

ANTIMIKROBNA SVOJSTVA ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE HRVATSKE NA STAFILOKOKE

Stojčević, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:760024>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Stojčević

ANTIMIKROBNA SVOJSTVA ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE HRVATSKE NA
STAFILOKOKE

Završni rad

Rijeka, 2015

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Stojčević

ANTIMIKROBNA SVOJSTVA ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE HRVATSKE NA
STAFILOKOKE

Završni rad

Rijeka, 2015

Mentor rada: doc.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 39 stranica, 12 slika, 5 tablica

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivani Gobin, dipl. san. ing. na strpljenju i stručnim savjetima te pomoći oko pisanja završnoga rada.

Hvala obitelji, prijateljima i kolegama koji su bili velika podrška.

SAŽETAK

Stafilokoki su gram pozitivne bakterije, dio fiziološke flore čovjeka, posebno kože i sluznica, te izazivaju infekciju kod bolesnika sa oslabljenim imunitetom. Medicinski najznačajnije vrste su *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Stafilokoki često pokazuju otpornost na najčešće korištene antibiotike što predstavlja veliki problem u borbi protiv stafilokoknih infekcija. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati antibakterijski učinak šest različitih eteričnih ulja (borovice, kadulje, lavandina, smilja jesen, smilja proljeće, tuje) na dvije vrste stafilokoka *S. aureus* i *S. epidermidis*. Kako bi se ispitali da li i rezistentni sojevi ispitivanih vrsta pokazuju osjetljivost na djelovanje eteričnih ulja korišteni su meticilin rezistentni *S. aureus* i meticilin rezistentni *S. epidermidis*. U radu su korištene tri metode ispitivanja antibakterijskog učinka eteričnih ulja: difuzijska, dilucijska te ispitivanje učinka hlapivih komponenti ulja. Rezultati pokazuju antibakterijsko djelovanje eteričnog ulja lavandina na rezistentne sojeve MRSA i MRSE, te eteričnog ulja smilje jesen na *S. aureus* bez obzira na rezistenciju. Ova studija pokazuje potencijal upotrebe eteričnih ulja kao antibakterijskih sredstava u liječenju stafilokoknih infekcije uključujući infekcije uzrokovane meticilin rezistentnim sojevima.

Ključne riječi: *Staphylococcus*, eterična ulja, infekcije

ABSTRACT

Staphylococci are gram pozitiv bacteria, they are usually part of the normal flora, especially skin and mucose membrans, so they cause infection only by a weakened immune system. Most medically important are *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. These bacteria show resistance to the most common antibiotics so they are a major problem in treatment od staphylococcal infection.

Therefore in this work antibacterial effect of six essential oils (juniper, sage, lavender, immortellje autumn and spring, thuja) on two difrent spicies of *Staphylococcus*, *S. aureus* and *S. epidermidis* was tested. To examine whether the resistant strains of tested species show sensitivity to the herb essential oils, methicillin resistant *S. aureus* and methicillin resistant *S. epidermidis* were used. In the research of antimicrobial activity three methods were used: diffusion , dilution and test the effect of the volatile components of the herb essential oils.

Results show anitmicrobial activity of lavender essential oil on resistant strains MRSA and MRSE, and immortelle autumn essential oil on *S. aureus* regardless of the resistance. This study demonstrates the potential use of essential oils as antibacterial agents for the treatment of staphylococcal infections, including infections caused by methicillin resistant strains.

Key words: *Staphylococcus*, herb essential oils, infections

SADRŽAJ

1. UVOD	7
1.1. Opće karakteristike	7
1.2. Epidemiologija	8
1.3. Patogeneza	9
1.4. Laboratorijska dijagnostika	10
1.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.7. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
1.8. Eterična ulja	13
1.9. Destilacija vodenom parom	14
1.10. Borovica	15
1.11. Kadulja	16
1.12. Lavandin	18
1.13. Smilje	19
1.14. Tuja	20
1.15. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Materijali	23
3.1.2 Hranjive podloge i mediji	24
3.2. Uzorci eteričnih ulja	25
3.1.1. Bakterijski soj	26
3.1.2 Bakterijski inokulum	26
3.2. Metode ispitivanja antibakterijskog učinka eteričnih ulja	26
3.2.1. Metoda difuzije (rupe u agru)	27
3.2.2. Metoda diska	28
3.2.3. Mikrodilucijska metoda	30
3.2.4. Metoda ispitivanja antimikrobnog učinka hlapljivih tvari	32
4. REZULTATI	33
5. RASPRAVA	0
6. ZAKLJUČAK	3
7. LITERATURA	4
8. ŽIVOTOPIS	0

1.UVOD

Stafilokoki su gram pozitivni, katalaza pozitivni koki. Većina su dio su normalne fiziološke flore, stoga su oportunistički patogeni. Naziv su dobili 1881. po škotskom kirurgu Sir Alexander Ogstonu, koji ih je nakon proučavanja pod mikroskopom nazvao po grčkoj riječi za grozdove. Najčešće uzrokuju različite kožne (impetigo, furunkul, karbunkul) te bolničke infekcije (1). A zbog sposobnosti rasta u uvjetima visoke koncentracije soli i šećera *S.aureus* čest je uzročnik trovanja hranom. Stafilokoki su osjetljivi na povišenu temperaturu i na dezinficijense koji se koriste u bolnicama, ali na suhim površinama mogu preživjeti duže vrijeme (2).

1.1.Opće karakteristike

Rod bakterija iz porodice *Staphylococcus* uglavnom su aerobi ili fakultativni anaerobi. Nepokretni su, nemaju flagele i ne stvaraju spore. Za razliku od streptokoka produciraju enzim katalazu. Postoji oko 39 vrsta i 21 podvrsta. *Staphylococcus aureus* najvažniji je predstavnik ove porodice bakterija i jedini je medicinski značajni stafilocok koji producira enzim koagulazu dok ostali ne produciraju koagulazu i spadaju u koagulazu negativne stafilokoke (KNS). Primjer KNS-a: *Staphylococcus epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* (1). Lako se adaptiraju na različite uvjete okoline pa su tako razvili otpornost na antibiotike. Kada se penicilin prvi puta počeo koristiti u Drugom svjetskom ratu, svi sojevi su bili osjetljivi na njega. No s vremenom su počeli producirati enzim penicilinazu zbog kojeg penicilin više ne djeluje na njih (2).

1.2.Epidemiologija

S. aureus normalno se nalazi na koži, sluznicama, prednjim stranama nosnica, nazofarinksu, te međici dok *S. epidermidis* normalno nalazimo na koži i sluznicama (Tablica 1). Put prijenosa moguć je sa čovjeka na čovjeka, te kao nešto češći prijenos govori se o prijenosu pri različitim medicinskim zahtjevima gdje bakterije prelaze iz svoje normalne flore u područje gdje se inače ne nalaze ta tamo izazivaju infekciju (1).

Tablica 1. Epidemiologija stafilokoka

Bakterija	Stanište	Način ili put prijenosa
<i>S. aureus</i>	Prednji dio nosnica, stražnji dio nosnica, nazofarinks, međica, koža, sluznica	Endogene sonde, direktni kontakt: čovjek-čovjek, indirektno: aerosol
<i>S. epidermidis</i>	Koža, sluznica	Implantacije, kirurški zahvati, direktno: čovjek-čovjek

1.3. Patogeneza

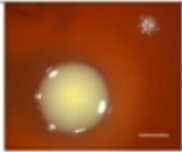
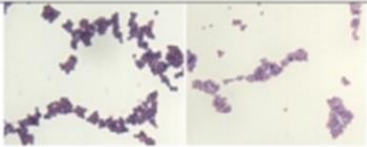
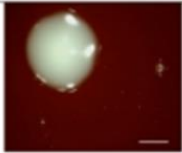
Na patogenost stafilokoka utječe više čimbenika zbog kojih tako često uzrokuju različite infekcije (Tablica 2). *S. aureus* i *S. epidermidis* proizvode polisaharidnu kapsulu kojom uspijevaju inhibirati fagocitozu. Stanični zid njihove gram pozitivne stjenke izlučuje endotoksin koji pojačava njihovu virulenciju. Važan dio patogenosti *S. aureus* je protein A kojeg izlučuje. Vezan je za citoplazmatsku membranu i ima veliki afinitet za Fc receptore na IgG molekulama, čime onemogućuje njihovu normalnu funkciju u obrani ljudskog organizma od infekcija. Proizvodnjom alfa toksina *S. aureus* lizira membranu citoplazme domaćina i stvara transmembranske porei time ometa glatko oticanje krvi u mišiće, te je toksičan za eritrocite, leukocite, hepatocite i trombocite. Dok delta toksin kojeg izlučuju i *S. epidermidis* i *S. aureus* citotoksičan je također za eritrocite (1). Termostabilni enterotoksin kojeg izlučuje *S. aureus* uzrokuje probavne simptome poput povraćanja jer preživljava kuhanje, enzime želuca i enzime tankoga crijeva. Svi faktori virulencije stafilokoka dolaze do izražaja tek kada neometano mogu proći kožnu i sluzničku barijeru uzrokovanu ozljedom ili traumom kada imaju olakšan pristup tkivu. Tada se enzimima uspijevaju obraniti od odgovora organizma, a izlučivanjem toksina ga napadaju i uzrokuju infekcije (2).

Tablica 2. Činitelji virulencije stafilokoka

Bakterija	Faktori virulencije	Bolesti i infekcije
<i>S. aureus</i>	Polisaharidna kapsula, protein A, egzotoksini, citotoksini (alfa, beta, delta, gama), enterotoksini, enzimi (koagulaza, katalaza, hijaluronidaza, fibrinolizin, lipaza, nukleaza, penicilinaza)	Kliconoštvo Toksični šok sindrom Trovanje hranom Lokalne kožne infekcije Furunkuli, karbunkuli Impetigo Endokarditis, bakterijemija
<i>S. epidermidis</i>	Biofilm, delta toksin	Bolničke infekcije povezane sa kateterima

1.4. Laboratorijska dijagnostika

Uzorci koji se uzimaju za dijagnostiku najčešće su obrisak kožne promjene, rane, krv, iskašljaj, aspirat, ovisno o infekciji koji su uzrokovali (2). Najčešće se kultiviraju na 5% krvnom ovčijem agaru 24sata/35 °C ili na manitol slanom agaru (10% soli) 48sati. *S. aureus* raste kao srednje velike, glatke, blago izbočene krem-žute kolonije, dok *S. epidermidis* raste kao male do srednje velike, sivo-bijele ljepljive kolonije. Mikroskopiranjem stafilokoka jasno se vide diplokoki, tetrade ili grozdovi. Oni su svi ljubičasto obojeni koki po Gramu (1). Testovi dokazivanja i identifikacije stafilokoka provode se testovima katalaze i koagulaze (2).

	Kolonije na KA	Bojenje po Gramu (povećanje 1000X)
<i>S. aureus</i>		
<i>S. epidermidis</i>		

Slika 1. Karakteristike *S. aureus* i *S. epidermidis* (3)

1.6. *Staphylococcus aureus*

Poznat pod nazivom zlatni stafilocok, pripada gram pozitivnim kokima, kuglastog oblika koji se grupira u grozdove. On je dio normalne fiziološke flore čovjeka, i to kože i sluzinca. Stoga predstavlja opasnost kao oportunistički patogen. Kod 30 – 50% ljudi može se naći prirodno u sluznici nosa, a često i u usnoj šupljini. Uzrokuje mnoge infekcije, od lakših pa sve do težih kliničkih slika. Infekcije kože i rana te stvaranje gnojnih i tvrdih čireva jedne su od najčešćih kliničkih slika, nakon toga slijedi sepsa, upala pluća, meningitis(4).Lako se prenosi s čovjeka na čovjeka, s obzirom da je zaraženi čovjek kliconoša, pa je najčešći put prenošenja kihanje, kašljanje, izravan dodir s kožnom infekcijom. Nešto drugačiji je meticilin rezistentni zlatni stafilocok koji je otporan na meticilin, tj. na širok raspon antibiotika u osnovi penicilina. Danas predstavlja veliki problem jer sužava izbor terapije i otežava liječenje. Javlja se kao bolnička infekcija, kod osoba sa oslabljenim imunitetom, pacijenatima sa urinarnim i intravenoznim kateterima. Nakon što dođe do infekcije, unutar 24 sata na koži se razviju crvene kvržice, mjehurići, prištići popraćeni temperaturom i osipom. Nakon par dana razviju se do velikih bolnih gnojem ispunjenih mjehurića. Ako se na vrijeme primjete, infekcija može ostati lokalizirana i sprječena da se širi dalje. Prvi izbor u terapiji je vankomicin. U slučaju širenja infekcije može doći do sepse, toksičnog šoka, pneumonie (1).

1.7. *Staphylococcus epidermidis*

Gram pozitivni kok, roda bakterija *Staphylococcus*. Pripada normalnoj flori kože čovjeka, rijede se može naći na sluznicama. Prije nije bio medicinski značajan ali sve većom uporabom različitih medicinskih katetera i proteza počeo je izazivati infekcije. Infekcije uzrokuje kod imunokompromitiranih osoba, uglavnom hospitaliziranih sa različitim kataterima i stranim kirurškim implatima(5). Mogućnost stvaranja biofilma na stranim plastičnim protezama u organizmu omogućeno je zbogunutarstaničnog adhezivnog polisaharida kojeg proizvodi. On omogućuje drugim bakterijama da se vežu na biofilm i stvore višeslojni otporni biofilm. Takav biofilm teško je liječiti. U izboru terapije, u prvom redu nalazi se vankomicin. Nešto značajniji *S.epidermidis*jeMeticilin resistentni *Staphylococcus epidermidis*(MRSE)jer je stvorio otpornost na antibiotike roda penicilin (meticilin, oksacilin, dikloksacilin) i cefalosporin. Odgovoran je za infekcije koje se teško liječe, najčešće povezane sa centralnim kataterima kod hospitaliziranih pacijenata. Obzirom na široku rezistenciju na lijekove, kao i kod MRSA, prvi lijek izbora je vankomicin (1).

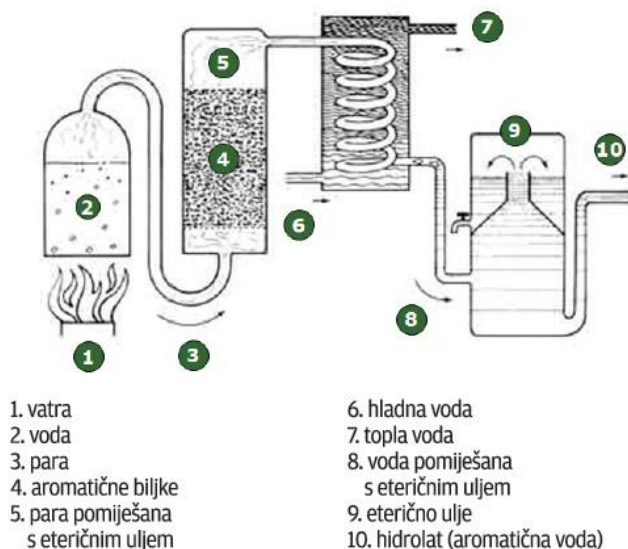
1.8. Eterična ulja

Eterična ulja koncentrirane su tekućine, biološki aktivne i hlapljive koje je moguće izolirati iz različitih biljaka i različitih dijelova biljke. Najčešće su to korijen, stabljika, list, cvijet i plod. Terpeni, ugljikovodici ugodnog mirisa, čine im najveći dio sastava. Zbog njihove varijabilne prirode, ne mora značiti da će se iz iste biljke dobiti ulje identičnog sastava kao s postupkom prije sa istom biljkom. Na njihov sastav utječe više faktora (mjesto rasta, kultivacija, uvjeti rasta). Zbog toga su postavljene norme, odnosno rasponi kojima se definira koliko glavnih ili karakterističnih spojeva neko ulje u sebi treba sadržavati. Primjer je kadulja. Njezin sastav se mijenja sezonski. Sadržaj kamfora (smolasta, bezbojna, gorka tvar jakoga mirisa) najviši je u doba cvatnje, što znači da nakon i prije cvatnje njegova koncentracija je puno niža. Dok se ulje metvice ubire prije same cvatnje, jer za to vrijeme ono ne sadrži toksičnu tvar pulegon koja se stvara pri cvatnji. Stoga je vrlo važno vrijeme kada se uzimaju biljke za proizvodnju eteričnog ulja. Osim vremena, važna je osunčanost biljke, gnojivo u kojem raste, temperatura i klima, te i sama obrada biljke nakon ubira. Veliku važnost pridobiva i sam postupak izolacije, postupak izolacije destilacijom vodene pare (6).

1.9. Destilacija vodenom parom

Destilacija je postupak razdvajanja homogene smjese na pojedine komponente na temelju razlike u temperaturi vrelišta. Eterična ulja koja se nalaze u samim žljezdama biljaka imaju vrelište uglavnom iznad 200°C što bi značilo kad bi dosegli tako visoke temperature vrenja, većina organskih komponenti ulja bi oksidirala. Stoga za takve tvari koje uz to su i netopljive u vodi, koristi se destilacija vodenom parom(7). Zbog visokog tlaka koja stvara vodena para, inače teško hlapljive komponente biljke, sada isparavaju već i na 100°C. Princip se zasniva na tome da se biljni materijal nalazi iznad vodene pare gdje onda kroz njega prolazi para nastala zagrijavanjem vode. Da bi se dobilo čisto eterično ulje, velike količine vode moraju ispariti. A da bismo znali koje su sastavne komponente u izoliranom ulju potrebna nam je naknadna analiza plinskom kromatografijom (GC) ili tankoslojnom kromatografijom (TLC) (8).

POSTUPAK DESTILACIJE



Slika 2.Postupak destilacije vodenom parom (9)

1.10. Borovica

Borovicu (lat. *Juniperus communis*) nazivaju još i običnom oborovicom, smrekom ili klekinjom, javlja se kao patuljasti grm, kao grm ili kao drvo i do 7 metara visoko. Spada u porodicu čempresa i može se naći u hrastovim i bukovim šumama, na pašnjacima i sječinama primorskog područja (10). Cvjetovi borovice pojavljuju se u svibnju, iz čega se razvijaju svijetlozeleni plodovi, te na jesen druge ili treće godine bobe dozrijevaju i dobivaju prepoznatljivu tamnoljubičastu boju sa voštanim premazom (slika 3). Zbog nejednakog načina dozrijevanja na biljci se mogu naći plodovi različitog stupnja zrelosti. Plodovi sadrže eterično ulje (1,0-2,5%), trjeslovine, flavonoidne glikozide, invertni šećer, pektin, smole, gume i voskove. Za borovicu je poznato da ima antiseptičko i diuretičko djelovanje, da se koristi kod bronhitisa, svih bolesti zglobova te ima pozitivno djelovanje na koži zbog sposobnosti dubljeg prodiranja u organizam (11).



Slika 3. Plod borovica (12)

1.11. Kadulja

Kadulja (lat. *Salvia officinalis*) znana je još i kao kraljica ljekovitog bilja. Poznata je od davnina i korištena je u borbi sa svim bolestima. Međuostalim, ona u obliku eteričnog ulja djeluje na upalne procese na koži te djeluje snažno na sve njezine slojeve. Ima snažno protuupalno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Ona je višegodišnja biljka, drvenastog korijena koja je otporna na sušu. Biljka je toplog podneblja, cvjetanje započinje u svibnju, a sazrijeva u kolovozu (slika 4). Cvat ima od 2 do 8 cvjetova vrlo ugodna mirisa. Samo eterično ulje nalazi se u nadzemnom dijelu biljke, posebno u listovima (13).



Slika 4. Cvijet kadulja (14)

1.12. Lavandin

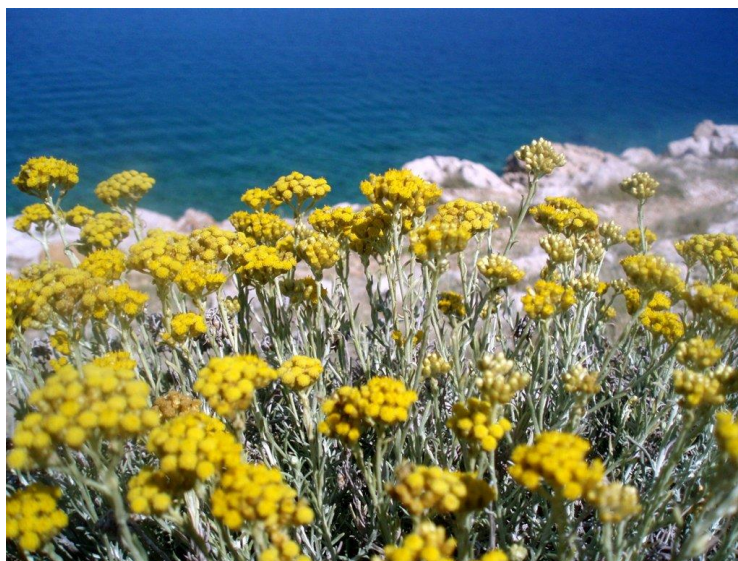
Lavandin (lat. *Lavandula x hybrida*) je naziv za hibride širokolisne prave lavande i uskolisne. Eterična ulja lavandina imaju nižu cijenu od pravog lavandinog ulja, ali što ne znači da oni imaju slabije djelovanje nego drugačije (15). Lavandin ima puno snažnije antibakterijsko i protugljivično djelovanje na koži. Često se koriste i u kozmetici opće njege kože. Nemaju umirujuće djelovanje kao prava lavanda, ali zato analgetički učinak je mnogo jači kod lavandina. Razlika nije samo u sastavu ulja, nego i u samoj biljci. Prava lavanda nizak je grm, žarko ljubičastih cvjetova i intenzivnog mirisa, dok lavandin ima veliki grm, a cvjetovi su svjetlije ljubičaste boje, no i do tri puta bogatije uljem (Slika 5) (16).



Slika 5. Cvijet lavandina (17)

1.13. Smilje

Smilje (lat. *Helichrysum italicum*) biljka je mediteranskog podrijetla, grma visokih do 60cm i žutih cvjetova (Slika 6). Raste na sunčanim kamenjarima. Njegova proizvodnja započela je u Dalmaciji početkom 20.stoljeća. Ulje smilja djeluje protuupalno, antioksidativno i antikoagulantno, zato se često upotrebljava kod tretiranja hematoma i proširenih vena, popucalih kapilara, ožiljaka i ozljeda i drugih kožnih bolesti(18). Smilje djeluje i fungicidono, mukolitički, neurotonizirajuće, diuretično stoga ima široku primjenu u tretiranju prehlade, gripe, astme, stresa, psihičkog zamora i reumatskih tegoba (6).



Slika 6. Cvijet smilje (19)

1.14. Tuja

Tuja (lat. *Thuja occidentalis*– smola, tamijan) smolasta je biljka, aromatična okusa i ugodnog mirisa. Stablo može narasti i do 20 metara. Česeri su jajolikog oblika, a listovi maleni (Slika 7). Sam plod tuje je otrovan i može izazvati mučninu, povraćanje, upale bubrega i mjehura. No kada se koristi u obliku eteričnoga ulja lokalno na koži ono ima pozitivne učinke. Bolni zglobovi, iritacije na koži, opekline samo su neke od tegoba gdje eterično ulje tuje pomaže. Često se koristi kao osvježivač zraka i dezinfekcijsko sredstvo, te kao repelent za insekte. Djeluje kod menstrualnih tegoba, pojačava imunosni sustav, stimulira sekreciju enzima i hormona u tijelu. Kod urinarnih infekcija se koristi jer potiče mokrenje (20).



Slika 7.Tuja – plod i grm (21)

1.15. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja

Eterična ulja mogu različito djelovati na stanice bakterije. Jedno od mogućih i najčešćih djelovanja je prodiranje kroz staničnu membranu i ometanje njezine funkcije. Dolazi do njezine razgradnje, uništavanje staničnih proteina, disfunkcije enzima i proizvodnje ATP. Fenolni spojevi eteričnih ulja djeluju na transmembranski pH gradijent i integritet membrane te uzrokuju izlazak unutarstaničnog sadržaja, ometaju transport i proces stvaranja energije. U ekstraktima određenih biljaka prisutan je veliki broj reaktivnih skupina, zato se antimikrobni učinak ne prepisuje samo jednom mehanizmu već ih je uključeno nekoliko koji djeluju na ciljna mjesta na stanici mikroorganizma. U bakterijskim stanicama, tri su mjesta gdje eterična ulja djeluju antimikrobno a to su: stanična stijenka, citoplazmatska membrana i citoplazma. Oštećenja do kojih dolazi u stanicama bakterija uslijed djelovanja antimikrobnih tvari ulja manifestiraju se na sljedeće načine:

- Dolazi do poremećaja transmembranske protonske pokretačke sile koji posljedično uzrokuje prekid oksidativne fosforilacije i inhibira aktivni transporta kroz membranu
- Inhibira kataboličke i anaboličke reakcije
- Dolazi do lize stanice
- Uzrokuje poremećaje replikacije
- Zbog gubitka čvrstoće stanične membrane esencijalni unutarstanični sastojaci (kalijevi ioni, pentoze, nukleotidi i proteini) izlaze iz stanice
- Unutarstanični sadržaj koagulira (23).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati antimikrobno djelovanje šest različitih eteričnih ulja primorske Hrvatske (borovice, kadulje, lavandin, smilje jesen, proljeće, tuja) na dvije vrste stafilokoka, *S. aureus* i *S. epidermidis*. Ispitano je i da li su meticilin rezistentni sojevi ovih vrsta osjetljivi na ispitivana eterična ulja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

- Petrijeve zdjelice
- Mikrobiološke ušice – „eže“
- Epruvete
- Automatske pipete 0.5 – 10 μL - Eppendorf,
2-20 μL , 20-100 μL , 20-200 μL i 100-1000 μL "Gilson Pipetman" - Gilson
- Nastavci za automatske pipete – ep T.I.P.S
- Plamenik – Poligas OMM
- Mješalica – Tecno Kartell
- Sterilni brisni štapići
- Parafilm „M“
- Inkubator
- Mikro titracijske pločice (96 rupa)
- Spektrofotometar: Biofotometar, "Eppendorf"

3.1.2 Hranjive podloge i mediji

Za uzgoj mikroorganizama korištene su hranjive podloge i bujoni pripremljeni prema propisanim recepturama. Kemikalije su dobavljene od proizvođača: Kemika (Hrvatska), Biolife, Oxoid i Difco.

Krvni agar

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 10,0 g/L; triptoza 10,0 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; agar 15,0 g/L; destilirana voda. Sterilizacija hranilišta se provodi na 121°C tijekom 15 minuta. Kada se hranilište ohladi na približno 50°C, aseptički se dodaje 5% sterilna defibrinirana ovčija krv. pH vrijednost hranilišta iznosi $7,4 \pm 0,2$.

Mueller Hinton agar

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 0,2 g/L; kazein hidrozilat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L; agar 17,0 g/L; destilirana voda 1 L. Sterilizacija hranilišta provodi se na 121°C tijekom 15 minuta. pH vrijednost hranilišta iznosi $7,4 \pm 0,2$.

Mueller Hinton bujon

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 0,2 g/L; kazein hidrozilat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L; destilirana voda 1 L. Sterilizacija hranilišta provodi se na 121°C tijekom 15 minuta. pH vrijednost hranilišta iznosi $7,4 \pm 0,2$.

Glicerol bujon

Sastav bujona: 3,7 mL BHI bujona, 50 ml 100%-tnog glicerola, 30 mL destilirane H₂O.

Sterilizacija bujona provodi se na 121 °C tijekom 20 minuta. pH vrijednost bujona iznosi 7,4±0,2.

3.2. Uzorci eteričnih ulja

Testirana eterična ulja dobivena su iz poduzeća "IREKS AROMA d. o. o." koja je jedna od tvrtki iz grupe IREKS čije je sjedište u Klumbachu u Njemačkoj. Uzorci korišteni u istraživanju pripremljeni su u DMSO (Dimetil sulfoksid) otopini tako da je štok otopina koju smo koristili iznosila 200mg/mL eteričnog ulja.

Tablica 3. Svojstva eteričnih ulja

Eterična ulja	Glavne sastavnice	Analitička svojstva
Borovica (<i>Juniperus Communis</i>)	α-pinen, mircen, sabinen, terpinen-4-ol, germakren D, limonen, γ-terpinen, β-pinen	Relativna gustoća kod 20°C = 0,845-0,900 Index refrakcije kod 20°C = 1,465-1,486
Kadulja (<i>Salvia officinalis</i>)	α-tujon, kamfor, 1,8-cineol, kamfen, α-humulen, β-kariofilen, β-tujon, borneol, bornilacetat, limonen	Relativna gustoća kod 20°C = 0,898-0,920 Index refrakcije kod 20°C = 1,460-1,470
Lavandin (<i>Lavandula x hybrid</i>)	Linalool (40-55%), cineol (8-12%), borneol (8-12%), linalilacetat (5-6%), terpinen-4-ol (7-10%), β-felandren (2,5-5%), kamfor (1-5%), α-pinen (0,1-1%), β-pinen (0,1-1%), limonen (<1%).	Relativna gustoća kod 20°C = 0,880-0,900 Index refrakcije kod 20°C = 1,455-1,470 Kut zakreta: -1° do -11°

Smilje (<i>Helicrysum italicum</i>)	α -pinen, γ -kurkumen, β -kariofilen, izoitalicen, α -bergamoten, nerilacetat	Reletivna gustoća kod 20°C = 0,880-0,920 Index refrakcije kod 20°C = 1,470-1,490
Tuja (<i>Thuja occidentalis</i>)	α -tujon, β -tujon, fenhon, sabinen, kamfor, limonene, α -pinen	Reletivna gustoća kod 20°C = 0,905-0,925 Index refrakcije kod 20°C = 1,450-1,470

3.1.1. Bakterijski soj

Korištena su 4 bakterijska soja: *Staphylococcus epidermidis* (klinički izolat), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Meticilin resistantni *Staphylococcus aureus* (MRSA), Meticilin resistantni *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Bakterije su čuvane u zamrzivaču na -80°C te su nasađivane na krvne agare i Mueller Hinton agar. Inkubirane 24 sata/37°C.

3.1.2 Bakterijski inokulum

Broj bakterija u inokulumu određivan je spektrofotometrijski te je računski namješten na optičku gustoću 1 (OD) što predstavlja 1×10^9 CFU/mL (engl. colony - forming units).

3.2. Metode ispitivanja antibakterijskog učinka eteričnih ulja

U ovom istraživanju korištene su tri različite metode. Difuzijske metode – gdje su korištene dvije varijante nanošenja i ispitivanja uzorka eteričnih ulja na podlogu (disk i rupe u agaru),

mikrodilucijska metoda kojom se određivala MIK i MBK koncentracija, te ispitivanje antibakterijskog učinka hlapivih komponenti eteričnih ulja metodom difuzije.

3.2.1. Metoda difuzije (rupe u agru)

Koristi se Mueller Hintonov agar u koju je ubačen detergent Tween 80 kako bi olakšao difuziju eteričnog ulja kroz sam agar. Na MH agar se je pomoću brisnog štapića nasadila ispitivana bakterijska kultura te se podloga inkubirala 15 minuta kako bi se suspenzija upila u podlogu. Zatim su se u agaru izbušile rupe pomoću sterilnog metalnog bušača rupa. U izbušene rupe dodavalo se 40 µl eterično ulja i zatim je slijedila inkubacija od 2 sata na +4°C kako bi eterično ulje što bolje difundiralo u podlogu te inkubacija od 24 sata na 37°C. Nakon inkubacije očitavaju se zone inhibicije u milimetrima. Sama rupa promjera je 5mm. U slučaju inhibitornog djelovanja eteričnog ulja na rast bakterija, područje oko otvora biti će veće od 5mm (Slika 8).



Slika 8. Metoda difuzije – bušenje rupa

3.2.2. Metoda diska

Brisnim štapićem na Muller Hintonovu ploču s dodatkom detergenta nanosi se suspenzija ispitivane bakterije. Zatim se rasporede diskovi u pravilnim razmacima, te se nakapa 5 μL izabranog eteričnog ulja. Inkubacija se provodi na 37°C kroz 24 sata nakon čega se očitavaju zone inhibicije bakterija oko diska (slika 9).

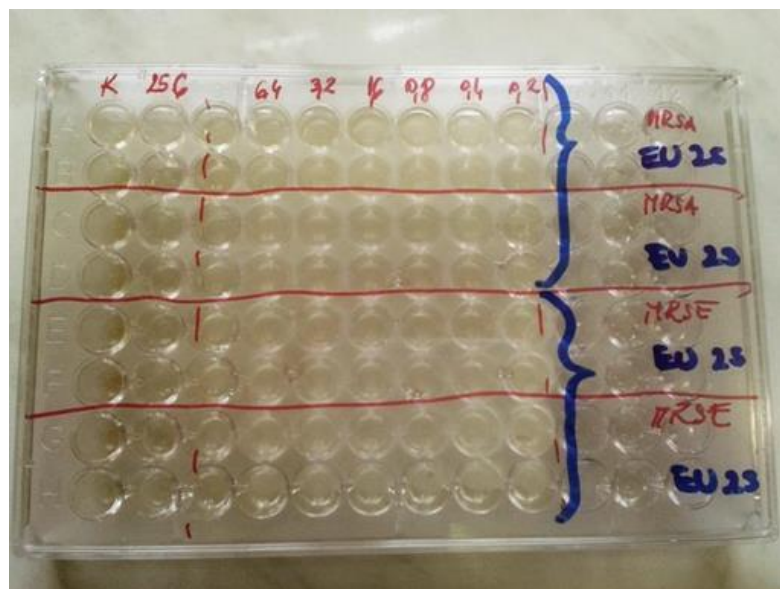


Slika 9. Disk difuzijska metoda

3.2.3. Mikrodilucijska metoda

Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) eteričnih ulja

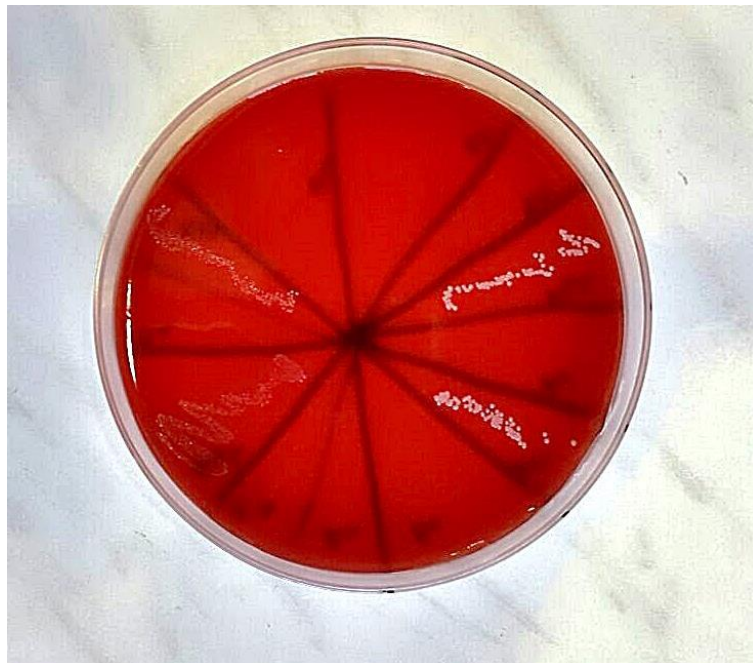
Metoda se radi u mikrotitracijskim pločama (Synthesis). Pripremljeni uzorci eteričnih ulja otopljeni su u BHI bujonu te nanešeni u mikrotitracijsku ploču u rupe u koncentracijama od 25.6 do 1.6 mg/mL. U rupe mikrotitar pločice uneseno je po 100 μ L suspenzije meduna navedenih koncentracija i 100 μ L bakterijske suspenzije. Za pozitivnu kontrolu korištena je bakterijska suspenzija od 10^5 CFU/mL (100 μ L). Mikrotitarska pločica je zatim stavljena u termostatski inkubator na temperaturi od 37°C. Rezultati su očitavani nakon 24 sata promatrajući vidljiva zamućenja unutar svake rupe uspoređujući ga s kontrolnim rupom. MIK vrijednost određena je kao najniža koncentracija eteričnih ulja kod koje nakon 24 sata inkubacije nije primijećeno vidljivo zamućenje.



Slika 10. Mikrodilucijska metoda

Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) eteričnih ulja

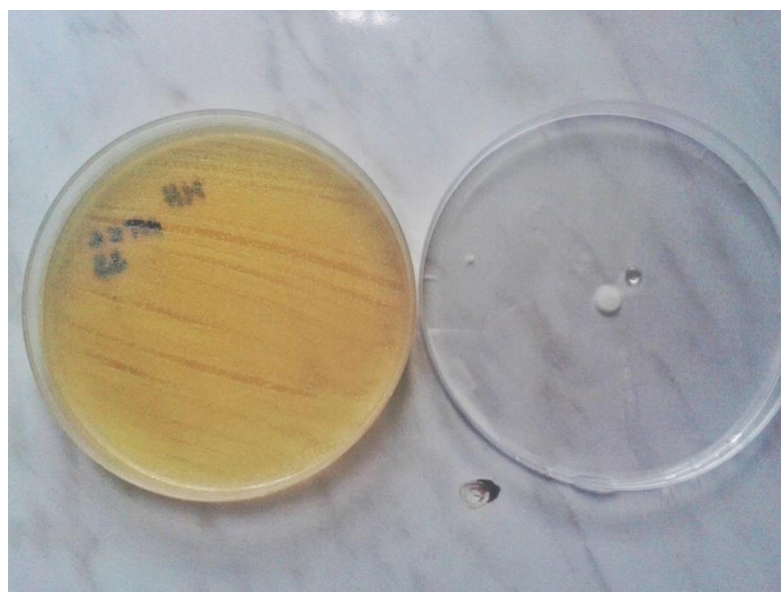
Nakon određivanja MIK vrijednosti, na krvni agar nasadujemo sterilnom mikrobiološkom ušicom uzorak iz onih rupe koncentracije gdje nije bilo zamućenja. Krvni agar stavljamo na inkubaciju 37°C/48 – 72 sata. Ako bakterije nisu porasle na agaru, to predstavlja minimalnu baktericidnu koncentraciju.



Slika 11. Rezultati MBK na krvnom agaru

3.2.4. Metoda ispitivanja antimikrobnog učinka hlapljivih tvari

Pripremljen bakterijski inokulum se je brisnim štapićem nasadio na Mueller Hintonov agar te se pustilo oko 15 minuta da se bakterije upiju u podlogu. Zatim se sterilni celulozni disk promjera 5 mm postavlja sa sterilnom pincetom na poklopac petrijeve zdjelice i natapio sa 5 μ L eteričnim uljem. Na poklopac se postavio donji dio petrijeve zdjelice sa nasadenim agarom (Slika 12). Parafilmom se cijela ploča hermetički zatvarala kako ulje nebi isparavalo izvan petrijeve zdjelice. Slijedila je inkubacija na 37°C kroz 24 sata, nakon čega semjerila zona inhibicije ispod diska natopljenog s eteričnim uljima.



Slika 12. Metoda ispitivanja hlapivih komponenti eteričnog ulja

4. REZULTATI

Antimikrobno djelovanje šest različitih eteričnih ulja na dvije vrste stafilokoka ispitano je pomoću tri različite metode.

Prvo je korištena difuzijska metoda te su se koristile dvije varijante aplikacija ulja na, odnosno u podlogu. Korištena je disk difuzijska metoda i metoda bušenja rupa u agaru. U obje je metode mjerena zona inhibicije nakon inkubacije 24 sata pri 37°C. Metodom disk difuzije nisu dobivene zone inhibicije za ni jednu od testiranih bakterija (slika 9).

Zatim, je korištena metoda bušenja rupa u agaru te dodatak pripremljenih eteričnih ulja u izbušene rupe. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tablici 4. Najbolje antibakterijsko djelovanje pokazuje eterično ulje smilja jesen te su sve ispitivanje bakterije bez obzira na rezistenciju osjetljive na njega. Ulje borovice pokazuje najbolje djelovanje na rezistentne sojeve te MRSA soj ima zonu inhibicije od 15mm, a MRSE od 11mm. Eterična ulja kadulje, lavandin te tuja ne pokazuju značajno antibakterijsko djelovanje niti na jednu od navedenih bakterija.

Tablica 4. Zone inhibicije rasta bakterija u mm nakon djelovanja eteričnih ulja

ETERIČNA ULJA	BAKTERIJE			
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>S. epidermidis</i>	MRSE
	Zona inhibicije/mm			
Tuja	5	5	6	5
Borovica	9	15	5	11
Kadulja	5	5	8	5
Lavandin	5	5	8	5

Smilje proljeće	8	8	6	8
Smilje jesen	12	14	7	22

Rezultati mikrotitracijske metode prikazani su u Tablici 5. Ovom metodom se odredila minimalna inhibicijska (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK).

BAKTERIJE		<i>S. aureus</i>		MRSA		<i>S. epidermidis</i>		MRSE	
(mg/mL)									
ETERIČNA ULJA	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	
Tuja	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	
Borovica	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	
Kadulja	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	
Lavandin	12.8	12.8	6.4	6.4	12.8	12.8	6.4	6.4	

Tablica 5. Minimalna inhibicijska i minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih eteričnih ulja na stafilokoke.

Smilje proljeće	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8
Smilje jesen	6.4	6.4	3.2	6.4	12.8	12.8	12.8	12.8

Dobiveni rezultati pokazuju da postoje razlike u antibakterijskom djelovanju eteričnih ulja na ispitivane vrste stafilokoka. Najizraženiji antibakterijski učinak pokazuje eterično ulje smilja jesen gdje MIK za *S. aureus* te MRSA soj iznose, 6.4 mg/mL te 3.2 mg/mL. Eterično ulje lavandina pokazuje najbolje djelovanje prema rezistentnim sojevima ispitivanih vrsta, MRSA i MRSE te MIK iznosi 6,4 mg/mL. Eteričana ulja borovice, kadulje, smilja proljeće i tuje na ispitivane bakterije pokazuju inhibitornu i baktericidnu učinkovitost u koncentraciji od 12.8 mg/mL. Kako bi se ispitalo da li hlapive komponente eteričnih ulja imaju učinak na stafilokoke, Petrijeva se zdjelica zatvorila pomoću parafilma. Nakon 24-satne inkubacije nijedno do inhibicije rasta ispod diska natopljenog eteričnim uljem. Prema navedenim rezultatima hlapive komponente ispitivanih eteričnih ulja svoj učinak ne ispoljavaju pomoću hlapivih komponenti.

5. RASPRAVA

Eterična ulja koncentrirane su tekućine, biološki aktivne i hlapljive koje je moguće izolirati iz različitih dijelova biljaka. Najčešće su to korijen, stabljika, list, cvijet i plod. Terpeni, ugljikovodici ugodnog mirisa, čine im najveći dio sastava (7). Eterična ulja mogu različito djelovati na stanice bakterije. Jedno od mogućih djelovanja je prodiranje kroz staničnu membranu i ometanje njezine funkcije. Dolazi do njezine razgradnje, uništavanje staničnih proteina, disfunkcije enzima i proizvodnje ATP. U ekstraktima određenih biljaka prisutan je veliki broj reaktivnih skupina, zato se antimikrobni učinak ne prepisuje samo jednom mehanizmu već ih je uključeno nekoliko koji djeluju na ciljna mjesta na stanici mikroorganizma (23). Da bi se dobilo eterično ulje iz biljaka provodi se postupak destilacijom vodenom parom. Destilacija je postupak razdvajanja homogene smjese na pojedine komponente na temelju razlike u temperaturi vrelišta. Eterična ulja koja se nalaze u samim žljezdama biljaka imaju vrelište uglavnom iznad 200°C što bi značilo kad bi dosegli tako visoke temperature vrenja, većina organskih komponenti ulja bi oksidirala. Stoga za takve tvari koje uz to su i netopljive u vodi, koristi se destilacija vodenom parom. Zbog visokog tlaka koja stvara vodena para, inače teško hlapljive komponente biljke, sada isparavaju već i na 100°C (8).

Stafilokoki su jedni od najčešćih uzročnika različitih kožnih te bolničkih infekcija. Put prijenosa moguć je sa čovjeka na čovjeka, te prijenos pri različitim medicinskim zahtjevima gdje bakterije prelaze iz svoje normalne flore u područje gdje se inače ne nalaze ta tamo izazivaju infekciju. Uzročnici su mnogih bolesti poput toksičnog šok sindroma, trovanja hranom, lokalnih kožnih infekcija, furunkula, karbunkula, impetiga, endokarditisa, bakterijemije te različitih bolničkih infekcija povezanih sa kateterima (1). Obzirom na veliki broj infekcija koje uzrokuju i na problem koji predstavljaju velikom rezistencijom na

antibiotike ovaj rad je posvećen istraživanju pronalaska alternativne metode liječenja stafilokoknih bolesti. Eterična ulja imaju ljekovite supstance koje razaraju bakterijsku stanicu, te bi se mogla koristiti u terapiji infekcija uzrokovanih stafilokokima. Cilj istraživanja bio je ispitati kako šestrazličitih eteričnih ulja primorske hrvatske: Borovice (*Juniperus communis*), Kadulje (*Salvia officinalis*), Lavandina (*Lavandula x hybrida*), Smilja jesen (*Helichrysum italicum*), Smilja proljeće (*Helichrysum italicum*), Tuje (*Thuja occidentalis*) utječu na 2 vrste stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*).

Da bi ispitali antimikrobno djelovanje eteričnih ulja bilo je potrebno odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) ulja i minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK). Sva ulja u istraživanju pokazali su antimikrobno djelovanje na obje bakterije.

Eterično ulje smilja jesendifuzijskommetodomnajboljeantimikrobnodjelovanjepokazujena MRSE sa inhibicijskom zonom od 22 mm, na MRSA 14 mm te na *S. aureus* 12 mm. Mikrodilucijskom metodom sa koncentracijom od 6.4 mg/mL MIK i MBK vrijednosti na *S. aureus*, te sa koncentracijom od 3.2 mg/mL MIK vrijednosti i 6.4 mg/mL MBK vrijednosti na MRSA. Disk difuzijskom metodom nisu dobiveni rezultati iako je u podlogu dodan detergent Tween80 koji olakšava difuziju eteričnog ulja. Jedan od razloga zašto nije došlo do difuzije i posljedično inhibicije rasta testiranih bakterija je mala količina eteričnog ulja koja je nanesena na disk. U pokusima u kojima se bušio agar je nanešena značajno više eteričnog ulja te je došlo do inhibicije porasta bakterija. Podaci iz literature pokazuju antimikrobno djelovanje ulja smilje na bakterije *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumonia*, kao i na gljivu *Candida albicans* (24).

Testiranje eteričnog ulja lavandina pokazalo je difuzijskom metodom sa rupama inhibicijsku zonu od 8 mm na *S. epidermidis*. Dok najbolje antimikrobno djelovanje mikrodilucijskom metodom daje na rezistentne sojeve MRSA i MRSE u koncentracijama 6.4 mg/mL za MIK i

MBK vrijednost. Na *S. aureus* i *S. epidermidis* pokazuje inhibicijski učinak sa 12.8 mg/mL, ali ne i baktericidni. Podaci u literaturi pokazuju antimikrobno djelovanje eteričnog ulja lavandina i na *E. coli* i *Shigella flexneri* (25).

Eterično ulje borovice kod difuzijske metode pokazuje zonu inhibicije od 15 mm za MRSA i 11 mm za MRSE. Mikrodilucijskom metodom pokazuje inhibitorno djelovanje na sve bakterije na koncentraciji od 12.8 mg/mL ali baktericidno ne djeluje. Dok u literaturi se navodi antimikrobno djelovanje eteričnog ulja borovice na *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* i *S. epidermidis* sa zonama inhibicije od 10 do 16 mm (26).

Kod difuzijske metode ulje smilja proljeće pokazuje antimikrobno djelovanje sa zonama inhibicije od 8 mm prema *S. aureus*, MRSA i MRSE, dok eterično ulje kadulje zonu od 8 mm pokazuje na *S. epidermidis*. Eterično ulje kadulje kao i smilja proljeće pokazuju MIK vrijednosti prema svim bakterijama na 12.8 mg/mL, dok baktericidan učinak nemaju na spomenute bakterije. U drugim radovima ulje kadulje pokazalo je antimikrobno djelovanje za *S. aureus* i *Streptococcus* grupe D (27). Eterično ulje tuje ne pokazuje ni inhibitorno ni baktericidno djelovanje na bakterije roda *Staphylococcus*. Istraživanja pokazuju antimikrobno djelovanje na bakteriju *P. aeruginosa* (28).

Obzirom na dobivene rezultate, možemo reći da ulje lavandina ima dobro baktericidno djelovanje na MRSA i MRSE, kao i ulje smilja jesen na *S. aureus* bez obzira na rezistenciju te bi moglo imati potencijalnu u liječenju stafilokoknih infekcija.

6. ZAKLJUČAK

1. Obje ispitivane vrste stafilokoka pokazuju osjetljivost na testirana eterična ulja: Borovice (*Juniperus communis*), Kadulje (*Salvia officinalis*), Lavandina (*Lavandula x hybrida*), Smilja jesen (*Helichrysum italicum*), Smilja proljeće (*Helichrysum italicum*), Tuje (*Thuja occidentalis*).
2. Najbolje inhibitorno djelovanje pokazuju ulje smilja jesen na *S. aureus* bez obzira na rezistenciju na koncentracijama ulja 6.4 i 3.2 mg/mL, te ulje lavandina na MRSA i MRSE u koncentraciji 6.4 mg/mL MIK i MBK vrijednosti.
3. Rezultati pokazuju potencijal upotrebe testiranih eteričnih ulja, posebno eteričnog ulja smilja kao antibakterijskih sredstava u liječenju stafilokoknih infekcije uključujući infekcije uzrokovane meticilin rezistentnim sojevima.

7. LITERATURA

1. Tille, P., Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13 edition, section 2, chapter 14, 230 str – 244 str
2. Kalenić, S., i suradnici: Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, 14. poglavlje, 117-124 str
3. Slika 1.
Openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3265459_pone.0029031.g002&req=4
(Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
4. <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8228> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807625/> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
6. Miholjević, I.,: Proizvodnja i prerada aromatičnog i ljekovitog bilja, Prodigital, Hrvatska
7. <http://www.plantagea.hr/dev/dobivanje-etericnih-ulja> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
8. https://en.wikipedia.org/wiki/Steam_distillation (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
9. Slika 3. <http://novovrijeme.ba/wp-content/uploads/2014/02/17575ab.jpg> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
10. <http://www.val-znanje.com/index.php/ljekovite-biljke/1029-borovica-obicna-juniperus-communis-l> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
11. <http://www.gospodarski.hr/Publication/2014/18/borovica-kleka-za-lijek-zain-rakiju/8075#.Ve6lUdLtmko> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
12. Slika 4. v<http://www.hazud.hr/borovica> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)

13. <http://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/kadulja-225/> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
14. Slika 5. <http://altertv.org/tv/tekstovi/kadulja> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
15. http://www.lavanda-lavandin.com/Karakteristike_lavande_i_lavandina.htm (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
16. <http://www.aromaterapija.biz/fito-aromaterapija/21-etericna-ulja/42-etericno-ulje-lavande-ili-etericna-ulja-lavandi.html> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
17. Slika 6. <http://everything-lavender.com/lavender-hybrids.html> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
18. <http://www.aromattera.hr/aromaterapija/etericnaulja/smilje.htm> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
19. Slika 7. <http://www.pticica.com/slike/smilj/121867> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
20. <https://www.organicfacts.net/health-benefits/essential-oils/health-benefits-of-thuja-essential-oil.html> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
21. Slika 8. <http://imoart.hr/portal/index.php/priroda/priroda-zivi-svijet/biljke/342-istonjaka-tuja-biota>, <http://rasadniksmaragd.com/proizvodi/cetinari-2/>
22. <http://www.plantagea.hr/dev/djelovanje-etericnih-ulja> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
23. Alabayrak, S., Aksoy, A., Budak, U.: Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helychrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey, *Turk J Biol*, 2010. 463 – 473
24. Gruia, T., A., Horhat, G., F., Jianu, C., Pop, G.: Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania, *International journal of agriculture & biology*, Romania, 2013., 772 – 776

25. Blažević, N., Kalodera, Z., Kosalec, I., Pepeljnjak, S.: Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*), *Acta Pharm*, 55, 2005, 417 – 422.
26. Khalil, R., Li, Zheng- Gou: Antibacterial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria, *Africal Journal of Biotechnology* Vol. 10 (42), Syria, 2011., 8397 – 8402
27. Noor Jahan, Mansoor Ahmad, Mehjabeen, Sikandar Khan, Sherwani, Ghazala Raza Naqvi: Antimicrobial potency against microbes found in clinical samples and toxicity studies on selected medical plants, *Moksha Publishing House, Pakistan*, 2013., 109 – 112.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime	Ivana Stojčević
Adresa	Rizzijeva 6, 52100 Pula
Elektronička pošta, Web adresa	stojcevicivana@hotmail.com
Datum i mjesto rođenja	09.01.1993., Pula
Državljanstvo	Hrvatsko

ŠKOLOVANJE

Datum	Rujan 2011. – Srpanj 2015.
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet
Zvanje	Prvostupnik sanitarnog inženjerstva

DODATNI PODACI

Sudjelovanje o organizaciji međunarodnih skupova:

- Peta nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – Regionalna suradnja, Opatija, 11. 04. 2015.

Rad na fakultetu:

- Demonstratorica na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom

