

ANTIMIKROBNI UČINAK ODABRANIH ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE HRVATSKE NA BAKTERIJU ACINETOBACTER BAUMANNII

Živković, Nensi

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:103477>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nensi Živković

**ANTIMIKROBNI UČINAK ODABRANIH ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE
HRVATSKE NA BAKTERIJU *ACINETOBACTER BAUMANNII***

Završni rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nensi Živković

**ANTIMIKROBNI UČINAK ODABRANIH ETERIČNIH ULJA PRIMORSKE
HRVATSKE NA BAKTERIJU *ACINETOBACTER BAUMANNII***

Završni rad

Rijeka, 2015.

Mentorica 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, 10 slika, 4 tablice, 19 literaturnih navoda.

SAŽETAK

Acinetobacter baumannii nepokretni je Gram - negativni štapić koji izaziva teške infekcije kod imunokompromitiranih bolesnika. U posljednje vrijeme, ovaj oportunistički uzročnik značajno je povezan s rastom infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi, odnosno bolničkih infekcija. Njegova rezistentnost na većinu antibiotika danas predstavlja veliki problem. Cilj ovog rada bio je utvrditi antimikrobni učinak eteričnih ulja primorske Hrvatske na referentne sojeve *A. baumannii* (ATCC BAA-1605 i ATCC 19606) od kojih je *A. baumannii* ATCC BAA-1605, multiplerezistentni soj.

Različitim je metodama testirano antimikrobno djelovanje pet različitih biljnih eteričnih ulja (smilje, proljeće i jesen - *Helichrysum arenarium*, ulje kadulje - *Salvia officinalis*, ulje borovice - *Juniperus communis*, ulje tuje - *Thuja occidentalis* i ulje lavandina - *Lavandula hybrida*) na oba soja *A. baumannii*. Dokazano je kako je *A. baumannii* osjetljiv na sva testirana eterična ulja unutar 48 sati. Najbolji antimikrobni učinak pokazalo je eterično ulje lavandina, *Lavandula hybrid*, uz minimalnu inhibicijsku koncentraciju od 1,6 mg/mL te istu minimalnu baktericidnu koncentraciju. Metodom difuzije uz bušenje rupa u agaru također je zabilježen dobar učinak eteričnog ulja lavandina, ali samo na referentni soj *A. baumannii* ATCC 19606 s promjerom inhibicije od 27 mm, dok je eterično ulje borovice djelovalo na oba soja u promjeru od 18 do 19 mm.

Zaključno, rezultati pokazuju da eterična ulja lavandina i borovice posjeduju dobru antimikrobnu aktivnost prema acinetobakteru i imaju veliki potencijal primjene kao sredstvo za suzbijanje nastanka ili širenja infekcija, najvećim dijelom zastupljenih u bolničkom okruženju.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, eterična ulja, antimikrobni učinak

SUMMARY

Acinetobacter baumannii is immobile Gram - negative rod which induces severe infection in compromised patient. Lately, this opportunistic cause is significantly connected with increased number of hospital infections which represents global problem due to bacterial resistance to larger amount of antibiotics. Objective of this study was to determine antimicrobial activity of plant essential oils from Croatian coastal region on reference strains *A. Baumannii* (ATCC BAA-1605 and ATCC 19606), of which *A.baumannii* ATCC BAA-1605 is multiply-resistant strain.

The activity of five different essential oils (*Helichrysum arenarium*, *Salvia officinalis*, *Juniperus communis*, *Thuja occidentalis* and *Lavandula hybrida*) was tested by different methods on both strains of *A. baumannii*. It is shown that regardless to antibiotic resistancy, *A. baumannii* is sensitive to all tested plant essential oils within 48 hours. The best antimicrobial effect was shown by the essential oils of *Lavandula hybrida* with a minimum inhibitory concentration of 1.6 mg/mL and the same bactericidal concentration. The good performance of essential oil *Lavandula hybrid* was also recorded by agar well diffusion method, but only on *A.baumannii* ATCC 19606 with diameter of inhibition of 27 mm, while the essential oil of *Juniperus communis* had an effect on each strain in diameter from 18 to 19 mm.

Ultimately, results suggest that essential oils *Lavandula hybrid* and *Juniperus communis* have a good antimicrobial activity against *Acinetobacter* and have large potential of application as a means of controlling the formation and spread of infection which are mainly represented in the hospital environment.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, essential oils, antimicrobial activity

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA | 8 |
| 1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE BAKTERIJE <i>ACINETOBACTER</i> | 8 |
| 1.1.1. Labratorijska dijagnostika acinetobaktera | 9 |
| 1.1.2. Patogeneza i imunost | 10 |
| 1.1.3. Klinička slika | 10 |
| 1.1.4. Epidemiologija..... | 10 |
| 1.2. ETERIČNA ULJA..... | 11 |
| 1.2.1. Dobivanje eteričnih ulja..... | 11 |
| 1.2.1.1. Destilacija vodenom parom..... | 11 |
| 1.2.1.2. Tiještenje | 12 |
| 1.2.2. Antimikrobni učinak eteričnih ulja | 12 |
| 1.2.3. Lavandin (<i>Lavandula hybrida</i>) | 12 |
| 1.2.4. Borovica (<i>Juniperus communis</i> , porodica <i>Cupressaceae</i> , čempresi) | 14 |
| 1.2.5. Kadulja (<i>Salvia officinalis</i> , porodica <i>Lamiaceae</i> , usnače)..... | 15 |
| 1.2.6. Smilje (<i>Helichrysum italicum</i> , porodica <i>Asteraceae</i> , glavočike)..... | 17 |
| 1.2.7. Tuja (<i>Thuja occidentalis</i> , porodica <i>Cupressaceae</i> , čempresovke) | 18 |
| 2. CILJ RADA | 20 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 21 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 21 |
| 3.2. METODEISPITIVANJA ANTIBAKTERIJSKOG DJELOVANJA..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1. Metoda difuzije | 23 |
| 3.2.1.1. Metoda diska | 24 |
| 3.2.1.2. Metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru | 24 |
| 3.2.2. Dilucijska metoda | 25 |
| 3.2.2.1. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) | 27 |
| 3.2.2.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)..... | 27 |
| 3.2.3. Metoda ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja | 27 |
| 4. REZULTATI | 29 |
| 4.1. REZULTATI DISK METODE | 29 |
| 4.2. REZULTATI DIFUZIJSKE METODE UZ BUŠENJE RUPA U AGARU | 29 |
| 4.3. REZULTATI DILUCIJSKE METODE..... | 31 |
| 4.4. REZULTATI METODE ISPITIVANJA HLAPLJIVIH KOMPONENTI ETERIČNIH ULJA | 32 |
| 5. RASPRAVA | 33 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 36 |
| 7. LITERATURA | 37 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 39 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Opće karakteristike bakterije *Acinetobacter*

U porodicu *Moraxellaceae*, rod *Acinetobacter* ubrajamo Gram-negativne, nefermentativne, nepokretne kokobacile. Ove saprofite bakterije rasprostranjene su u tlu i vodi te su značajan uzročnik infekcija vezanih za zdravstvenu skrb, posebno u jedinicama intenzivnog liječenja. Veoma važna karakteristika *Acinetobacteria* je njegova rezistentnost na glavne antibiotike (cefalosporini treće generacije, karbapanemi i ksipenicilini), a jedna od najrezistentnijih i najčešće izoliranih vrsta je *A. baumannii* (1).

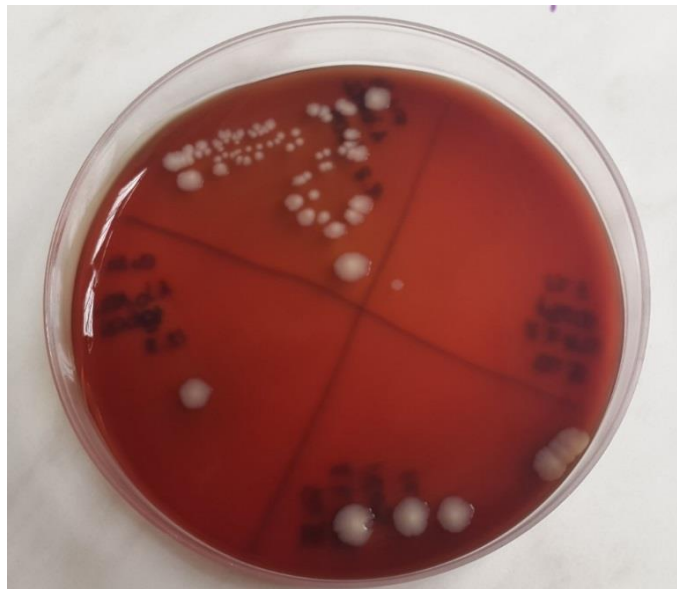
Danas je poznata 31 vrsta od kojim je 17 imenovano, a neke od njih prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Taksonomija i klasifikacija unutar roda *Acinetobacter* (1)

| VRSTA | GENOVRSTA |
|--------------------------|-----------|
| <i>A. baumannii</i> | 2 |
| <i>A. baylyi</i> | |
| <i>A. bouvetii</i> | |
| <i>A. calcoaceticus</i> | 1 |
| <i>A. gernerii</i> | |
| <i>A. grimontii</i> | |
| <i>A. haemolyticus</i> | 4 |
| <i>A. johnsonii</i> | 7 |
| <i>A. junii</i> | 5 |
| <i>A. lwoffii</i> | 8/9 |
| <i>A. parvus</i> | |
| <i>A. radioresistens</i> | 12 |
| <i>A. schindleri</i> | |
| <i>A. tandoii</i> | |
| <i>A. tjernbergiae</i> | |
| <i>A. townneri</i> | |
| <i>A. ursingii</i> | |

1.1.1. Laboratorijska dijagnostika acinetobaktera

Osim što su Gram-negativni, acinetobakteri posjeduju kapsulu te su nefermentativni, katalaza-pozitivni, oksidaza-negativni kokobacili. Iako je kod nekih opisana kličuća pokretljivost, inače su nepokretni jer nemaju flagele. Lako se uzgajaju na hranjivim podlogama, posebno na krvnom agaru (Slika 1.) pri 37°C. Nakon inkubacije od 18-24 sata vidljive su sivobijele kolonije, glatke i ponekad sluzave površine (1).



Slika 1. Porast *A. baumannii* na krvnom agaru

Neke genovrste pokazuju hemolizu na krvnom agaru, dok kod *A. baumannii* nije prisutna. Za identifikaciju pojedinih vrsta koristi se DNA-DNA hibridizacija, no u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima nije rutinska. Zbog prevencije i kontrole bitno je razlikovati *A. baumannii* kompleks od ostalih acinetobaktera kako bi se moglo spriječiti i suzbiti širenje infekcije. U rutinskom radu većina se glukoza-oksidirajućih nehemolitičkih acinetobaktera identificira kao *A. baumannii* (1).

1.1.2. Patogeneza i imunost

A. baumannii ima polisaharidnu kapsulu kojom zajedno s pilima i fimbrijama adherira na ljudske epitelne stanice, ali ne proizvodi difuzibilne toksine i citolizine. Stvaranje biofilma, inhibicija fagocitoze i adheriranje na površinu sluznice ili biomaterijala onemogućuje imunom mehanizmu da se brani. Poticanje proinflamatornih citokina dovodi do patogeneze infekcije (1).

1.1.3. Klinička slika

Acinetobakteri su oportunistički patogeni koji dovode do postoperativnog meningitisa, sepse, infekcije rana te respiratornog i urinarnog trakta. Infekcije su najčešće prisutne kod unutarbolničke populacije, no moguće je nastajanje i izvan bolnice. Posebno važan patogen u jedinicama intenzivnog liječenja je *A. baumannii* za kojeg se vežu brojne infekcije – od asimptomatskih infekcija do fulminantnih sepsi. Najčešća oboljenja povezana su sa strojnom ventilacijom i intravaskularnim kateterima te su česta pojava kod osoba s oslabljenim imunitetom. Pojedine studije pokazuju da su rezistentni sojevi *A. baumannii* uzrokovali infekcije koje su rezultirale s lošijim ishodom (1).

1.1.4. Epidemiologija

U gastrointestinalnom sustavu bakterija je kolonizirana kod 45% nehospitaliziranih i 25% zdravih ljudi, dok kod hospitaliziranih osoba brojka seže do 75%. *Acinetobacter baumannii* se rijetko, u svega 0,5-3%, može naći na ljudskoj koži, kao i u fecesu (0,8%). Unatoč činjenici da se može naći u uzorcima tla i na biljkama, kolonizacija spomenute bakterije rijetka je u Europi. U bolničkom okruženju acinetobakteri neuobičajeno preživljavaju na suhim površinama poput kože ili u česticama prašine te na vlažnim površinama poput opreme za terapiju i respiratornu

potporu. Boravak u jedinicama intenzivnog liječenja, teška osnovna bolest, strojna ventilacija i nedavni kirurški zahvati čimbenici su rizika povezanih s nastankom infekcije (1).

1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljive smjese biološki aktivnih spojeva koja se dobivaju iz biljnog materijala (korijena, lista, stabljike, cvijeta i ploda), procesom destilacije, ekstrakcijom ili tiještenjem (2). Najvećim dijelom sastoje se od terpena, hlapljivih nezasićenih ugljikovodika koji su ugodnog mirisa. Ovisno o procesu dobivanja, mogu biti žućkaste boje ili bezbojni (3).

1.2.1. Dobivanje eteričnih ulja

Najčešće se dobivaju destilacijom vodenom parom ili tiještenjem. Ovisno o načinu samog dobivanja ulja ili o dijelu biljke koji se podvrgava destilaciji katkad se mogu dobiti različita ulja iz iste biljke (4).

1.2.1.1. Destilacija vodenom parom

Temperatura vrelišta eteričnih ulja veoma je visoka i prelazi 100°C. Kako bi odvojili eterično ulje od ostatka materijala, a da ne dođe do oksidacije, provodi se postupak destilacije vodenom parom. Netopljivost u vodi jedna je od bitnih karakteristika eteričnih ulja koja je važna za destilaciju. Prilikom postupka destilacije dolazi do prolaska vruće vodene pare kroz biljnu masu koja zbog pritiska destilira hlapljive mirisne tvari. Nakon što se mješavina para ohladi i kondenzira u posebnom hladioniku s hladnom vodom nastaju dva produkta: mala količina eteričnog ulja koja ovisno o gustoći potone na dno ili pliva na površini te cvjetna vodica odnosno hidrolat. Nekoliko stotina kilograma do nekoliko tona potrebno je za dobivanje jednog kilograma eteričnog ulja (4).

1.2.1.2. Tiještenje

Hladno prešanje je jednostavan postupak kojim se dobivaju eterična ulja iz kore citrusa u kojoj su sadržane znatne količine vrlo ugodnog mirisa (5).

Usplođe se izbuši sitnim iglicama ili preša kako bi se oslobodio sadržaj iz žlijezda. Potom se materijal miješa s vodom, a od ostatka biljne mase se centrifugiranjem odvaja ulje koje se sastoji od hlapive i nehlapive komponente (5).

1.2.2. Antimikrobni učinak eteričnih ulja

Na djelovanje eteričnog ulja otpornije su Gram-negativne bakterije. Prisutnost dvostrukog sloja fosfolipida i lipopolisaharida (LPS) pruža veću otpornost. Kod Gram-pozitivnih bakterija stanična stijenka se većinskim dijelom sastoji od peptidoglikana na kojeg su vezane ostale molekule poput kiselina i proteina. Upravo ta struktura omogućava molekulama da lako prođu u stanicu i djeluju unutar nje (6). Stoga, antimikrobni učinak eteričnih ulja najbolje objašnjava njihova hidrofobnost. Ta karakteristika omogućuje eteričnom ulju da akumulira između lipida stanične membrane bakterije čime ju čini još propustljivijom, posebno za protone i ione.

1.2.3. Lavandin (*Lavandula hybrida*)

Lavandin je dobiven križanjem lavande latifolije (širokolistne lavande) i prave lavande. Iako su intezivnijeg mirisa, lavandini nemaju izražena svojstva kao lavanda stoga im je i primjena različita. Od mnogobrojnih klonova, pojedini su istaknuti kao što su Abrial, Super, Grosso i Budrovka. Lavandin Super i Grosso pronašli su primjenu u kozmetičkoj industriji, dok je Abrial prepoznatljiv po antibakterijskom i antifungalnom djelovanju, a Budrovka je dobar analgetik. Suhi cvijet lavandina koristi se za zaštitu od moljaca, dok su svi lavandini prisutni u industriji deterdženata i sredstva za čišćenje. Hibridna lavanda, iako zahtjevnija, najbolje

uspijeva na plodnim, dubokim i vodozračnim tlima i to već na 300 metara n/v. Po izgledu veoma je slična lavandi, a ono što ju čini drugačijom je viši rast i tri cvjetne glavice (Slika 2.) (3).



Slika 2. Cvijet lavandina (13)

Destilacijom cvijeta, dobiveno eterično ulje, koristi se kao mirisna komponenta u farmaceutskoj industriji i kozmetičkim proizvodima te kao sastojak aroma za hranu i u aromaterapiji. Također, primjenjuje se kod kožnih tegoba, grčeva, opekлина i nervoze (3).

1.2.4. Borovica (*Juniperus communis*, porodica *Cupressaceae*, čempresi)

Borovica je nisko stablo ili visok grm 3-5 m, ponekad i do 15 m visok i oko 50 cm širok, a visine od 3-5 m. Habitus je nepravilan, stupast, jajast ili čunjast. Grane su dignute ili viseće dok je deblo žljebasto. U početku je kora glatka, poslije izbrazdana, odvaja se u obliku ljuski i traka. Sustav korijena je razgranat žilom srčanicom, a i endotrofna mikroza je razvijena. Pupovi su obloženi ljuskama i sitni, a lišće je bodljikavo, široko, uspravno, najšire na početku te se postepeno sužava u šiljasti vrh. Donja strana je zelena, a gornja ima bijelu ili sivu uzdužnu prugu. Na stablu znaju ostajati i do četiri godine. Sporog je rasta i može doživjeti veliku starost. Veoma je otporna na jake mrazove i velike suše. Ovisno o nadmorskoj visini, cvijeta u travnju ili svibnju (3).



Slika 3. Plod borovice (14)

Eterično ulje borovice koje se dobiva destilacijom ploda, koristi se u laksativima i diureticima, kao mirisna komponenta u kozmetičkim proizvodima, u aromaterapiji te za

aromatiziranje hrane. Djelovanje ulja je antiseptičko, antireumatsko, spazmolitičko, rubefacijentno, tonizirajuće, emenagogno, detoksificirajuće i diuretičko. Primjenjuje se kod problema s probavom, bronhitisa, bolova u mišićima, nakupljanju tekućine u tijelu te celulita. Nije preporučljiva duža primjena od 3 tjedna te ne smiju koristiti osobe s bolesnim bubrezima ili trudnice (3).

1.2.5. Kadulja (*Salvia officinalis*, porodica *Lamiaceae*, usnače)

Kadulja je višegodišnja biljka, otporna na sušu, drvenastog korijena koji prodire duboko u tlo. Toplog je podneblja te klije pri temperaturi od 12°C do 15°C, a može i pri 6 do 8°C, ali je tada nešto sporiji proces. Mlada biljka ima zeljastu stabljiku koja pri dnu s vremenom odrveni. Mladi izdanci su svijetlozeleni do ljubičasti, prekriveni rjeđim ili gušćim dlačicama koje su sivobijele boje. Listovi su s obje strane obrasli dlačicama, jajasto do izduženo kopljastog oblika i svijetli. Cvast je klasast te se sastoji od 2 – 8 cvjetova (Slika 4.), ružičaste, bijele ili plave boje koji zbog vrlo ugodnog mirisa privlače pčele. Eterično ulje nalazi se u cijelom nadzemnom dijelu biljke, a najvećim dijelom u listovima te ga u osušenom obliku možemo pronaći od 1,6 do 2,7 %. Kadulja ima životni vijek 5-7 godina, no, ukoliko je dođe do loše tehnologije uzgoja, urod se može smanjiti već nakon četiri godine (3).



Slika 4. Cvijet kadulje (15)

Destilacijom biljke dobiva se eterično ulje koje se upotrebljava za aromatizaciju hrane, kao mirisna komponenta u kozmetičkoj industriji i u aromaterapiji. Djelovanje je antibakterijsko, eksponirajuće i lipolitično. Može se koristiti kod virusnih infekcija, poticanja probave, afti, celulita i pretilosti, a također je primjenjivo kod amenoreje. U većim dozama, posebno unesno oralno, može nadražiti kožu, a ima i abortivno djelovanje (3).

1.2.6. Smilje (*Helichrysum italicum*, porodica *Asteraceae*, glavočike)

Smilje je trajni, zeljasti, aromatični polugrm kojem sivkastu boju daje vunasta dlaka. Rasprostranjen je na mediteranskom području, a proteže se kamenjarima i kamenjarskim travnjacima i to ljeti kada cvjeta od lipnja do srpnja. Stabljika je uspravna i obrasla duguljastim listovima, a na vrhu ima nekoliko glavičastih žutih cvjetova (Slika 5.) od kojih se razlikuju ženski končasti cvjetovi, dok su muški neugledni i cjevasti. Kada se cvjetovi počnu otvarati, cvjetne glavice upotrebljavaju se kao lijek. Plod je ahenija (suhog izgleda, karakterističan za porodicu *Asteraceae*) hrapava ili glatka, dužine do jednog milimetra. Žućkastu boju i eterično ulje daju flavonski heterozidi. Osim njih, biljka sadrži i tanine, gorku materiju i smolu (3).



Slika 5. Cvijet i lišće smilja (16)

Destilacijom biljke dobivamo eterično ulje koje se koristi u aromaterapiji i kao mirisna komponenta u kozmetičkim proizvodima. Njegovo djelovanje je fungicidno, kolagogno,

antialergijsko, spazmolitično, antiseptično, antikoagulantno, mukolitično, ekspektorirajuće, diuretično, adstringentno, protuupalno i neurotonizirajuće. Primjenjuje se kod reumatoidnog artritisa, za olakšavanje tegoba proširenih vena, u tretmanu napetih i bolnih mišića i kod grčeva. Također, primjena je česta i kod raznih vrsta kašlja, bakterijskih infekcija, gripe, prehlade, stresa te u programima za detoksifikaciju kod bronhitisa, astme i sinustitisa. Upotreba nije preporučljiva trudnicama, premda je primjena sigurna i ulje ne nadražuje kožu (3).

1.2.7. Tuja (*Thuja occidentalis*, porodica *Cupressaceae*, čempresovke)

Tuja je zimzeleno crnogorično stablo čije su grane lepezastog oblika, a lišće je ljuskavo i tamnozeleno boje. Kora je crveno-smeđa, izbrazdana s uzdužnim trakama. Češeri su žuto-zeleni i vitki (Slika 6.), a kad sazriju poprimaju smeđu boju (7).



Slika 6. Češeri tuje (17)

Eterično ulje u biljci koristi se za čišćenje, kao osvježivač zraka, kod dezinfekcijsnih sredstava, insekticida, masti i mekih sapuna. Zbog neurotoksičnog spoja, interna upotreba može biti štetna ako se koristi dulje vrijeme ili tijekom trudnoće (7).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ispitati kako odabrana eterična ulja (smilje proljeće i jesen (*Helicrysum italicum*), kadulja (*Salvia officinalis*), borovica (*Juniperus communis*), tuja (*Thuja occidentalis*) i lavandin (*Lavandula hybrid*)), koja rastu na području primorske Hrvatske, djeluju na bakteriju *A. baumannii*, odnosno njena dva referentna soja: ATCC BAA-1605 i ATCC 19606.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

- Petrijeve zdjelice
- Inkubator (BTE-S, Bodalec i Havočić, Dugo selo – Zagreb)
- Spektrofotometar (Biofotometar, "Eppendorf", Njemačka)
- Tresilica (Tecno Kartell)
- Mikrotitar pločice
- Automatske pipete: 0,5-10 μL (Eppendorf, Njemačka), 2-20 μL , 20-100 μL , 20-200 μL

i 10-1000 μL "Gilson Pipetman" (Gilson, USA)

- Plamenik (Poligas OMM)
- Sterilni brisni štapići
- Parafilm "M"
- Nastavci za automatske pipete (ep T.I.P.S.)
- Epruvete
- Mikrobiološke ušice ("eze")

Odabrana eterična 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.

Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja pripremljena je štok otopina eteričnih ulja u DMSO (dimetil sulfoksid) otopini čija je koncentracija bila 200 mg/mL.

Bakterijski soj

U istraživanju su korištena dva referentasoja (Tablica 2.): *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 i *A. baumannii* ATCC BAA-1605 koji je multiplerezistentan soj. Izolati ovih bakterija najčešće su prisutni unutar bolničke sredine gdje predstavljaju veliku prijetnju, stoga je za potrebe ovog rada korišten klinički izolat. Bakterije su bile skladištene na -80°C , a za potrebe korištenja nasađivale su se na Mueller Hinton i krvni agar, nakon čega su se inkubirale 24 sata na 37°C .

Tablica 2. Sojevi koji su korišteni u istraživanju

| Naziv soja | Rezistencija na antibiotika | Osjetljivost na antibiotika |
|---------------|--|--|
| ATCC BAA-1605 | Ceftazidim, , Piperacilin, Aztreonam, Gentamicin , Meropenem, Ticarcilin, Cefepim, Ciprofloksacin, Imipenem | Tobramycin, Amikacin |
| ATCC 19606 | Gentamicin | Amikacin, Tobramycin, Imipenem, Tigecyclin Meropenem, Ciprofloksacin, Mimocyclin, Gatifloksacin, Levofloksacin |

Hranjive podloge i mediji

Hranjive podloge i bujoni su korišteni za uzgoj mikroorganizama prema propisanoj recepturi. Proizvođači od kojih su dobavljene kemikalije: Biolife (Italija), Difco (SAD), Kemika (Hrvatska) i Oxoid (Engleska).

Mueller Hinton agar

Sastav podloge: 2,0 g goveđeg ekstrakta, 17,5 g kiselog hidrolizat kazeina, 1,5 g škroba, 17,0 agara po litri pročišćene vode

Krvni agar

Sastav podloge: 10,0 g/L goveđeg ekstrakta, 10,0 g/L triptoze, 5,0 g/L natrijevog klorida, 15 g/L agar po litri destilirane vode

Sterilizacija hranjivih podloga se provodi autoklaviranjem 15 minuta na 121°C. Kada se podloga ohladi na približno 50°C, aseptički se dodaje 5% sterilna defibrinirana ovčija krv, a pH podloge iznosi 7,4±0,2.

Priprema bakterijskog inokluma

Broj bakterija u inokulumu određen je spektrometrijski te se računski namještala optička gustoća (OD) na vrijednost 1 što označava 10⁹ CFU/ml (engl. colony – forming units).

3.2. Metode ispitivanja antibakterijskog djelovanja

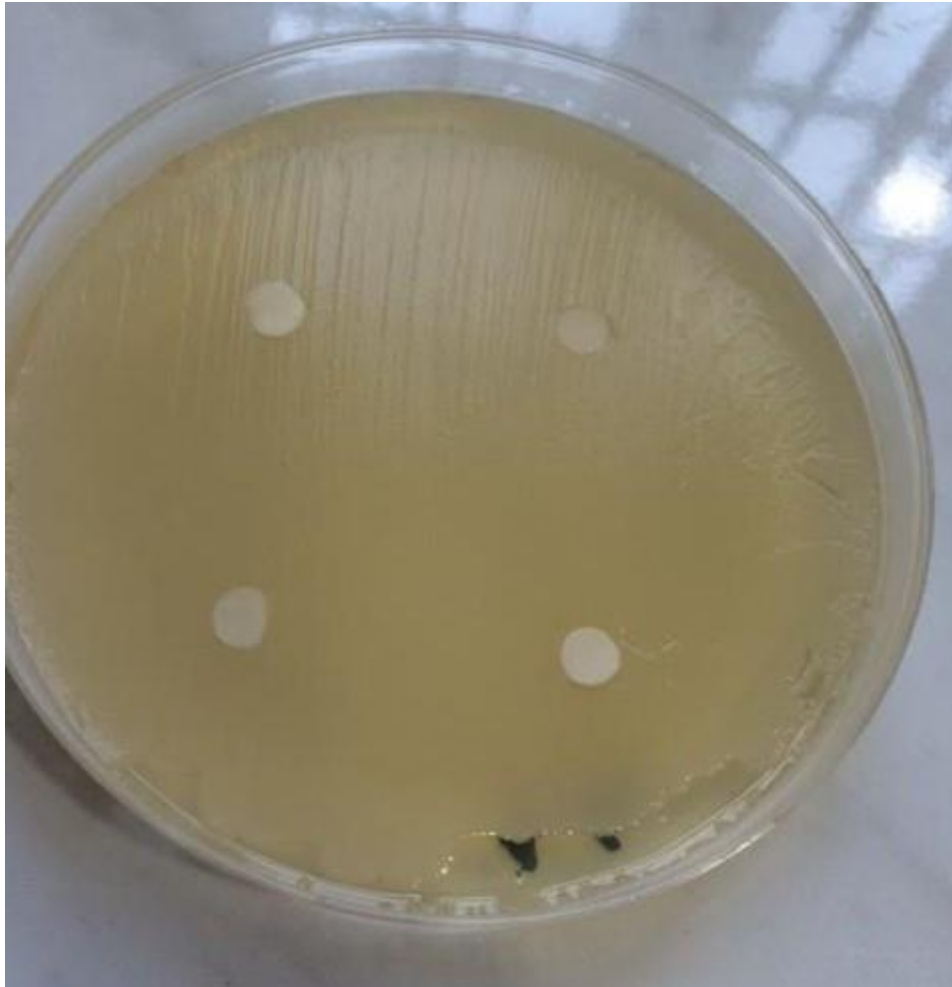
U ovom radu korištene su četiri metode: dvije metode difuzije - disk difuzija i metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru, dilucijska metoda i metoda ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja.

3.2.1. Metoda difuzije

Najčešće primjenjena i jednostavna metoda koja se koristi za određivanje antimikrobnog učinka eteričnih ulja je metoda difuzije. U ovom radu korištene su dvije metode difuzije: metoda diska i metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru.

3.2.1.1. Metoda diska

Na Mueller Hinton ploče s dodatkom detergenta, brisnim štapićem se nanosi suspenzija ispitivane bakterije. Zatim se na ploče u pravilim razmacima rasporede diskovi na koje se nakapa 5 μ L pripremljenog eteričnog ulja. Inkubacija se provodi 24 sata na 37°C nakon čega se očitavaju rezultati odnosno zona inhibicije bakterija oko diska (Slika 7.).

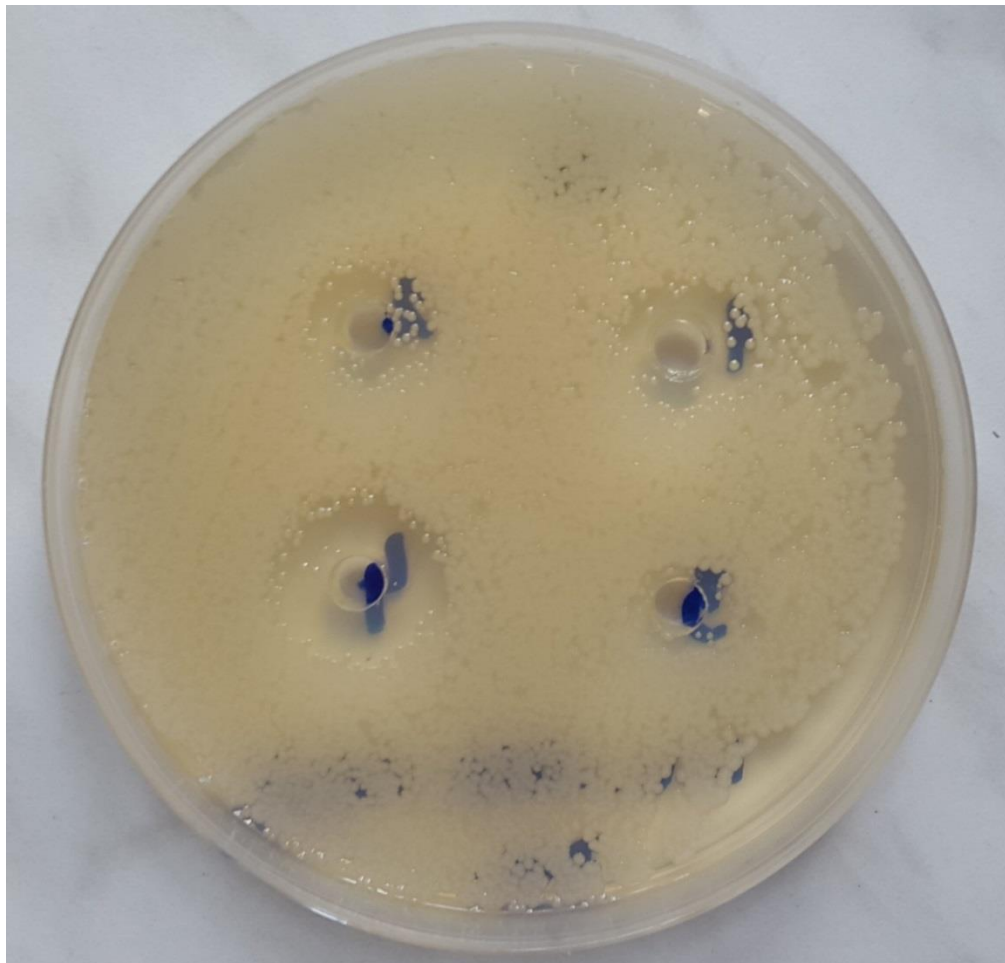


Slika 7. Metoda disk difuzije na *A. baumannii*

3.2.1.2. Metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru

Na Mueller Hinton agar kojem je dodan detergent Tween 80 zbog pojačavanja difuzije ulja, brisnim sterilnim štapićem nanosi se suspenzija bakterija. Nakon inkubacije od 15 minuta kako

bi bakterije upile u podlogu, pomoću sterilnog bušača rupa izbušene su rupe promjera 5 mm u koje je dodano 40 μ L pripremljenog eteričnog ulja. Za svaki testni mikroorganizam provodi se inkubacija 24 sata na 37°C nakon čega se mjeri promjer oko izbušene rupe (Slika 8.), odnosno zona inhibicije koja označava djelovanje eteričnog ulja izraženo u mm.



Slika 8. Metoda difuzije uz bušenje rupa u agaru

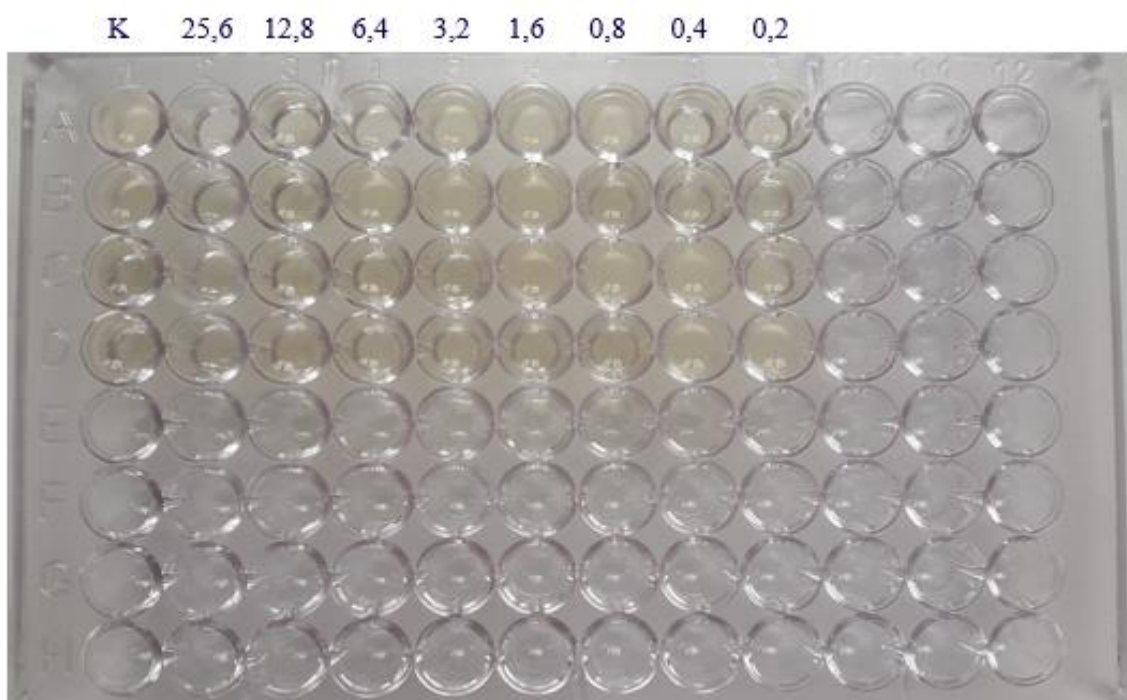
3.2.2. Dilucijska metoda

Metoda za utvrđivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) je tehnika koja zahtjeva homogenu disperziju u vodi, odnosno metoda kojom se razrjeđuje u tekućem mediju ili agaru (8).

Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) definirana je kao najniža koncentracija koja će spriječiti vidljivi rast mikroorganizma nakon inkubacije.

Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) je najniža koncentracija koja će uništiti mikroorganizme nakon nasađivanja na podlogu (9).

Metoda se temelji na izlaganju točno definiranog broja bakterija na različite koncentracije antibiotika ili ispitivane prirodne tvari. Nakon provedene inkubacije očitava se MIK vrijednost kao izostanak zamućenja u rupi s najmanjom koncentracijom antibiotika ili ispitivane tvari (Slika 9.). Nasađivanjen na krvni agar, uzoraka u kojima je izostalo zamućenje i ponovnom inkubacijom, dobiva se MBK vrijednost.



Slika 9. Određivanje MIK i MBK vrijednosti

3.2.2.1. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK)

Metodom razrjeđenja iz štok otopine eteričnog ulja (200 mg/mL) radilo se razrjeđenje od 25,6 mg/mL do 0,025 mg/mL.

U svaku rupu osim one koja je označena kao kontrola otpipetirano je 100 μ L bujona s opadajućim koncentracijama eteričnog ulja i 100 μ L bakterijske suspenzije. Kontrola sadrži 100 μ L bujona i 100 μ L bakterijske suspenzije. Mikrotitar pločicu se stavlja na inkubaciju 37°C/24 sata.

Dobiveni rezultati očitavaju se vizualno tj, golim okom. Usporedbom prisutstva/odsutstva zamućenja ili taloga s kontrolnom rupom koja sadrži samo bakterijsku suspenziju, konstatira se da li je došlo do porasta bakterija. MIK vrijednost predstavlja rupa u kojoj je najveće razrjeđenje eteričnog ulja, a ne pokazuje vizualno zamućenje ili talog.

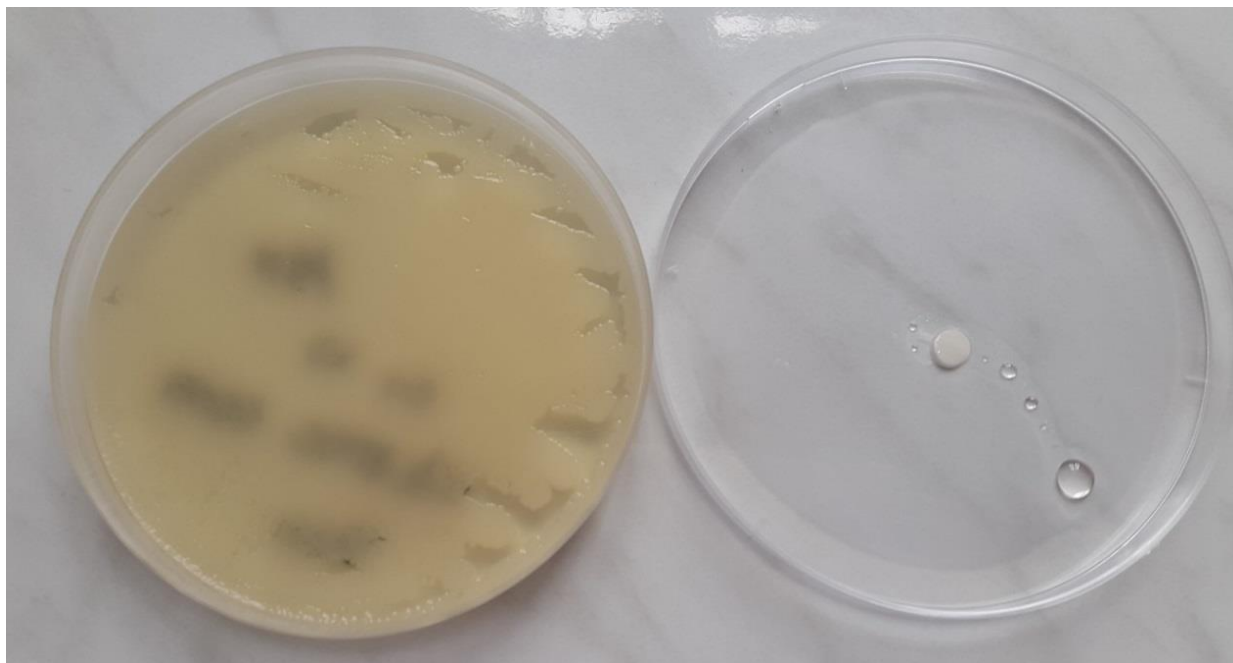
3.2.2.2. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)

Nakon provedene inkubacije i vizualnog očitavanja rezultata, uzorke iz rupa u kojima nije bilo zamućenja nasađujemo na krvni agar i inkubiramo na 37°C/24-48 sati. MBK vrijednost označava izostanak porasta bakterija na krvnom agaru iz uzorka s najmanjom koncentracijom eteričnog ulja.

3.2.3. Metoda ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja

U ovom je ispitivanju također korištena Mueller Hinton podloga s dodatkom detergenta. Brisnim sterilnim štapićem nanosi se suspenzija ispitivanih bakterija. Na poklopac petrijeve zdjelice stavi se sterilni disk na kojeg se pipetom nanosi 5 μ L određenog eteričnog ulja. Na

petrijeve zdjelice stavlja se parafilm te potom idu na inkubaciju 24 sata na 37°C, nakon čega se mjeri zona inhibicije ispod diska (Slika 10.).



Slika 10. Metoda ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja

4. REZULTATI

Pomoću četiri različite metode ispitano je antimikrobno djelovanje eteričnih ulja na dva soja acinetobaktera. Korištene su dvije varijante difuzijske metode, dilucijska metoda te ispitivanje antibakterijskog učinka hlapljivih komponenti ulja na agaru.

4.1. Rezultati disk metode

Postavljanjem diskova na ploču gdje je bila nanešena suspenzija bakterija nije došlo do inhibicije rasta acinetobaktera. Zbog neučinovitosti ove metode, dalje se provodila difuzijska metoda uz bušenje rupa u agaru.

4.2. Rezultati difuzijske metode uz bušenje rupa u agaru

Ovom metodom ispitali smo zonu inhibicije odabranih eteričnih ulja. U Tablici 3. prikazani su rezultati odabranih eterična ulja na *A. baumannii* ATCC 19606 i ATCC BAA-1605.

Tablica 3. Promjeri inhibicijske zone eteričnih ulja na *A. baumannii* ATCC 19606 i ATCC BAA-1605

| | <i>A. baumannii</i> ATCC BAA-1605 | <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| ETERIČNA ULJA | <i>Zona inhibicije/mm</i> | |
| Smilje jesen | 12 | 14 |
| Smilje proljeće | 13 | 13 |
| Tuja | 10 | 10 |
| Borovica | 18 | 19 |
| Kadulja | 1 | 15 |
| Lavandin | 1 | 27 |

Iz rezultata se vidi da su eterična ulja imala bolji antibakterijski učinak na *A. baumannii* ATCC 19606, dok su na multirezistentni ATCC BAA-1605 slabije djelovala.

Najbolje rezultate dalo je ulje lavandina, ali samo za *A. baumannii* ATCC 19606 gdje je promjer inhibicijske zone iznosio 27 mm, dok za drugi soj je iznosilo 1 mm. Najlošije se pokazala tuja gdje su zone kod oba soja iznosile 10 mm.

4.3. Rezultati dilucijske metode

Određivanjem MIK i MBK vrijednosti ispitali smo koliki je antimikrobni učinak pojedinog eteričnog ulja na *A. baumannii*. U Tablici 4. prikazane su dobivene vrijednosti za sva testirana ulja na sojeve ATCC BAA-1605 i ATCC 19606.

Tablica 4. MIK i MBK vrijednosti testiranih eteričnih ulja na bakteriju *A. baumannii* ATCC BAA-1605 i ATCC 19606

| ETERIČNA ULJA | BAKTERIJE | | | |
|--|-----------------------------------|------|--------------------------------|------|
| | <i>A. baumannii</i> ATCC BAA-1605 | | <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 | |
| | MIK | MBK | MIK | MBK |
| | mg/mL | | mg/mL | |
| Lavandin (<i>Lavandula hybrid</i>) | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |
| Borovica (<i>Juniperus communis</i>) | 3,2 | 3,2 | 6,4 | 6,4 |
| Kadulja (<i>Salvia officinalis</i>) | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 |
| Smilje – proljeće (<i>Helicrysum italicum</i>) | 3,2 | 6,4 | 3,2 | 6,4 |
| Smilje – jesen (<i>Helicrysum italicum</i>) | 3,2 | 6,4 | 3,2 | 6,4 |
| Tuja (<i>Thuja occidentalis</i>) | 12,8 | 12,8 | 12,8 | 12,8 |

Iz rezultata se vidi da sva eterična ulja pokazuju dobar antimikrobni učinak prema oba testirana soja acinetobaktera. Kod oba soja najučinkovitijim se pokazalo eterično ulje lavandina, *Lavandula hybrid*, gdje je MIK vrijednost 1,6 mg/mL, kao i MBK.

Eterično ulje tuje, *Thuja occidentalis*, pokazalo je najlošiji učinak. MIK i MBK vrijednosti iznosile su 12,8 mg/mL.

4.4. Rezultati metode ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja

Ovom metodom istražili smo ima li hlapljivost komponenti eteričnih ulja inhibicijski učinak na ispitivane sojeve acinetobaktera. Nakon inkubacije koja je trajala 24 sata na ploči je bio vidljiv porast bakterija što nam ukazuje da hlapljive komponente ispitivanih eteričnih ulja ne djeluju inhibicijski.

5. RASPRAVA

Eterična ulja smjesa su hlapljivih i biološki aktivnih spojeva koji se dobivaju iz biljnog materijala (korijena, lista, stabljike, cvijeta i ploda), procesom destilacije, ekstrakcijom ili tještenjem (2). Sastav najvećim dijelom čine terpeni, hlapljivi nezasićeni ugljikovodici koji su ugodnog mirisa. Ovisno o procesu dobivanja, mogu biti žućkaste boje ili bezbojni (3).

Zbog svoje hidrofoničnosti eterična ulja akumuliraju između lipida stanične membrane i imaju dobar antimikrobni učinak, posebno na Gram-pozitivne bakterije.

Acinetobakter je značajan uzročnik infekcija u bolničkom okruženju, a kao najrezistentnija vrsta prisutan je *A. baumannii*. Upravo tu vrstu Gram-negativnih, nepokretnih kokobacila potrebno je razlikovati zbog prevencije i kontrole kako bi se suzbila infekcija. Oportunistički su patogeni i najčešće problem stvaraju u strojnoj ventilaciji i intravaskularnim kateterima te su česta pojava kod osoba s oslabljenim imunitetom. U ovom su istraživanju korištena dva soja acinetobaktera čije su karakteristike definirane.

Multiplerezistentni soj *A.baumannii* ATCC BAA-1605 izoliran je iz sputuma vojnika koji se vratilo iz Afganistana, u kanadskoj bolnici, 30. lipanja, 2006. godine (10). Otporan je na ceftazidim, gentamicin, tikarcilin, piperacilin, aztreonam, cefepim, ciprofloksacin, imipenem i meropenem, a osjetljiv je na amikacin i tobramicin (11).

Referentni soj *A. baumannii* ATCC 19606 je osjetljiv na većinu antibiotika te proizvodi i izlučuje bakterijski siderofor koji ima važnu ulogu u patogenezi (12).

Antimikrobni učinak eteričnih ulja predstavlja alternativni pristup borbe protiv bakterija i njihovog razmnožavanja.

Cilj ovog rada bio je ispitati kako određena eterična ulja primorske Hrvatske utječu na razmnožavanje i rast dva soja iz roda *Acinetobacter*, referentni *Acinetobacter baumannii*

ATCC 19606 i multiplorezistentni ATCC BAA-1605. U radu je korišteno pet eteričnih ulja: smilje proljeće i jesen (*Helicrysum italicum*), kadulja (*Salvia officinalis*), borovica (*Juniperus communis*), tuja (*Thuja occidentalis*) i lavandin (*Lavandula hybrid*).

Kako bi ispitali antimikrobni učinak pojedinog eteričnog ulja koristili smo 4 metode: dvije metode difuzije – disk metodu i metodu difuzije uz bušenje rupa u agaru, dilucijsku metodu i metodu ispitivanja hlapljivih komponenti eteričnih ulja.

Metoda disk difuzije nije pokazala inhibicijski učinak eteričnih ulja. Smatramo da je razlog tome slaba difuzija ispitivanog biljnog ulja u podlogu bez obzira na dodatak detergenta te mala količina nanosena na disk. Zbog neučinovitosti ove metode primjenili smo metodu difuzije uz bušenje rupa u agaru gdje smo u izbušene rupe dodali veću količinu ispitivanih eteričnih ulja te inkubirali 2 sata na 4°C kako bi se olakšala ravnomjerna difuzija u agar. Zadnja metoda u kojoj smo ispitivani hlapljivost komponenti eteričnih ulja pokazala je da hlapljive komponente ispitivanih eteričnih ulja nemaju inhibicijski učinak na acinetobakter.

Metodom difuzije uz bušenje rupa u agaru sva eterična ulja pokazala su bolji učinak na referentni soj *A. baumannii* 19606, dok su na multiplorezistentni slabije djelovala. Najbolje se pokazalo ulje lavandina, ali samo za *A. baumannii* ATCC 19606 gdje je promjer inhibicijske zone iznosio 27 mm, dok za drugi soj je iznosilo 1 mm. Drugo najbolje djelovanje kod ove metode je pokazalo eterično ulje borovice pri čemu je zona inhibicije kod ATCC 19606 bila 19 mm, a kod BAA-1605 18 mm. Iza njih slijedi kadulja, smilje jesen i proljeće, a najlošijim se pokazala tuja gdje su zone kod oba soja iznosile 10 mm.

Određivanjem MIK i MBK vrijednosti ispitali smo koliki je antimikrobni učinak pojedinog eteričnog ulja na *A. baumannii*. U rezultatima koji su dobiveni vidljivo je da sva eterična ulja imaju dobar antimikrobni učinak. Posebno se ponovo istaknulo eterično ulje lavandina, *Lavandula hybrid* i to kod oba soja gdje je MIK vrijednost iznosila 1,6 mg/mL, kao i MBK.

Najlošije djelovanje dobiveno je također s eteričnim uljem tuje, gdje je MIK i MBK vrijednost bila 12,8 mg/mL. Eterično ulje borovice isto je dalo dobre rezultate na multiplerezistantni *A. baumannii* ATCC BAA-1605. Dobivena MIK vrijednosti bila je 3,2 mg/ mL, kao i MBK, dok su rezultati lošiji za *A.baumannii* ATCC 19606 gdje je MIK i MBK vrijednost 6,4mg/mL. Vrijednosti MIK i MBK za eterično ulje smilje i jesen i proljeće pokazala su se ista za oba soja. MIK vrijednosti iznosila je 3,2 mg/mL, a MBK 6,4. Kadulja je dala iste vrijednosti kod oba soja, MIK i MBK vrijednost bila je 6,4 mg/mL.

Dokazano je da eterično ulje kore cimeta pokazuje snažnu antibakterijsku aktivnost protiv kliničkih i ekoloških sojeva *A. baumannii* s MIK vrijednostima u rasponu od 0,5 do 2,5 μ L/ mL (ref). U istom su istraživanju pokazali da MIK vrijednosti za eterično ulje geranija iznosi između 7,5 i 9,5 μ L/ mL, a za etrično ulje lavande između 10,5 i 13,0 μ L/mL (18).

Nadalje, Prakasam i suradnici su utvrdili da eterična ulja klinčića, paprene metvice i eukaliptusa imaju antibakterijsko djelovanje protiv kliničkih izolata *A. baumannii* dobivene iz različitih kliničkih uzoraka kao što su: krv, endotrahealni aspirat, gnoj, urin i pljuvačka (19).

Usporedba podataka koji su dobiveni u ovom radu je kompleksna iz razloga što su korištene različite metode ispitivanja, a uzorci eteričnih ulja su pripremani odnosno otapani u različitim otapalima. Dodatni problem je da ista eterična ulja, porijeklom od biljaka iz različitog geografskog područja, mogu imati različiti kemijski sastav te stoga i različita antimikrobna svojstva.

Iz svega navedenog može se zaključiti da testirana eterična ulja, a posebno eterično ulje lavandina, pokazuju dobar antibakterijski učinak na bakteriju *A. baumannii*.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati pokazuju kako je bakterija *A. baumannii* osjetljiva na sva testirana eterična ulja. Najbolji antimikrobni učinak na referentni i multiplerezistentni soj pokazalo je eterično ulje lavandina, *Lavandula hybrid*, s minimalnom inhibicijskom koncentracijom 1,6 mg/mL kao i minimalnom baktericidnom koncentracijom. Metodom difuzije također je zabilježen izražen učinak lavandina, ali samo na referentni *A. baumannii* 19606, 27 mm, dok je eterično ulje borovice djelovalo na oba soja 18-19 mm.

Zbog dobrih rezultata koji su pokazali antimikrobni učinka na rast acinetobaktera možemo zaključiti kako odabrana eterična ulja imaju velik potencijal primjene u suzbijanju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom.

7. LITERATURA

1. Kalenić, S., i suradnici. (2013). Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 222 – 226.
2. <http://www.terra-organica.hr/aromaterapija/etericna-ulja-apsoluti.html> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
3. http://www.ras.hr/Media/Ljekovito_bilje.pdf
4. <http://www.naturala.hr/carolija-dobivanja-etericnih-ulja/1176> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
5. <http://anias-de-moras.com/2011/03/27/dobivanje-etericnih-ulja> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
6. Coppola, R., De Feo, M., Fratisni, F., De Martino, L., Nazzaro, F. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451-1474
7. https://en.wikipedia.org/wiki/Thuja_occidentalis (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
8. <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1143-1156.pdf> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
9. <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Chapter-2-Determination-of-MICs-2006updated.pdf> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
10. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/BAA-1605.aspx?geo_country=hr (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
11. <https://www.atcc.org/~ps/BAA-1605.ashx> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
12. Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P.L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., Actis, L. A. (2004). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*, 150, 3657-3667.

13. Slika 2. <http://www.newseasons.co.uk/shop/essential-oils/lavandin/#.Ve166JdtJ7V>
(Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
14. Slika 3. <http://www.prirodni-lijek.com/2013/11/borovica-zimski-lijek.html> (Pristupljeno:
Kolovoz, 2015.)
15. Slika 4. http://www.bvo.zadweb.biz.hr/pages/biljke/biljke%20-%20livadna%20kadulja_pla.htm (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
16. Slika 5. <http://fitoaromaterapija.hr/smilje> (Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
17. Slika 6.
http://www.plantsystematics.org/imgs/robbin/r/Cupressaceae_Thuja_occidentalis_23951.html
(Pristupljeno: Kolovoz, 2015.)
18. Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Wiktorowska-Owczarek, A., Józwiak-Bębenista, M., & Łysakowska, M. (2014). The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*, 19, 20929-20940.
19. Prakasam, G., Bhashini, M., LakshmiPriya, & N., Ramesh, S.S. (2014). *In-vitro* antibacterial activity of some essential oils against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32, 90–91.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

| | |
|--------------------------------|--|
| Ime i prezime | Nensi Živković |
| Adresa | Kurirski put 2a, 51 000 Rijeka |
| Elektronička pošta, Web adresa | nensi.zivkovic16@gmail.com |
| Datum i mjesto rođenja | 16.04.1993., Rijeka |
| Državljanstvo | Hrvatsko |

ŠKOLOVANJE

DODATNI PODACI

| | |
|----------|---------------------------|
| Datum | Rujan 2011. – Rujan 2015. |
| Mjesto | Rijeka |
| Ustanova | Medicinski fakultet |

Sudjelovanje o organizaciji međunarodnih skupova:

- "Peta nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – više od proizvodnje", Opatija, 10. travnja 2015.
- "CroViwo – Croatian Virus Workshop", Rijeka, 14.11.2014.

Ostali poslovi:

- 2014. - danas: Wings tim koordinator za Hrvatsku, Red Bull Adria d.o.o., 10 000 Zagreb