

SINERGISTIČKI ANTIBIOFILM UČINAK ODABRANIH ETERIČNIH ULJA NA BAKTERIJU LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Bosilj, Kristijan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:540943>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of
Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Kristijan Bosilj

SINERGISTIČKI ANTIBIOFILM UČINAK ODABRANIH ETERIČNIH
ULJA NA BAKTERIJU *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Diplomski rad

Rijeka, 2018

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Kristijan Bosilj
SINERGISTIČKI ANTIBIOFILM UČINAK ETERIČNIH ULJA NA
BAKTERIJU LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: prof.dr.sc. Ivana Gobin dipl.san.ing.

Diplomski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

SAŽETAK

Legionella pneumophila je gram negativna bakterija koju nalazimo u različitim prirodnim vodenim sredinama, kao i u umjetnim vodenim sustavima. Udisanjem aerosola inficiranog legionelama kod čovjeka se razvija pontijačka groznica ili teška legionarska bolest. Uz sve veću svijest o legionelozi povezanoj uz korištenje bazena i jacuzzi bazena, redovito čišćenje i dezinfekcija postaju ključan rizični faktor u širenju infekcije. Osim topline i dezinfekcije klorom, alternativna antibakterijska sredstva kao što su eterična ulja ekstrahirana iz raznih biljaka sve se više procjenjuju. Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi sinergistički antilegionela učinak između odabranih eteričnih ulja te sinergistički učinak eteričnih ulja u sprječavanju formiranja biofilma kako bi se uspostavila alternativna metoda dezinfekcije vode. Korišteno je eterično ulje lavandina, ružmarina i smilja, a ispitivanje je provedeno metodom šahovnice uz upotrebu mikrotitarskih ploča.

Dobiveni rezultati pokazuju sinergističko i aditivno djelovanje navedenih eteričnih ulja. Minimalna inhibicijska koncentracija eteričnog ulja ružmarina iznosi 12,8 mg/mL, dok minimalna inhibicijska koncentracija eteričnih ulja lavandina i smilja iznosi 3,2 mg/mL. Kada su eterična ulja pokazala sinergistički učinak bile su potrebne puno niže koncentracije (0,05 – 0,8 mg/mL) za suzbijanje legionela nego kada je djelovalo samo jedno eterično ulje. Navedena eterična ulja pokazala su i sinergistički učinak kod sprječavanja formiranja biofilma. Zaključno najbolje djelovanje pokazala je kombinacija eteričnog ulja lavandina i ružmarina.

Ključne riječi: eterična ulja, *Legionella pneumophila*, sinergistički anti-legionela učinak

SUMARRY

Legionella pneumophila is a gram negative bacterium found in different natural water environments, as well as in artificial water systems. Inhalation of aerosol infected with *Legionella* develops in a man a Pontiac fever or a severe Legionnaires disease. With the growing awareness of legionellosis associated with usage of pools and jacuzzi, regular cleaning and disinfection become a key risk factor for spreading infection. In addition to heat and chlorine disinfection, alternative antibacterial agents such as essential oils extracted from various plants are increasingly evaluated. Therefore, the aim of this study is to determine the synergistic anti-*Legionella* effect between selected essential oils and the synergistic effect of essential oils in preventing biofilm formation in order to establish an alternative water disinfection method. Essential oil of lavender, rosemary and immortelle was used, and the examination was carried out using the chessboard method with the usage of microtiter plates.

The obtained results show the synergistic and additive affect of these essential oils. The minimum inhibitory concentration of rosemary essential oil is 12.8 mg/mL, while the minimum inhibitory concentration of lavender and immortelle essential oils is 3.2 mg/mL. When essential oils produced a synergistic effect, much lower concentrations (0.05 to 0.8 mg/mL) were needed to suppress *Legionella* than when only one essential oil was in used. These essential oils have also shown a synergistic effect in preventing biofilm formation. In conclusion, the best anti - *Legionella* effect was shown by a combination of lavender and rosemary essential oil.

Keywords: essential oils, *Legionella pneumophila*, synergistic anti - *Legionella* effect

Sadržaj:

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. ETERIČNA ULJA	1
1.2. SASTAV ETERIČNOG ULJA	1
1.3. DOBIVANJE ETERIČNOG ULJA.....	2
1.3.1. VODENA DESTILACIJA	2
1.3.2. DESTILACIJA VODENOM PAROM	3
1.3.3. TIJEŠTENJE.....	4
1.3.4. EKSTRAKCIJA OTAPALIMA I PLINOVIMA	4
1.4. KARAKTERISTIKE ODABRANIH ETERIČNIH ULJA	5
1.4.1. RUŽMARIN (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS L.</i>)	5
1.4.2. LAVANDIN (<i>LAVANDULA HYBRIDA</i>).....	7
1.4.3. SMILJE (<i>HELICHRYSUM ITALICUM</i>).....	8
1.5. OPĆE KARAKTERISTIKE BAKTERIJE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i>	10
1.5.1. PREVENCIJA I KONTROLA	12
1.5.2. BIOFILM.....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. LABORATORIJSKI PRIBOR I UREĐAJI.....	16
3.2. ETERIČNA ULJA	16
3.3. BAKTERIJSKI SOJ I PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE	17
3.4. HRANJIVE PODLOGE.....	17
3.5. ODREĐIVANJE SINERGIJE ETERIČNIH ULJA METODOM ŠAHOVNICE	18
3.5.1 OČITANJE REZULTATA.....	20
3.5.2. IZRAČUN FRAKCIJSKOG INDEKSA INHIBICIJE KONCENTRACIJE (FIC INDEKS).....	20
3.6. ODREĐIVANJE SINERGISTIČKOG ANTIBIOFILM DJELOVANJA	21
4. REZULTATI.....	23
4.1. UTVRĐIVANJE SINERGISTIČKOG DJELOVANJA IZMEĐU ODABRANIH ETERIČNIH ULJA	23
4.2. UTJECAJ KOMBINACIJA ODABRANIH ETERIČNIH ULJA NA FORMIRANJE BIOFILMA	28
5. RASPRAVA	33

6. ZAKLJUČAK	36
7. LITERATURA.....	37
OSOBNİ PODACI	40

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. ETERIČNA ULJA

Eteričnim uljima nazivamo lako hlapljive i lako zapaljive tvari dobivene iz različitih dijelova biljke. U dijelove biljke iz kojih je moguće dobiti eterična ulja ubrajamo list, cvijet, korijen, plod i stabljiku (1).

Kod određenih vrsta biljaka eterično ulje dobivamo samo iz jednog dijela kao što su latice kod ruže. Zatim naprimjer kod lavande se ulje nalazi u cvjetovima i listovima, a kod drva naranče nalazi se u listovima, cvjetovima i kori ploda, pa na taj način dobivamo tri vrste eteričnog ulja. Iako ih nazivamo uljima, ona nisu masna i ne ostavljaju mastan trag. Biljke ih proizvode u koncentriranom obliku te u vrlo malim količinama. Za proizvodnju jednog kilograma eteričnog ulja potrebno je otprilike nekoliko stotina kilograma biljnog materijala. Važno je naglasiti da eterična ulja imaju snažno djelovanje i prije korištenja ih je potrebno razrijediti. Najčešće su eterična ulja bezbojna ili žućkasta, ali mogu imati i izraženu boju ovisno o dijelu biljke i postupku kojim je dobiveno. Boja i miris aromatične biljke, pa tako i sastav eteričnog ulja ovisi o području i okruženju u kojem je ta biljka rasla (2).

1.2. SASTAV ETERIČNOG ULJA

Eterična ulja su zapravo smjese složenih hlapljivih molekula. Osnovni sastojci su u najvećem postotku terpeni, zatim alkoholi, fenoli, kiseline, aldehidi, acetoni i slične tvari. Svi ti spojevi u određenim koncentracijama i kombinacijama stvaraju lako prepoznatljive mirise. Na sam sastav naravno utječe više faktora. Nemoguće je svake godine dobiti ulje identičnog

sastava čak i ako imamo istu plantažu te genetički iste biljke. Usporedbom omjera sastojaka istog ulja kroz nekoliko godina zamijete se velika odstupanja (3).

Sastav tla, vegetacijska faza, djelovi biljke koji su upotrebljeni za dobivanje eteričnog ulja i klima odnosno okruženje biljke u kojem je rasla predstavljaju većinu faktora o kojima ovisi sastav eteričnog ulja. Tijekom proučavanja kroz niz godina postavljeni su rasponi, odnosno norme kojima je definiran karakteristični sastav koji bi određeno eterično ulje trebalo sadržavati (4).

1.3. DOBIVANJE ETERIČNOG ULJA

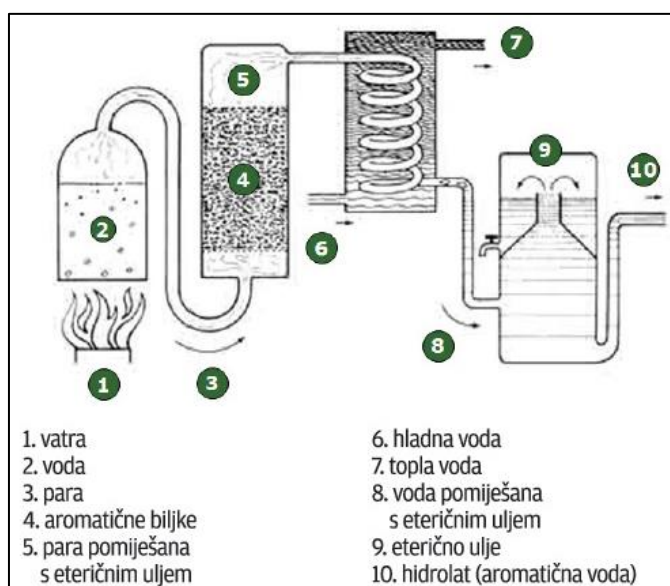
Najčešće upotrebljavani načini za dobivanje eteričnih ulja su destilacija i tiještenje, ali može se iskoristiti ekstrakcija različitim otapalima te ekstrakcija superkritičnim plinom. Iz iste bilje možemo dobiti različita eterična ulja, sve ovisi o tome koji se dio biljke podvrgava destilaciji ili nekom drugom postupku (5).

1.3.1. VODENA DESTILACIJA

Vodena destilacija je najstariji, ali i najskuplji proces destilacije. Najčešće se koristi za male pogone gdje se biljni materijal ne može daleko transportirati ili nije za to prikladan. Ovaj postupak zahtijeva više iskustva u radu i stručnosti nego drugi postupci destilacije. Biljni materijal se uranja u vodu koja se zagrijava plamenom ispod kotla ili unutarnjim zagrijavanjem kod kojeg se koriste cijevi spiralnog oblika (5).

1.3.2. DESTILACIJA VODENOM PAROM

Destilacija vodenom parom u odnosu na vodenu destilaciju je ekonomski isplativija jer destilacija traje kraće, potroši se manje goriva, ali isto tako dobije se bolje iskorištenje biljnog materijala, odnosno više eteričnog ulja. Biljni materijal se nalazi u posudi kroz čije otvore prolazi vodena para, a kako bi se ujednačio prolazak biljni materijal ne smije biti previše usitnjen (5).



Slika 1. Shema pogona za destilaciju vodenom parom (6)

Vodena para prolazi kroz otvore na posudi i biljni materijal te odnosi čestice eteričnog ulja sa sobom. Zatim prolazi kroz cijev koja se hladi vodom. Prilikom hlađenja dolazi do kondenzacije eteričnog ulja i vode. Obzirom da eterično ulje nije topivo u vodi, slojevi se odjeljuju. Eterična ulja se nalaze na površini zato jer su lakša od vode, a ta voda koja se nalazi ispod zove se hidrolat (cvjetna vodica). Hidrolat je zapravo vodena otopina koja je zasićena česticama iz eteričnog ulja, ali se u njoj otapaju više hidrofilne tvari pa sadrži više kiselina, aldehida i alkohola, a manje sekviterpena i terpena koji su jako hidrofobni (5).

1.3.3. TIJEŠTENJE

Tiještenje ili prešanje je dosta jednostavan proces. Proces se primjenjuje za dobivanje eteričnih ulja koja imaju nepromijenjen sadržaj kao žlijezde iz plodova agruma. Proces se obavlja na sobnoj temperaturi bilo to mehanički ili ručno. Prvo se plodovi buše sa sitnim iglama kako bi se omogućilo istjecanje ulja, a zatim se prešaju. Tekućina se sastoji od ulja i vode i većinom stvara emulziju zbog prisutnosti pektinskih tvari i različitih primjesa. Iz takve tekućine ulje se može izdvojiti destilacijom, centrifugiranjem, filtriranjem ili dekantiranjem (5).

Eterična ulja dobivena tiještenjem imaju finiju aromu za razliku od ulja dobivenih destilacijom vodenom parom. Također sastoje se od nehlapive i hlapive frakcije. Dominantna je hlapiva frakcija i ona sadrži različite estere, aldehide i monoterpene, dok se u nehlapivoj frakciji nalaze flavonoidi, masne kiseline, furanokumarini i tetraterpeni (7).

1.3.4. EKSTRAKCIJA OTAPALIMA I PLINOVIMA

Ovi postupci izolacije eteričnih ulja smatraju se alternativnim. Mogu se primijeniti za izravnu izolaciju iz biljnog materijala ili kod postupka destilacije za izolaciju vodenih otopina. Otpala se odabiru prema polarnosti i vrlo bitnoj temperaturi vrenja. Najčešće se koristi dietileter jer ima visoki ekstrakcijski kapacitet. Lako hlapive supstance mogu se izgubiti prilikom procesa otparavanja otapala, dok s druge strane neki nehlapivi spojevi zaostanu u ekstraktu. Takva ulja imaju polučvrstu konzistenciju zbog zaostalih spojeva te se onda takva mirisna masa još naziva i konkret. Upotrebom apsolutnog etanola uklanjaju se masno ulje i vosak te se dobivaju čista eterična ulja koja se najčešće primjenjuju u kozmetici i parfumeriji (5).

Ekstrakcija provedena superkritičnim plinom proces je kojim se dobivaju sadržaji poznatiji pod nazivom apsoluti. Kao plin se najčešće koristi ugljikov dioksid. Postupak je skup i tehnološki zahtjevan te plin može stvoriti kiselinu kada je veća prisutnost vlage. Ta kiselina može oštetiti estere koji su samo neki od osjetljivih sastojaka. Apsoluti se smiju koristiti samo u aromaterapiji (7).

1.4. KARAKTERISTIKE ODABRANIH ETERIČNIH ULJA

1.4.1. RUŽMARIN (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.)

Biljka ružmarina izgleda kao razgranati zimzeleni grm koji naraste i do 2 metra. Postoje i niski oblici koji puzaju i koriste se kao pokrivači tla. Stabljika je drvenasta samo u donjem dijelu. Listovi su čvrsti i kožasti te dužine do 3 centimetra. Trljanjem listova između prstiju oslobađa se intenzivan miris (5).



Slika 2. Ružmarin (8)

Ružmarin cvate tijekom cijele godine, a cvjetovi su svijetlo plave do ljubičaste boje. Samostalna biljka raste na kamenjaru do kojeg dopiјеva mnogo sunca kao što je makija u

mediteranskom području. U krajevima Hrvaskog priobalja razvija se najbujnije, zatim u sjevernoj Italiji, predjelima južne Francuske, Španjolske i Portugala te na obalama sjeverne Afrike. Osjetljiv je na mraz i na hladne zime. Najveći proizvođač, s time da posjeduje i monopol, je Španjolska. U Hrvatskoj se počelo sa uzgojem na Hvaru, Korčuli, Visu i Šolti. Lišće ružmarina ima intenzivni aromatični miris koji nekako podsjeća na kamfor i ima oštri, trpki i lagano gorki okus (5).

Tablica 1. Primjer kemijskog sastava eteričnog ulja ružmarina (9)

Tvar	Ružmarinovo ulje
1,8 - cineol	48,5%
Kamfor	11,2%
α - pinen	11,2%
β - pinen	6,7%
Kamfen	3,6%
Linalol	1,2%
Borneol	3,8%
(+) - limonenon	1,8%

Kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina ovisi o razvojnem stadiju biljke, o podrijetlu biljnog materijala i o vremenu prikupljanja materijala. Većina ovih supstanci nabrojanih u tablici, ali i mnoge druge supstance kao naprimjer karnozolna kiselina ili flavonoidi imaju antioksidativna svojstva. Eterično ulje ružmarina može se primjenjivati lokalno i oralno. Djeluje kao antiseptik u probavnom sustavu, djeluje kao digestiv i karminativ te se koristi u kombinaciji s drugim tvarima za liječenje tegoba cirkulacije i reumatskih bolesti. Inhalacijski pomaže kod prehlade, a kao ulje se rabi i u aromaterapiji. Čuva se hermetički zatvoreno, na temperaturi do 25 °C i zaštićeno od svjetlosti.

1.4.2. LAVANDIN (*LAVANDULA HYBRIDA*)

Lavanda raste kao niski višegodišnji polugrm. Može narasti do 80 centimetara. Listove ima slične ružmarinu što znači da su uski i duguljasti veličine do 3 centimetra. Cvjetovi su sitni, modroljubičaste boje i razvijaju se samo u gornjim dijelovima izdanka. To je vrsta biljke koja se spontano križa pa postoje mnoge podvrste, križanci, hibridi, varijeteti i forme (5).



Slika 3. Lavanda (10)

Raste na suhim obroncima gdje ima dosta topline, ali može uspjeti i na kamenitom tlu. Odgovara joj topla sredozemna klima. U našim primorski krajevima raste vrsta koja ima svijetlo sive listove, a nakupine cvjetova su kraće. Lavanda se intenzivno uzgaja u Provansi (južna Francuska), ali i u Španjolskoj, Grčkoj, Engleskoj i sjevernoj Africi. Lavandin je hibrid odnosno križanac između širokolisne i uskolisne lavande dobiven prirodnim putem. Vrlo je raširen na otoku Hvaru gdje je skoro u potpunosti istisnuo lavandu. Raste u naizgled većim grmovima od lavande i ima duže cvjetne stapke te daje više ulja.

Sastav eteričnog ulja ovisi o kakvoći tla, klimatskim uvjetima, nadmorskoj visini ali isto tako ovisi dali su te biljke samonikle ili su pak uzgojene. Što je biljka rasla na većoj nadmorskoj visini u pravilu se dobiva eterično ulje bolje kvalitete. Kod uzgojenih lavandi

nalazi se dva puta veća količina eteričnog ulja nego kod samoniklih, ali i između podvrsta i različitih križanaca nalazimo razlike u postotku doprinosa ulja. *Lavandula angustifolia* je vrsta koja daje dosta nizak prinos ulja, ali je to eterično ulje zato najkvalitetnije. Najveći udio od 30 do 60 % u eteričnom ulju lavande zauzima linalilacetat, zatim slijedi slobodni linalol te male količine kamfora, bornilacetata i borneola. Lavandin ima veći doprinos ulja, ali je to ulje lošije kvalitete zbog veće prisutnosti estera (od 7 do 16%) i posjeduje miris na kamfor.

U farmaciji se većinom primjenjuje lokalno gdje nastaje crvenilo kože. Također ima analgetsko i antiseptičko djelovanje te se stoga nalazi kao sastojak u različitim alkoholima i mastima. U velikim količinama koristi se u industriji parfema, sapuna i dezodoransa. Pokazuje antimikrobno djelovanje pa se u prehrambenoj industriji koristi kao konzervans. Čuva se hermetički zatvoreno, na temperaturi do 25 °C i zaštićeno od svjetlosti (5).

1.4.3. SMILJE (*HELICHRYSUM ITALICUM*)

Smilje je biljka kod koje razlikujemo preko nekoliko stotina različitih vrsta. U Hrvatskoj je najpoznatije pješčano smilje (*Helichrysum arenarium*) i primorsko smilje (*Helichrysum italicum*). Pješčano smilje je rasprostranjeno u suhom i toplom mediteranskom području, a obuhvaća i centralnu te istočnu Europu. Raste u obliku niskog grma sa specifičnim žutim cvjetićima i blagim oporim mirisom (11).



Slika 4. Smilje (12)

Primorsko smilje je pak neizostavna vrsta hrvatskih priobalja i kamenarskih pašnjaka, a rasprostranjeno je i u zemljama Sredozemlja (Francuska, Italija, Maroko, Alžir, Grčka, Cipar i Španjolska). Samoniklo raste u krškom području, zatim na plitkim i pjeskovitim tlima sa puno sunčanih dana. Ukoliko se smilje bere za proizvodnju eteričnog ulja obično je prvi otkos u srpnju kada je otprilike otvoreno 50% cvjetova. I cvjetovi i stabljike se moraju u što kraćem vremenu iskoristiti kod proizvodnje ulja kako bi se spriječilo truljenje. Očekivani prinosi eteričnog ulja prosječno se kreću oko 10 kg po hektaru. Ova vrsta spada u kategoriju zaštićenih biljaka te je za skupljanje potrebno odgovarajuće dopuštenje (11).

Primorsko smilje u svojem sastavu sadrži mnoge aromatične tvari koje mu određuju njegovu primjenu. Najznačajnije tvari su: italidion, α -pinen, geraniol, β -pinen, α -kariofilen, linalol, γ -kurkumen i nerol. Upotrebljava se u kozmetičkoj i farmaloškoj industriji i kulinarstvu. Ima vrlo blagi učinak na kožu, a posjeduje antialergijsko, fungicidno, antibakterijsko, antiseptično, antikoagulantno i inflamantorno djelovanje. Pješčano smilje se najčešće koristi samo u farmakološkoj industriji. Eterična ulja se čuvaju na tamnim mjestima i na niskim temperaturama u vakumski zatvorenim bocama da se spriječi polimerizacija i naravno gubitak kvalitete (13).

1.5. OPĆE KARAKTERISTIKE BAKTERIJE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

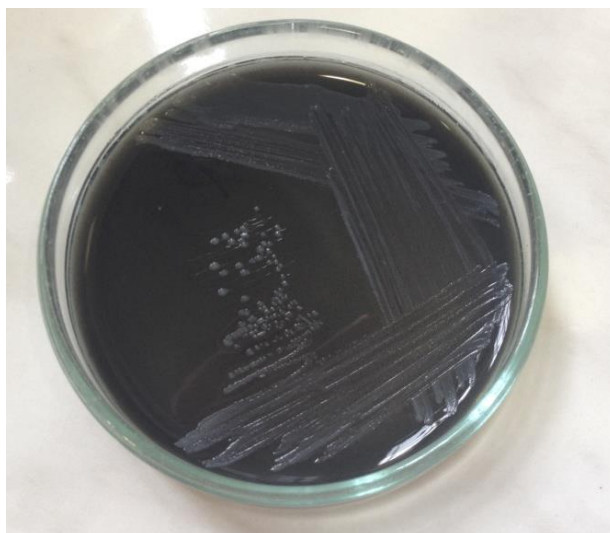
Legionella pneumophila je bakterija otkrivena 1979. godine. Do sada su znanstvenici otkrili više od šesdeset različitih vrsta sa više od sedamdeset različitih seroskupina. Bakterija je svrstana u porodicu *Legionellaceae*. Kod ljudi može uzrokovati infekciju oko dvadeset vrsta legionela, a najčešći uzročnik je *Legionella pneumophila* (14).



Slika 5. *Legionella pneumophila*

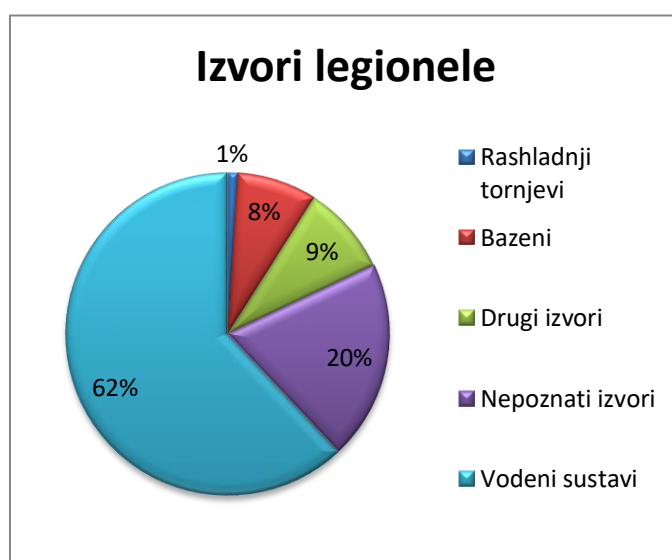
Pojavljaju se u obliku pleomorfnih štapića. Pokreću se pomoću jedne ili dvije lateralne flagele, imaju pile, ali u nepovoljnim uvjetima ne stvaraju spore. Dosta su zahtjevne i ne rastu na većini bakterioloških podloga. Uobičajena podloga za uzgoj je BCYE agar (engl. Buffered charcoal yeast extract) koja sadrži aktivni ugljen, ekstrakt kvasca i ponekad alfa – ketoglutaru kiselinu. Također u hranjivoj podlozi moraju biti prisutni L – cistein i soli željeza (14).

Vrijeme inkubacije traje od 48 do 72 sata na 37 °C i neki sojevi zahtjevaju povišenu koncentraciju ugljikova dioksida. Nakon inkubacije na podlozi se javljaju pravilne, konveksne i svjetlucave kolonije ravnog ruba (Slika 6).



Slika 6. *Legionella pneumophila* na BCYE agaru

Legionele zbog sve veće otpornosti na ionako visoke koncentracije klora uspijevaju opstati u sustavima za opskrbu vode i upravo ti sustavi predstavljaju najčešći izvor infekcije. Mogu preživjeti u rasponu temperature vode od 0 pa do 63 °C, a optimalna temperatura za rast im je 36 ili 37 °C. Za rast i razmnožavanje ove bakterije najbolji uvjeti nalaze se u sanitarnoj toploj vodi, ovlaživačima zraka, rashladnim tornjevima, slijepim završecima cijevi, SPA centrima, različitim saunama i sličnim mjestima gdje može nastati aerosol (14).



Graf 1. Raspodjela mjesta uzorkovanja nakon pozitivnog testa na legionele (16)

Ljudi oboljevaju samo ako udišu kontaminirani aerosol. Imunološki sustav čovjeka i infektivna doza presudni su faktori za pojavu bolesti. Kako legionele u vodi preživljavaju u različitim vrstama ameba, tako ulaskom u respiratorni sustav čovjeka inficiraju makrofage odnosno fagocitne stanice. Unutar fagosoma se nesmetano razmnožavaju samo virulentni sojevi tako što sprječavaju proteolitičku razgradnju i spajanje fagosoma s lizosomom.

Razlikujemo dva klinička oblika bolesti. To su pontijačka groznica koja ima simptome slične gripi i legionarska bolest koja se manifestira kao izrazito teška upala pluća. Bolest se javlja sporadično tijekom cijele godine, dok se epidemije javljaju najčešće u ljetnim mjesecima. Pontijačka groznica je karakterizirana sa velikom brzinom širenja bolesti s vremenom inkubacije 1 ili 2 dana. Obično prolazi nakon nekoliko dana bez ikakvih komplikacija. Inkubacija kod legionarske bolesti traje od 2 do 10 dana. Prvi simptomi koji se javljaju su povišena temperatura, malaksalost, glavobolja, suhi kašalj, zbunjenost i dezorijentiranost te gastrointestinalni poremećaji (povraćanje i proljev). Razvijanjem bolesti javljaju se bolovi u prsima, otežano disanje i respiratorni sindrom. Za liječenje se koristi kombinacija antibiotika (kinoloni i makrolidi). (14)

1.5.1. PREVENCIJA I KONTROLA

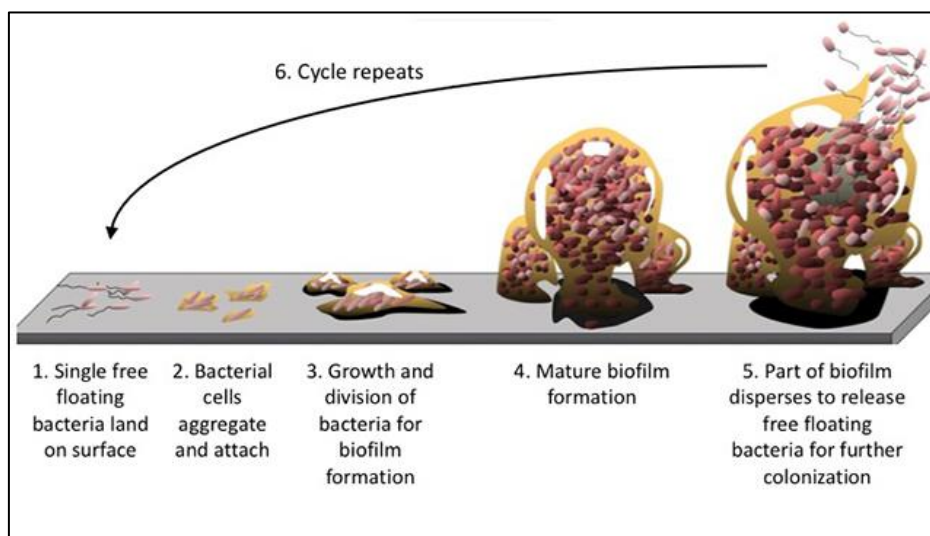
Preventivne mjere se provode kako bi se osigurala zdravstvena ispravnost i kondicioniranje vode za piće, hotelskih objekata, bazenskih ili sličnih voda u SPA centrima. Mjere obuhvaćaju održavanje hladne vode na temperaturi manjoj od 20 °C i tople vode na temperaturi većoj od 50 °C za vrijeme rada takvog objekta. Zatim mora biti ispravna izvedba sanitarno-tehničke vodoopskrbe, klimatizacije i grijanja što je izravan način sprječavanja stagnacije i niskog protoka vode, a to su glavni čimbenici rizika nastanka biofilma te preživljavanja i razmnožavanja legionela. Također provodi se dezinfekcija vode sa raznim

sredstvima, najčešće sa klorom, gdje se ovisno o objektu održava stalno prisutna koncentracija slobodnog rezidualnog klora (17).

U bazenima s pjenom kao što su spa bazeni, jacuzzi ili whirlpool prvo se ispusti voda iz cijelog takvog sustava. Na taj način se spremnici bazena i sami bazeni mogu mehanički očistiti kako bi se uklonio kamenac kojim se legionela hrani. Zatim se cijeli sustav ispiri čistom vodom i provodi trajna dezinfekcija bazena. Redovito se mora kontrolirati razina slobodnog rezidualnog klora kao i pH vode. Koncentracija slobodnog rezidualnog klora mora se kratati u rasponu između 2 i 3 mg/L (17).

1.5.2. BIOFILM

Biofilmovi se mogu oblikovati na širokom rasponu površina, uključujući živa tkiva, medicinske uređaje, industrijske ili cjevovode za pitku vodu te u prirodnim vodenim sustavima. Biofilm vodenog sustava je vrlo složen i te sadrži korozijske proizvode, glinene materijale, diatome slatke vode i vlaknaste bakterije. Karakteristike vodenog medija, kao što su pH, razine hranjivih tvari, razina iona i temperatura mogu imati ulogu u brzini vezanja mikroorganizama. Pričvršćeni mikroorganizmi za površinu generiraju matricu ekstracelularne polimerne supstance (EPS). EPS se može razlikovati u kemijskim i fizikalnim svojstvima, ali se prvenstveno sastoji od polisaharida. Blizina stanica unutar biofilma pruža idealno okruženje za stvaranje hranjivih gradijenata, razmjenu gena i komunikaciju putem senzora kvoruma. U biofilmovima se konjugacija odnosno razmjena plazmida događa većom brzinom nego između stanica koje ne pripadaju biofilmu. Unutar biofilma bakterije imaju osigurane potrebne hranjive tvari za rast i razvoj te se lako razmnožavaju i postaju otpornije na vanjske utjecaje bilo kakvim sredstvima (20).



Slika 7. Nastajanje biofilma (19)

Formiranje biofilma možemo podijeliti na nekoliko faza (Slika 7). Prvo dolazi do reverzibilnog vezivanja bakterija na površinu gdje su već adsorbirane organske i anorganske tvari. Zatim slijedi lučenje EPS-a i na taj način se formiraju pojedinačne stanice koje omogućuju ireverzibilno vezanje bakterija. Posljednja faza je faza kolonizacije površine. U toj fazi pričvršćene bakterije rastu i razmnožavaju se te nastaju mikrokolonije koje se smatraju osnovnom jedinicom biofilma (21).

Legionela u okolišu stvara simbiotkse odnose s drugim mikrorganizmima (bakterije i protozoe). Ti simbiotski odnosi im omogućuju kolonizaciju u cijevima vodoopskrbe te dolazi do nastanka biofilma koji im onda osigurava potrebne hranjive tvari za rast i razvoj. Takvi biofilmovi su vrlo otporni na različita dezinfekcijska sredstva uključujući i klor. Bakterije preživljavaju i puno veće koncentracije slobodnog klora (12 ppm) nego što se općenito nalaze u vodi za piće (22).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Legionella pneumophila postala je sve zahtjevniji javnozdravstveni problem razvijanjem otpornosti prema različitim dezinfekcijskim sredstvima. Istraživanjem sinergističkog antilegionela učinka odabranih eteričnih ulja želi se uspostaviti alternativna metoda dezinfekcije vode. Zamišljeno je da metoda dezinfekcije bude usmjerena prema vodama koje se nalaze u spa centrima jer u takvim centrima postoji veliki rizik od pojave kontaminiranog aerosola. Cilj rada je ispitati potencijalni sinergistički učinak tri eterična ulja, ružmarina, lavandina i smilja na planktonske bakterije *L. pneumophila* te njihov učinak na stvaranje biofilma.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. LABORATORIJSKI PRIBOR I UREĐAJI

- Mikrotitarske pločice
- Automatske pipete: 0,5-10 μ L (Eppendorf, Njemačka), 2-20 μ L, 20-100 μ L, 20-200 μ L i 10-1000 μ L “Gilson Pipetman” (Gilson, USA)
- Nastavci za automatske pipete (ep T.I.P.S.)
- Spektrofotometar (Biofotometar, “Eppendorf”, Njemačka)
- Inkubator (BTE-S, Bodalec i Havočić, Dugo selo – Zagreb)
- Plamenik (Poligas OMM)
- Epruvete
- Mikrobiološke ušice (“eze”)
- Termostatirana tresilica: Heidolph unimax 1010
- Ultrazvučna kupelj (Bacto Sonic 14, Bandelin)

3.2. ETERIČNA ULJA

Za ovo istraživanje odabrali smo eterično ulje ružmarina, lavandina i smilja. Eterična ulja su dobivena ljubaznošću gospodina Mihe Jeršeka iz Slovenije, a biljni materijal za dobivanje ulja potiče s otoka Hvara. Eterična ulja su dobivena vodenom destilacijom. Od lavandina ubrani su cvjetovi i otprilike 10 cm stabla u 7. mjesecu, a za smilje stabla i cvjetovi isto u 7. mjesecu. Od ružmarina ubrane su iglice. Štok otopine koncentracije 200 mg/mL pripremljena je pomoću DMSO. Iz štok otopine smo pripremali različite količine eteričnih ulja koncentracije 25,6 mg/mL. Koncentracija od 25,6 mg/mL je polazna koncentracija za sve provedene pokuse.

3.3. BAKTERIJSKI SOJ I PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

U istraživanju je korištena bakterija *Legionella pneumophilla* (soj 130b). Bakterija je čuvana u zamrzivaču na -80°C . Da bi se koristila u pokusima bakteriju je potrebno nasaditi na BCYE agar te inkubirati na 37°C . Porast na podlozi vidljiv je nakon 3 – 5 dana.

Za pripremu bakterijske suspenzije ezom se pikiraju porasle kolonije i razmute u bujonu ili vodi ovisno o pokusu. Suspenzija se dobro promiješa i odredi se apsorbancija na spektrofotometru. Vrijednost apsorbancije približno OD (optička gustoća) 1 znači da u suspenziji ima približno 10^9 bakterija. Zatim se rade deseterostruka razrjeđenja sve do koncentracije bakterija od 10^6 koja se koristi dalje u pokusima.

3.4. HRANJIVE PODLOGE

Za potrebe ovog diplomskog rada korištene su dvije hranjive podloge:

- BCYE agar (pH 6,9): 10 g ACES (N-[2-acetamido]-2-aminoetansulfonske kiseline), 10 g/l kvašćevog ekstrakta, 20 g/l agara, 2 g/l aktivnog ugljena te 1g/l alfa-ketoglutarat uz dodatak 10 ml/ l 0,33 M L-cisteina te 10 ml/ l 0,1 M željezovog (III) nitrata.
- AYE bujon sastav (pH 6,9): 10 g/l kvašćev ekstrakt, 10 g/l ACES, 1 g/l alfa-ketoglutara uz dodatak 10 ml/ l 0,33 M L-cisteina te 10 ml/ l 0,1 M željezovog (III) nitrata.

3.5. ODREĐIVANJE SINERGIJE ETERIČNIH ULJA METODOM ŠAHOVNICE

Nakon pripremljenih koncentracija eteričnih ulja slijedi priprema mikrotitarskih ploča prema opisanoj metodi. Određene su kombinacije eteričnih ulja i utvrđeno je da su za svaku kombinaciju potrebne dvije mikrotitarske ploče. Jedna ploča za jedno eterično ulje.

U jednim pokusima se koristio AYE bujon, a u drugim pokusima sterilna vodovodna voda sa $\frac{1}{4}$ AYE bujona:

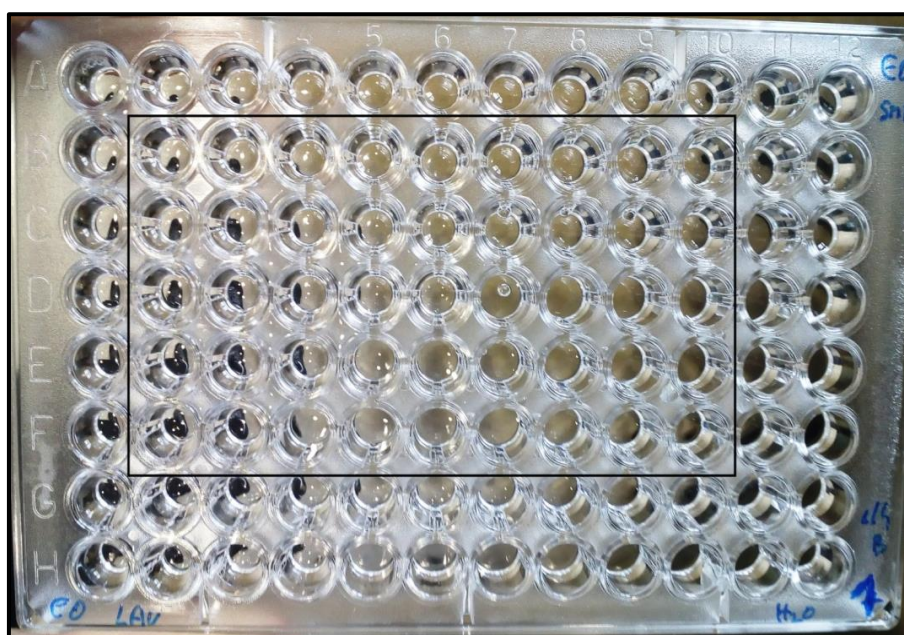
Ploča 1:

- a. 50 μ l AYE bujona ili vode sa AYE bujonom ($\frac{3}{4}$ vode i $\frac{1}{4}$ AYE bujona) dodano je u svaku jažicu osim onih u redu H i stupcu 12
- b. 50 μ l eteričnog ulja A, koncentracije 25,6 mg/mL, dodano je u svaku jažicu koja se nalazi u stupcu 11 osim one u H redu
- c. Zatim su napravljena dvostruka razrjeđenja automatskom pipetom od stupca 11 do stupca 2
- d. Zaključno stupac 1 ostaje potpuno prazan

Ploča 2

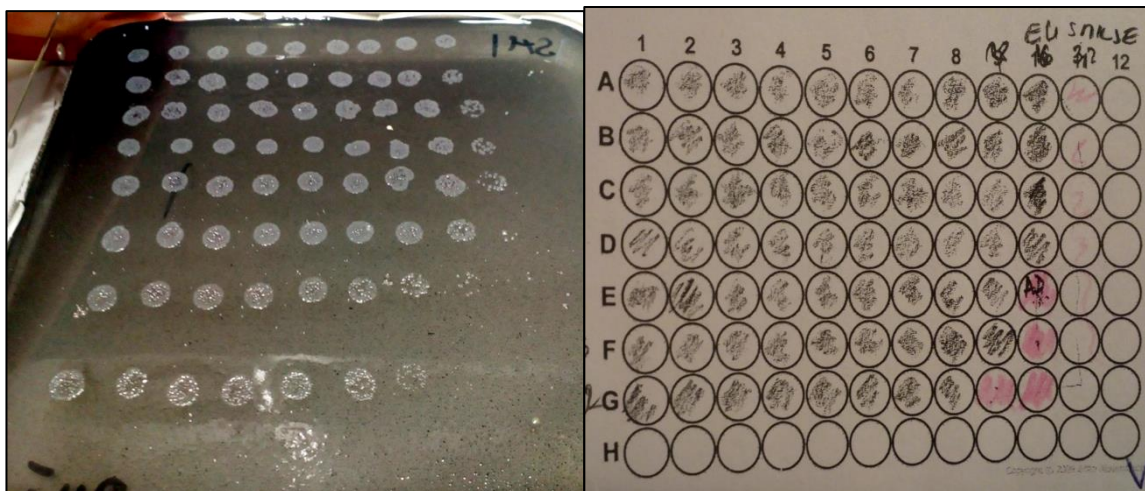
- a. 100 μ l AYE bujona ili vode sa AYE bujonom ($\frac{3}{4}$ vode i $\frac{1}{4}$ AYE bujona) dodaje se u svaku jažicu osim onih u redu H i stupcu 12
- b. 100 μ l eteričnog ulja B, koncentracije 25,6 mg/mL, dodano je u svaku jažicu koja se nalazi u redu H osim one u stupcu 12
- c. Zatim su napravljena dvostruka razrjeđenja automatskom pipetom od reda H do reda B
- d. Zaključno red A ostaje potpuno prazan

Nakon pripreme ovakve dvije ploče slijedi njihovo spajanje na način da se automatskom pipetom prenese po 50 μ l mješavine iz ploče 2 u ploču 1 na identično mjesto iz koje je uzeto. Na primjer ako se uzeo cijeli red B iz ploče 2 prenese se u red B na ploči 1. Na taj način dobije se jedna ploča sa 50 kombinacija, različitih koncentracija oba eterična ulja, koje se nalaze u obilježеном području (slika 8).



Slika 8. Prikaz mikrotitarske pločice sa kombinacijama koncentracija eteričnih ulja

Na kraju u sve jažice dodajemo 100 μ l bakterijske suspenzije ($CFU=10^6$) i ploče stavljamo u inkubator na 37 °C kroz 24 sata. Drugi dan slijedi nakapavanje uzoraka iz svih jažica na BCYE agar pomoću multikanalne pipete. Iz svake jažice prenese se 5 μ l. Nakapane BCYE podloge pustimo da se osuše i stavljamo na inkubaciju na 37 °C kroz 3-5 dana. Zatim očitavamo da li je u jažicama došlo ili nije došlo do porasta legionele, odnosno da li su eterična ulja u tim koncentracijama i kombinacijama djelovale antibakterijski.



Slika 9. Prikaz porasta na BCYE agaru i očitavanje istog porasta

3.5.1 OČITANJE REZULTATA

- Iz reda A očitavamo minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIC) eteričnog ulja A - prva jažica u kojoj nije došlo do porasta bakterije
- Iz stupca 1 očitavamo minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIC) eteričnog ulja B - prva jažica u kojoj nije došlo do porasta bakterije
- Iz ostalih jažica gdje nije došlo do porasta izračunava se FIC index

3.5.2. IZRAČUN FRAKCIJSKOG INDEKSA INHIBICIJE KONCENTRACIJE (FIC INDEKS)

FIC (FIC indeks) = FIC eteričnog ulja A + FIC eteričnog ulja B = $\text{MIC}_{AB} / \text{MIC}_A + \text{MIC}_{BA} / \text{MIC}_B$

FIC eteričnog ulja A = MIC eteričnog ulja A u kombinaciji s eteričnim uljem B / MIC samo eteričnog ulja A

FIC eteričnog ulja B = MIC eteričnog ulja B u kombinaciji s eteričnim uljem A / MIC samo eteričnog ulja B

Rezultati su tumačeni kako slijedi:

FIC indeks ≤ 0.5 , sinergistički učinak

FIC indeks > 0.5 i < 1.0 , aditivan učinak

FIC indeks > 1.0 i < 4 , indiferentan učinak

FIC indeks > 4 , antagonistički učinak

Ako eterična ulja imaju sinergistički učinak to znači da u točno tom omjeru koncentracija ona djeluju pojačano u odnosu na iste koncentracije kada su eterična ulja testirana sama za sebe. Aditivni učinak je sličan učinak sinergističkom, ali u puno manjoj mjeri. Eterična ulja mogu u određenim kombinacijama imati antagonistički učinak što je u potpunosti suprotan učinak od sinergističkog. Takav učinak je slabiji u odnosu na onaj kada djeluje samo jedno eterično ulje. Kod indiferentnog učinka ne dolazi do nikakve interakcije između eteričnih ulja.

3.6. ODREĐIVANJE SINERGISTIČKOG ANTIBIOFILM DJELOVANJA

Prvi dio metode je identičan prethodno opisanoj metodi šahovnice. Pripreme se ploča 1 i ploča 2 prethodno opisanim postupkom. Zatim se spoje na identičan način. Jedina razlika je što se u ovoj metodi koriste mikrotitarske ploče sa ravnim dnom kako bi bakterije mogle adherirati i kako bi mogao nastati biofilm. Ploče se inkubiraju 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije od 24 sata ploče se 2 puta ispiru sterilnim PBS-om te se podvrgavaju procesu razaranja biofilma u ultrazvučnoj kupelji (Bacto Sonic 14, Bandelin) kroz jednu minutu. Zatim slijedi nakapavanje BCYE agara istim postupkom kao i u metodi šahovnice, ali se u ovoj metodi iz svake jažice prenosi 10 μ l kako bi se mogao odrediti CFU (broj bakterija koje tvore kolonije). Nakon što se podloge osuše stavljamo ih na inkubaciju na 37°C kroz 72 sata.

Nakon 72 sata slijedi očitavanje rezultata na način, kao i metodi šahovnice, da se zabilježi porast bakterija s time da se izbroje kolonije tamo gdje je to moguće.

4. REZULTATI

4.1. UTVRĐIVANJE SINERGISTIČKOG DJELOVANJA IZMEĐU ODABRANIH ETIRIČNIH ULJA

S ciljem utvrđivanja odnosa između odabranih eteričnih ulja u antimikrobnoj aktivnosti za svaku kombinaciju od 2 eteričnih ulja ispitivano je 60 mogućih kombinacija koncentracija. Kod onih kombinacija gdje nije došlo do porasta bakterija, na osnovi vrijednosti MIC eteričnog ulja, izračunat je FIC indeks kako bi se izrazio tip interakcije između dva eterična ulja.

Minimalna inhibicijska koncentracija (MIC) određuje se u AYE bujonu jer je to hranjivi medij za bakterije i želi se dokazati da li eterična ulja ubijaju bakterije u tom mediju. Inače se koristi kao rutinska metoda s antibioticima. Dobivene vrijednosti MIC i izračinati FIC indeksi te istaknuti tip interakcije između eteričnih ulja lavandina, ružmarina i smilja prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Tipovi interakcija između odabranih eteričnih ulja prema bakteriji *Legionella pneumophila* u AYE bujonu.

Kombinacija eteričnog ulja lavandina i ružmarina								
	mg/mL							
MIC lavandin 3,2 MIC ružmarin 12,8	0,05 Lav + 3,2 Ruž	0,1 Lav + 3,2 Ruž	0,2 Lav + 3,2 Ruž	0,4 Lav + 3,2 Ruž	0,8 Lav + 3,2 Ruž	1,6 Lav + 0,8 Ruž	1,6 Lav + 1,6 Ruž	1,6 Lav + 3,2 Ruž
FIC _{Lav}	0,015	0,031	0,062	0,125	0,250	0,500	0,500	0,500
FIC _{Ruž}	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,062	0,125	0,250
FIC _{Ind}	0,265	0,281	0,312	0,375	0,500	0,562	0,625	0,750
Interaction	Sin	Sin	Sin	Sin	Sin	Adi	Adi	Adi

Kombinacija eteričnog ulja smilja i ružmarina							
	mg/mL						
MIC smilje 3,2 MIC ružmarin 12,8	0,2 Smi + 3,2 Ruž	0,4 Smi + 3,2 Ruž	0,8 Smi + 3,2 Ruž	1,6 Smi + 0,8 Ruž	1,6 Smi + 1,6 Ruž	1,6 Smi + 3,2 Ruž	
FIC _{Smi}	0,062	0,125	0,250	0,500	0,500	0,500	
FIC _{Ruž}	0,250	0,250	0,250	0,062	0,125	0,250	
FIC _{Ind}	0,312	0,375	0,500	0,562	0,625	0,750	
Interaction	Sin	Sin	Sin	Adi	Adi	Adi	

Kombinacija eteričnog ulja smilja i lavandina						
	mg/mL					
MIC smilje 3,2 MIC lavandin 3,2	3,2 Smi + 0,4 Lav	3,2 Smi + 0,8 Lav	3,2 Smi + 1,6 Lav	3,2 Smi + 3,2 Lav	1,6 Smi + 3,2 Lav	
FIC _{Smi}	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	
FIC _{Lav}	0,125	0,250	0,500	1,000	1,000	
FIC _{Ind}	1,125	1,250	1,500	2,000	1,500	
Interaction	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	

Prikazanim rezultatima utvrđeno je kako kombinacija eteričnog ulja lavandina i ružmarina pokazuje najbolje rezultate. Kod 5 kombinacija koncentracija dobiven je sinergistički učinak, a ostale kombinacije gdje nije bilo porasta bakterija pokazale su aditivan učinak. S druge strane kombinacija eteričnog ulja lavandina i smilja pokazala je samo indiferentan učinak i kod najvećih koncentracija, a u manjim koncentracijama došlo je do porasta bakterija. Indiferentan učinak pokazuje da nije došlo do nikakve interakcije između ta dva eterična ulja. Bitno je za istaknuti da su kod sinergističnog učinka između 2 eterična ulja potrebne vrlo niske koncentracije (od 0,05 do 0,8 mg/mL) za suzbijanje legionele i da su te koncentracije puno niže nego vrijednost MIC (3,2 i 12,8 mg/mL) kada je djelovalo samo jedno eterično ulje.

Nakon određivanja djelovanja eteričnih ulja prema legioneli u bujonu provedeno je ispitivanje u vodi, mediju u kojem su legionele prirodno prisutne. Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti dobiva se minimalna efektivna koncentracija (MEC), a to je minimalna doza eteričnog ulja koja suzbija legionelu u vodi. Dobivene vrijednosti MEC i izračinati FIC indeksi te istaknuti tip interakcije između eteričnih ulja lavandina, ružmarina i smilja prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Tipovi interakcija između odabranih eteričnih ulja prema bakteriji *Legionella pneumophila* u sterilnoj vodovodnoj vodi.

Kombinacija eteričnog ulja lavandina i ružmarina								
	mg/mL							
MEC lavandin 3,2 MEC ružmarin 12,8	0,0125 Lav + 3,2 Ruž	0,025 Lav + 3,2 Ruž	0,05 Lav + 3,2 Ruž	0,1 Lav + 3,2 Ruž	0,2 Lav + 3,2 Ruž	0,4 Lav + 3,2 Ruž	0,8 Lav + 3,2 Ruž	1,6 Lav + 0,4 Ruž
FIC _{Lav}	0,004	0,008	0,015	0,031	0,062	0,125	0,250	0,500
FIC _{Ruž}	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,031
FIC _{Ind}	0,254	0,258	0,265	0,281	0,312	0,375	0,500	0,531
Interaction	Sin	Sin	Sin	Sin	Sin	Sin	Sin	Adi

Kombinacija eteričnog ulja smilja i ružmarina				
	mg/mL			
MEC smilje 3,2 MEC ružmarin 12,8	0,8 Smi + 3,2 Ruž	1,6 Smi + 1,6 Ruž	1,6 Smi + 3,2 Ruž	1,6 Smi + 0,8 Ruž
FIC _{Smi}	0,250	0,500	0,500	0,500
FIC _{Ruž}	0,250	0,125	0,250	0,062
FIC _{Ind}	0,500	0,625	0,750	0,562
Interaction	Sin	Adi	Adi	Adi

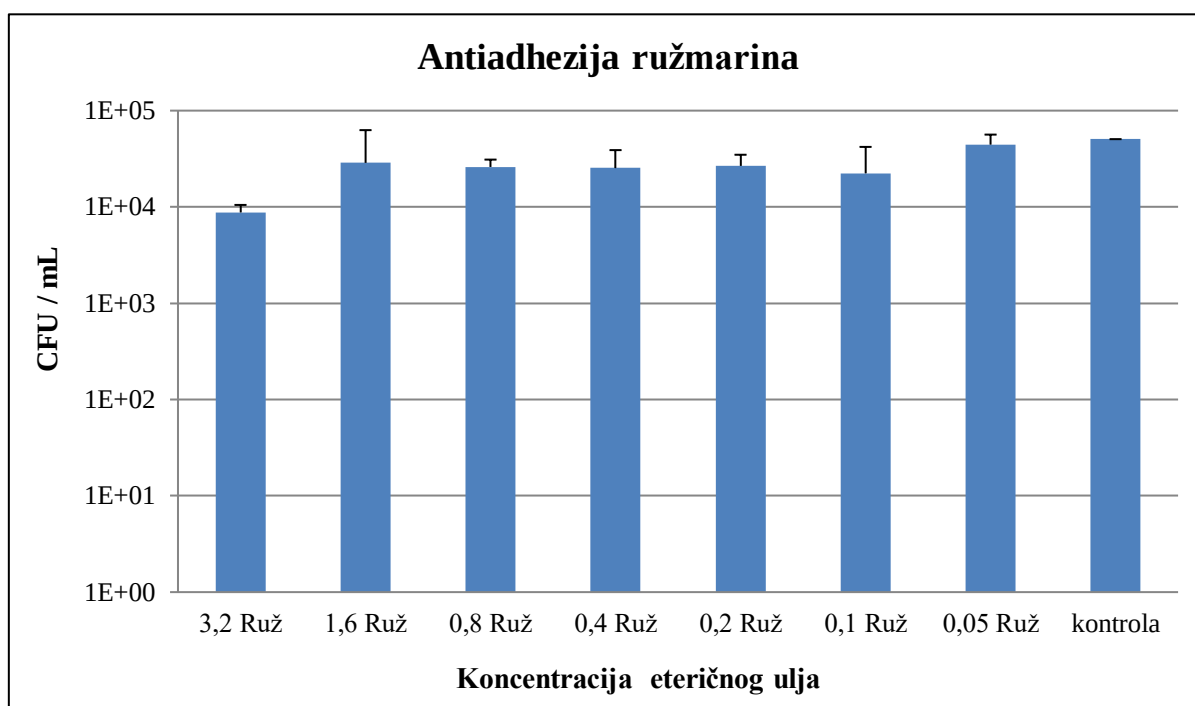
Kombinacija eteričnog ulja smilja i lavandina								
	mg/ml							
MEC smilje 3,2 MEC lavandin 3,2	1,6 Smi + 0,8 Lav	1,6 Smi + 1,6 Lav	0,8 Smi + 1,6 Lav	0,1 Smi + 3,2 Lav	0,2 Smi + 3,2 Lav	0,4 Smi + 3,2 Lav	0,8 Smi + 3,2 Lav	1,6 Smi + 3,2 Lav
FIC _{Smi}	0,500	0,500	0,250	0,031	0,062	0,125	0,250	0,500
FIC _{Lav}	0,250	0,500	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
FIC _{Ind}	0,750	1,000	0,750	1,031	1,062	1,125	1,250	1,500
Interaction	Adi	Adi	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

Prema prikazanim rezultatima djelovanja eteričnih ulja u vodi prema legioneli opet je najbolje djelovanje pokazala kombinacija eteričnog ulja lavandina i ružmarina. Čak u sedam kombinacija koncentracija dobiven je sinergistički učinak, a u ostalih nekoliko dobiven je

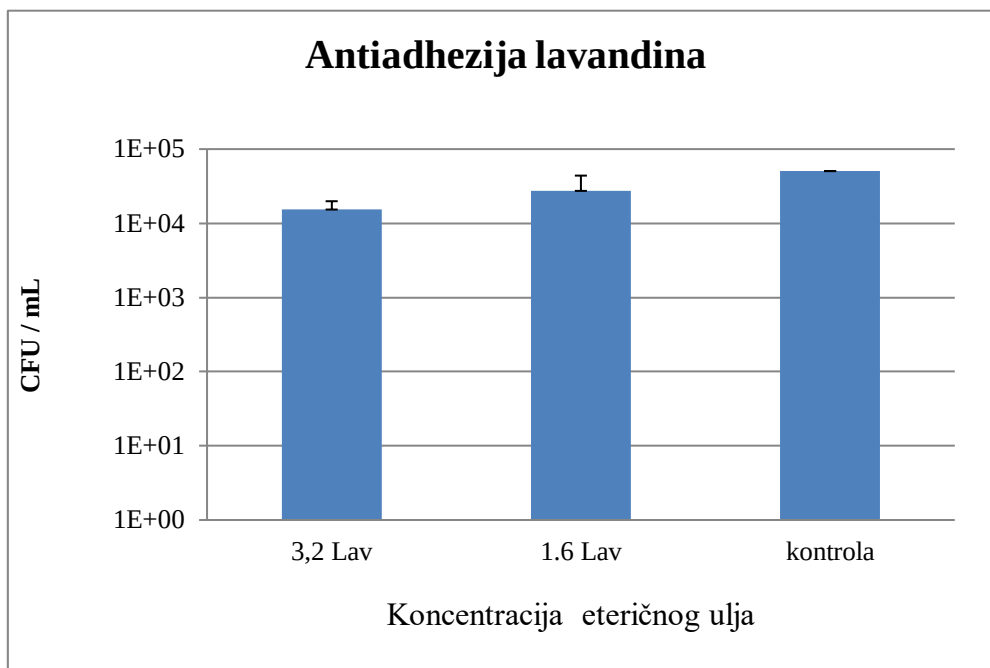
aditivan učinak. Kod kombinacije eteričnog ulja smilja i ružmarina samo u kombinaciji 0,8 mg/mL eteričnog ulja smilja i 3,2 mg/mL ružmarina dobiven je sinergistički učinak. U ostalih nekoliko kombinacija dobiven je aditivan učinak. Najslabije rezultate u vodi pokazuje kombinacija eteričnog ulja smilja i lavandina gdje je većina kombinacija pokazala indiferentan učinak (nema interakcije), a samo dvije kombinacije pokazale su aditivan učinak. Rezultati ispitivanja u vodi vrlo su slični rezultatima ispitivanja u bujonu.

4.2. UTJECAJ KOMBINACIJA ODABRANIH ETERIČNIH ULJA NA FORMIRANJE BIOFILMA

Legionella pneumophila je bakterija koja ima sposobnost adherencije na mikrotitarsku pločicu, a upravo adhezija bakterija na neku površinu je prvi korak u formiranju biofilma. Formiranjem biofilma bakterije imaju mnogo veću mogućnost preživljavanja nego kada se nalaze pojedinačno i upravo to je razlog određivanja antiadhezivnog učinka eteričnih ulja. Sljedeći grafovi prikazat će pojedinačni antiadhezivni učinak eteričnih ulja.



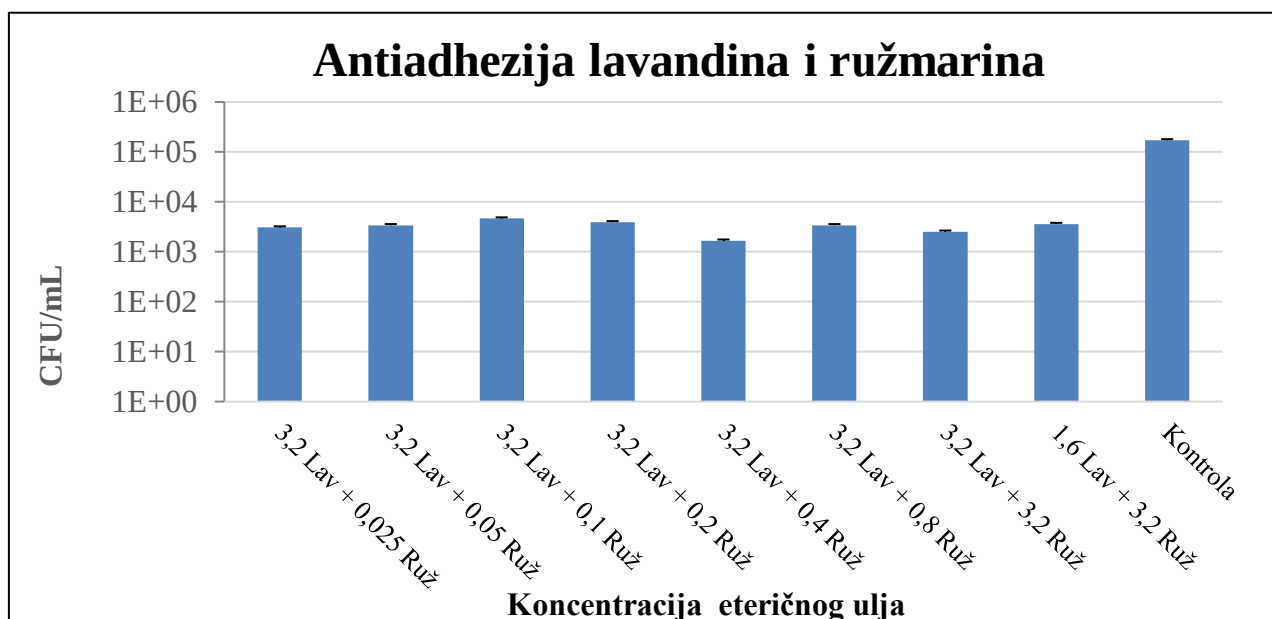
Graf 2. Antiadhezivni učinak eteričnog ulja ružmarina



Graf 3. Antiadhezivni učinak eteričnog ulja lavandina

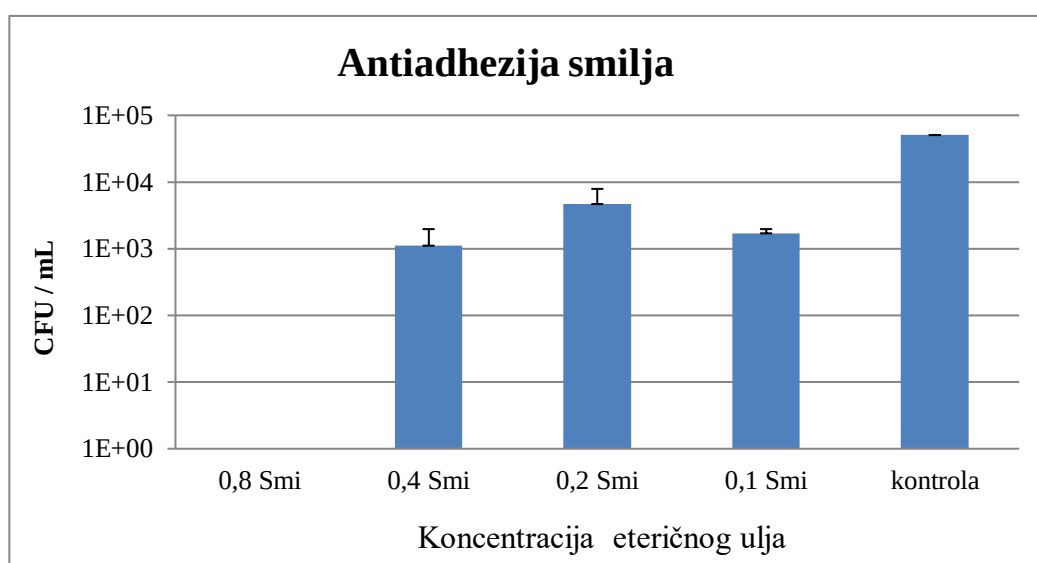
Prikazane su samo određene koncentracije eteričnog ulja ružmarina i lavandina jer su te koncentracije u zajedničkom djelovanju ta dva eterična ulja pokazale antiadhezivni učinak. U zadnjem stupcu dijagrama prikazna je kontrola. To je broj bakterija koji je adherirao na pločicu bez djelovanja eteričnih ulja i iznosi oko 10^5 bakterija. Kod nijedne prikazane koncentracije bilo eteričnog ulja lavandina ili ružmarina nije došlo do statistički značajnog smanjenja broja bakterija u odnosu na kontrolu.

Kada su eterično ulje lavandina i ružmarina djelovala zajedno došlo je do statistički značajnog smanjenja broja bakterija u odnosu na kontrolu što znači da je postignut antiadhezivni učinak. Broja bakterija nakon djelovanja eteričnih ulja iznosi oko 10^3 bakterija. Rezultati zajedničkog djelovanja prikazani su u grafu 4.



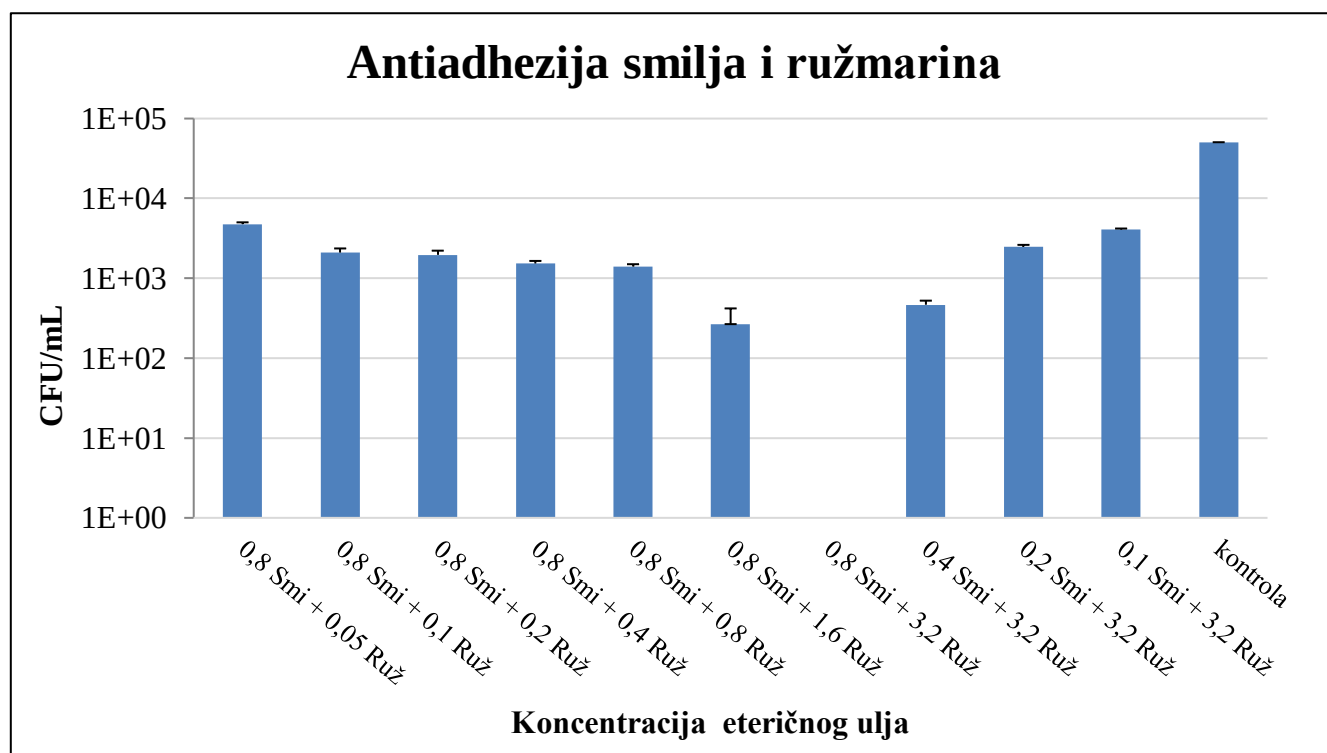
Graf 4. Antiadhezivni učinak eteričnog ulja ružmarina i lavandina

Pojedinačno djelovanje eteričnog ulja smilja već kod koncentracije od 0,8 mg/mL u potpunosti inhibira adheziju legionele na mikrotitarsku pločicu. Kod nižih koncentracija koje iznose 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL i 0,1 mg/mL došlo je do statistički značajnog smanjenja broja bakterija u odnosu na kontrolu. Ti rezultati nam govore kako eterično ulje smilja pokazuje antiadhezivni učinak (graf 5).



Graf 5. Antiadhezivni učinak eteričnog ulja smilja

Kombinacija eteričnog ulja smilja i ružmarina pokazala je antiadhezivni učinak i došlo je do statistički značajnog smanjenja broja bakterija u odnosu na kontrolu kod određenih kombinacija koncentracija. Kod kombinacije koncentracija eteričnog ulja smilja od 0,8 mg/mL i ružmarina od 3,2 mg/mL došlo je do potpune inhibicije adhezije legionele. Broj bakterija kod zajedničkog djelovanja smilja i ružmarina iznosi oko 10^3 bakterija (graf 6).



Graf 6. Antiadhezivni učinak eteričnog ulja smilja i ružmarina.

Pokus je ponovljen dva puta, a u svakom je pokusu bilo dva ponavljanja. Prikazana je srednja vrijednost svih rezultata $\pm$ standardna devijacija. Zanimljivo je kako eterično ulje smilja pojedinačno i u kombinaciji s ružmarinom pokazuje antiadhezivni učinak, a u kombinaciji s lavandinom uopće nema učinka odnosno kod svake kombinacije koncentracija dobiven je gusti porast bakterija. U gustom porastu bakterija prisutan je veći ili približno isti broj bakterija kao i kod kontrole (10^5 bakterija). To je dokaz kako eterično ulje ima više

načina kako inhibira porast i adheziju bakterija i u nekim kombinacijama djeluje (smilje i ružmarin), dok u drugim uopće ne djeluje (smilje i lavandin).

5. RASPRAVA

Eterična ulja su aromatske uljne tekućine dobivene od biljnog materijala kao što su lišće, cvjetovi, sjemenke, pupoljci, kora, grančice ili korijeni, a uglavnom se sastoje od mješavine aromatskih spojeva i terpenoida. Eterična ulja su klasificirana prema kemijskoj prirodi njihovi glavnih aktivnih komponenata (23). Posjeduju široki spektar antagonističkih aktivnosti kao što su antibakterijske, antivirusne, antigljivične, antiparazitske i insekticidne aktivnosti (24;25).

Istraživanjem koje su proveli Chang et al. (2008b) za procjenu antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja protiv bakterije *Legionella pneumophila* dokazali su kako eterično ulje ekstrahirano iz lišća vrste *Cinnamomum osmophloeum* i različitih tkiva vrste *Cryptomeria japonica* imaju anti-legionela učinak. Pokazalo se kako je naviši baktericidni učinak imalo eterično ulje *C. osmophloeum* sa minimalnom baktericidnom koncentracijom od 1 mg/mL. Usporedbom sa minimalnim inhibicijskim koncentracijama eteričnog ulja lavandina i smilja (3,2 mg/mL) te ružmarina (12,8 mg/mL) ima bolji anti-legionela učinak jer je potrebna niža koncentracija za inaktivaciju bakterija (26).

Određivanje antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja u istraživanju provedenom na sveučilištu u Rijeci određena je minimalna inhibicijska koncentracija u bujonu i sterilnoj vodi protiv bakterija *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium intracellulare*. Antimikrobna aktivnost se ispitala u vodi budući da su mikobakterije, posebno *M. avium* kompleks vezane uz vodu u kojoj preživljavaju i razmnožavaju se te im je voda izvor infekcije. U našim smo istraživanjima koristili sterilnu vodovodnu vodu no rezultati nisu bili ponovljivi jer legionela lako prelazi u VBNC oblik (vijabilni nekultivabilni oblik) te smo sterilnoj vodovodnoj vodi dodali ¼ AYE bujona. Minimalna inhibicijska koncentracija za eterično ulje smilja i u vodi i u bujonu iznosila je 3,2 mg/mL što je identično kao i djelovanje protiv bakterije *Legionella pneumophila*. Minimalna inhibicijska koncentracija eteričnog ulja lavandina iznosila je 3,2

mg/mL u bujonu, a 12,8 mg/mL u vodi. Djelovanje eteričnog ulja lavandina prema *L. pneumophila* identično je u bujonu, no minimalna inhibicijska koncentracija u vodi iznosi 3,2 mg/mL. Mi smo koristili vodu sa dodatkom $\frac{1}{4}$ bujona kako bi razvili uvjete slične vodoopskrbnom sustavu. Naime, legionele kako bi preživjele moraju imati L-cistein i soli željeza, barem u niskoj koncentraciji (34).

Nedavno su provedena istraživanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja dobivenih od Tuniskih biljaka. Ulja ekstrahirana iz vrsta *Juniperus phoenicea* i *Thymus vulgaris* pokazala su najveće anti-legionela aktivnosti s najmanjim inhibicijskim koncentracijama od 0,03 i 0,07 mg/mL. U usporedbi s eteričnim uljem lavandina, ružmarina i smilja imaju puno bolji anti-legionela učinak, no kada se koriste dva eterična ulja zajedno i imaju sinergistički učinak potrebne su i niže koncentracije za uništavanje legionela. U usporedbi sa eteričnim uljem čajevca kojem je minimalna inhibicijska koncentracija iznosila 0,5% v/v eterična ulja odabrana za ovo istraživanje pokazala su približno jednak učinak (27;28).

U istraživanju antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja dobivenih iz grančica *C. macrocarpa* i lišća *C. citriodora* u Egiptu dobivene su minimalne inhibicijske koncentracije protiv *E. coli* za vrstu *C. macrocarpa* od 0,1 do 0,2 mg/mL dok je vrsta *C. citriodora* bila manje učinkovita. Protiv testiranih gljiva *C. citriodora* pokazala je minimalnu inhibicijsku koncentraciju od 0.11 do 0.52 mg/mL dok je vrsta *C. macrocarpa* imala slabiji učinak gdje je MIC vrijednost iznosila od 0.29 do 3.21 mg/mL (30). Eterično ulje dobiveno od vrste *Senna occidentalis* pokazalo je antimikrobnu aktivnost prema bakterijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* s minimalnom inhibicijskom koncentracijom od 0,78 do 3,12 mg/mL (29).

Gledajući ove rezultate i druga istraživanja eterična ulja iz različitih dijelova svijeta i dobivena od različitih vrsta bilja djeluju drugačije na određenu vrstu bakterija. Eterična ulja

pokazuju iznimnu antimikrobnu aktivnost zato jer nemaju jedan specifičan put djelovanja kao naprimjer antibiotici. Mogu djelovati oštećujući citoplazmatsku membranu i membranske proteine pa tako uzrokovati curenje supstanci iz stanice, mogu degradirati staničnu stijenku ili dovesti do koaguliranja citoplazme (32;33). Upravo to je bitno kako bakterije nebi mogle lako razviti rezistenciju. Također eterična ulja djelujući zasebno imaju određenu antimikrobnu aktivnost, no kada kombiniramo njihovo djelovanje i dobijemo sinergistički učinak potrebne su nam puno niže koncentracije za istu inhibiciju porasta ili adhezije bakterija.

6. ZAKLJUČAK

Legionella pneumophila je osjetljiva na eterična ulja kao i na druge biološki aktivne molekule. Eterična ulja lavandina, smilja i ružmarina pokazala su značajnu antimikrobnu aktivnost, kao i sinergistički učinak u određenim koncentracijama te djelomično ili potpuno inhibiranje nastanka biofilma bakterije *Legionella pneumophila*. Stoga bi eterična ulja, kao i druge prirodne biomolekule, mogla predstavljati moćne alate za biološku kontrolu bakterije *Legionella pneumophila* u industriji za obradu voda. Također može biti i alternativni postupak dezinfekcije vode u spa centrima što je bio i cilj ovog istraživanja.

7. LITERATURA

1. https://hr.wikipedia.org/wiki/Eteri%C4%8Dna_ulja (pristupljeno: Veljača, 2018.)
2. Dragica Vitas: Staza mirisnih ulja, Eurofutura, Zagreb, 2001.
3. <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/varijabilnost-sastava-eterienih-ulja-2/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
4. Faleiro, M., L.,: The mode of antibacterial action of essential oils, FORMATEX, 2011., Portugal
5. Kuštrak D: Farmakognozija fitofarmacija, Golden Marketing - Tehnička Knjiga; 2005.
6. <http://novovrijeme.ba/etericna-ulja-osvjezavaju-i-lijece/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
7. <https://anias-de-moras.com/2011/03/27/dobivanje-etericnih-ulja> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
8. <http://www.koval.hr/blogeky/ljekovite%20biljke/ruzmarin.html> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
9. <http://roberttisserand.com/2012/03/rosemary-boosts-brain-power> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
10. <http://www.znet.hr/2014/08/lavanda-vanilija-jasmin-prirodni-mirisi-za-srecu-ljepotu-i-zdravlje> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
11. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/smilje-370/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
12. <http://www.kucacajamakarska.com/shop/ljekovito-bilje/smilje-cvijet/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
13. http://www.savjetodavna.hr/adminmax/publikacije/smilje812015_.pdf (pristupljeno: Veljača, 2018.)
14. Kalenić S. i suradnici: Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
15. <http://en.vircell.com/diseases/20-legionella-pneumophila/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2012., Stockholm: ECDC; 2014.
17. https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/03/preporuke_leg_verz2017.pdf (pristupljeno: Veljača, 2018.)

18. <http://www.energetika-net.com/specijali/izdvajamo/ucinkovita-rjesenja-za-zastitu-od-legionela-16397> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
19. <https://www.zmescience.com/science/what-are-biofilms/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732559/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
21. <http://www.nalaz.org/v2/bs/biofilmovi/> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
22. <http://www.energetika-net.com/specijali/izdvajamo/ucinkovita-rjesenja-za-zastitu-od-legionela-16397> (pristupljeno: Veljača, 2018.)
23. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.* 46 446–475. 10.1016/j.fct.2007.09.106
24. Rodrigues I. A., Azevedo M. M., Chaves F. C., Bizzo H. R., Corte-Real S., Alviano D. S., et al. (2013). In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7- hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. *BMC Complement Altern. Med.* 13:249 10.1186/1472-6882-13-249
25. Seow Y. X., Yeo C. R., Chung H. L., Yuk H. G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 625–644. 10.1080/10408398.2011.599504
26. Chang C. W., Chang W. L., Chang S. T., Cheng S. S. (2008b). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Res.* 42 278–286. 10.1016/j.watres.2007.07.008
27. Mondello F., Girolamo A., Scaturro M., Ricci M. L. (2009). Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *J. Microbiol. Methods* 77 243–248. 10.1016/j.mimet.2009.02.012
28. Chaftar N., Girardot M., Labanowski J., Ghairi T., Hani K., Frere J., et al. (2015a). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. *Adv. Exp. Med. Biol.* 10.1007/5584_2015_5011 [Epub ahead of print]
29. Essien EE, Thomas PS, Ascrizzi R, Setzer WN, Flamini G. *Senna occidentalis* (L.) Link and *Senna hirsuta* (L.) H. S. Irwin & Barneby: constituents of fruit essential oils and antimicrobial activity. *Nat Prod Res.* 2018 Jan 18:1-4. [Epub ahead of print]

30. Salem MZM, Elansary HO, Ali HM, El-Settawy AA, Elshikh MS, Abdel-Salam EM, Skalicka-Woźniak K. Bioactivity of essential oils extracted from *Cupressus macrocarpa* branchlets and *Corymbia citriodora* leaves grown in Egypt. BMC Complement Altern Med. 2018 Jan 22;18(1):23.
31. Karaca N, Demirci B, Demirci F. Evaluation of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* L., *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* L. essential oils and their main components against sinusitis pathogens. Z Naturforsch C. 2018 Feb 27. [Epub ahead of print]
32. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., et al. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*
33. Ultee A., Bennik M. H., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne *pathogen Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*
34. Dolores Peruč i suradnici. Antimycobacterial potential of the juniper berry essential oil in tap water. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 69, 2018. ISSN 1848-6312.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime:	Kristijan Bosilj
Adresa:	Gornja Konjščina 75, 49282 Konjščina
E-mail:	Kristijan.bosilj1994@gmail.com
Datum i mjesto rođenja:	31. 08. 1994; Zabok
Državljanstvo:	Hrvatsko

ŠKOLOVANJE

- 2009 - 2013: Medicinska škola Varaždin, smjer Zdravstveno - laboratorijski tehničar
- 2013 - 2016: Medicinski fakultet Rijeka, Preddiplomski sveučilišni studij smjer sanitarno inženjerstvo
- 2016 – 2018: Medicinski fakultet Rijeka, Diplomski sveučilišni studij smjer sanitarno inženjerstvo

ZNANSTVENO - STRUČNE AKTIVNOSTI

- Aktivno sudjelovanje na Sedmom studentskom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem „Prehrana i klinička dijetoterapija“ (10. – 12. lipnja 2016, Rijeka) uz osvojenu nagradu za najbolju poster prezentaciju
- Aktivno sudjelovanje na petom internom simpoziju studenata Medicinskog fakulteta i Fakulteta i Fakulteta zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci „MEDRI znanstveni PIKNIK“ (17.12.2016)
- Aktivno sudjelovanje na šestom internom simpoziju studenata Medicinskog fakulteta i Fakulteta zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci „MEDRI znanstveni PIKNIK“ (15.12.2018.)
- Aktivno sudjelovanje na prvom studentskom kongresu zaštite zdravlja „Sanitas“ s međunarodnim sudjelovanjem održanom u Rijeci 13. i 14. travnja 2018.