iako su brojna istraživanja dokazala kako je njezino povećanje u korelaciji sa redukcijom broja bakterija (YODER i sur., 2012.; MENCONI i sur., 2013.; KASSEM i sur., 2017.; VADDU i sur., 2021.), u našem slučaju primjena 4 %-tnih otopina obje vrste kiselina nije rezultirala i statistički većim redukcijama populacije *Y. enterocolitica*. Pojedini autori (CHOI i sur., 2009.; RODRIGUEZ-MELCON i sur., 2017.) su došli do istog zaključka i kod primjene većih raspona koncentracija kiselina. Uzimajući u obzir pH vrijednosti takvih otopina, odnosno neznatna odstupanja između korištenih koncentracija (0,15-0,18), za očekivati je kako 4 %-tne otopine kiselina u većini slučajeva nisu bile dostatne i za postizanje jačeg antimikrobnog učinka, barem ne u mjeri kao ostali promatrani parametri poput temperature otopina ili vremena izlaganja. Navedeno ide u prilog razmatranju ostalih potencijalnih negativnih ishoda dekontaminacije kao što je utjecaj na organoleptička svojstva mesa, primjerice u slučaju octene kiseline kod koje i blago povećanje koncentracije može imati negativan utjecaj na miris mesa.

U odnosu na koncentraciju, primjena otopina kiselina različitih temperatura tijekom kraćeg odnosno duljeg izlaganja se u našem istraživanju pokazao kao značajniji faktor u redukciji broja bakterijske populacije pri čemu su više temperature i dulji dekontaminacijski protokol bili u međusobnoj ovisnosti. Pri tome su u slučaju primjene otopine kiseline temperature 80 °C statistički značajno veće redukcije zabilježene samo tijekom tretiranja od 30 sekundi. U literaturi se po pitanju ovih faktora mogu naći oprečni podaci koji su opet rezultat primjene različitih metodologija pokusa pa je time i njihova interpretacija otežana. Primjerice, CHRISTIANSEN i sur. (2009.) su 5 sekundi duljom primjenom 2,5 %-tne otopine mliječne kiseline utvrdili značajno veću redukciju broja *Salmonella* spp., dok u istraživanju LAURY i sur. (2009.) ni 15 sekundi dulja primjena istovjetne vrste i koncentracije kiseline nije utjecala na razlike u njihovom broju. Navedeni nesrazmjeri su zapravo realni za očekivati, posebno ako se sagledaju ostali parametri koji su se razlikovali, a tiču se vrste tretirane sirovine (svinjski odresci; pileći trupovi s kožom), načina tretiranja (prskanje kiselina, uranjanje u otopinu),

temperature primjenjene otopine (55-80 °C; sobna temperatura) te broja inokuliranih bakterijskih stanica (10^7 CFU/cm²; 10^6 CFU/mL) uz napomenu da su u prvom istraživanju pored *Salmonella* spp. kokultivirane i druge bakterijske vrste. Naši rezultati pokazali su nešto veću redukciju broja *Y. enterocolitica* u svim protokolima s duljim izlaganjem, no kako smo već spomenuli, statistički značajno veće bile su jedino one postignute primjenom vrućih otopina kiselina. Jedan od mogućih razloga za to je temperatura otopine koja je neposredno prije primjene zagrijana na 80 °C, no prskanjem odnosno prolaskom kroz zrak brže dolazi do njezinog hlađenja, a time i slabije učinkovitosti koja se onda nadoknađuje duljom primjenom od 30 sekundi. Vezano uz to, kod primjene hladnih otopina takve značajne razlike izostaju, a one utvrđene vjerojatno su rezultat mehaničkog utjecaja, odnosno "efekta ispiranja".

Uspoređujući dva intervala mjerenja (0. i 24. sat) unutar testnih i kontrolnih uzoraka, iz rezultata je jasno uočljivo kako primjena dekontaminacijskih protokola s otopinama organskih kiselina pored inicijalne redukcije broja *Y. enterocolitica* postupno utječe i na daljne smanjivanje populacije tijekom hlađenja mesa. Navedeno je zapaženo i u slučaju kontrolnih uzoraka, no u manjem obimu i bez statističke značajnosti. Ovi rezultati nisu iznenađujući, imajući na umu psihrotrofnu narav *Y. enterocolitica*, koja joj i u uvjetima hlađenja omogućava preživljavanje pa se njihov broj održava unutar stabilne populacije s tek neznatnim odstupanjima. S druge strane, netom po izlaganju, u tretiranim se uzorcima inokulirana bakterijska populacija smanji, a broj preostalih preživjelih, ali oštećenih bakterijskih stanica stagnira te s vremenom opada. Razlog tome je već spomenuti rezidualni utjecaj organskih kiselina koji prema navodima RODRIGUEZ-MELCON i sur. (2017.) u slučaju mliječne kiseline opstaje čak i nakon 120 sati od njezine primjene i time dovodi do dodatne redukcije broja bakterijske populacije (>2 log) u odnosu na kontrolni uzorak. Slično je potvrđeno istraživanjem HAN i sur. (2021.) u kojem je primjena mliječne kiseline povećala održivost goveđeg mesa tijekom pohrane uslijed redukcije broja enterobakterija. Uzevši u obzir činjenicu da se u našem istraživanju primjenjivalo već hlađeno meso, za očekivati je kako bi ovakav trend smanjivanja bakterijske populacije bio i veći kada bi se dekontaminacija provodila na liniji klanja, u fazi prije hlađenja mesa kada bi i inicijalni dekontaminacijski učinak bio jači. U svakom slučaju, pri usporedbi istovjetnih protokola s otopinama mliječne kiseline i octene kiseline, dokazano je kako se u oba slučaja najbolji dekontaminacijski učinak postiže primjenom vrućih otopina tijekom 30 sekundi od kojih mliječna kiselina ipak dominira. Ipak, imajući na umu kako utjecaj visoke temperature pored redukcije broja bakterija zasigurno negativno utječe na organoleptička svojstva mesa, pri konačnoj evaluaciji potrebno je sagledati i taj aspekt dekontaminacije.

Iako i mliječna i octena kiselina u nedisociranom obliku postižu jači baktericidni/bakteriostatski učinak od anorganskih kiselina, između te dvije vrste postoji određena razlika u antimikrobnim svojstvima. Ona se definira kao specifični učinak kiseline za kojeg je poznato kako je najjače izražen kod mliječne kiseline (HASTAOĞLU i sur., 2022.) što ide u prilog našim rezultatima. Nedisocirane molekule organskih kiselina su najvažnije za ispoljavanje antimikrobne aktivnosti koja ovisi o pH vrijednosti i koncentraciji kiseline. U našem istraživanju praćen je pad pH vrijednosti površine mesa nakon dekontaminacijskih protokola kako bi se utvrdile njihove međusobne razlike te utjecaj koji imaju na redukciju broja *Y. enterocolitica*. Obzirom da je standardnim pH sondama teško odrediti pH vrijednost površine mesa, mjerenje je provedeno u homogenizatu uzorka (MBANDI i SHELEF, 2002.) nakon tretiranja, a trend vrijednosti uspoređen s kontrolnim uzorkom. Uspoređujući obje vrste kiselina, iz rezultata je vidljiv izraženiji pad pH mesa nakon dekontaminacija otopinama mliječne kiseline. Nadalje, međusobnom usporedbom protokola unutar obje skupine utvrđeno je kako su protokoli s vrućim otopinama kiselina primjenjenim tijekom 30 sekundi rezultirali statistički značajno većim padom pH vrijednosti mesa što je dovelo i do najvećih redukcija u broju *Y. enterocolitica*. Ipak, kada se ustanovljene pH vrijednosti između promatranih parametara usporede sa vrijednostima redukcija broja bakterija između istih, dolazimo do zaključka kako one međusobno ne ovise jedna o drugoj što nam ukazuje na važnost ostalih parametara korištenih u pokusu. To je najbolje uočljivo na primjeru skupnih pH vrijednosti mesa izmjerenih nakon 24 sata hlađenja gdje se pod utjecajem snažnog puferskog kapaciteta pH vraća na fiziološku razinu, dok se istovremeno zabilježava pad populacije inokuliranih bakterijskih stanica.

Vodeći se preporukama navedenim u znanstvenom mišljenju EFSE (EFSA, 2018.) koji upućuju na manjkavost znanstvenih dokaza kojima bi se usporedio dekontaminacijski učinak mliječne kiseline i vode kao jedinog dopuštenog sredstva za dekontaminaciju kod svinja, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi rezultira li primjena vode pri istim uvjetima jednakim redukcijama broja *Y. enterocolitica* na mesu. Ispiranje (tuširanje) trupova vodom je rutinski postupak na liniji klanja koji se pokazao učinkovitim u uklanjanju prisutnih mikroorganizama (HUGAS i TSIGARIDA, 2008.). Dekontaminacijski potencijal vode u istraživanjima je većinom promatran u kontekstu uključivanja vode kao dodatnog sredstva u dekontaminacijske protokole s organskim kiselinama i uglavnom su takve kombinacije rezultirale najvećim redukcijama ciljane bakterijske populacije (EGGENBERGER-SOLORZANO i sur., 2002.; BRUSTOLIN i sur., 2014.; TANGO i sur., 2014.). Uspoređujući korištene parametre u tretiranju mesa vodom s onima tijekom primjene otopina organskih kiselina, i ovdje je utvrđena važnost

temperature obzirom da je primjena vruće vode 0. sat rezultirala statistički značajno većim redukcijama broja *Y. enterocolitica*, no samo tijekom duljeg izlaganja od 30 sekundi što je dokazano i na primjeru organskih kiselina. To je u skladu s brojnim istraživanjima (SOFOS i SMITH, 1998.; EGGENBERGER-SOLORZANO i sur., 2002.; LI i sur., 2002.; BOSILEVAC i sur., 2006.) koji su dokazali kako se s povećanjem temperature vode korištene u dekontaminaciji povećavaju i vrijednosti redukcija promatranih bakterijskih populacija. Mogući razlog neutvrđenih razlika u slučaju kraćeg izlaganja je, kao i kod kiselina, brzo hlađenje vode tijekom prskanja čija temperatura je kroz kraći period izlaganja nedostatna za postizanje većih redukcija broja bakterija. Suprotno od toga, dulje tretiranje tijekom 30 sekundi rezultiralo je statistički većim redukcijama broja bakterija i kod hladne i vruće vode uz napomenu kako su te razlike bilo znatno manje kod primjene hladne vode. Iz svega zaključujemo kako će učinkovitost primjene vode veće temperature biti bolja što je trajanje prskanja dulje. Kod primjene hladne vode to je faktor koji dovodi tek do neznatnih promjena, pa je za prepostaviti kako u tom slučaju utjecaj primjenjenog tlaka ima veći značaj. S druge strane, SOFOS i SMITH (1998.) navode kako primjena većeg tlaka u pojedinim slučajevima može djelovati i kontraproduktivno na način da rezultira boljim prijanjanjem bakterija u tkivo.

Kao i u protokolima s kiselinama, skupne vrijednosti redukcija pri dekontaminaciji vodom su se nakon 24 sata povećale, no bez statističke značajnosti. Obzirom da je bakterijska populacija u kontrolnim uzorcima u oba mjerenja bila ista, razlog većih redukcija je pad broja bakterijskih stanica na tretiranim uzorcima tijekom hlađenja mesa. Imajući na umu kako u ovom slučaju nije bilo rezidualnog utjecaja kiselina odnosno niskih pH vrijednosti, teško je sa sigurnošću utvrditi razlog navedenoga. S jedne strane, moguće je da je prilikom inokulacije na tom dijelu uzorka zadržan manji broj stanica, no kada se promatraju pojedinačne vrijednosti između svih 10 sojeva *Y. enterocolitica*, u kojima su takvi niži brojevi podjednako zastupljeni, jasno je kako su vjerojatnosti za to male. S druge strane, obzirom da razlike između kontrolnih i testnih uzoraka upućuju na različiti trend kretanja broja bakterijskih stanica, razumljivo je razmotriti ulogu primjene vode u navedenome. Naime, nakon primjene vode meso se podvrgava naglom hlađenju na 4 °C, pri čemu voda preostala na površini doprinosi ubrzanom hlađenju te izlaganju bakterijskih stanica tzv. "hladnom odgovoru". Kako navode brojni autori (PHADTARE i INOUE, 2004.; CAO-HOANG i sur., 2010.; BARRIA i sur., 2013.), sposobnost prilagodbe takvim temperaturnim razlikama mora biti popraćena nizom složenih biokemijskih i staničnih promjena u bakterijskoj stanici poput membranske permeabilnosti, konformacije proteina ili ekspresije gena. U istraživanju LI i sur. (2020.) cilj je bio ispitati fiziološke procese odgovora na hladnoću kod *Y. enterocolitica* usporedbom sposobnosti rasta,

ekspresije gena i proteina kao i pokretljivosti stanica nakon izlaganja hladnim uvjetima. Induciranje hladnog odgovora provedeno je na 55 sojeva *Y. enterocolitica* različitih bioserotipova, a rezultati su, između ostalog, pokazali kako je razina indukcije takvog odgovora specifična za soj te vremenski uvjetovana prilagodbom na hladne uvjete. Povezujući navedene tvrdnje s našim istraživanjem, moguće da je pad broja populacije *Y. enterocolitica* u testnim uzorcima nakon 24 sata hlađenja mesa uvjetovan njihovom niskom razinom prilagodbe na hladne uvjete pogotovo ako uzmemo u obzir da je takav trend izostao u kontrolnim netretiranim uzorcima.

Uspoređujući dekontaminacijski potencijal vode i organskih kiselina, iz skupnih rezultata nultog sata možemo zaključiti kako primjena otopina mliječne kiseline rezultira najboljim učinkom. S druge strane, primjena vode i otopina octene kiseline pokazala se jednako učinkovitom. Temeljem već spomenutih povećanja redukcija tijekom hlađenja mesa, nakon 24 sata njihov učinak je izjednačen što u slučaju primjene kiselina (primarno octene) pripisujemo prolongiranom antimikrobnom učinku kiselina na mesu, dok se u protokolima s vodom takve razlike objašnjavaju neadekvatnom prilagodbom sojeva *Y. enterocolitica* na uvjete hlađenja koji su onemogućili održavanje bakterijske populacije na istoj razini.

Još jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi dovodi li opetovano izlaganje sojeva *Y. enterocolitica* otopinama organskih kiselina do razvoja rezistencije na njihovo djelovanje te povezati acidorezistenciju sa otpornošću na antibiotike. Naime, poznato je da mikroorganizmi izloženi djelovanju kiselina imaju sposobnost indukcije metaboličkog odgovora na kisele uvjete (eng. ATR – *acid tolerance response*) tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta (HILL i sur., 1995.; BEARSON i sur., 1997.; KOUTSOUMANIS i sur., 2003.) što ih s vremenom čini prilagodljivima te otpornima na okolišne stresne čimbenike (SAMELIS i sur., 2002.; CHENG i sur., 2003.; THERON i LUES, 2007.). Iako su takve spoznaje već bile predmet brojnih starijih istraživanja (DICKSON i KUNDURU, 1995.; BRUL i COOTE, 1999.; ROERING i sur., 1999.), do danas još uvijek nije poznato pružaju li uistinu zaštitu mikroorganizmima u industrijskim uvjetima, u ovom slučaju prilikom kemijske dekontaminacije mesa. Pritom je bitno naglasiti kako je fokus većine istraživanja bio usmjeren na patogene bakterije poput *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* te *E. coli*, dok za *Y. enterocolitica* nema dovoljno spoznaja.

Prvi zadatak u ovom dijelu istraživanja bio je selektirati promatrane sojeve *Y. enterocolitica* temeljem njihovog odgovora na stresne čimbenike koji su u ovom slučaju bili 2 %-tne otopine mliječne i octene kiseline. Iz tih rezultata vidljiva je različita razina prilagodbe iznimno kiselim uvjetima pa se tako kod dva soja dogodila potpuna redukcija inokulirane populacije dok je kod pojedinih zabilježen visoki stupanj preživljavanja. Očekivano, jači

antimikrobni učinak uočen je nakon izlaganja otopini mliječne kiseline, ali je razina osjetljivosti kod svih sojeva bila u korelaciji s octenom kiselinom. Daljnjim analizama kojima je cilj bio simulirati uvjete dekontaminacije mesa (izlaganje jednako kiselim uvjetima tijekom 24 sata) zabilježena je visoka stopa preživljavanja sojeva kod kojih je prilagodbom na blago kisele uvjete (5,2-5,8) induciran odgovor na iznimno niske pH vrijednosti. Preživljavanjem takvih uvjeta nakon svakog ciklusa bakterijska populacija dosegla je stacionarnu fazu rasta od minimalno 8 log₁₀ CFU/mL. Dakako, treba imati na umu da smo za ovo testiranje odabrali sojeve koji su prethodnim rezultatima pokazali najveću otpornost, pa pretpostavljamo da bi kod ostalih ove vrijednosti mogle biti manje. Prilikom usporedbe pH vrijednosti s postignutom razinom bakterijske populacije, uočava se kako navedene vrijednosti nisu u korelaciji, no to je očekivani rezultat obzirom na mala međusobna odstupanja. Ti rezultati u skladu su sa istraživanjem ALVAREZ-ORDÓÑEZ i sur. (2009.) koji su prilagodbom *Salmonella* Typhimurium na različite vrste kiselina (octena, limunska, mliječna i klorovodična) pri različitim pH vrijednostima (6,4; 5,4; 4,5) inducivali rezistenciju na iznimno kisele uvjete (pH 2,5). Slično su dokazali i ARVIZU-MEDRANO i ESCARTÍN (2005.) nakon izlaganja *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Typhimurium kiselim uvjetima (pH 3,0-3,8) nakon kojih su kod takvih stresiranih stanica pratili rast u blago zakiseljenom mediju (pH 4,5). Tijekom rasta autori su utvrdili znatno skraćenje lag faze što objašnjavaju prethodnom prilagodbom bakterijskih stanica na kisele uvjete, posebno ako se uzme u obzir da navedeno nije zamijećeno tijekom rasta u neutralnom mediju.

Nakon što su se dekontaminacijski protokoli sa 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline ponovili na prethodno prilagođenim sojevima *Y. enterocolitica* (N=3), napravljena je usporedba dobivenih vrijednosti redukcija sa onima iz prvotnog testiranja. Iako su vrijednosti redukcija u većini protokola bile manje nego prvi put, čiji mogući razlog su prethodno spomenute prilagodbe na kisele uvjete, razlike između tih vrijednosti nisu bile statistički značajne. Osim toga, u pojedinim protokolima su pak bile veće nego prvi put što ne ide u prilog tvrdnji o stečenoj prilagodljivosti sojeva *Y. enterocolitica* tijekom ciklusa izlaganja kiselim uvjetima. Slično su dokazali VAN NETTEN i sur. (1998.) koji su kod sojeva *S. Typhimurium* prilagođenih na kisele uvjete utvrdili veću osjetljivost na mliječnu kiselinu u odnosu na one neprilagođene. Nadalje, prilikom usporedbe razlika u redukcijama između promatranih sojeva, tijekom spomenutih izlaganja kod soja br. 40 utvrđena je najveća osjetljivost temeljem praćenja dinamike rasta, pa smo očekivali kako će se i vrijednosti redukcija razlikovati u odnosu na ostale promatrane sojeve. To nije utvrđeno, obzirom da su kod sva tri soja te vrijednosti u više od 50 % protokola bile manje. Razlike između dekontaminacijskih protokola utvrđene prvotnim

testiranjem, a koje se tiču značajnosti pojedinih ispitivanih parametara poput temperature, trajanja izloženosti, vrste i koncentracijske kiseline u većini slučajeva nisu potvrđene i ovim ponovljenim testiranjem. Razlog tome je manji broj sojeva *Y. enterocolitica* korištenih u naknadnom testiranju koji je time utjecao na značajniju varijabilnost podataka. Kao što smo već prethodno spomenuli, manjkavost novije literature vezane uz razvoj acidorezistencije bakterijskih sojeva prilagođenih na kisele uvjete je djelomično otežala usporedbu dobivenih rezultata, posebno u slučaju *Y. enterocolitica*. Prema našem saznanju, jedino slično istraživanje koje je uključivalo *Y. enterocolitica* provedeno je prije više od 25 godina (VAN NETTEN i sur., 1997.b), a zaključci takvog istraživanja većinom su u skladu s našim spoznajama. Autori temeljem dobivenih rezultata smatraju kako prilagodba sojeva *Y. enterocolitica* kiselim uvjetima ne vodi prema razvoju acidorezistencije, a navedene tvrdnje podupiru s nekoliko činjenica koje se djelomično odnose na uvjete provedbe takvog testiranja, odnosno razlike između onih stvarnih (industrijskih) te prilagođenih (laboratorijskih). Naime, iako je kod takvih sojeva uočeno skraćanje lag faze rasta kao i generacijskog vremena, redukcije broja njihovih stanica na mesu tretiranom mliječnom kiselinom bile su i dalje zamjetno visoke unatoč tome što je primjena mliječne kiseline rezultirala značajnim smanjenjem popratne mikrobiote mesa čime su stvoreni uvjeti za olakšani rast na kiselinu prilagodljive *Y. enterocolitica*. Nadalje, u prilog tome govore i usporedbe prethodno spomenutih uvjeta, a tiču se visokog broja stanica namijenjenih inokulaciji ($3 \log_{10}$ CFU/cm²) za koje je malo vjerojatno da će se dogoditi pri kontaminaciji u industrijskim uvjetima. Pretpostavlja se kako je kontaminacija trupa *Y. enterocolitica* na liniji klanja manja od $1 \log_{10}$ CFU/cm² (DE BOER i NOUWS, 1991.; KOTULA i SHARAR, 1993.), uz činjenicu kako takve stanice nisu prethodno prilagođene na kisele uvjete. Isto tako, bakterijske stanice su u toku inokulacije bile u stacionarnoj fazi rasta što je omogućilo njihovo bolje prijanjanje, a time i smanjenu osjetljivost na kiseline u odnosu na one stresirane koje bi se tu našle kontaminacijom u prirodnim uvjetima (DICKSON i FRANK, 1993.). VAN NETTEN i sur. (1997.b) također ističu kako je aktivitet vode uzoraka mesa korištenih u analizama bio veći (0,97-1) od onih koje se očekuju na mesu u industrijskim uvjetima gdje pod utjecajem struje hlađenja dolazi do sušenja njegove površine i pada vrijednosti na 0,91-0,94 (JAMES i BAILEY, 1990.; VEERKAMP, 1990.). U uvjetima nižeg aktiviteta vode dolazi do izraženijeg baktericidnog učinka kiseline, a time i slabijeg rasta inokulirane populacije bakterijskih stanica (DICKSON i SIRAGUSA, 1994.).

Temeljem navedenoga, uočene razlike između dva testiranja u našem istraživanju ne upućuju na mogućnost prilagodbe sojeva *Y. enterocolitica* kiselim uvjetima, a time i stjecanja otpornosti na kiseline. Ako takav proces zamislimo u realnim uvjetima, a to je linija klanja, onda su takvi izgledi manje vjerojatni. Naime, kako EFSA (2018.) navodi, vjerojatnost da će svinje po dolasku u klaonicu biti nositelji sojeva *Y. enterocolitica* adaptiranih na kisele uvjete je mala. Dakako, ukoliko se u objektu ne poštuju načela dobre higijenske prakse pa se potencijalno adaptiranim sojevima omogući preživljavanje i naknadna rekontaminacija mesa, izgledi za širenje acidorezistencije postaju realniji. Iz tog razloga, program sanitacije objekta mora uključivati više vrsta dezinficijensa čijom izmjenom će se spriječiti razmnožavanje i održavanje rezistentne populacije bakterija u objektu.

Pored razjašnjavanja uloge dekontaminacije organskim kiselinama u razvoju acidorezistencije bakterija, već dugi niz godina predmet brojnih rasprava je i pitanje križne rezistencije na antibiotike. Naime, izlaganjem bakterijske stanice okolišnim čimbenicima stresa potiče se njezina prilagodba na fenotipskoj i genotipskoj razini koja uključuje niz zaštitnih mehanizama prema inicijalnom okidaču stresa, a koji pritom dovode do križne zaštite prema ostalima, poput djelovanja antibiotika (ROWAN, 1999.; KATZIF i sur., 2003.). Ovo područje je slabije istraženo u odnosu na acidorezistenciju, a i u ovom slučaju podataka za *Y. enterocolitica* gotovo da ni nema. U našem istraživanju je mogućnost razvoja antimikrobne rezistencije razmatrana tijekom izlaganja sojeva *Y. enterocolitica* kiselim uvjetima i to praćenjem promjena minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) tijekom pet intervala mjerenja. Antibiotici korišteni u pokusu odabrani su temeljem njihove učestale primjene u terapijanju jersinioze, a kod kojih se redovito prate razine osjetljivosti prema kriterijima Europskog odbora za testiranje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST – eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). *Y. enterocolitica* je uglavnom rezistentna na penicilin i prvu generaciju cefalosporina pa antibiotici od izbora uključuju trimetoprim-sulfametoksazol, aminoglikozide, treću generaciju cefalosporina, tetracikline i fluorokinolone. Uspoređujući promjene minimalnih inhibicijskih koncentracija antibiotika tijekom izlaganja sojeva *Y. enterocolitica* 2 %-tnim otopinama mliječne i octene kiseline, u većini slučajeva uočava se trend uniformnog povećanja/smanjenja MIC vrijednosti koje u oba slučaja nisu bile ni približno blizu graničnoj vrijednosti koja bakteriju proglašava rezistentnom. Iznimka od navedenoga odnosi se na gentamicin čija se MIC vrijednost povećala dvostruko kod sojeva izlaganih otopinama 2 %-tne mliječne kiseline, što potencijalno može ukazati na opasnost od razvoja rezistencije. Ipak, i na tom primjeru povećanje MIC vrijednosti nije bilo

eksplozivno dok je kod istog antibiotika u slučaju octene kiseline nulta i 5. MIC vrijednost ostala nepromijenjena.

Privremena povećanja/smanjenja minimalnih inhibicijskih koncentracija uočena su i u istraživanju McMAHON i sur. (2007.) nakon izlaganja *S. enterica* subletalnim pH vrijednostima koristeći klorovodičnu kiselinu. Autori takve oscilacije pripisuju kratkotrajnim fenotipskim promjenama bakterijske stanice poput strukturiranja veznih mjesta na staničnoj membrani, amplifikacije gena ili indukcije šok proteina. S tim u vezi, smatraju kako takve promjene imaju zanemarivu ulogu u razvoju i širenju rezistencije obzirom na malu vjerojatnost perzistiranja takvih čimbenika u hrani te dovođenja istoga u vezu sa potrošačem. Pojedini autori (AL-NABULSI i sur., 2011.; KOMORA i sur., 2017.) pak, temeljem svojih rezultata smatraju kako subletalne koncentracije kiselina u konzerviranoj hrani služe kao podloga razvoju antimikrobne rezistencije kod patogenih bakterija prenosivih hranom te time predstavljaju opasnost za potrošača. Ipak, u literaturi još uvijek nema dovoljno dokaza koji bi poduprli hipotezu o povezanosti acidorezistencije sa rezistencijom na antibiotike što je potvrđeno i našim istraživanjem. U prilog tome ponajprije idu činjenice o dosadašnjim sveobuhvatnim primjenama obje vrste kiselina kao i njihovoj prisutnosti u biljnim i životinjskim tkivima što je još davno prije dalo osnovu za potencijalni razvoj rezistencije.

Na kraju, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako primjena pojedinih dekontaminacijskih protokola utječe na organoleptička svojstva mesa. Za razliku od istraživanja acidorezistencije i s njom povezane otpornosti na antibiotike, pitanje utjecaja dekontaminacijskih protokola na organoleptička svojstva mesa često je sastavni dio takvih istraživanja što upućuje na njihovu važnost pri konačnoj evaluaciji dekontaminacije. Parametri uključeni u takve analize u najvećem broju slučajeva obuhvaćaju procjenu boje, mirisa i okusa, no i ostalih poput sočnosti, kiselosti ili teksture. Obzirom da je mliječna kiselina daleko više zastupljena u istraživanjima dekontaminacijskog potencijala, rezultati vezani uz organoleptičku ocjenu mesa se u većini slučajeva referiraju na nju, a manji broj uspoređuje njezin utjecaj s octenom kiselinom (SURVE i sur., 1991.; KOTULA i THELAPPURATE, 1994.; JENSEN i sur., 2003., HECER i ULUSOY SÖZEN, 2011.).

Promatrajući skupne vrijednosti, u našem istraživanju su prilikom ocjenjivanja parametra boje najlošije ocijenjeni uzorci mesa tretirani otopinama octene kiseline dok su u slučaju mliječne kiseline ocjene bile nešto više, ali i dalje manje u odnosu na vodu. Naime, boja tretiranih uzoraka mesa opisuje se kao manje "živopisna", odnosno boja manjeg intenziteta u odnosu na kontrolni uzorak obzirom da rezultira pojavom svjetlijih nijansi različitih stupnjeva ovisno o vrsti dekontaminacije. Očekivano, unutar sve tri grupe, protokoli u kojima su se

koristile vruće otopine tijekom duljeg izlaganja su rezultirali najvećom promjenom u boji mesa pa su i dodijeljeni bodovi bili statistički značajno manji od bodova kontrolnih uzoraka, osim u slučaju mliječne kiseline. Navedeno vodi zaključku o minimalnom utjecaju mliječne kiseline na promjenu boje mesa, što je i u skladu s većinom dosadašnjih istraživanja (GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.; MANZOOR i sur., 2020.; RODRIGUEZ-MELCON i sur., 2020.; EASTWOOD i sur., 2021.). U svakom slučaju pri usporedbama takvih razlika s drugim istraživanjima opet treba uzeti u obzir sve parametre korištene u pokusu, a koji kao i u redukcijama bakterijske populacije neposredno utječu na izgled mesa. Primjerice, u istraživanju GRAJALES-LAGUNES i sur. (2012.) promjena boje promatrana je na uzorcima mesa koji su izlagani tijekom duljeg perioda 3 %-tnim otopinama mliječne kiseline (3 minute) te su bili uranjani u otopine što dodatno pojačava doticaj mesa s kiselinom. S druge strane, MANZOOR i sur. (2020.) su primjenjivali otopine mliječne kiseline većih koncentracija (do 6 %) i tek na najvećima utvrdili promjene u diskoloraciji mesa, dok je istovremeno primjena nižih koncentracija unaprijedila njihova organoleptička svojstva. U oba slučaja, ali i kod većine ostalih istraživanja, otopine mliječne kiseline bile su sobne temperature u tijeku primjene. Naši rezultati vezani uz primjenu protokola s hladnim otopinama mliječne kiseline su time očekivani obzirom da se dodijeljene ocjene nisu razlikovale od onih kontrolnih uzoraka. Kao što smo već naveli, najlošije ocijenjeni uzorci mesa po pitanju boje bili su oni podvrgnuti vrućim otopinama mliječne kiseline što upućuje na važnost temperature kao parametra, u odnosu na primjerice koncentraciju kiseline ili duljinu trajanja dekontaminacije. To je potvrđeno PCA analizom iz koje je jasno vidljivo kako su svi protokoli koji su uključivali primjenu dekontaminacijskog sredstva visoke temperature (obje vrste kiseline i voda) smješteni s lijeve strane koordinanog prikaza pokazavši time najveći utjecaj na promatrane parametre. Sukladno tome, pretpostavljamo kako bi prethodno spomenuti rezultati ostalih istraživanja bili tim lošiji da je i temperatura primijenjenih otopina bila veća.

Ipak, postoje i ona istraživanja koja su potvrdila suprotno. Tako su STIVARIUS i sur. (2002.) primjenjivali vruću vodu od 80 °C i 5 %-tnu otopinu mliječne kiseline na goveđim obrescima s ciljem procjene utjecaja na organoleptička svojstva (panel ocjenjivača) te boju mesa (instrumentalno, spektrofotometrijski). Prilikom određivanja boje spektrofotometrijskim putem, autori su zamijetili kako je govedina tretirana mliječnom kiselinom svjetlija te ima manju razinu oksimioglobina, u usporedbi s kontrolnim uzrokom. Pri istoj ocjeni od strane panelista, primjetna razlika između uzoraka nije uočena. Što je još više iznenađujuće, boja uzoraka mesa tretiranih vrućom vodom od 80 °C nije se razlikovala od kontrolnih prilikom oba načina ispitivanja. U našem istraživanju su takvi uzorci mesa ocijenjeni statistički značajno

nižim ocjenama od kontrolnog uzorka uz napomenu kako je vrijeme izlaganja bilo znatno kraće (30 sekundi naspram 3 minute). Obzirom da su u gore navedenom istraživanju obje metode pokazale iste rezultate, kao uzrok tome možemo isključiti eventualnu subjektivnost ocjenjivača koji su između ostalog bili i educirani u tu svrhu. Slične rezultate potvrdili su i RODRIGUEZ-MELCON i sur. (2020.) koji su uočili kako je boja goveđeg mesa spektrofotometrijski bila znatno svjetlija nakon primjene 2 %- i 4 %-tnih otopina mliječne kiseline, no isto nije zapaženo i pri evaluaciji panelista. Autori time naglašavaju kako takve rezultate treba uzimati s dozom opreza obzirom na mali broj korištenih panelista koji nisu bili educirani u tu svrhu. Iako na isto upućuju i rezultati HARRIS i sur. (2012.), autori ovdje naglašavaju važnost opažanja panelista te smatraju kako su ona indikativnija za percepciju potrošača na razini maloprodaje koji takve jedva primjetne razlike vjerojatno ne bi ni uočili. S tim u vezi, smatrali smo kako će ovoj fazi istraživanja organoleptička ocjena mesa od strane panelista doprinijeti utvrđivanju osnovnih razlika te time opravdati primjenjivost pojedinih dekontaminacijskih metoda, ali i pružiti osnovu za daljnja istraživanja.

Kao što smo već spomenuli, primjena octene kiseline rezultirala je znatno svjetlijim nijansama mesa u odnosu na mliječnu kiselinu, pa su i dodjeljeni bodovi bili značajno niži ($p < 0,05$). Ti rezultati uglavnom nisu u skladu s onima ostalih autora iako je takvih istraživanja bilo daleko manje. Tako su HARRIS i sur. (2012.) zaključili kako nije bilo razlike u boji goveđeg mesa nakon primjene 2 %-tne otopine octene kiseline i mliječne kiseline, a značajnih razlika nije bilo ni u odnosu na kontrolne uzorke. S druge strane, u istraživanju HECER i ULUSOY SOZEN (2011.) boja uzoraka pilećeg mesa tretiranog mliječnom kiselinom ocijenjena je nižim bodovima u odnosu na octenu kiselinu ($p < 0,05$), no treba imati na umu da su koncentracije primjenjenih otopina kiselina bile daleko manje (0,2-0,3 %) nego u većini istraživanja. U nešto starijem istraživanju (KOTULA i THELAPPURATE, 1994.) gdje su također primjenjivane niže koncentracije (0,6 % i 1,2 %) octene i mliječne kiseline, spektrofotometrijskom analizom utvrđeno je kako su uzorci mesa tretirani s obje vrste kiseline pri obje koncentracije bili značajno svjetliji ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolni uzorak. Ipak, usporedbom takvih uzorka od strane panelista razlika nije utvrđena, barem što se tiče parametra boje, što potvrđuje prethodne zaključke ostalih istraživanja. Kao i u slučaju mliječne kiseline, u ovim istraživanjima octena kiselina je primjenjena pri sobnoj temperaturi, što je zasigurno doprinijelo očuvanju boje tretiranih uzoraka mesa. Tome u prilog govore naši rezultati u kojima su unutar protokola s octenom kiselinom ($N=8$) najnižim bodovima ocijenjeni uzorci mesa tretirani vrućim otopinama, a posebno u tijeku duljeg izlaganja ($p < 0,05$). U slučaju primjene

hladnih otopina ti bodovi su bili veći, no i dalje manji pri usporedbi s mliječnom kiselinom i vodom.

Miris mesa ocijenjen je najnižim ocjenama nakon dekontaminacije octenom kiselinom ($p < 0,05$). Panelisti takav miris opisuju kao "po octu", a intenzitet mu se pojačava duljim izlaganjem. Kiseli miris zabilježen je i na mesu tretiranom mliječnom kiselinom, no u manjoj mjeri. Ovakvi rezultati bili su velikim dijelom očekivani, imajući na umu prodoran miris koncentrirane octene kiseline koji se zadržao i nakon njezinog razrjeđivanja. I ostali autori (EL-TABIY i sur., 2011.; HECER i ULUSOY SOZEN, 2011.; SMULDERS i sur., 2011.) uočili su znatnija odstupanja u mirisu između predmetnih vrsta kiselina, a pojedini ističu zadržavanje mirisa octene kiseline na mesu i nakon 24 sata (SMULDERS i sur., 2011.), pa čak i tri dana (EL-TABIY i sur., 2011.). Obzirom da se procjena mirisa na našim uzorcima mesa provodila nakon 24 sata pohrane, za očekivati je njegovo zadržavanje na mesu i tijekom duljeg perioda. Navedeno ukazuje na važnost procjene organoleptičkih pokazatelja pri evaluaciji dekontaminacijskih postupaka, iako neki autori (REYES CARRANZA i sur., 2013.) u takvoj procjeni razmatraju isključivo njezin antimikrobni potencijal. U ovom slučaju, prethodni navodi ne idu u prilog octenoj kiselini kao potencijalnom dekontaminacijskom sredstvu, unatoč postignutim redukcijama bakterijske populacije.

Za razliku od parametra boje i mirisa, u teksturi površine mesa nisu zamijećene značajne razlike između promatranih skupina. Manjim bodovima ocijenjeni su uzorci podvrgnuti protokolima vrućim otopinama koji su rezultirali promjenama teksture vidljivima i nakon 24 sata. Ipak, takve promjene izraženije su netom po izlaganju visokoj temperaturi, a karakterizira ih naborani izgled površine s istaknutijim pukotinama koje prate tračci vezivnog tkiva. Tijekom pohrane mesa one postaju manje uočljive dok u slučaju primjene hladnih otopina izostaju. Što se tiče parametra okusa, između skupina nije bilo značajnijih razlika iako je i u ovom slučaju najlošije ocijenjeno meso tretirano otopinama octene kiseline. Za razliku od mirisa koji je procjenjivan na svježim uzorcima, kiseli okus mesa se djelomično ublažio procesom kuhanja. Unutar skupine octene kiseline je kao i u ostalim parametrima najmanji broj bodova dodjeljen uzorku mesa tretiranom vrućom otopinom u trajanju od 30 sekundi. Tretiranje otopinama mliječne kiseline nije rezultiralo značajnijim odstupanjima od kontrolnih uzoraka, a takvi rezultati su uglavnom u skladu s drugim istraživanjima (KANG i sur., 2002.; GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.; FERNANDEZ i sur., 2021.), dok pojedini autori čak ističu kako niske koncentracije mliječne kiseline poboljšavaju okus mesa (GRAJALES-LAGUNES i sur., 2012.). S druge strane, KANG i sur. (2002.) ističu kako se kiseli okus mesa nakon tretiranja octenom kiselinom pojačava tek drugi dan nakon njegove pohrane pri 4 °C.

Sumirajući rezultate organoleptičke pretrage mesa, evidentno je kako primjena octene kiseline dovodi do razvoja nepoželjnih karakteristika mesa u gotovo svim promatranim parametrima. Provedenom faktorskom analizom uočava se kako je primjena visoke temperature u sve tri promatrane skupine (obje vrste kiselina te voda) najviše utjecala na nepoželjan izgled mesa, ponajprije u pogledu njegove boje. S tim u vezi, zaključujemo kako su ostali faktori (koncentracija, duljina izlaganja) imali znatno manju ulogu. Boja je uglavnom prvi uočljivi senzorički parametar u sklopu kojeg se procjenjuje ukupni izgled mesa pa mu iz tog razloga pridodajemo najveću važnost u odnosu na ostale parametre. Ako razmatramo to sa strane potrošača, nepoželjna boja mesa u vidu smanjene "živopisnosti" odnosno intenzivnije bljedoće je često i odlučujući faktor pri kupnji istog. S tim u vezi, dekontaminacijske protokole koji rezultiraju takvim izgledom mesa trebalo bi izbjegavati, bez obzira na njihovu dokazanu učinkovitost u redukciji bakterijske populacije. Kao što je već spomenuto, primjena hladnih otopina imala je minimalni utjecaj na boju mesa pa su iz tog razloga bolji izbor, ovisno o procijenjenom utjecaju na ostale promatrane parametre. Obzirom da su hladne otopine octene kiseline u kontekstu boje, ali i mirisa polučile lošije rezultate, zaključujemo kako primjena mliječne kiseline ima veći potencijal, iako je njezin učinak u ovom dijelu istovjetan učinku vode.

Uzevši u obzir sve rezultate ovog rada, dekontaminacijski potencijal obje vrste kiseline u redukciji broja *Y. enterocolitica* na svinjskom mesu je značajan (ili evidentan). Učinak je uvjetovan vrstom dekontaminacijskog protokola, odnosno kombinacijom određenih parametara, primarno temperaturom otopine te duljinom izlaganja. Tako je u pogledu vrste kiseline bolji dekontaminacijski učinak postignut primjenom mliječne kiseline, a redukcije su bile veće u slučaju primjene vrućih otopina tijekom duljeg izlaganja. Učinak postignut primjenom mliječne kiseline bio je značajno veći pri usporedbi s učinkom vode. Uočene razlike odnose se na inicijalni učinak kiselina odmah po tretiranju mesa, dok se nakon 24 sata njihov učinak izjednačava. Navedeno je rezultat stagnacije rasta netretirane populacije bakterijskih stanica (kontrolni uzorci) i istovremenog pada broja populacije izloženih stanica što dovodi do povećanja vrijednosti redukcija. U slučaju primjene kiselina uzrok tog pada je rezidualni utjecaj kiselina koji onemogućuje održavanje bakterijske populacije na istoj razini, dok je u protokolima s vodom on vjerojatno rezultat neadekvatnog odgovora stanica na hladne uvjete kojima su izloženi netom po izlaganju.

Rezultati induciranja acidorezistencije *Y. enterocolitica* i s njom povezane rezistencije na antibiotike ne upućuju na mogućnost prilagodbe sojeva kiselim uvjetima, a time i stjecanja otpornosti prema njihovom učinku. Redukcije postignute ponovljenim testiranjem na stresiranim sojevima nisu bile statistički značajno manje u odnosu na prvotno testiranje, a za očekivati je kako bi u industrijskim uvjetima okolnosti za stjecanje prilagodbe na kiseline bile još više otežane. Mogućnost pojave križne rezistencije na antibiotike je time manja, a to je i potvrđeno obzirom da u toku prilagodbe sojeva kiselim uvjetima nisu zamijećena značajna povećanja minimalnih inhibicijskih koncentracija.

Organoleptička svojstva mesa bila su narušena primjenom vrućih otopina kiselina, ali i vruće vode. Utjecaj ostalih parametara poput koncentracije kiseline i duljine izlaganja bio je manje značajan, za razliku od vrste kiseline pri čemu je dokazano kako primjena octene kiseline narušava organoleptička svojstva svinjskog mesa. Mliječna kiselina time minimalno utječe na konačni izgled mesa, a jednako je utvrđeno i nakon primjene vode.

7. ZAKLJUČCI

1. Dekontaminacijski učinak otopina organskih kiselina prema sojevima *Y. enterocolitica* 4/O:3 na svinjskom mesu uvjetovan je njihovom temperaturom primjene i duljinom izlaganja, no ne i vrstom te koncentracijom
2. Najizraženiji početni dekontaminacijski učinak postignut je duljim izlaganjem mesa vrućim otopinama mliječne kiseline
3. Međusobni dekontaminacijski učinak otopina mliječne i octene kiseline, ali i vode izjednačuje se tijekom hlađenja mesa
4. Visoki postotak preživljavanja sojeva *Y. enterocolitica* 4/O:3 u kiselim uvjetima te izostanak povećanja minimalnih inhibicijskih koncentracija testiranih antibiotika ne upućuje na mogućnost stjecanja otpornosti na organske kiseline i/ili antibiotike
5. Primjena vrućih otopina organskih kiselina i vode doprinosi negativnim organoleptičkim svojstvima tretiranog mesa
6. Hladne otopine mliječne kiseline i vode ne mijenjaju značajnije organoleptička svojstva mesa za razliku od octene kiseline čija primjena se iz tog razloga ne preporučuje

8. POPIS LITERATURE

ABD ELLATIF, Z., S. SAAD, F. HASSANIN, A. SALEM, E. SALEH (2020): Efficiency of some organic acids as decontaminants in sheep carcasses. *Benha Vet. Med. J.* 38, 116-119. doi:10.21608/bvmj.2020.27504.1197

ACUFF, G. R. (2005): Chemical decontamination strategies for meat. U: Improving the Safety of Fresh Meat. (Sofos, J. N., Ur.), Woodhead Publishing, UK, str. 350-363. doi:10.1533/9781845691028.2.350

ADEOLU, M., S. ALNAJAR, S. NAUSHAD, R. S. GUPTA (2016): Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5575-5599. doi:10.1099/ijsem.0.001485

ALBERT, T., P. G. BRAUN, J. SAFFAF, C. WIACEK (2021): Physical Methods for the Decontamination of Meat Surfaces. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 8, 9-20. doi:10.1007/s40588-021-00156-w

AL-NABULSI, A. A., T. M. OSAILI, N. A. Z. ELABEDEEN, Z. W. JARADAT, R. R. SHAKER, K. A. KHEIRALLAH, Y. H. TARAIZI, R. A. HOLLEY (2011): Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 137-143. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.013

AL-NABULSI, A. A., T. M. OSAILI, R. R. SHAKER, A. N. OLAIMAT, Z. W. JARADAT, N. A. Z. ELABEDEEN, R. A. HOLLEY (2015): Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 46, 154-160. doi:10.1016/j.fm.2014.07.015

ALONSO-HERNANDO, A., R. CAPITA, M. PRIETO, C. ALONSO-CALLEJA (2009): Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. J. Microbiol. 47, 142-146.

doi:10.1007/s12275-008-0237-5

ALONSO-HERNANDO, A., C. ALONSO-CALLEJA, R. CAPITA (2013): Effectiveness of several chemical decontamination treatments against Gram-negative bacteria on poultry during storage under different simulated cold chain disruptions. Food Control 34, 574-580.

doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.020

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., A. FERNÁNDEZ, A. BERNARDO, M. LÓPEZ (2009): A comparative study of thermal and acid inactivation kinetics in fruit juices of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg grown at acidic conditions. Foodborne Pathog. Dis. 6, 1147-1155.

doi:10.1089/fpd.2009.0313

ALVSEIKE, O., M. PRIETO, K. TORKVEEN, C. RUUD, T. NESBAKKEN (2018): Meat inspection and hygiene in a Meat Factory Cell – An alternative concept. Food Control 90, 32-39.

doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.014

ANDERSON, M. E, R. T. MARSHALL (1990): Reducing Microbial Population on Beef Tissues: Concentration and Temperature of an Acid Mixture. J. Food Sci. 55, 903-905.

doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01561.x

ANGELOVSKA, M., M. M. ZAHARIEVA, L. L. DIMITROVA, T. DIMOVA, I. GOTOVA, Z. URSHEV, Y. ILIEVA, M. D. KALEVA, T. C. KIM, S. NAYDENSKA, Z. DIMITROV, H. NAJDENSKI (2023): Prevalence, Genetic Homogeneity, and Antibiotic Resistance of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Slaughtered Pigs in Bulgaria. Antibiotics 12, 716.

doi:10.3390/antibiotics12040716

ANONIMNO (2002): Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane.

ANONIMNO (2003): Direktiva 2003/99/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 17. studenoga 2003. o praćenju zoonoza i uzročnika zoonoza, o izmjeni Odluke Vijeća 90/424/EEZ i o stavljanju izvan snage Direktive Vijeća 92/117/EEZ.

ANONIMNO (2004a): Uredba (EZ) br. 852/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o higijeni hrane.

ANONIMNO (2004b): Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla.

ANONIMNO (2004c): Uredba (EZ) br. 854/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju posebnih pravila organizacije službenih kontrola proizvoda životinjskog podrijetla namijenjenih prehrani ljudi.

ANONIMNO (2005a): Antimicrobial Spray Treatments for Red Meat Carcasses Processed in Very Small Meat Establishments. The Pennsylvania State University.

ANONIMNO (2005b): Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

ANONIMNO (2008): Uredba (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehranbenim aditivima.

ANONIMNO (2013): UREDBA KOMISIJE (EU) br. 101/2013 od 4. veljače 2013. o primjeni mliječne kiseline za smanjivanje površinskog mikrobiološkog onečišćenja goveđih trupova.

ANONIMNO (2014): Uredba Komisije (EU) br. 219/2014 od 7. ožujka 2014. o izmjeni Priloga I. Uredbi (EZ) br. 854/2004 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu posebnih zahtjeva za post mortem pregled domaćih svinja.

ANONIMNO (2017): Uredba (EU) 2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. ožujka 2017. o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima kojima se osigurava primjena propisa o hrani i hrani za životinje, pravila o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja.

ANONIMNO (2019): Provedbena uredba Komisije (EU) 2019/627 od 15. ožujka 2019. o utvrđivanju ujednačenog praktičnog uređenja za provedbu službenih kontrola proizvoda životinjskog podrijetla namijenjenih prehrani ljudi u skladu s Uredbom (EU) 2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća i o izmjeni Uredbe Komisije (EZ) br. 2074/2005 u pogledu službenih kontrola.

ANYASI, T. A., A. I. O. JIDEANI, J. N. EDOKPAYI, C. P. ANOKWURU (2020): Application of organic acids in food preservation. U: Organic Acids. Characteristics, properties and synthesis. (Vargas, C., Ur.), Nova Science Publishers, USA, str. 1-45.

ARDEN, K., K. GEDYE, O. ANGELIN-BONNET, E. MURPHY, D. ANTIC (2022): *Yersinia enterocolitica* in wild and peridomestic rodents within Great Britain, a prevalence study. Zoonoses Public Health 69, 537-549.
doi:10.1111/zph.12943

ARSIĆ, M., I. VIĆIĆ, N. GALIĆ, M. DMITRIĆ, J. KURELJUŠIĆ, M. DIMITRIJEVIĆ, M. PETROVIĆ, LJ. ŠARIĆ, N. KARABASIL (2022): Risk factors and the overall characterization of *Yersinia enterocolitica* as an initial model of pathogen surveillance in the pig production system in Serbia. Res. Vet. Sci. 152, 167-174.
doi:10.1016/j.rvsc.2022.08.007

ARSIĆ, M., I. VIĆIĆ, M. PETROVIĆ, M. DMITRIĆ, N. KARABASIL (2023): *Yersinia enterocolitica* and Control Measures for Reducing Risks in the Pork Production Chain. Meat Technol. 64, 237-241.
doi:10.18485/meattech.2023.64.2.43

ARVIZU-MEDRANO, S. M., E. F. ESCARTÍN (2005): Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in acidified media. J. Food Prot. 68, 2047-2053.

doi:10.4315/0362-028x-68.10.2047

AUDIA, J. P., C. C. WEBB, J. W. FOSTER (2001): Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. Int. J. Med. Microbiol. 291, 97-106.

doi:10.1078/1438-4221-00106

BACON, R. T., J. N. SOFOS, P. A. KENDALL, K. E. BELK, G. C. SMITH (2003): Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance-inducing and noninducing conditions. J. Food Prot. 66, 732-740.

doi:10.4315/0362-028x-66.5.732

BANCERZ-KISIEL, A., A. SZCZERBA-TUREK, A. PLATT-SAMORAJ, W. SZWEDA (2012): Distribution of the *ymoA* and *ystA* genes and enterotoxins Yst production by *Yersinia enterocolitica* strains isolated from humans and pigs. Pol. J. Vet. Sci. 15, 609-614.

doi:10.2478/v10181-012-0096-1

BANCERZ-KISIEL, A. M., PIECZYWEK, P. ŁADA, W. SZWEDA (2018): The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection. Genes 9, 235.

doi:10.3390/genes9050235

BARI, M. L., M. ANWAR HOSSAIN, K. ISSHIKI, D. UKUKU (2011): Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. J. Pathog. 420732.

doi:10.4061%2F2011%2F420732

BARRIA, C., M. MALECKI, C. M. ARRAIANO (2013): Bacterial adaptation to cold. Microbiol. 159, 2437-2443.

doi:10.1099/mic.0.052209-0

BEARSON, S., B. BEARSON, J. W. FOSTER (1997): Acid stress response in enterobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 147, 173-180.

doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10238.x

BEN BRAÏEK, O., S. SMAOUI (2021): Chemistry, Safety, and Challenges of the Use of Organic Acids and Their Derivative Salts in Meat Preservation. J. Food Qual. 2021, 1-20.

doi:10.1155/2021/6653190

BERRY, E. D., C. N. CUTTER (2000): Effects of Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on Efficacy of Acetic Acid Spray Washes to Decontaminate Beef Carcass Tissue. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1493-1498.

doi:10.1128/aem.66.4.1493-1498.2000

BHADURI, S. (2005): Survival, Injury, and Virulence of Freeze-Stressed Plasmid-Bearing Virulent *Yersinia enterocolitica* in Ground Pork. Foodborne Pathog. Dis. 2, 353-356.

doi:10.1089/fpd.2005.2.353

BIASINO, W., L. DE ZUTTER, J. WOOLLARD, W. MATTHEUS, S. BERTRAND, M. UYTENDAELE, I. VAN DAMME (2018): Reduced contamination of pig carcasses using an alternative pluck set removal procedure during slaughter. Meat Sci. 145, 23-30.

doi:10.1016/j.meatsci.2018.05.019

BLAGOJEVIĆ, B., T. NESBAKKEN, O. ALVSEIKE, I. VAGSHOLM, D. ANTIĆ, S. JOHLER, K. HOUF, D. MEEMKEN, I. NASTIJEVIĆ, M. VIEIRA PINTO., B. ANTUNOVIĆ, M. GEORGIEV, L. ALBAN (2021): Drivers, opportunities, and challenges of the European risk-based meat safety assurance system. Food Control 124, 107870.

doi:10.1016/j.foodcont.2021.107870

BLAŽEVIĆ, M., M. KIŠ, Ž. CVRILA, N. ZDOLEC (2023): Primjena organskih kiselina u dekontaminaciji trupova klaonički obrađenih životinja. Meso 25, 500-507.

doi:10.31727/m.25.6.3

BOLTON, D. J, C. IVORY, D. McDOWELL (2013): A small study of *Yersinia enterocolitica* in pigs from birth to carcass and characterisation of porcine and human strains. Food Control 33, 521-524.

doi:10.1016/j.foodcont.2013.03.039

BONARDI S., A. PARIS, L. BASSI, F. SALMI, C. BACCI, E. RIBOLDI, E. BONI, M. D'INCAU, S. TAGLIABUE, F. BRINDANI (2010): Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. J. Food Prot. 73, 1785-1792.

doi:10.4315/0362-028x-73.10.1785

BONARDI, S., L. BASSI, F. BRINDANI, M. D'INCAU, L. BARCO, E. CARRA, S. PONGOLINI (2013): Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. Int. J. Food Microbiol. 163, 248-257.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012

BONARDI, S., I. BRUINI, M. D'INCAU, I. VAN DAMME, E. CARNIEL, S. BRÉMONT, P. CAVALLINI, S. TAGLIABUE, F. BRINDANI (2016): Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. Int. J. Food Microbiol. 235, 125-132.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.033

BONETTI, A., B. TUGNOLI, B. ROSSI, G. GIOVAGNONI, A. PIVA, E. GRILLI (2020): Nature-identical compounds and organic acids reduce *E. coli* K88 growth and virulence gene expression in Vitro. Toxins 12, 468-479.

doi:10.3390/toxins12080468

BONNET, M., T. J. MONTVILLE (2005): Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 40, 237-242.

doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01661.x

BOSILEVAC, J. M., X. NOU, G.A. BARKOCY-GALLAGHER, T.M. ARTHUR, M. KOOHMARAIE (2006): Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on preevisceration beef carcasses. J. Food Prot. 69, 1808-1813.

doi:10.4315/0362-028x-69.8.1808

BOTTONE E. J. (2015): *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an Enduring Human Pathogen. Clin. Microbiol. Newsl. 37, 1-8.

doi:10.1016/j.clinmicnews.2014.12.003

BRACKETT, R. E., Y.-Y. HAO, M. P. DOYLE (1994): Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. J. Food Prot. 57, 198-203.

doi:10.4315/0362-028x-57.3.198

BRUL, S., P. COOTE (1999): Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 50, 1-17.

doi:10.1016/s0168-1605(99)00072-0

BRUSTOLIN, J. C., A. DAL PISOL, J. STEFFENS, G. TONIAZZO, E. VALDUGA, M. DI LUCCIO, R. L. CANSIAN (2014): Decontamination of Pig Carcasses Using Water Pressure and Lactic Acid. Braz. Arch. Biol. Technol. 57, 954-961.

doi:10.1590/S1516-8913201402363

BUNČIĆ, S., J. SOFOS (2012): Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. Food Res. Int. 45, 641-655.

doi:10.1016/j.foodres.2011.10.018

BURIN, R. C. K., A. SILVA, L. A NERO (2014): Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. Food Res. Int. 64, 726-732.

doi:10.1016/j.foodres.2014.08.019

CAO-HOANG L., F. DUMONT, P. A. MARECHAL, P. GERVAIS (2010): Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in relation to membrane permeabilization due to rapid chilling followed by cold storage. Arch. Microbiol. 192, 299-305.
doi:10.1007/s00203-010-0555-y

CAP, M., S. VAUDAGNA, M. MOZGOVOJ, T. SOTERAS, A. SUCARI, M. SIGNORINI, G. LEOTTA (2019): Inactivation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh beef by electrolytically-generated hypochlorous acid, peroxyacetic acid, lactic acid and caprylic acid. Meat Sci. 157, 107886.
doi:10.1016/j.meatsci.2019.107886

CARPENTER, C. E., J. V. SMITH, J. R. BROADBENT (2011): Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. Meat Sci. 88, 256-260.
doi:10.1016/j.meatsci.2010.12.032

CASTILLO, A., L. M. LUCIA, D. B. ROBERSON, T. H. STEVENSON, I. MERCADO, G. R. ACUFF (2001): Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. J. Food Prot. 64, 58-62.
doi:10.4315/0362-028x-64.1.58

CENTORAME, P., N. SULLI, C. DE FANIS, O. V. COLANGELO, F. DE MASSIS, A. CONTE, T. PERSIANI, C. MARFOGLIA, S. SCATTOLINI, F. POMILIO, A. TONELLI, V. A. PRENCIPE (2017): Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pig tonsils at slaughterhouse in Central Italy. Vet. Ital. 53, 331-344.
doi:10.12834/vetit.761.3689.3

CHAPLOT, S., B. YADAV, B. JEON, M. S. ROOPESH (2019): Atmospheric cold plasma and peracetic acid-based hurdle intervention to reduce *Salmonella* on raw poultry meat. J. Food Prot. 82, 878-888.
doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-377

CHENG, H.-Y., R.-C. YU, C.-C. CHOU (2003): Increased Acid Tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as Affected by Acid Adaptation Time and Conditions of Acid Challenge. Food Res. Int. 36, 49-56.

doi:10.1016/S0963-9969(02)00107-2

CHOI, Y. M., O. Y. KIM, K. H. KIM, B. C. KIM, M. S. RHEE (2009): Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157:H7 in fresh pork. Lett. Appl. Microbiol. 49, 510-515.

doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02702.x

CHRISTIANSEN, P., R. KRAG, S. AABO (2009): Effect of hot water and lactic acid decontamination on *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia enterocolitica* on pork. Book of abstracts of the 8th International Symposium „Safe Pork“, 30-1 October, Quebec, Canada, pp. 253-257.

CONTE-JUNIOR, C. A., B. T. MACEDO, M. M. LOPES, R. M. FRANCO, M. Q. FREITAS, M. FERNANDEZ, S. B. MANO (2010): Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage. U: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. (Mendez-Vilas, A., Ur.), Formatex Research Center, Spain, str. 1217-1223.

COSANSU, S., K. AYHAN (2012): Effects of lactic and acetic acid on survival of *Salmonella* enteritidis during refrigerated and frozen storage of chicken meats. Food Bioprocess Technol. 5, 372-377.

doi:10.1007/s11947-009-0320-x

COTTER, P. D., C. HILL (2003): Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 429-453.

doi:10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003

DAN, S. D., M. MIHAIU, O. ROTARU, I. DALEA (2007): Microbial changes on the surface of pork carcasses due to lactic and acetic acids decontamination. Bull. 64, 403-408. doi:10.15835/buasvmcn-vm:64:1-2:2450

DAN, S. D., M. MIHAIU, O. REGET, D. OLTEAN, A. TĂBĂRAN (2017): Infuence on week organic acids on pathogens on swine carcasses. Lucrari StiintiEce-Medicina Veterinara Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara "Ion Ionescu de la Brad" Iasi. 60, 265-273.

DAVIDSON, P. M., T. M. TAYLOR (2001): Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. U: Food microbiology: fundamentals and frontiers. (Doyle, M. P., L. R. Beuchat, Ur.), ASM Press, Washington, D.C., str. 593-627. doi:10.1128/9781555818463.ch30

DE BOER, E., J. F. M. NOUWS (1991): Slaughter pigs and pork as source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int. J. Food Microbiol. 12, 375-378. doi:10.1016/0168-1605(91)90151-E

DEGEER, S. L., L. WANG, G. N. HILL, M. SINGH, S. F. BILGILI, C. L. BRATCHER (2016): Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. Meat Sci. 118, 28-33. doi:10.1016/j.meatsci.2016.03.008

DENIS, M., B. MINVEILLE, C. FEURER, M.H. DESMONTS, E. CARNIEL (2012): Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* in pigs, animal reservoir of strains pathogenic to human. Epidemiol. Bull. 50-51.

DICKSON, J. S., J. F. FRANK (1993): Bacterial starvation stress and contamination of beef. Food Microbiol. 10, 215-222. doi:10.1006/fmic.1993.1023

DICKSON, J. S., G. R. SIRAGUSA (1994): Survival of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* during storage on beef sanitised with organic acids. J. Food Saf. 14, 313-327.

doi:10.1111/j.1745-4565.1994.tb00603.x

DICKSON, J. S.; M. R. KUNDURU (1995): Resistance of Acid-adapted *Salmonellae* to Organic Acid Rinses on Beef. J. Food Prot. 58, 973-976.

doi:10.4315/0362-028x-58.9.973

DJENANE, D., A. SANCHEZ-ESCALANTE, J. A. BELTRAN, P. RONCALES (2003): The shelf-life of beef steaks treated with DL-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. Food Microbiol. 20, 1-7.

doi:10.1016/s0740-0020(02)00138-7

EASTWOOD, L. C., T. M. TAYLOR, J. W. SAVELL, K. B. GEHRING, A. N. ARNOLD (2021): Efficacy of antimicrobial interventions in reducing *Salmonella enterica*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* biotype I surrogates on non-chilled and chilled, skin-on and skinless pork. Meat Sci. 172, 108309.

doi:10.1016/j.meatsci.2020.108309

EDWARDS, J. R., D. Y. C. FUNG (2006): Prevention and decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abbatoirs. J. Rapid Meth. Auto. Microbiol. 14, 1-95.

doi:10.1111/j.1745-4581.2006.00037.x

EFSA (2007): Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. EFSA J. 595, 1-30.

doi:10.2903/j.efsa.2007.595

EFSA BIOHAZ Panel (2010): Revision of the joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin intended for human consumption European Food Safety Authority. EFSA J. 8, 1544.

doi:10.2903/j.efsa.2010.1544

EFSA (2011): Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). EFSA J. 9, 2351.

doi:10.2903/j.efsa.2011.2351

EFSA (2018): Evaluation of the safety and efficacy of the organic acids lactic and acetic acids to reduce microbiological surface contamination on pork carcasses and pork cuts. EFSA J. 16, 1-76.

doi:10.2903/j.efsa.2018.5482

EFSA and ECDC (2024): The European union One Health 2023 Zoonoses Report. EFSA J. 22, 1-201.

doi:10.2903/j.efsa.2024.9106

EGGENBERGER-SOLORZANO, L., S. E. NIEBUHR, G. R. ACUFF, J. S. DICKSON (2002): Hot Water and Organic Acid Interventions To Control Microbiological Contamination on Hog Carcasses during Processing. J. Food Prot. 65, 1248-1252.

doi:10.4315/0362-028x-65.8.1248

EL-TABIY, A. A., Z. I. SOLIMAN (2011): Effect of lactic acid and acetic acid on the quality of local meat. Assiut Vet. Med. J. 57, 1-26.

doi:10.21608/avmj.2011.176680

ESTRADA, C. L., G. I., FAVIER, M. E. ESCUDERO (2019): An overview of *Yersinia enterocolitica* and related species in samples of different origin from San Luis, Argentina. Food Microbiol. 86, 103345.

doi:10.1016/j.fm.2019.103345

FABREGA, A., J. VILA (2012): *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. Infect. Dis. Clin. Microbiol. 30, 24-32.

doi:10.1016/j.eimc.2011.07.017

FABRIZIO, K. A., C. N. CUTTER (2004): Comparison of electrolyzed oxidizing water with other antimicrobial interventions to reduce pathogens on fresh pork. *Meat Sci.* 68, 463-468.
doi:10.1016/j.meatsci.2004.04.013

FERL, M., D. MADE, P. G. BRAUN (2020): Combined molecular biological and microbiological detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in spiced ground pork, meat for production of ground pork and raw sausages. *J. Consum. Prot. Food S.* 15, 27-35.
doi:10.1007/s00003-019-01257-x

FERNANDEZ, M., A. RODRIGUEZ, M. FULCO, T. SOTERAS, M. MOZGOVOJ, M. CAP (2021): Effects of lactic, malic and fumaric acids on *Salmonella* spp. counts and on chicken meat quality and sensory characteristics. *J. Food Sci. Technol.* 58, 3817-3824.
doi:10.1007/s13197-020-04842-3

FOIS, F., F. PIRAS, M. TORPDHL, R. MAZZA, D. LADU, S. G. CONSOLATI, C. SPANU, C. SCARANO, E. P. DE SANTIS (2018): Prevalence, bioserotyping and antibiotic resistance of pathogenic *Yersinia enterocolitica* detected in pigs at slaughter in Sardinia. *Int. J. Food Microbiol.* 283, 1-6.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.010

FOSTER, P. L. (2000): Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays* 22, 1067-1074.
doi:10.1002/2F1521

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., A. STOLLE, R. STEPHAN (2007): Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 207-212.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.050

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. (2012): Isolation of enteropathogenic *Yersinia* from non-human sources. *Adv. Exp. Med. Biol.* 954, 97-105.
doi:10.1007/978-1-4614-3561-7-12

FREDRIKSSON-AHOMMA, M. (2015): Enteropathogenic *Yersinia* spp. U: Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals. (Sing, A., Ur.), Springer, Dordrecht, str. 213-234.
doi:10.1007/978-3-031-27164-9-8

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. (2017): *Yersinia enterocolitica*. U: Foodborne diseases. (Dodd, C. E. R., T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, H. P. Riemann, Ur.), Academic Press, New York, str. 223-233.
doi:10.1016/B978-0-12-385007-2.00009-7

GAVRIIL, A., A. THANASOULIA, P. N. SKANDAMIS (2020): Sublethal concentrations of undissociated acetic acid may not always stimulate acid resistance in *Salmonella enterica* sub. *enterica* serovar Enteritidis Phage Type 4: Implications of challenge substrate associated factors. PLoS ONE 15, e0234999.
doi:10.1371/journal.pone.0234999

GIERCZYNSKI, R. (2012): Phylogeny, pathogenicity and genetic diversity of *Yersinia enterocolitica*. Med. Dosw. i Mikrobiol. 64, 159-181.

GILBERT, P., A. J. McBAIN (2003): Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev. 16, 189-208.
doi:10.1128/2FCMR.16.2.189-208.2003

GNANASEKARAN, G., E. J. NA, H. Y. CHUNG, S. KIM, Y. T. KIM, W. KWAK, H. KIM, S. RYUL, S. O. CHOIL, J. H. LEE (2018): Genomic insights and its comparative analysis with *Yersinia enterocolitica* reveals the potential virulence determinants and further pathogenicity for foodborne outbreaks. J. Microbiol. Biotech. 27, 262-270.
doi:10.4014/jmb.1611.11048

GRAJALES-LAGUNES, A., C. RIVERA-BAUTISTA, M. RUIZ-CABRERA, R. GONZALES-GARCIA, J. RAMIREZ-TELLES, M. ABUD-ARCHILA (2012): Effect of lactic acid on the meat quality properties and the taste of pork *Serratus ventralis* muscle. Agric. Food Sci. 21, 171-181.
doi:10.23986/afsci.6082

GREER, G. (1993): Control of meat spoilage bacteria by lactic acid. *Meat Focus International* 2, 207-208.

GREER, G., B. D. DILTS (1995.): Lactic-acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 141-151.
doi:10.1016/0168-1605(94)00088-n

GREER, G. G. (2005): Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 68, 1102-1111.
doi:10.4315/0362-028x-68.5.1102

GUILIER, L., P. FRAVALO, A. LECLERCQ, A. THEBAULZ, P. KOOH, V. CADAVEZ, U. GONZALES-BARRON (2021): Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: A systematic review and meta-analysis. *Microb. Risk Anal.* 17, 100141.
doi:10.1016/j.mran.2020.100141

GULMEZ, M., N. ORAL, L. VATANSEVER (2006): The effect of water extract of sumac (*Rhus 395 coriaria* L.) and lactic acid on decontamination and shelf life of raw broiler wings. *Poult. Sci.* 85, 1466-1471.
doi:10.1093/ps/85.8.1466

GUPTA, V., P. GULATI, N. BHAGAT, M. S. DHAR, J. S.VIRDI (2014): Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 641-650.
doi:10.1007/s10096-014-2276-7

HAN, J., X. LUO, Y. ZHANG, L. ZHU, Y. MAO, P. DONG, X. YANG, R. LIANG, D. L. HOPKINS, Y. ZHANG (2020): Effects of spraying lactic acid and peroxyacetic acid on the bacterial decontamination and bacterial composition of beef carcasses. *Meat Sci.* 164, 108104.
doi:10.1016/j.meatsci.2020.108104

HAN, J., Y. LIU, L. ZHU, R. LIANG, P. DONG, L. NIU, D. L. HOPKINS, X. LUO, Y. ZHANG (2021): Effects of spraying lactic acid and peroxyacetic acid on the quality and

microbial community dynamics of vacuum skin-packaged chilled beef during storage. Food Res. Int. 142, 110205.

doi:10.1016/j.foodres.2021.110205

HARDIN, M. D., G. R. ACUFF, L. M. LUCIA, J. S. OMAN, J. W. SAVELL (1995): Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. J. Food Prot. 58, 368-375.

doi:10.4315/0362-028x-58.4.368

HARRIS, D., M. M. BRASHEARS, A. J. GARMYN, J. C. BROOKS, M. F. MILLER (2012): Microbiological and organoleptic characteristics of beef trim and ground beef treated with acetic acid, lactic acid, acidified sodium chlorite, or sterile water in a simulated commercial processing environment to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. Meat Sci. 90, 783-788.

doi:10.1016/j.meatsci.2011.11.014

HASTAOĞLU E., E. HASTAOĞLU, Ö. P. CAN (2022): Lactic Acid Decontamination in Carcass Meat. Acad. Res. J. Tech. Voc. Schools 1, 36-40.

HAUSER, C. J. THIELMANN, P. MURÁNYI (2016): Organic acids: usage and potential in antimicrobial packaging. U: Antimicrobial Food Packaging. (Barros-Velazquez, J. Ur.), Academic Press, New York, str. 563-580.

doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00046-2

HECER, C., B. H. ULUSOY SÖZEN (2011): Microbiological properties of mechanically deboned poultry meat that applied lactic acid, acetic acid and sodium lactate. Afr. J. Agric. Res. 6, 3847-3852.

doi:10.5897/AJAR11.714

HILL, C., B. O'DRISCOLL, I. BOOTH (1995): Acid adaptation and food poisoning microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 28, 245-254.

doi:10.1016/0168-1605(95)00060-7

HOFVENDAHL, K., B. HAHN-HÄGERDAL (2000): Factor affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 87-107. doi:10.1016/S0141-0229(99)00155-6

HRN EN ISO 10273:2007. Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti patogene *Yersinia enterocolitica*

HUGAS, M., E. TSIGARIDA (2008): Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. *Meat Sci.* 78, 43-52. doi:10.1016/j.meatsci.2007.09.001

HUGHES, M. K., S. YANAMALA, M. S. FRANCISCO, G. H. LONERAGAN, M. F. MILLER, M. M. BRASHEARS (2010): Reduction of multidrug-resistant and drug-susceptible *Salmonella* in ground beef and freshly harvested beef briskets after exposure to commonly used industry antimicrobial interventions. *J. Food Prot.* 73, 1231-1237. doi:10.4315/0362-028x-73.7.1231

HUOVINEN, E., L. M. SIHVONEN, M. J. VIRTANEN, K. HAUKKA, A. SIITONEN, M. KUUSI (2010): Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica* infection: A case-control study. *BMC Infect. Dis.* 10, 122. doi:10.1186/1471-2334-10-122

IBANEZ, T. R., R. LAUKKANEN-NINIOS, M. HAKKINEN, T. JOHANSSON, M. VOLAR, H. KORKEALA (2016): Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in finnish slaughter pigs. *J. Food Prot.* 79, 677-681. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-389

IKEDA, J. S., J. SAMELIS, P. A. KENDALL, G. C. SMITH, J. N. SOFOS (2003): Acid Adaptation Does Not Promote Survival or Growth of *Listeria monocytogenes* on Fresh Beef following Acid and Nonacid Decontamination Treatments. *J. Food Prot.* 66, 985-992. doi:10.4315/0362-028X-66.6.985

IVANOVIĆ, J., R. MITROVIĆ, J. JANJIĆ, M. BOŠKOVIĆ, V. ĐORĐEVIĆ, J. ĐORĐEVIĆ, T. BALTIĆ, M. BALTIĆ (2015): Inactivation of *Yersinia enterocolitica* in Fermented Sausages during Fermentation. J. Agric. Sci. Technol. 5, 626-634.
doi:10.17265/2161-6264/2015.09.005

JAMES, S. J., C. BAILEY (1990): Chilling of beef carcasses. U: Chilled Foods - The State of the Art. (Gormley, T. R., Ur.), Elsevier Science Publishers, London, str. 159-181.

JAMILAH, M. B., K. A. ABBAS, R. A. RAHMAN (2008): A review on some organic acids additives as shelf life extenders of fresh beef cuts. Am. J. Agric. Biol. Sci. 3, 566-574.
doi:10.3844/ajabssp.2008.566.574

JENSEN, J. M., K. L. ROBBINS, K. J. RYAN, C. HOMCO-RYAN, F. K. MCKEITH, M. S. BREWER (2003): Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. Meat Sci. 63, 501-508.
doi:10.1016/s0309-1740(02)00111-0

JOUTSEN, S., M. FREDRIKSSON-AHOMAA (2016a): *Yersinia enterocolitica* Properties and occurrence. U: Encyclopedia of Food and Health. (Caballero, B., P. Finglas, F. Toldra, Ur.), Elsevier Academic Press, Oxford, str. 606-611.

JOUTSEN, S., K. EKLUND, R. LAUKKAANEN-NINIOS, R. STEPHAN, M. FREDRIKSSON-AHOMAA (2016b): Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 5/O:3 in the feces at slaughter. Vet. Microbiol. 197, 78-82.
doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.004

KAMEYAMA, M., J. YABATA, N. OBANE, H. OTSUKA, Y. NOMURA (2016): Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pet Djungarian hamsters in Japan. J. Vet. Med. Sci. 78, 1639-1641.
doi:org10.1292/jvms.15-0654

KANG, S. N., A. JANG, S. O. LEE, J. S. MIN, M. LEE (2002): Effect of Organic Acids on Value of VBN, TBARS, Color and Sensory Property of Pork Meat. J. Anim. Sci. Technol. 44, 443-452.

doi:10.5187/JAST.2002.44.4.443

KASSEM, A., J. MEADE, J. GIBBONS, K. MCGILL, C. WALSH, J. LYNG, P. WHYTE (2017): Evaluation of chemical immersion treatments to reduce microbial populations in fresh beef. Int. J. Food Microbiol. 261, 19-24.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.005

KATZIF, S., D. DANAVAL, S. BOWERS, J. T. BALTHAZAR, W. M. SHAFER (2003): The major cold shock gene, *cspA*, is involved in the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to an antimicrobial peptide of human cathepsin G. Infect. Immun. 71, 4304-4312.

doi:10.1128/iai.71.8.4304-4312.2003

KING, D. A., L. M. LUCIA, A. CASTILLO, G. R. ACUFF, K. B. HARRIS, J. W. SAVELL (2005): Evaluation of peroxyacetic acid as a postchilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcass surfaces. Meat Sci. 69, 401-407.

doi:10.1016/j.meatsci.2004.08.010

KING, A. M., R. K. MILLER, A. CASTILLO, D. B. GRIFFIN, M. D. HARDIN (2012): Effects of lactic acid and commercial chilling processes on survival of *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, and *Campylobacter coli* in pork variety meats. J. Food Prot. 75, 1589-1594.

doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-004

KOCHARUNCHITT, C., L. MELLEFONT, J. P. BOEMAN, T. ROSS (2020): Application of chlorine dioxide and peroxyacetic acid during spray chilling as a potential antimicrobial intervention for beef carcasses. Food Microbiol. 87, 103355.

doi:org/10.1016/j.fm.2019.103355

KOLLER, V., D. SEINIGE, J. SAATHOFF, C. KEHRENBURG, C. KRISCHEK (2021): Impact of a combination of UV-c irradiation and peracetic acid spray treatment on *Brochothrix*

thermosphacta and *Yersinia enterocolitica* contaminated pork. Foods 10, 204.
doi:10.3390/foods10020204

KOMESU, A., J. A. ROCHA DE OLIVEIRA, L. H. DA SILVA MARTINS, M. R. WOLF MACIEL, R. MACIEL FILHO (2017): Lactic Acid Production to Purification: A Review. BioRes. 12, 4364-4383.
doi:10.15376/biores.12.2.4364-4383

KOMORA, N., C. BRUSCHI, R. MAGALHAES, V. FERREIRA, P. TEIXEIRA (2017): Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. Int. J. Food Microbiol. 245, 79-87.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.013

KOSKINEN, J., R. KETO-TIMONEN, S. VIRTANEN, M. J. VILAR, H. KORKEALA (2019): Prevalence and Dynamics of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Among Finnish Piglets, Fattening Pigs and Sows. Foodborne Pathog. Dis. 16, 12.
doi:10.1089/fpd.2019.2632

KOTULA, A. W., A. K. SHARAR (1993): Presence of *Yersinia enterocolitica* O:5/27 in slaughtered pigs. J. Food Microbiol. 56, 215-218.
doi:10.4315/0362-028x-56.3.215

KOTULA, K. L., R. THELAPPURATE (1994): Microbiological and Sensory Attributes of Retail Cuts of Beef Treated with Acetic and Lactic Acid Solutions. J. of Food Prot. 57, 665-670.
doi:10.4315/0362-028X-57.8.665

KOUTSOUMANIS, K. P., P. A. KENDALL, J. N. SOFOS (2003): Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7514-7516.
doi:10.1128/aem.69.12.7514-7516.2003

KOUTSOUMANIS, K. P., L. V. ASHTON, K. E. GEORNARASI BELK, J. A. SCANGA, P. A. KENDALL, G. C. SMITH, J. N. SOFOS (2004): Effect of single or sequential hot water and lactic acid decontamination treatments on the survival and growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microflora during aerobic storage of fresh beef at 4, 10 and 25 degrees C. J. Food Prot. 67, 2703-2711.

doi:10.4315/0362-028x-67.12.2703

KUMAR, S., M. SINGH, D. E. COSBY, D. N. A. COX, H. THIPPAREDDI (2020): Efficacy of peroxy acetic acid in reducing *Salmonella* and *Campylobacter* spp. populations on chicken breast fillets. Poult. Sci. 99, 2655-2661.

doi:10.1016/j.psj.2019.12.045

LATHA, C., C. J. ANU, V. J. AJAYKUMAR, B. SUNIL (2017): Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica* Typhimurium in meat and meat products using multiplex polymerase chain reaction. Vet. World 10, 927-931.

doi:10.14202/vetworld.2017.927-931

LAUKKANEN, R., P. O. MARTÍNEZ, K. M. SIEKKINEN, J. RANTA, R. MAIJALA, H. KOREKEALA (2009): Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. Foodborne Pathog. Dis. 6, 681-688.

doi:10.1089/fpd.2009.0265

LAUKKANEN, R., J. RANTA, X. DONG, M. HAKKINEN, P. O. MARTÍNEZ, J. LUNDÉN, T. JOHANSSON, H. KORKEALA (2010): Reduction of enteropathogenic *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum. J. Food Prot. 73, 2161-2168.

doi:10.4315/0362-028x-73.12.2161

LAUKKANEN-NINIOS, R., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, H. KORKEALA (2014): Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: Challenges for control. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13, 1165-1191.

doi:10.1111/1541-4337.12108

LAURY, A. M., M. V. ALVARADO, G. NACE, C. Z. ALVARADO, J. C. BROOKS, A. ECHEVERRY, M. M. BRASHEARS (2009): Validation of a lactic acid and citric acid-based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on beef tips and whole chicken carcasses. J. Food Prot. 72, 2208-2211.

doi:10.4315/0362-028x-72.10.2208

LEE, Y. H., J. H. KIM (2017): Direct interaction between the transcription factors CadC and OmpR involved in the acid stress response of *Salmonella enterica*. J. Microbiol. 55, 966-972.

doi:10.1007/s12275-017-7410-7

LEON-VELARDE, C. G., J. W. JUN, M. SKURNIK (2019): *Yersinia* Phages and Food Safety. Viruses 11, 31795231.

doi:10.3390/v11121105

LI, Y., H. YANG, B. L. SWEM (2002): Effect of high-temperature inside– outside spray on survival of *Campylobacter jejuni* attached to prechill chicken carcasses. Poult. Sci. 81, 1371-1377.

doi:10.1093/ps/81.9.1371

LI, C., J. MURUGAIYAN, C. THOMAS, T. ALTER, C. RIEDEL (2020): Isolate Specific Cold Response of *Yersinia enterocolitica* in Transcriptional, Proteomic, and Membrane Physiological Changes. Front. Microbiol. 10, 3037.

doi:10.3389/fmicb.2019.03037

LIANG, J., X. WANG, Y. XIAO, C. ZHANG, X. SHENGLI, H. QIONG, Y. JINCHUAN, L. LONGZE, W. SHUKUN, L. KEWEI, Y. HAOSHU, G. WENPENG, X. JIANGUO, K. BIAO, J. HUAIQI (2012): Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs. Appl. Environ. Microbiol. 78, 2949-2956.

doi:10.1128/aem.07893-11

LÜ, Z., X. SU, J. CHEN, M. QIN, H. SHENG, Q. ZHANG, J. ZHANG, J. YANG, S. CUI, F. LI, C. FENG, Z. PENG, B. YANG (2022): Prevalence, bio-serotype, antibiotic susceptibility

and genotype of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species isolated from retail and processed meats in Shaanxi Province, China. LWT 168, 113962.

doi:10.1016/j.lwt.2022.113962

LUCERO-ESTRADA, C. S. M., J. M. SORIA, G. I. FAVIER, M. E. ESCUDERO (2015): Evaluation of the pathogenic potential, antimicrobial susceptibility and genomic relations of *Yersinia enterocolitica* strains from food and human origin. Can. J. Microbiol. 61, 851-860.

doi:10.1139/cjm-2015-0391

MA, D., D. N. COOK, M. ALBERTI, N. G. PON, H. NIKAIDO, and J. E. HAERST (1995): Genes *Acra* and *Acrb* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 16, 45-55.

doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x

MANCINI, M. E., M. BEVERELLI, A. DONATIELLO, A. DIDONNA, L. DATTOLI, S. FALEO (2022): Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from foods in Apulia and Basilicata regions (Italy) by conventional and modern methods. PLOS ONE 17, 0268706.

doi:10.1371/journal.pone.0268706

MANI-LÓPEZ, E., H. S. GARCÍA, A. LÓPEZ-MALO (2012): Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. Food Res. Int. 45, 713-721.

doi:10.1016/j.foodres.2011.04.043

MANZOOR, A., M. H. JASPAL, T. YAQUB, A. U. HAQ, J. NASIR, M. AVAIS, B. ASGHAR, I. H. BADAR, S. AHMAD, M. K. YAR (2020): Effect of lactic acid spray on microbial and quality parameters of buffalo meat. Meat Sci. 159, 107923.

doi:10.1016/j.meatsci.2019.107923

MARTINEZ, P. O., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, A. PALLOTTI, R. ROSMINI, K. HOUF, H. KORKEALA (2011): Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. Foodborne Pathog. Dis. 8, 445-450.

doi:10.1089/fpd.2009.0461

MARTINS, B. T. F., C. V. BOTELHO, D. A. L. SILVA, F. G. P. A. LANNA, J. L. GROSSI, M. E. M. CAMPOS-GALVAO, R. S. YAMATOIGI, J. P. FALCAO, L. DOS SANTOS BERSOT, L. A. NERO (2018): *Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 276, 5-9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028

MAZZETTE, R., F. FOIS, S. G. CONSOLATI, S. SALZA, T. TEDDE, P. SORO, C. COLLU, D. LADU, S. VIRGILIO, F. PIRAS (2015): Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pigs by cultural methods and real-time polymerase chain reaction. *Ital. J. Food Saf.* 4, 4579. doi:10.4081/ijfs.2015.4579

MBANDI, E.; L. A. SHELEF (2002): Enhanced Antimicrobial Effects of Combination of Lactate and Diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Beef Bologna. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 191-198. doi:10.1016/s0168-1605(02)00026-0

McMAHON, M. A. S., J. XU, J. E. MOORE, I. S. BLAIR, D. A. MCDOWELL (2007): Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 211-217. doi:10.1128/AEM.00578-06

MEGAHED, A., B. ALDRIDGE, J. LOWE (2020): Antimicrobial efficacy of aqueous ozone and ozone–lactic acid blend on *Salmonella* contaminated chicken drumsticks using multiple sequential soaking and spraying approaches. *Front. Microbiol.* 11, 1-11. doi:10.3389/fmicb.2020.593911

MENCONI, A., S. SHIVARAMAIAH, G. R. HUFF, O. PRADO, J. E. MORALES, N. R. PUMFORD, M. MORGAN, A. WOLFENDEN, L. R. BIELKE, B. M. HARGIS, G. TELLEZ (2013): Effect of different concentrations of acetic, citric, and propionic acid dipping solutions on bacterial contamination of raw chicken skin. *Poult. Sci.* 92, 2216-2220. doi:10.3382/ps.2013-03172

MEREDITH, H., D. WALSH, D. A. MCDOWELL, D. J. BOLTON (2013): An investigation of the immediate and storage effects of chemical treatments on *Campylobacter* and sensory characteristics of poultry meat. Int. J. Food Microbiol. 166, 309-315. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.005

MIKULSKIS, A. V., I. DELOR, V. H. THI, G. R. CORNELIS (1994): Regulation of the *Yersinia enterocolitica* yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. Mol. Microbiol. 14, 905-915. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb01326.x

MILNE-DAVIES, B., C. HELBIG, S. WIMMI, D. W. C. CHENG, N. PACZIA, A. DIEPOLD (2019): Life After Secretion—*Yersinia enterocolitica* Rapidly Toggles Effector Secretion and Can Resume Cell Division in Response to Changing External Conditions. Front. Microbiol. 10, 2128. doi:10.3389/fmicb.2019.02128

MOHAN, A., F. W. POHLMAN (2016): Role of organic acids and peroxyacetic acid as antimicrobial intervention for controlling *Escherichia coli* O157: H7 on beef trimmings. LWT 65, 868-873. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.077

MOREIRA, L. M., C. MILAN, T. G. GONÇALVES, C. N. EBERSOL, H. G. DE LIMA, C. D. TIMM (2019): Contamination of pigs by *Yersinia enterocolitica* in the abattoir flowchart and its relation to the farm. Cienc. Rural 49, 20181040. doi:10.1590/0103-8478cr20181040

MORILD, R. K., J. E. OLSEN, S. AABO (2011): Change in attachment of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. Int. J. Food Microbiol. 145, 353-358. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.018

MORKA, K., E. WALECKA-ZACHARSKA, J. SCHUBERT, B. DUDEK, A. WOZNIAK-BIEL, M. KUCZKOWSKI, A. WIELICZKO, J. BYSTRON, J. BANIA, G. BUGLA-

PLOSKONSKA (2021): Genetic Diversity and Distribution of Virulence-Associated Genes in *Y. enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-Like Isolates from Humans and Animals in Poland. Pathogens 10, 65.

doi:10.3390/pathogens10010065

NASSER, M., A. ABDOL, M. GWIDA, A. ELGOHARY (2023): Prevalence and Molecular Characterization of *Yersinia* species Isolated from Dogs and Cats. Egyp. J. Vet. Sci. 54, 149-158.

doi:10.21608/ejvs.2022.158028.1389

NEUBAUER, H., A. HENSEL, S. ALEKSIC, M. MEYER (2000): Identification of *Yersinia enterocolitica* within the Genus *Yersinia*. Syst. Appl. Microbiol. 23, 58-62.

doi:10.1016/S0723-2020(00)80046-6

NKOSI, D. V., J. L. BEKKER, L. C. HOFFMAN (2021): The Use of Organic Acids (Lactic and Acetic) as a Microbial Decontaminant during the Slaughter of Meat Animal Species: A Review. Foods 10, 2293.

doi:10.3390/foods10102293

NN (2022): Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 83, 1248.

NOWAK, B., T. V. MUEFFLING, K. CASPARI, J. HARTUNG (2006): Validation of a method for the detection of virulent *Yersinia enterocolitica* and their distribution in slaughter pigs from conventional and alternative housing systems. Vet. Microbiol. 117, 219-228.

doi:10.1016/j.vetmic.2006.06.002

NURYANA, I., A. ANDRIANI, P. LISDIYANTI (2019): Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 251, 012054.

doi:10.1088/1755-1315/251/1/012054

ODA S., H. KABEYA, S. SATO, A. SHIMONAGANE, K. INOUE, H. HAYASHIDANI (2015): Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 from Apodemus mice in Japan. J. Wildl. Dis. 51, 260-264.

doi:10.7589/2014-02-053

ÖZDEMİR, H., Y. YILDIRIM, KÜPLÜLÜ Ö, KOLUMAN A, GÖNCÜOĞLU M, İNAT G. (2006): Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. Food Control 17, 299-303.

doi:10.1016/j.foodcont.2004.11.003

PALAU, R., S. J. BLOOMFIELD, C. JENKINS, D. R. GREIG, F. JORGENSEN, A. E. MATHER (2024): *Yersinia enterocolitica* biovar 1A: An underappreciated potential pathogen in the food chain. Int. J. Food Microbiol. 412, 110554.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110554

PAULSEN, P., F. J. M. SMULDERS (2004): Reduction of the microbial contamination of carcasses and meat cuts with particular reference to the application of organic acids. U: Safety assurance during food processing. (Smulders, F. J. M., J. D. Collins, Ur.), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, str. 177-199.

PAŽIN, V. (2021): Fenotipske i genske značajke izolata *Yersinia enterocolitica* izdvojenih u lancu proizvodnje svinjskoga mesa. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

PERUZY, M. F., M. APONTE, Y. T. R PROROGA, F. CAPUANO, D. CRISTIANO, E. DELIBATO, K. HOUF, N. MURRU (2020): *Yersinia enterocolitica* detection in pork products: Evaluation of isolation protocols. Food Microbiol. 92, 103593.

doi:10.1016/j.fm.2020.103593

PETSIOS, S., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, H. SAKKAS, C. PAPADOPOULOU (2016): Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. Int. J. Food Microbiol. 237, 55-72.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.015

PHADTARE S., M. INOUE (2004): Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186, 7007-7014.

doi:10.1128/JB.186.20.7007-7014.2004

PIPEK, P., M. HOUŠKA, J. JELENÍKOVÁ, K. KÝHOS, K. HOKE, M. ŠIKULOVÁ (2005): Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. J. Food Eng. 67, 309-315.

doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.04.033

PLATT-SAMORAJ, A.; A. BANCERZ-KISIEL, W. SZWEDA (2006): *Yersinia enterocolitica* pathogenicity and the significance of biotype 1A in the pathogenesis of yersiniosis. Med. Vet. 62, 113–115.

PLATT-SAMORAJ, A. (2022): Toxigenic Properties of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A. Toxins 14, 118.

doi:10.3390/toxins14020118

PRIMAVILLA, S., S. FARNETI, R. ROILA, R. BRANCIARI, C. ALTISSIMI, A. VALIANI, D. RANUCCI (2023): Retrospective study on the prevalence of *Yersinia enterocolitica* in food collected in Umbria region (central Italy). Ital. J. Food Saf. 12, 10996. doi:10.4081/ijfs.2023.10996

RAHMAN, A., T. S. BONNY, S. STONSAOVAPAK, C. ANANCHAIPATTANA (2011): *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. J. Pathog. 2011, 239391. doi:10.4061/2011/239391

RAKIN, A., D. GARZETTI, H. BOUABE, L. D. SPRAGUE (2015): Chapter 73 - *Yersinia enterocolitica*. U: Molecular Medical Microbiology. (Tang, Y. W., D. Liu, J. Schwartzman, M. Sussman, I. Poxton, Ur.), Academic Press, New York, str. 1319-1344. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00073-1

RÅSBÄCK, T., T. ROSENDAL, M. STAMPE, A. SANNÖ, A. ASPÁN, K. JÄRNEVI, E. T. LAHTI (2018): Prevalence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Swedish pig farms. Acta Vet. Scand. 60, 39.

doi:10.1186/s13028-018-0393-5

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M., J. MOSQUEDA-MELGAR, R. SOLIVA-FORTUNY, O. MARTIN-BELLOSO (2009): Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 8, 157-180.

doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x

REIS, R. S., F. HORN (2010): Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. Gut Pathog. 2, 8.

doi:10.1186/1757-4749-2-8

REVELL, P. A., V. L. MILLER (2001): *Yersinia* virulence: More than a plasmid. FEMS Microbiol. Lett. 205, 159-164.

doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10941.x

REYES CARRANZA, L., M. S. RUBIO LOZANO, R. D. MENDEZ MEDINA, M. D. C. W. RODARTE, J. F. NUNEZ ESPINOSA, B. L. VELAZQUEZ CAMACHO R. E. F. MACEDO (2013): Acetic acid as an intervention strategy to decontaminate beef carcasses in mexican commercial slaughterhouse. Food Sci. Technol. 33, 446-450.

doi:10.1590/S0101-20612013005000065

RIAH, S. M., E. AHMADI, T. ZEINALI (2021): Global Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Cases of Gastroenteritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int. J. Microbiol. 2021, 1499869.

doi:10.1155/2021/1499869

RICKE, S. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poult. Sci. 82, 632-639.

doi:10.1093/ps/82.4.632

RODRIGUEZ-MELCON, C., C. ALONSO-CALLEJA, R. CAPITA (2017): Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Sci.* 129, 169-175.

doi:10.1016/j.meatsci.2017.01.007

ROERING, A. M., J. B. LUCHANSKY, A. M. IHNOT, S. E. ANSAY, C. W. KASPAR, S. C. INGHAM (1999): Comparative Survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Preservative-free Apple Cider and Simulated Gastric Fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 263-269.

doi:10.1016/s0168-1605(98)00198-6

ROHRBACHER, I. (2001): Decontamination of pork using steam condensation at sub-atmospheric pressure and organic acids with particular attention to sensory changes. Doctoral Thesis, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria.

ROSSI, G. A. M., D. TOSTA LINK, A. BEZERRA BERTOLINI, F. L. TOBIAS, M. DE SOUZA RIBEIRO MIONI (2023): A decriptive review of the use of organic acids and peracetic acid as a decontaminating strategy for meat. *eFood* 4, 104.

doi:10.1002/efd2.104

ROWAN, N. J. (1999): Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 261-270.

SABINA, J., A. RAHMAN, R. CHANDRA RAY, D. MONTET (2011): *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *J. Pathog.* 2011, 429069.

doi:10.4061/2011/429069

SACCHINI, L., G. GAROFOLO, G. DI SERAFINO, F. MAROTTA, L. RICCI, G. DI DONATO, M. G. MIRACCO, F. PERLETTA, E. DI GIANNATALE (2018): The prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in pigs from Central Italy. *Vet. Ital.* 54, 115-123.

doi:10.12834/VetIt.1126.6109.2

SALLAM, K. I., S. M. ABD-ELGHANY, M. A. HUSSEIN, K. IMRE, A. MORAR, A. E. MORSHDY, M. Z. SAYED-AHMED (2020): Microbial decontamination of beef carcass surfaces by lactic acid, acetic acid, and trisodium phosphate sprays. *BioMed Res. Int.* 2020, 1-11.

doi:10.1155/2020/2324358

SAMELIS, J., J. N. SOFOS, P. A. KENDALL, G. C. SMITH (2002): Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat decontamination washing fluids and potential effects of organic acid interventions on the microbial ecology of the meat plant environment. *J. Food Prot.* 65, 33-40.

doi:10.4315/0362-028x-65.1.33

SAMELIS, J. (2005): Meat decontamination and pathogen stress adaptation. U: Improving the safety of fresh meat. (Sofos, J. N., Ur.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, str. 562-591.

SAVIN, C., A. S. LE GUERN, M. LEFRAC, S. BRÉMONT, E. CARNIEL, J. PIZARRO-CERDÁ (2018): Isolation of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1B strain in France, and evaluation of its genetic relatedness to other European and North American biotype 1B strains. *Emerg. Micro & Infec.* 7, 1-3.

doi:10.1038/s41426-018-0123-0

SHOAIB, M., A. SHEHZAD, H. RAZA, S. NIAZI, I. M. KHAN, W. AKHTAR, W. SAFDARE, Z. WANG (2019): A comprehensive review on the prevalence, pathogenesis and detection of *Yersinia enterocolitica*. *RSC Adv.* 9, 41010-41021.

doi:10.1039%2Fc9ra06988g

SIGNORINI, M., M. COSTA, D. TEITELBAUM, V. RESTOVICH, H. BRASESCO, D. GARCIA, V. SUPERNO, S. PETROLI, M. BRUZZONE, V. ARDUINI, M. VANZINI, A. SUCARI, G. SUBERBIE, T. MARICEL, R. RODRIGUEZ, G.A. LEOTTA (2018): Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Meat Sci.* 142, 44-51.

doi:10.1016/j.meatsci.2018.04.009

SINGH, I., J. S. VIRDI (2004): Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of yst genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. J. Med. Microbiol. 53, 1065-1068.
doi:10.1099/jmm.0.45527-0

SKANDAMIS, P. N., G. J. E. NYCHAS, J. N. SOFOS (2010): Meat Decontamination. U: Handbook of Meat Processing. (Fidel, T., Ur.), Blackwell Publishing, New Jersey, str. 43-87.

SKŘIVANOVÁ, E., Z. MOLATOVÁ, M. MATĚNOVÁ, K. HOUF, M. MAROUNEK (2011): Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. Int. J. Food Microbiol. 144, 367-371.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.021

SMULDERS, F. J., G. G. GREER (1998): Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. Int. J. Food Microbiol. 44, 149-169.
doi:10.1016/s0168-1605(98)00123-8

SMULDERS, F. J. M., G. WELLM, J. HIESBERGER, I. ROHRBACHER, A. BAUER, P. PAULSEN (2011): Microbiological and sensory effects of the combined application of hot-cold organic acid sprays and steam condensation at subatmospheric pressure for decontamination of inoculated pig tissue surfaces. J. Food Prot. 74, 1338-1344.
doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-472

SMULDERS, F. J. M., G. WELLM, J. HIESBERGER, A. BAUER, P. PAULSEN (2012): The potential of the combined application of hot water sprays and steam condensation at subatmospheric pressure for decontaminating inoculated pig skin and muscle surfaces. Food Control 24, 154-159.
doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.019

SOFO, J. N., G. C. SMITH (1998): Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. Int. J. Food Microbiol. 44, 171-188.
doi:10.1016/s0168-1605(98)00136-6

SOHAIB, M., F. M. ANJUM, M. S. ARSHAD, U. U. RAHMAN (2016): Postharvest intervention technologies for safety enhancement of meat and meat based products; A critical review. J. Food Sci. Technol. 53, 19-30.

doi:10.1007/s13197-015-1985-y

SPIROVSKA VASKOSKA, R. (2020): Biological Hazards. U: EU Food Law Handbook. (Van der Meulen, B., B. Wernaart, Ur.), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, str. 267-286.

STARKE, M., T. M. FUCHS (2014): YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. 92, 287-301.

doi:10.1111/mmi.12554

STIJN, H. (2017): The decontamination effect of lactic acid on pig-associated *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica*. Master Dissertation, Ghent University, Faculty of Veterinary Sciences, Ghent, Belgium.

STIVARIUS, M. R., F. W. POHLMAN, K. S. MCELYEA, A. L. WALDROUP (2002): Effects of hot water and lactic acid treatment of beef trimmings prior to grinding on microbial, instrumental color and sensory properties of ground beef during display. Meat Sci. 60, 327-334.

doi:10.1016/s0309-1740(01)00127-9

STOPFORTH, J. D., Y. YOON, K. E. BELK, J. A. SCANGA, P. A. KENDALL, G. C. SMITH, J. N. SOFOS (2004): Effect of Simulated Spray Chilling with Chemical Solutions on Acid-Habituated and Non–Acid-Habituated *Escherichia coli* O157:H7 Cells Attached to Beef Carcass Tissue. J. Food Prot. 67, 2099-2106.

doi:10.4315/0362-028X-67.10.2099

STRATFORD, M., T. EKLUND (2003): Organic acids and esters. U: Food preservatives. (Russell, N., G. Gould, Ur.), Kluwer Academic Publishers, London, str. 48-84.

STRYDOM H, J. WANG, S. PAINE, K. DYET, K. CULLEN, J. WRIGHT (2019): Evaluating sub-typing methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* to support outbreak investigations in New Zealand. Epidemiol. Infect. 147, 186.

doi:10.1017/S0950268819000773

SURVE, A. N., A. T. SHERIKAR, K. N. BHILEGAONKAR, U. D. KARKARE (1991): Preservative effect of combinations of acetic acid with lactic or propionic acid on buffalo meat stored at refrigeration temperature. Meat Sci. 29, 309-322.

doi:10.1016/0309-1740(91)90010-N

TAN, L. K., P. T. OOI, K. L. THONG (2014): Prevalence of *Yersinia enterocolitica* from food and pigs in selected states of Malaysia. Food Control 35, 94-100.

doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.053

TANGO, C. N., A. R. MANSUR, G. H. KIM, D. H. OH (2014): Synergetic effect of combined fumaric acid and slightly acidic electrolysed water on the inactivation of foodborne pathogens and extending the shelf life of fresh beef. J. Appl. Microbiol. 117, 1709-1720.

doi:10.1111/jam.12658

TERENTJEVA, M., A. BERZINŠ (2010): Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Slaughter Pigs in Latvia. J. Food Prot. 73, 1335-1338.

doi:10.4315/0362-028X-73.7.1335

TERENTJEVA M., J. KIBILDS, S. GRADOVSKA, L. ALKSNE, M. STREIKIŠA, I. MEISTERE, O. VALCINA (2022): Prevalence, virulence determinants, and genetic diversity in *Yersinia enterocolitica* isolated from slaughtered pigs and pig carcasses. Int. J. Food Microbiol. 376, 109756.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109756

THERON, M. M., J. F. R. LUES (2007): Organic acids and meat preservation: a review. Food Rev. Int. 23, 141-158.

doi:10.1080/87559120701224964

THOMAS, C. L., A. M. STELZLENI, A. G. RINCON, S. KUMAR, M. RIGDON, R. W. MCKEE, H. THIPPAREDDI (2019): Validation of antimicrobial interventions for reducing shiga toxin-producing *Escherichia coli* surrogate populations during goat slaughter and carcass chilling. J. Food Prot. 82, 364-370.

doi:10.4315/0362

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDAS) (1996): Notice of policy change; achieving the zero tolerance performance standard for beef carcasses by knife trimming and vacuuming with hot water or steam; use of acceptable carcass interventions for reducing carcass contamination without prior agency approval. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Federal Register 61, 15024-15027.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDAS) (2020): Safe and Suitable Ingredients Used in the Production of Meat, Poultry, and Egg Products. FSIS Directive, 7120.1 Rev. 55.

VADDU, S., J. KATARIA, E. N. RAMA, A. E. MOLLER, A. GOURU, M. SINGH, H. THIPPAREDDI (2021): Impact of pH on efficacy of peroxy acetic acid against *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* on chicken wings. Poult. Sci. 100, 256-262. doi:10.1016/j.psj.2020.09.063

VAN BA, H., H. W. SEO, S. PIL-NAM, Y. S. KIM, B. Y. PARK, S. S. MOON, S. J. KANG, Y. M. CHOI, J. H. KIM (2018): The effects of pre-and post-slaughter spray application with organic acids on microbial population reductions on beef carcasses. Meat Sci. 137, 16-23. doi:10.1016/j.meatsci.2017.11.006

VAN DAMME, I., D. BERKVEN, G. VANANTWERPEN, J. BARE, K. HOUF, G. WAUTERS, L. DE ZUTTER (2015): Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: Distribution, quantification and identification of risk factors. Int. J. Food Microbiol. 204, 33-40.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.016

VAN NETTEN, P., D. A. MOSSEL, J. H. HUIS IN'T VELD (1997a): Microbial changes on freshly slaughtered pork carcasses due to "hot" lactic acid decontamination. J. Food Saf. 17, 89-111.

doi:10.1111/j.1745-4565.1997.tb00179.x

VAN NETTEN, P., D. A. MOSSEL, J. H. HUIS IN'T VELD (1997b): Fate of low temperature and acid-habituated *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* that contaminate lactic acid decontaminated meat during chill storage. J. Appl. Microbiol. 82, 769-779.

doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00159.x

VAN NETTEN, P., A. VALENTIJN, D. A. A. MOSSEL, J. H. J. HUIS IN'T VELD (1998): The survival and growth of acid-adapted mesophilic pathogens that contaminate meat after lactic acid decontamination. J. Appl. Microbiol. 84, 559-567.

doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00382.x

VEERKAMP, C. H. (1990): Chilling of poultry and poultry products. U: Chilled Foods: The State of the Art. (Gormley, T. R., Ur.), Elsevier Applied Science, London, str. 147-158.

VILAR, M. J., S. VIRTANEN, R. LAUKKANEN-NINIOS, H. KORKEALA (2015): Bayesian modelling to identify the risk factors for *Yersinia enterocolitica* contamination of pork carcasses and pluck sets in slaughterhouses. Int. J. Food Microbiol. 197, 53-57.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.020

VON ALTROCK, A., A. L. LOUIS, U. RÖSLER, T. ALTER, M. BEYERBACH, L. KREIENBROCK, K. H. WALDMANN (2006): The bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 119, 391-399.

WANG, C., T. CHANG, H. YANG, M. CUI (2015): Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 47, 231-236.

doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.034

WANG, Q., R. L. BUCHANAN, R. V. TIKEKAR (2019): Evaluation of adaptive response in *E. Coli* O157:H7 to UV light and gallic acid based antimicrobial treatments. Food Control 106, 106723.

doi:10.1016/j.foodcont.2019.106723

WANG, J., M. LIU, H. WANG, Q. WU, Y. DING, T. XU, G. MA, Y. ZHONG, J. ZHANG, M. CHEN, L. XUE, Q. YE, H. ZHENG, X. YANG, R. YANG (2021a): Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food samples in China. LWT 150, 111876.

doi:10.1016/j.lwt.2021.111876

WANG, J., Y. LEI, Y. YU, L. YIN, Y. ZHANG (2021b): Use of Acetic Acid to Partially Replace Lactic Acid for Decontamination against *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh Produce and Mechanism of Action. Foods 10, 2406.

doi:10.3390/foods10102406

WICKE, A., P. PAULSEN, K. KETTERITZSCH, D. MADE (2018): Detection and assessment of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelkontrolle 2, 46–47.

WOLF, M. J., M. F. MILLER, A. R. PARKS, G. H. LONERAGAN, A. J. GARMYN, L. D. THOMPSON, A. ECHEVERRY, M. M. BRASHEARS (2012): Validation comparing the effectiveness of a lactic acid dip with a lactic acid spray for reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* on beef trim and ground beef. J. Food Prot. 75, 1968-1973.

doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-038

WU, R. A., H. G. YUK, D. LIZ, T. DING (2021): Recent advances in understanding the effect of acid-adaptation on the cross-protection to food-related stress of common foodborne pathogens. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 62, 7336-7353.

doi:10.1080/10408398.2021.1913570

YAGÜE-MUÑOZ, A., A. ARNEDO-PENA, S. HERRERA-LEÓN, N. MESEGUER-FERRER, A. VIZCAÍNO-BATLLÉS, M. A. ROMEU-GARCÍA, L. SAFONT-ADSUARA, J. B. BELLIDO-BLASCOET (2019): Descriptive epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection in a high-incidence area over an 8-year period, 2006-2013. EDICS Project. Inf. Dis. Cl. Microbiol. 37, 441-447.
doi:10.1016/j.eimc.2018.11.002

YANG, X., F. TRAN, T. WOLTERS (2017): Microbial ecology of decontaminated and not decontaminated beef carcasses. J. Food Res. 6, 85-91.
doi:10.5539/jfr.v6n5p85

YEH, Y., F. H. DE MOURA, K. VAN DEN BROEK, A. S. DE MELLO (2018): Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. Meat Sci. 139, 44-48.
doi:10.1016/j.meatsci.2018.01.007

YODER, S. F., W. R. HENNING, E. W. MILLS, S. DOORES, N. OSTIGUY, C. N. CUTTER (2012): Investigation of chemical rinses suitable for very small meat plants to reduce pathogens on beef surfaces. J. Food Prot. 75, 14-21.
doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-084

YOUNIS, G., M. MADY, A. AWAD (2019): *Yersinia enterocolitica*: Prevalence, virulence, and antimicrobial resistance from retail and processed meat in Egypt. Vet. World 12, 1078-1084.
doi:1078-1084.10.14202/vetworld.2019.1078.-1084

YOUSSEF, M. K., X. YANG, M. BADONI, C. O. GILL (2012): Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. Food Control 25, 717-722.
doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.021

YUE, Y., J. ZHENG, M. SHENG, X. LIU, Q. HAO, S. ZHANG, S. XU, Z. LIU, X. HOU, H. JING (2023): Public health implications of *Yersinia enterocolitica* investigation: an ecological

modeling and molecular epidemiology study. Infect. Dis. Poverty 12, 1-15.
doi:10.1186%2Fs40249-023-01063-6

ZADERNOWSKA, A., W. CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, Ł. ŁANIEWSKA-TROKENHEIM (2013): *Yersinia enterocolitica*: A dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. Food Rev. Int. 30, 53-70.
doi:10.1080/87559129.2013.853775

ZADERNOWSKA, A., W. CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA (2016): Prevalence, biofilm formation and virulence markers of *Salmonella* sp. and *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin in Poland. LWT 75, 552-556.
doi:10.1016/j.lwt.2016.10.007

ZAKI, H. M. B. A., H. M. H. MOHAMED, A. M. A. EL-SHERIF (2015): Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella enterica* attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. LWT 64, 558-564.
doi:10.1016/j.lwt.2015.06.012

ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, S. KAZAZIĆ, I. ŠIMUNIĆ, Z. DUMBOVIĆ (2017): Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* strains from food production chain. Book of abstracts of 7th International Congress „Veterinary Science and Profession“, 5-7 October, Zagreb, pp. 99.

ZDOLEC, N., M. KIŠ (2021): Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. Processes 9, 815.
doi:10.3390/pr9050815

ZDOLEC, N., M. KIŠ, D. JANKULOSKI, K. BLAGOEVSKA, S. KAZAZIĆ, M. PAVLAK, B. BLAGOJEVIĆ, D. ANTIĆ, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, V. PAŽIN (2022): Prevalence and persistence of multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* 4/O: 3 in tonsils of slaughter pigs from different housing systems in Croatia. Foods 11, 1459.
doi:10.3390/foods11101459

ZHICHAO C, Z. FENG, G. DAWEI, C. HONGWEI, S. JIE, J. HUAIQI (2019): Epidemiological characters of *Yersinia enterocolitica* in poultry and livestock feces in Lu'an, Anhui. China Trop. Med. 19, 943-946.
doi:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2019.10.09

ZWEIFEL, C., R. STEPHAN (2014): Microbial Contamination During Slaughter. U: Meat Inspection and Control in the Slaughterhouse. (Ninios, T., J. Lauden, H. Korkeala, M. Fredriksson-Ahomaa, Ur.), John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, str. 423-438.

9. ŽIVOTOPIS AUTORICE S POPISOM OBJAVLJENIH PUBLIKACIJA

Marta Kiš rođena je 13. kolovoza 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala je u Josipdolu, a srednju školu u Zagrebu. Na Veterinarskom fakultetu diplomirala je 2017. godine. Od 2020. godine zaposlena je na suradničkom mjestu asistentice na Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a iste godine upisuje i doktorski studij Veterinarske znanosti. Suradnica je u nastavi jednog obveznog, tri obvezno-izborna i šest izbornih predmeta integriranog preddiplomskog i diplomskog studija veterinarske medicine na hrvatskom i engleskom jeziku. Osim toga, aktivno sudjeluje u provođenju znanstveno stručnih aktivnosti Zavoda s posebnim osvrtom na područje mikrobiologije hrane. Dosad je pohađala nekoliko edukacija vezanih uz sigurnost hrane i inspekciju mesa te se znanstveno usavršavala na inozemnim institucijama (Danska, Italija, Makedonija, Engleska, Španjolska). Kao autorica ili koautorica objavila je preko 20 znanstvenih i stručnih radova te sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima. Također, bila je suradnica na projektu financiranom iz Fonda za regionalni razvoj EU-a *Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva* prijavitelja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2019.-2023.) te na projektu Operativnog programa Konkurentnost i kohezija *CEKOM 3LJ* (2020.-2023.). Od 2020.-2023. godine bila je članica COST akcije RIBMINS radne grupe WG2. Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva.

POPIS OBJAVLJENIH PUBLIKACIJA

VINCEKOVIĆ, M., L. ŽIVKOVIĆ, E. TURKEYEVA, B. MUTALIYEVA, G. MADYBEKOVA, S. ŠEGOTA, N. ŠIJAKOVIĆ VUJIČIĆ, A. PUSTAK, T. JURKIN, **M. KIŠ**, S. KAJIĆ (2024): Development of Alginate Composite Microparticles for Encapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Gels 10, 752-786.

KIŠ, M. (2024): Decontamination effect of organic acids against *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains on pork cuts – a preliminary laboratory study. Zbornik radova 5. Međunarodnog kongresa o sigurnosti hrane i kvaliteti hrane: Sigurna hrana, danas i sutra, 6.-9. studenoga, Poreč, Hrvatska, str. 47-47.

PAPOULA-PEREIRA, R., H. LOTTIE, R. O'CARROLL, **M. KIŠ**, D. ANTIĆ (2024): Prevalence of *Yersinia* spp in the tonsils of pigs slughtered in UK. Proceedings of the ECVPH Scientific Conference and Annual General Meeting: Getting ahead of the risks: Strategies to avoid known and unknown hazards, 11.-13. rujna, Liverpool, UK, pp. 17.

ZDOLEC, N., M. FRANIČEVIĆ, L. KLANAC, I. KAVAIN, J. BATINIĆ, M. ZADRAVEC, J. PLEADIN, D. ČOBANOV, **M. KIŠ** (2024): Antimicrobial Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), Lavender (*Lavandula officinalis* L.), Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), and Savory (*Satureja montana* L.) and Their Application in Hard Cheese Production. Hygiene 4, 135-145.

BLAŽEVIĆ, M., **M. KIŠ**, Ž. CVRTILA, N. ZDOLEC (2023): Primjena organskih kiselina u dekontaminaciji trupova klaonički obrađenih životinja. Meso: prvi hrvatski časopis o mesu 6, 500-507.

FUŠTIN, D., **M. KIŠ**, D. OVNIČEVIĆ, T. ZUBAK, N. ZDOLEC (2023): Primjena serologije mesnog soka u dijagnostici invazije protistom *Toxoplasma gondii* u klaonički obrađenih svinja. Hrvatski veterinarski vjesnik – Hrvatska veterinarska komora 31, 56-60.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, M. FRANIČEVIĆ, I. KAVAIN, J. BATINIĆ, D. ČOBANOV (2023): Mikrobiološka kakvoća tvrdih sireva s dodatkom aromatskog bilja Dalmacije. Zbornik radova Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem „Veterinarski dani 2023.“, 26.-29. listopada, Osijek, Hrvatska, str. 208-208.

ZDOLEC, N., L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, V. DOBRANIĆ, T. MIKUŠ, **M. KIŠ**, B. HENGL, M. JURAS, M. FERRI (2023): Trendovi edukacije u području veterinarskog javnog zdravstva s naglaskom na sigurnost hrane. Zbornik radova Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem „Veterinarski dani 2023.“, 26.-29. listopada, Osijek, Hrvatska, str. 196-196.

HORVAT, E., **M. KIŠ**, S. KAZAZIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2023): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from Pag sheep milk, curd, and cheese. Book of Abstracts of 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”, 5.-7. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 146-146.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, M. FRANIČEVIĆ, I. KAVAIN, J. BATINIĆ, M. ZADRAVEC, J. PLEADIN, D. ČOBANOV (2023): Development of new hard cheeses supplemented with Dalmatian medicinal and aromatic herbs: preliminary results of the ERDF project Center of competence 3LJ. Book of Abstracts of 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”, 5.-7. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 141-141.

KIŠ, M., F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, S. KAZAZIĆ, V. DOBRANIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. ČUBRIĆ ČURIK, N. ZDOLEC (2023): Potential of microencapsulation in cheese production – development of innovative technology in dairy science. Book of Abstracts of 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”, 5.-7. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 140-140.

KIŠ, M., D. FUŠTIN, N. ZDOLEC (2023): Relevance of Meat Juice Seroprevalence and Presence of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. in Pig Tonsils for Risk Management at Slaughter. Processes 11, 2234.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, I. KAVAIN, J. BATINIĆ, M. FRANIČEVIĆ, S. ČAUŠEVIĆ (2023): Upgrading the cheese production in Croatia by using medicinal and aromatic herbs – an example of the European Regional Development Fund project CEKOM 3LJ. Proceedings of lectures and posters of international conference Hygiena alimentorum XLIII "Safety and quality of milk and plant commodities - current issues and trends", 10.-12. svibnja, Košice, Slovačka, pp. 656-660.

VINCEKOVIĆ, M., N. MIKULEC, F. OŠTARIĆ, S. JURIĆ, K. VLAHOVIČEK KAHLINA, **M. KIŠ**, N. ZDOLEC, K. SOPKO STRACENSKI (2023): Encapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* in alginate microspheres. 58 hrvatski i 18. međunarodni simpozij agronoma, 11.-17. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, str. 174-174.

KIŠ, M., N. ZDOLEC, S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, S. JURIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, I. MARIĆ, N. MIKULEC (2023): Implementation of Novel Autochthonous Microencapsulated Strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, and Lamb's Rennet in the Production of Traditional "Paški Sir" Cheese. *Fermentation* 9, 441.

KOZAČINSKI, L., N. ZDOLEC., Ž. CVRTILA, V. DOBRANIĆ, T. MIKUŠ, **M. KIŠ** (2022): Laboratorijske vježbe iz higijene i tehnologije hrane. Sveučilišni priručnik (Kožačinski, L., N. Zdolec, Ž. Cvrtila, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

KIŠ, M., S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2022): Viability of novel microencapsulated indigenous cultures of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in Pag cheese pilot production – preliminary results. 4. međunarodni skup o sigurnosti hrane i kvaliteti hrane: Jedno zdravlje, 9.-12. studenoga, Dubrovnik, Hrvatska, str. 53-53.

KIŠ, M., L. KLANAC, T. NINČEVIĆ RUNJIĆ, D. ČOBANOV, M. VUKADIN, N. ZDOLEC (2022): Antibacterial effect of dried aromatic herbs and their extracts on cheese starter culture in vitro - preliminary results. FEMS Conference on Microbiology in association with Serbian Society of Microbiology, 30. lipnja - 3. srpnja, Beograd, Srbija, pp. 759-759.

FUŠTIN, D., **M. KIŠ**, I. VLAHEK, N. ZDOLEC (2022): Meat juice seroprevalence and presence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in tonsils of slaughtered pigs. Proceedings ECVPH Scientific Conference and Annual General Meeting 2022, Food Safety and Animal Health in times of crises: a syndemic perspective. 28.-30. rujna, Atena, Grčka, pp. 42-42.

HUDIKA, T., N. ZDOLEC, **M. KIŠ**, T. CIGULA (2022): Providing Antimicrobial Properties to Cardboard Food Packaging by Coating with ZnO, TiO₂, and SiO₂ —Water-Based Varnish Nanocomposites. *Processes* 10, 2285.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, D. JANKULOSKI, K. BLAGOEVSKA, S. KAZAZIĆ, M. PAVLAK, B. BLAGOJEVIĆ, D. ANTIĆ, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, V. PAŽIN (2022): Prevalence and Persistence of Multidrug-Resistant *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in Tonsils of Slaughter Pigs from Different Housing Systems in Croatia. *Foods* 11, 1459.

OŠTARIĆ, F., N. ANTUNAC, V. ČUBRIĆ-ČURIK, I. ČURIK, S. JURIĆ, S. KAZAZIĆ, **M. KIŠ**, M. VINCEKOVIĆ, N. ZDOLEC, J. ŠPOLJARIĆ, N. MIKULEC (2022): Challenging Sustainable and Innovative Technologies in Cheese Production: A Review. *Processes* 10, 1-30.

ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, K. SEVERIN, V. DOBRANIĆ, S. KAZAZIĆ, J. GRBAVAC, J. PLEADIN, S. PETRIČEVIĆ, **M. KIŠ** (2022): Biogenic Amine Content in Retailed Cheese Varieties Produced with Commercial Bacterial or Mold Cultures. *Processes* 10, 11010.

ZDOLEC, N., T. MIKUŠ, **M. KIŠ** (2022): Lactic acid bacteria in meat fermentation: Dry sausage safety and quality. In: *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology, Innovations and Functional Aspects, Applied Biotechnology Reviews*. (R. C. Ray, S. Paramithiotis, A. de Carvalho, A. Vasco, D. Montet, Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 145-159.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ** (2022): Antimicrobial properties of food enterococci. In: *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology, Innovations and Functional Aspects, Applied Biotechnology Reviews*. (R. C., Ray, S. Paramithiotis, A. de Carvalho, A. Vasco, D. Montet, Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 195-203.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, S. KAZAZIĆ, D. JANKULOSKI, B. BLAGOJEVIĆ, M. PAVLAK, V. PAŽIN (2021): Prevalence, phenotypic and genetic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from slaughtered pigs raised in different housing systems in Croatia. *Proceedings ECVPH Scientific Conference and Annual General Meeting*, 23.-24. rujna, pp. 26-26.

LOVRIĆ, L., A. MARINCULIĆ, **M. KIŠ**, S. LEGEN (2021): Trichinellosis in Croatia - past and present. *Proceedings of lectures and posters HYGIENA ALIMENTORUM XLI*, 23. studenoga, Vysoké Tatry, Slovačka, pp. 288-295.

KIŠ, M., V. BADOVINAC, L. LOVRIĆ, N. ZDOLEC (2021): The use of meat juice serological surveillance for the control of important zoonotic agents in pigs at slaughter // Proceedings of lectures and posters HYGIENA ALIMENTORUM XLI, 23. studenoga, Vysoké Tatry, Slovačka, pp. 244-251.

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., L. LOVRIĆ, I. C. ŠOŠTARIĆ- ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, D. VLAHOVIĆ, A. GUDAN KURILJ, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, **M. KIŠ, M. HOHŠTETER (2021):** Differential diagnosis of intestinal emphysema and cysticercosis (*Cysticercus tenuicollis*) in pigs. Book of Abstracts of 9th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 9. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 51-51.

PAJAČ, L., **M. KIŠ, S. KAZAZIĆ, N. ZDOLEC (2021):** Characterization and selection of *Lactococcus lactis* strains from ewe's milk as potential cheese starter culture. Book of Abstract of the 9th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 9. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 57-57.

ZDOLEC, N., L. KLANAC, **M. KIŠ, V. DOBRANIĆ (2021):** Inhibition of foodborne resistant and pathogenic bacteria by Dalmatian aromatic herbs extract. Book of Abstract of the 9th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 9. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 49-49.

KIŠ, M., V. BADOVINAC, L. LOVRIĆ, N. ZDOLEC (2021): Meat juice serology as a potential tool in farm risk categorization - survey on *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs and wild boars in Karlovac county. Book of Abstract of the 9th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 9. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 48-48.

KIŠ, M., S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2021): Potencijal mikroinkapsulacije u sirarstvu: odabir autohtone mljekarske kulture za Paški sir. Zbornik radova Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem „Veterinarski dani 2021. ”, 26.-29. rujna, Vodice, Hrvatska, str. 363-370.

PAJAČ, L. (2021): Karakterizacija sojeva *Lactococcus lactis* izoliranih iz ovčjeg mlijeka i odabir potencijalne sirarske kulture. Zdolec, Nevijo (mentor); **Kiš, Marta** (neposredni voditelj). Zagreb, Agronomski fakultet.

KIŠ, M., I. KOLAČKO, N. ZDOLEC (2021): Unprocessed milk as a source of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Acta veterinaria (Brno) 90, 357-363.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ** (2021): Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. Processes 9, 815.

KIŠ, M., I. KOLAČKO, N. ZDOLEC (2020): Presence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in milk from vending machines. Zbornik radova 3. međunarodnog skupa o sigurnosti hrane i kvaliteti hrane: Hrana, zdravlje i klimatske promjene, 10.-13. studenoga, Zagreb, Hrvatska, str. 50-50.

KRALJ, D., **M. KIŠ**, N. ZDOLEC (2020): Utjecaj enterocina EF-101 na mikrofloru mljevenog mesa. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora 28, 63-68.

VUJIĆ, K., **M. KIŠ**, N. ZDOLEC (2020): Mikrobiološka čistoća površina hladnjaka za čuvanje hrane u kućanstvima. Veterinar : časopis studenata veterinarske medicine Zagreb 58, 23-27.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, Ž. CVRILA, T. MIKUŠ, S. KAZAZIĆ, J. PLEADIN, T. LEŠIĆ, L. KOZAČINSKI, V. DOBRANIĆ, H. MAZIJA (2020): Mikrobiološka i fizikalno-kemijska svojstva autohtone trajne kobasice od kokošjeg mesa. Meso : prvi hrvatski časopis o mesu 22, 5, 368-377.

ZDOLEC, N., **M. KIŠ**, T. MIKUŠ, M. ZADRAVEC, M. OSTOVIĆ, V. DOBRANIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRILA (2019): ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA APATOGENIH BAKTERIJA U HRANI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA . Zbornik radova Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem „Veterinarski dani 2019. ”, 23.-26. listopada, Primošten, Hrvatska, str. 239-245.

KIŠ, M., V. PAŽIN, S. KAZAZIĆ, E. CMREČAK, I. VIĆIĆ, N. ZDOLEC (2019): Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* isolated from tonsils of pigs produced on family farms. Book of Abstract of the 8th International Congress “Veterinary Science and Profession” , 10.-12. listopada, Zagreb, Hrvatska, pp. 102-102.

ZDOLEC, N., V. PAŽIN, **M. KIŠ** (2019): Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from tonsils and lymph nodes of slaughtered pigs in Croatia. Proceeding of 13th SafePork 2019- Symposium on Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in the Pork Chain, 26.-29. kolovoza, Berlin, Njemačka, str. 169-170.

KIŠ, M., J. GRBAVAC, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ, P. DŽAJA, N. ZDOLEC (2019): Mikrobiološka kvaliteta i masnokiselinski sastav autohtonog sira iz mišine. Hrvatski veterinarski vjesnik – Hrvatska veterinarska komora 27, 58-63.

ZDOLEC, N., D. JANKULOSKI, **M. KIŠ**, B. HENGL, N. MIKULEC (2019): Detection and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates from Milk Vending Machines in Croatia. Beverages 5, 46.

MIKUŠ, T., **M. KIŠ**, O. MIKUŠ (2019): Grizenje repova - rizik po dobrobit i zdravlje svinja te propusti europskih politika. Meso : prvi hrvatski časopis o mesu 21, 295-303.