

# UTJECAJ ETERIČNIH ULJA LIMUNSKOG EUKALIPTUSA I ČAJEVCA I NJIHOVIH KOMBINACIJA NA BIOFILM BAKTERIJE LEGIONELLA PNEUMOPHILA

---

**Bićanić, Lucia**

**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:184:463295>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**  
**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Lucia Bićanić**

**UTJECAJ ETERIČNIH ULJA LIMUNSKOG EUKALIPTUSA I ČAJEVCA I  
NJIHOVIH KOMBINACIJA NA BIOFILM BAKTERIJE *LEGIONELLA***

***PNEUMOPHILA***

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2018**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**  
**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Lucia Bićanić**

**UTJECAJ ETERIČNIH ULJA LIMUNSKOG EUKALIPTUSA I ČAJEVCA I  
NJIHOVIH KOMBINACIJA NA BIOFILM BAKTERIJE *LEGIONELLA***

***PNEUMOPHILA***

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2018**

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

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 45 stranica, 9 slika, 7 tablica i 39 literaturnih navoda.

## **ZAHVALE:**

*U prvom redu se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. san. Ing. Koja je svojim mentorstvom pokazala veliku dozu razumjevanja na moje brojne upite te što mi je odvojila svoje vrijeme u pripremi i izradi moga diplomskog rada, te što mi je omogućila svu potrebnu opremu za realiziranje istoga. Zahvaljujem se i Gabrijeli Begić, mag. med. lab. diagn. na pomoći tokom rada u laboratoriju i na savjetima. Veliko hvala i firmi Dea flores d.o.o koja mi je ustupila eterična ulja za izvedbu diplomskog rada. Na samom kraju se zahvaljujem svojoj obitelji na ohrabrenju i svojim kolegama na pomoći tokom obrazovanja.*

## SAŽETAK

Kontrola bakterije legionela u vodoopskrbnim sustavima predstavlja sve veći prioritet za zdravstvo. Tretiranje vode zagađene legionelom je bitno, a obično se koriste brojni pristupi koji nekada nisu učinkoviti protiv samih biofilmova. Legionela je rasprostranjena, patogena bakterija koja svojom virulencijom može uzrokovati niz zaraza od kojih neke mogu biti veoma opasne. Uglavnom se prenosi vodom, točnije aerosolom koji je kontaminiran bakterijama. Najkritičnija polazišta zaraze stoga predstavljaju distribucijski vodovodni sustavi. Eterična ulja su prirodni spojevi dobiveni iz dijelova biljaka koji nalaze sve češću primjenu u svakodnevnom životu ljudi. Osim što svojim mirisom aromatiziraju prostor, istovremeno djeluju antivirusno i antibakterijski.

Kako su saznanja o uporabi eteričnih ulja kao prirodnih dezinficijensa oskudna, cilj ovog rada je odrediti antibakterijski učinak kombinacije eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na biofilmove koje stvara ova bakterija.

U svrhu ovog istraživanja koristila se *L. pneumophila* (soj 130b) koja je uzgajana na BCYE podlozi. Ispitivanje se temeljilo na tri odvojena eksperimenta kako bi se ispitala sinergija ulja, inhibicijsko djelovanje ulja na adheziju na polistiren odnosno na prvi korak stvaranja biofilma i na inhibiciju samog stvaranja biofilma. Testirana eterična ulja čajevca i limunskog eukaliptusa su dobivena iz firme Dea Flores d.o.o.

Dobiveni rezultati pokazuju različito, ali učinkovito djelovanje kombinacija eteričnih ulja. Zaključno, možemo reći da antibakterijska svojstva ulja uvelike ovise o sinergističkom djelovanju eteričnih ulja jednog s drugim kao i o samim kemijskim sastavnicama koja čine ta eterična ulja. Na ulja koje smo mi ispitali legionela je pokazala osjetljivost, stoga spajanjem ugodnog egzotičnog mirisa s korisnim antibakterijskim djelovanjem, eterična ulja pokazuju dobar alternativan način zaštite i prevencije.

**Ključne riječi:** *Legionella pneumophila*, biofilm, vodovodni sustavi, eterična ulja, sinergija

## ABSTRACT

Control of bacteria *Legionella* in water supply systems is an increasing priority for healthcare all around the world. *Legionella* is a widespread, pathogenic bacteria that can cause a variety of infections with its virulence, some of them can be very dangerous. *Legionella* is mainly transmitted by water, specifically by aerosol contaminated by bacteria. The most critical starting points for this bacteria are the distribution water supply systems. Essential oils are natural compounds obtained from parts of plants and are increasingly used in everyday life. Apart from the fact that their fragrance aromatizes the space, they simultaneously act antivirally and antibacterial. As the knowledge about the use of essential oils as natural disinfectants is scarce, the aim of this study is to determine the antibacterial effect of a combination of essential oils of tea and lemon eucalyptus on the biofilm created by this bacterium. For the purpose of this study, *L. pneumophila* (strain 130b) was grown on BCYE substrate. The study was based on three separate experiments to investigate the effect of essential oils on the destruction of the created biofilm, the inhibition of adhesion to the polystyrene, the first step in the formation of biofilm and on the inhibition of biofilm formation. Tested essential oils of tea and lemon eucalyptus were obtained from Dea Flores d.o.o. The results obtained show a different but effective effect of a combination of essential oils. In conclusion, we can say that the antibacterial properties of oil depend largely on the synergistic effect of essential oils with each other as well as on the chemical components that make these essential oils. The oils we tested on *L. pneumophila* showed sensitivity, therefore by combining a pleasant exotic fragrance with useful antibacterial activity, essential oils show a good alternative way of protection and prevention.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, biofilm, water supply systems, essential oils, synergy

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. <i>Legionella pneumophila</i> .....	3
2.1.1. Karakteristike bakterije i strukturna građa .....	3
2.1.2. Ekologija i epidemiologija legionele.....	4
2.1.3. Bakterijska adhezija .....	5
2.1.4. <i>Legionella pneumophila</i> i biofilm .....	6
2.1.5. Patogeneza legioneloze .....	8
2.1.6. Klinička slika legioneloze .....	8
2.1.7. Dijagnostika .....	9
2.1.8. Liječenje legioneloza.....	9
2.1.9. Kontrola legionloza .....	10
2.2. Eterično ulje.....	11
2.2.1. Dobivanje eteričnih ulja .....	12
2.2.2. Primjena .....	12
2.3. Eterično ulje čajevca.....	13
2.4. Eterično ulje limunskog eukaliptusa.....	13
2.5. Eterično ulje kao prirodni lijek.....	14
2.6. Određivanje interakcije između različitih antibakterijskih tvari .....	16
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	17



4. MATERIJALI I METODE .....	18
4.1. Materijali .....	18
4.1.1. Hranjiva podloga .....	18
4.1.2. Bakterijski soj.....	19
4.1.3. Eterična ulja.....	19
4.1.4. Karakteritacija ulja .....	19
4.1.5. Voda iz slavine .....	19
4.2. Metode .....	20
4.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma .....	20
4.2.2. Priprema štok otopine eteričnih ulja.....	20
4.2.3. Određivanje MEK za eterična ulja .....	20
4.2.4. Metoda određivanja interakcije između eteričnog ulja limunskog eukaliptusa i čajevca.....	20
4.2.5. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na inhibiciju adhezije na polistiren	22
4.2.6. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na inhibiciju stvaranja biofilma .....	22
4.2.7. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na razaranje biofilma .....	23
5. REZULTATI.....	24
5.1. MEK koncentracija pojedinačnih eteričnih ulja .....	24
5.2. Određivanje interakcije između eteričnog ulja limunskog eukaliptusa i čajevca metodom šahovnice .....	24
5.3. Rezultati inhibicije adhezije na polistiren .....	27

5.4. Učinak kombinacije eteričnih ulja na inhibiciju legionele nakon trodnevne inkubacije .....	28
5.5 Učinak kombinacije eteričnih ulja na inhibiciju stvaranja biofilma.....	30
5.5. Učinak eteričnih ulja na razaranje biofilma.....	31
1. RASPRAVA .....	34
2. ZAKLJUČAK .....	38
3. LITERATURA .....	39
4. ŽIVOTOPIS.....	43

## 1. UVOD

Legioneloze je skupni naziv za infekcije uzrokovane *Legionella* vrstama, prvenstveno *L. pneumophila*. Zapravo možemo reći da je odgovorna za 90% infekcija prouzrokovanih bakterijama iz ovoga roda. Razlikujemo dva oblika infekcije koje se mogu javiti kod izloženih ljudi, a to su legionarska bolest koja se obično manifestira kao upala pluća te predstavlja teško oboljenje sa zabilježenim smrtnim ishodom. Blaži oblik, Pontijačka groznica, uključuje simptome visoke temperature, zimice, kašlja, bolova u mišićima i glavobolje stoga se ona vrlo često uspoređuje sa prehladom. (1)

Ekološka rasprostranjenost vrste *Legionella* relevantna je za samu prevenciju legioneloze. Legionelu nalazimo u prirodnim vodenim tijelima, uključujući rijeke, jezera i toplinski zagađene vode. (1) Ono što je karakteristično za legionelu je njezina otpornost na procese obrade vode, odnosno njezina tolerancija na klorinaciju vode. Jedan od načina na koji bakterija postiže otpornost je da stvara jednostanične ili pak višestanične biofilmove na slijepim završecima vodovodnih cijevi u vodoopskrbnim mrežama. Nedavna izvješća sugeriraju da rast legionele u biofilmovima može dovesti do pojačane virulencije. (2) Polimerna matrica ne samo da pomaže u hvatanju i koncentraciji hranjivih tvari u okolišu, nego također djeluje kao zaštitna prepreka protiv ekoloških izazova ili antimikrobnih čimbenika. Bakterije i ostali mikrobi u biofilmu razvijaju zaštitu od različitih vanjskih utjecaja, a također razvijaju rezistenciju na djelovanje antibiotika i antiseptika koji se uobičajeno koriste. Različiti su mehanizmi kojima se u biofilmovima ostvaruje ova otpornost, a neki od najčešćih su hibernacija, međusobna zaštita i blokiranje ulaska štetnih tvari. Takva osobina, stvaranja biofilma, bakteriji omogućuje preživljavanje u umjetno stvorenim distribucijskim sustavima te ju ujedno čini i velikom prijetnjom za ljudsko zdravlje. (3) Infekcije vezane za legionelu najčešće se pojavljuju u obliku epidemija i to na mjestima gdje

velik broj ljudi koristi vodu iz istog sustava kao što su na primjer hoteli, spa-centri i ostali veliki turistički kompleksi. (4)

Brojne metode dezinfekcije usmjerene protiv legionele opisane su u literaturama. (5) Nažalost, ti tretmani općenito ne dovode do potpunog iskorjenjivanja bakterije, a rekolonizacija se javlja čim se tretmani prekinu. (5) Otpornost legionele na dezinfekciju posljedica je njezine sposobnosti da stvara biofilm gdje su bakterije zaštićene od biocida i vanjskih čimbenika. Uobičajeno se upotrebljavaju kemijski dezinficijensi ili biocidi kako bi se spriječila kontaminacija mikroorganizama i rast potencijalnih patogenih mikroorganizama u ljudskim vodenim mjestima (6). Međutim, oni su učinkoviti samo u visokim koncentracijama, koje su štetne za ljude. Korištenje prirodnih alternativa naspram kemikalija može smanjiti rizik od toksičnosti. Agensi različitih eterična ulja za razliku od kemijskih dezinficijensa, općenito se prepoznaju kao sigurni (GRAS) i stoga su prihvatljivi za uporabu u hrani i vodenim sustavima. (6)

S tim saznanjem od velike je važnosti razviti dobre, nove tehnike i sredstva za suzbijanje ove opasne bakterije u otpornim biofilmovima upravo na mjestima gdje njena pojavnost može ugroziti veliki broj ljudi. Različitim tretmanima vode i sa različitim učinkovitim sredstvima bi se postigla značajna eradikacija epidemija izazvanih legionelama.

Iz toga razloga ovaj rad se temelji na ispitivanju utjecaja eteričnih ulja na adheziju legionele, preveniranje stvaranja biofilma i razaranje samog biofilma u vodi. Eterična ulja bi se stoga mogla potencijalno koristiti kao alternativna sredstva u tretmanima vode protiv legionele i njenih biofilмова u različitim malim vodenim sustavima koja mogu stvarati aerosol (spa centri).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. *Legionella pneumophila*

#### 2.1.1. Karakteristike bakterije i strukturna građa

*Legionella pneumophila* je Gram negativna, metabolizmom strogo aerobna, patogena bakterija iz obitelji *Legionellaceae*. *L. pneumophila* se pojavljuje kao mali, kratki i tanki štapić dužine od 3 do 5  $\mu\text{m}$  pa su onda više nalik kokobacilima, a ovisno o uvjetima može se pojaviti kao dugački filamentni bacil s duljinom od 10-25  $\mu\text{m}$ . Nije dokazano da posjeduje kapsulu, a prilikom bojenja slabo poprima boju zbog sastava stanične stijenke koja sadrži velik udio masnih kiselina i ubikinona. Najčešće ima jednu polarnu flagelu koju koristi za kretanje, a ima i pilije koje joj služe za adheziju na različitu vrstu površina. Rod *Legionella* broji 62 vrste i nešto više od 70 serogrupa bakterija. Optimalni raspon temperature za rast i opstanak bakterije je između 30 °C i 40 °C iako će preživjeti i nepovoljnije temperature između 5,0 °C – 63,0 °C, ali se pri istima neće razmnožavati. Kako ima širok raspon temperatura na kojima preživljava, tako joj se kreće i pH. Iako spada u neutrofilne bakterije preživljavat će i niže vrijednosti pH. Sam raspon pH kreće se od 5,0 do 9,2. Nefermentativna je, oksidaza i katalaza pozitivna te proizvodi beta – laktamazu. Kolonije koje stvara *Legionella pneumophila* su sivo bijelkaste boje, karakterizirane izgledom rezanoga stakla. (4)



**Slika 1.** Kolonije *L. pneumophila* na BCYE agaru

Za rast i razmnožavanje legionela zahtjeva cistein i željezo koji su i najvažniji, a druge tvari koje poboljšavaju njen rast su aminokiseline i različite soli. Ono što utječe na inhibiciju

rasta bakterije je isušivanje, ultraljubičasto zračenje te visoke koncentracije klora. Bakterija ima mogućnost stvaranja biofilma te isto tako može živjeti kao unutarstaničan parazit u protozoama. Na taj način sama bakterija stječe veću otpornost prema vanjskim čimbenicima.

(5)

**Tablica 1.** Najvažnije karakteristike bakterije *Legionella pneumophila*

<b>Karakteristika</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i></b>
<b>Stanični metabolizam</b>	Striktno aerobna bakterija
<b>Oblik bakterijske stanice</b>	Bacil, nitaste tvorbe
<b>Ekologija</b>	Sve vrste površinskih voda
<b>pH</b>	5,0 – 9,2
<b>Temperatura na kojoj preživljava</b>	5,0 – 63,0 °C
<b>Nutritivne tvari</b>	L-cistein, željezo
<b>Osjetljivost</b>	Klor, isušivanje

### 2.1.2. Ekologija i epidemiologija legionele

Prirodno stanište legionele je slatkovodna voda, poput jezera i rijeka, gdje raste planktonski ili u biofilmu, s optimalnim rasponom temperature za rast i opstanak između 30 °C i 40 °C, najviše preferira onu ljudskoga tijela odnosno 37 °C. Bakterija međutim, može ući i u umjetne vodene sustave i preživjeti, stvarajući potencijalni izvor infekcije. Prethodne su studije izolirale bakteriju iz sustava za piće, rashladne tornjeve klimatizacijskih uređaja, lječilišta, fontana, ledenih strojeva, povrća, dentalnih uređaja i tuš glava (6).

Epidemiologija infekcija legionele je kompleksan proces koji podrazumijeva nekoliko glavnih čimbenika, a to su vodeni okoliš (uključujući predstavnike višestrukih mikrobnih

biljaka, ljudi, mehaničkih sredstava i medicinskih objekata), potom čimbenik širenja iz okoliša do domaćina i na kraju samu osjetljivost domaćina (7)

Čimbenik koji pogoduje opstanku legionele u umjetno stvorenim vodenim sredinama je njezina relativna otpornost na učinke klora i topline. Bakterija može pronaći utočište u relativno nepoželjnim sredinama kao što su spremnici tople vode. (8)

Drugi čimbenik epidemiološkog procesa je širenje bakterija iz okoliša u domaćina. U većini slučajeva veza je aerosol vode kontaminirane organizmima. Isparivački kondenzatori i rashladni tornjevi dokazani su izvori infekcije na otvorenom. U zatvorenom prostoru, raspršivači i ovlaživači ispunjeni kontaminiranom vodom za piće širili su legionelu na osjetljive pacijente. (8)

Konačni faktor procesa infekcije sa legionelom je osjetljivost bolesnika. Infekcije legionelom mogu biti sporadične ili epidemijske. Postoji velika geografska varijacija u učestalosti infekcije čak i unutar zajednica, vjerojatno zbog prisutnost prikladnih vodenih sredina i osjetljivih osoba. I sporadični slučajevi i slučajevi epidemije češći su tijekom ljeta nego zimskih mjeseci, možda zbog povećane uporabe uređaja za hlađenje zraka koji generira aerosol. (8)

### **2.1.3. Bakterijska adhezija**

Bakterijska adhezija predstavlja kompleksan i dinamičan proces interakcija kojima bakterijske stanice adheziraju na receptorska mjesta odnosno na površine. Ona predstavlja temelj i početak svake infekcije stoga je od iznimne važnosti spriječiti njenu pojavu. Jendom kada se bakterije adheriraju na određenu površinu te započnu svoj rast u zajednicama dolazi do nastanka stvaranja biofilma. Nastali biofilm možemo opisati kao skup mikrobnih stanica (različitih ili iste vrste) sa promjenjenim fenotipom koje na okupu drži matrica ekstracelularnih polisaharida. Bakterijske stanice imaju veliki potencijal adhezije na različite materijale. Život u biofilmu im omogućava različite pogodnosti za preživljavanje u lošim

uvjetima. Mnogi čimbenici kao na primjer površinska obrada, masovni transport, površinski naboj, hidrofobnost i hrapavost površine, nutritivne tvari te površinska mikrotopografija mogu znatno utjecati na pojavu adhezije bakterijskih stanica. Stoga je razumjevanje bakterijske adhezije i tvorbe samoga biofilma od ključne važnosti za oblikovanje strategije za sprječavanje njihove pojave. (9)

#### **2.1.4. *Legionella pneumophila* i biofilm**

Kako bi mogla rasti kao čista kultura u laboratorijskim uvjetima, legionela je ekstremno zahtjevna. Ona zahtijeva nekoliko različitih hranjivih tvari, uključujući soli željeza i brojne aminokiseline poput L-cisteina, koji se koriste kao ugljik, dušik i izvor energije. Činjenica da je legionela uobičajeno otkrivena u oligotrofnim vodenim okolišima koje karakterizira nizak sadržaj hranjivih tvari, podrazumijeva da bakterija može dobiti potrebnu količinu aminokiselina i organskog ugljika iz istog okruženja, točnije iz biofilmova.

Biofilmovi su definirani kao složene mikrobne zajednice koje karakteriziraju stanice pričvršćene na granicu supstrata ili faze i međusobno pomoću matrice samostalnih ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS). Kolonije bakterijskih stanica okružene EPS matricom međusobno se odvajaju intersticijskim kanalima vode, omogućujući transport hranjivih tvari, kisika, gena i čak antimikrobnih sredstava. Zbog njihovog dinamičkog karaktera, zajednice se mogu kontinuirano mijenjati u vremenu i prostoru, pružajući bolje preživljavanje i rast pridruženih mikroorganizama. Zbog toga je lako shvatiti da su u većini prirodnih okoliša biofilmovi dominantni mikrobiološki stil života. Općenito postoje tri različite faze u životnom ciklusu bakterija: (i) vezanje bakterija na supstrat, (ii) sazrijevanje biofilmova i (iii) odstranjivanje iz biofilmova i kasnije raspršivanje u okolišu.

Brojni humani patogeni kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus gordonii* i *Burkholderia cepacia* mogu formirati monostaničan biofilm. U slučaju legionele, zabilježeno je da čiste



kulture formiraju biofilm samo pod dobro definiranim eksperimentalnim uvjetima koristeći medije bogate hranjivim tvarima. Upravo iz toga razloga možemo reći da će legionela vrlo rijetko sama stvoriti biofilm već da će kolonizirati biofilm prethodno uspostavljen od nekog drugog mikroorganizma kao sekundarni kolonizator.

U sljedećoj fazi procesa integracije, sekundarni kolonizatori počinju rasti i formiraju mikrokolonije, koje su osnovna strukturna jedinica biofilmova. Nakon daljnjeg rasta i povećanja volumena, mikrokolonije postaju ugrađene u EPS matricu, koja pojačava strukturu biofilma. Različite bakterijske vrste proizvode različite količine EPS. Kod višestrukih biofilmova, gdje je bakterijsko natjecanje za hranu visoko, korisno je imati više od jednog načina dobivanja potrebnih hranjivih tvari za rast. U slučaju legionele postoje dva različita načina. Prvo, hranjive tvari mogu biti isporučene samim biofilmom. Drugo, legionelamože inficirati i replicirati se unutar protozoa. Tijekom svog boravka u unutarstaničnom okruženju, peptidi i proteini zaraženog domaćina degradirani su i korišteni kao izvor hranjivih tvari.

Odstranjivanje bakterija iz biofilmova sastavni je dio dinamičke prirode života u mikrobiološkim zajednicama. Biofilmske stanice mogu se odvojiti i dispergirati bilo kao rezultat niskog nivoa hranjivih tvari ili kvorskog osjeta, ili odvajanjem biofilmskih agregata zbog učinaka protoka. Odvajanje uzrokovano efektima protoka može se podijeliti u dva procesa: eroziju i slijevanje. Erozija je odjeljivanje pojedinačnih stanica i malih dijelova biofilmova, dok je slijevanje inducirano neočekivanim događajima i karakterizira brz i masivan gubitak biofilmova. Takav učinak slijevanja moguć je nastankom biofilma u lamilarnom protoku te kad taj protok postane turbulentan biofilm se masivno gubi. Problemi mogu nastati kada se veliki broj legionele odvoji od biofilma i mobilizira u fazi ispuštanja vode. Tada odvojene patogene bakterije imaju potencijal da vrlo brzo dosegnu infektivnu dozu kod ljudi. (10)

### **2.1.5. Patogeneza legioneloze**

Patogeneza infekcije sa legionelom započinje unosom vode u obliku aerosola odnosno raspršenih sitnih kapljica vode koja sadrži virulentne bakterije. Nikada nije zabilježena pojava prijenosa bakterije intrahumanim putem, a sama Legionella nije član normalne bakterijske flore ljudi. (5)

Infekcija započinje u donjem dišnom putu. Alveolarni makrofagi, koji su primarna obrana od bakterijske infekcije pluća, imaju za zadaću ukloniti bakterije. Međutim, legionela je fakultativni unutarstanični parazit i slobodno se razmnožava u makrofazima. Bakterije se vežu na alveolarne makrofage putem komplementarnih receptora. Nepoznatim mehanizmom, bakterije blokiraju fuziju lizosoma s fagosomom, tako sprječavajući normalno zakiseljavanje fagolizosoma što omogućuje bakterijama razmnožavanje unutar fagosoma. Dakle, stanični odjeljak koji bi trebao uzrokovati smrt bakterije i time zaštititi organizam umjesto toga postaje sigurno mjesto za razmnožavanje legionele. Na kraju, stanica je uništena, oslobađajući novu generaciju mikroba kako bi zarazila druge stanice. (11)

### **2.1.6. Klinička slika legioneloze**

Kliničke manifestacije legioneloza prvenstveno su respiratorne. Dvije su vrlo različite vrste respiratornih bolesti kao posljedica infekcije. Najčešća prezentacija je akutna upala pluća, koja varira u težini od blage bolesti koja ne zahtijeva hospitalizaciju do fatalne upale pluća. Tipično, pacijenti imaju visoku, neujednačenu groznicu i kašalj, ali ne proizvode puno sluzi. Izvanplućni simptomi, kao što su glavobolja, zbunjenost, bolovi u mišićima i gastrointestinalni poremećaji, su česti. Većina pacijenata odmah reagira na odgovarajuću antimikrobnu terapiju, ali oporavak se često produžuje (traje nekoliko tjedana ili čak mjeseci).

Drugi oblik respiratorne bolesti naziva se Pontijačka groznica po gradu u Michiganu gdje je prepoznata prva epidemija. Ova infekcija i njena manifestacija nalikuju na akutnu

gripu, uključujući groznicu, glavobolju i teške bolove u mišićima. Bolest je samoograničavajuća te se puno lakše i brže liječi u usporedbi sa legionarskom bolešću. (5)

### **2.1.7. Dijagnostika**

Preferirana dijagnostička metoda je uzgajanje, jer je i osjetljiva i specifična. Medij izbora je puferirani ekstrakt drvenog ugljena i kvasca. Ovaj medij sadrži ekstrakt kvasca, željezo, L-cistein i  $\alpha$ -ketoglutarat za rast bakterija. Aktivirani ugljen služi za inaktivaciju toksičnih peroksida koji se razvijaju u mediju koji je puferiran pri pH 6,9, optimalnom za rast legionelskih organizama. Dodavanje albumina u medij može dodatno olakšati rast drugih vrsta osim legionele. Za kontaminirane uzorke treba dodati antibiotike. Morfološki značajne bakterijske kolonije obično se mogu otkriti u roku od 3 do 5 dana i identificiraju se kao vrsta *Legionella* ako ovise o cisteinu za rast i razmnožavanje. Identifikacija se može potvrditi specifičnim imunološkim tipiziranjem izoliranih bakterija ili, u problematičnim slučajevima, molekulskom analizom. (5)

Izravna detekcija bakterijskog antigena u kliničkim uzorcima potencijalno je mnogo brža od uzgoja. Nažalost, izravna imunofluorescencija detekcije legionela antigena u respiratornim uzorcima nije ni osjetljiva ni dovoljno specifična da bi se opravdala opća upotreba. Komercijalno dostupan radioimunološki test za bakterijski antigen u urinu je zadovoljavajući, ali je dostupan samo za određenu serumsku skupinu legionele i zahtijeva uporabu i uklanjanje radioaktivnih tvari. (5)

Serološka dijagnoza je umjereno osjetljiva i razumno specifična. Treba ga smatrati dodatkom dijagnozi po kulturi. Najčešće se koristi neizravna imunofluorescencija. (5)

### **2.1.8. Liječenje legioneloza**

Pontijačka groznica ne zahtijeva antimikrobnu terapiju. Preferirani lijek za simptomatske legionarske infekcije je eritromicin. Ako je pacijent ozbiljno bolestan, važno je prvo dati antibiotik intravenozno, naknadno se može koristiti oralna terapija. Rifampin se

ponekad doda kao drugi antibiotik kod ozbiljnih bolesnika. Eksperimentalno, i eritromicin i rifampin inhibiraju rast legionela u zaraženim makrofagima, ali ne ubijaju bakterije. Profilaktička antibiotska terapija može biti korisna kod bolesnika s visokim rizikom od ozbiljnih bolesti, poput primatelja transplantata, kada se javlja dokumentirana epidemija.

Predložena je imunizacija kao sredstvo sprječavanja infekcije sa legionelom u osjetljivim populacijama. Ovaj pristup djeluje kod pokusnih životinja, ali nije bilo pokušaja kod ljudi. (5)

### **2.1.9. Kontrola legionloza**

Bakterija je najčešće prisutna u vodama sa većom temperaturom, što mjesta poput wellnessa, sauna, bazena, jacuzzi-ja, čini savršenima za njeno pojavljivanje. Upravo iz toga razloga na ta mjesta se treba obraćati puno veća pozornost kao i na samu prevenciju. Legionelae bakterija koja kako bi rasla u određenoj vodi ta voda treba ispuniti nekoliko zahtjeva. Prvenstveno je to temperatura između 25 i 40 °C, ali isto tako potrebne su joj nutritivne tvari kao što su cistein i željezo te aminokiseline. Sve te tvari ona dobiva iz biofilmova, koji su prisutni u cijevima, a naročito na mjestima gdje je protok vode manji, odnosno na slijepim završecima.

Biofilmovi zapravo predstavljaju najveći problem u dezinfekciji jer mnoga dezinfekcijska sredstva neće djelovati ili će njihovo djelovanje biti neznatno na biofilmove. Ono što je najvažnije kako bi se spriječilo nastajanje biofilmova je izvedba cijevi. Ključno je da u cjevovodu bude što manje slijepih završetaka koji omogućuju slabiji protok vode i time rast biofilma. Vrlo je bitno u sustavu upotrebljavati meku vodu bez puno mineralnih tvari kako bi se spriječilo prekomjerno stvaranje kamenca. Ono što moraju ispuniti isezonski kompleksi je da se redovno provodi nadzor i kontrolu u njihovim vodovodnim mrežama. To podrazumijeva da se, kako na početku, tako i na kraju sezone provedu postupci podizanja temperature sustava iznad 70 °C tokom određenog vremena. Ono što je nedostatak kod ove tehnike

spriječavanja pojave legionele je samo trenutno djelovanje na moguću prisutnost, no nakon ponovnog spuštanja temperature može doći do naknadne kontaminacije, također prilikom tako visokih temperatura vrlo je često da dođe do pucanja ili oštećenja samih cijevovoda. Ono što je pozitivno jest da se ovom metodom voda ne obrađuje nikakvim kemijski opasnim tvarima.

Drugi način na koji je moguće obraditi vodu je tretman sa UV zračenjem. UV zrakama eliminirat će se živi oblici mikroorganizama, no ono što će preživjeti su bakterije u biofilmu što kod legionele predstavlja jako veliki problem. Također kao i kod podizanja temperatura UV zračenje nema rezidualno djelovanje. Najefikasnijim preparatima pokazala su se kemijska sredstva jer imaju mogućnost prodiranja u biofilm no problem kod istih je što nisu ekonomična i što jednom kada se puste u sustav teško je kontrolirati njihovu koncentraciju i štetnost. (6,11)

## **2.2. Eterično ulje**

Eterično ulje je koncentrirana hidrofobna tekućina koja sadrži hlapive arome koje se dobivene iz biljaka procesom destilacije. (12) Eterična ulja se općenito ekstrahiraju destilacijom, često pomoću vodene pare. Ostali procesi uključuju ekspresiju, ekstrakciju otapala, apsolutnu ekstrakciju ulja, tapkanje smole i hladno prešanje. (13)

Eterična ulja koriste se tisućama godina u različitim kulturama za ljekovite i zdravstvene svrhe. Zbog svojih antidepresivnih, stimulirajućih, detoksikacijskih, antibakterijskih, antivirusnih svojstava postaju sve više poznata i korištena kao prirodna, sigurna i troškovno učinkovita terapija za niz zdravstvenih problema. Svaka vrsta eteričnog ulja ima drugačiji kemijski sastav koji utječe na miris, apsorpciju i iskorištenje u organizmu. Čak i ulja iz sorti biljaka unutar iste vrste mogu imati različite kemijske kompozicije. Isto vrijedi i za biljke koje se uzgajaju ili sakupljaju na različite načine ili lokacije. (13)

### **2.2.1. Dobivanje eteričnih ulja**

Najčešća eterična ulja kao što su lavanda, metvica, ulje čajevca i eukaliptus se dobivaju postupkom destilacije. Sirovi biljni materijal, a to mogu biti cvjetovi, lišće, drvo, kora, korijenje, sjemenje, stavlja se u aparat za destilaciju vodenom parom. Zagrijavanjem voda prelazi u paru koja prolazi kroz biljni materijal te uklanjaju hlapive komponente iz tog materijala. Zagrijana para potom putuje do spiralne cijevi koja se hladi vodom te posljedično ta para kondenzira natrag u tekućinu koja se sakuplja. Budući da se voda i eterično ulje ne miješaju, eterično ulje naći će se na površini vode u kojoj se ispušta. Voda na dnu sakupljačke posude se naziva hidrosol, hidrolat, biljni destilat ili biljna voda, koja se može prodati kao druga vrsta mirisnih proizvoda. (13)

### **2.2.2. Primjena**

Ljekovito i aromatsko bilje čine veliki dio prirodne flore i smatraju se važnim resursom u različitim područjima kao što su farmaceutska i kozmetičke industrije i parfumerijama. Proizvodi od esencijalnih ulja ili prirodne aromatske kemikalije imaju veću potražnju u kozmetičkim, prehrambenim, parfemskim i farmaceutskim industrijama, a na međunarodnom tržištu godišnje se trguje više od 250 vrsta eteričnih ulja, u vrijednosti od 1,2 milijarde USD. Eterična ulja dobivena iz aromatskog i ljekovitog bilja su aromatične prirode zbog mješavine raznovrsnih kemijskih tvari koje pripadaju različitim kemijskim obiteljima, uključujući terpene, aldehide, alkohole, estere, fenolne, etere i ketone. Eterična ulja se koriste u aromaterapiji i za liječenje pojedinih bolesti uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes, Alzheimerove bolesti, karcinom, te kao dobro sredstvo prevencije različitih infekcija i bolesti. Antimikrobni učinci eteričnih ulja i njihovih kemijskih komponenti u prošlosti su prepoznati od strane više istraživača. Nadalje, istraživanja pokazuju sinergistički učinak bilo koja dva ili više sastojaka esencijalnih ulja protiv različitih ljudskih patogena. (13)

### 2.3. Eterično ulje čajevca

Čajevac je zimzelena grmolika biljka, samonikla u Australiji, danas široko kultivirana na plantažama. Ima izdužene nepodijeljene listove koji više podsjećaju na iglice, s vidljivim žlijezdama duž listova koje sadrže eterično ulje. Cvjetovi su mali i bijele su boje. Biljka je endemska u suptropskom obalnom području istočne Australije. (15)Ulje čajevca, također poznato kao ulje maleluke ili ulje čajevog stabala, je eterično ulje sa svježim mirisom kamfora i boje koja se kreće od blijedo žute do gotovo bezbojne i čiste. Porijeklom ovo ulje pripada obali Australije.

Ulje čajevca je toksično kada je uzeto oralnim putem. Iako ima malo dokaza o njegovoj djelotvornosti, obično se koristi u niskim koncentracijama u narodnoj medicini za liječenja kožnih infekcija. Međutim, kvaliteta dokaza o djelotvornosti u tim uvjetima je minimalna. (14)



Slika 2. Biljka čajevca (*Melaleuca alternifolia*)

[http://aromateka-eskulap.hr/media/com\\_eshop/products/resized/Cajevac-1-500x500.jpg](http://aromateka-eskulap.hr/media/com_eshop/products/resized/Cajevac-1-500x500.jpg)

### 2.4. Eterično ulje limunskog eukaliptusa

Limunski eukaliptus je biljka koja pripada travi obitelji *Poaceae*. Limunasto ulje ima lagani i svjež miris limuna s zemljanim podlogama. To je poticajno, opuštajuće i umirujuće ulje.

Limunski eukaliptus raste u gustim nakupinama koje mogu narasti 2 metra visine i širine 4 metra. Izvorno je toplim i tropskim područjima, kao što su Indija, Jugoistočna Azija i Oceanija. Koristi se kao ljekovito bilje u Indiji i uobičajeno je u azijskoj kuhinji. U zemljama afričke i južnoameričke države popularno se koristi za izradu čaja. (18)

Eterično ulje limunskog eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora*) ima izraženo protuupalno, protugljivično, smirujuće, analgetičko i lipolitičko djelovanje.

Zbog lipolitičkog djelovanja čest je sastojak u pripravcima za tretiranje celulita, a zbog anagetičkog, protuupalnog i blago spazmolitičkog neizostavan je u terapijama artritisa i artroza. Nađe se i u mješavinama za bolne i ukočene mišiće.

Također je odličan repelent (odbija insekte), a iz njega se komercijalno dobiva citridiol, sastojak visoke repelente aktivnosti. Za kožne gljivične infekcije učinkovita je 5% mješavina u nekom biljnom ulju (najbolje tamjanu). (18)



**Slika 3.** Limunski eukaliptus

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/Corymbia\\_citriodora.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/Corymbia_citriodora.jpg)

## **2.5. Eterično ulje kao prirodni lijek**

Djelovanje eteričnih ulja protiv bakterija može biti samo inhibicija rasta bakterije tada govorimo o bakteriostatskom djelovanju ili ako se koriste u većim koncentracijama ili su eterična ulja po prirodi agresivnija djelovati će na smrt stanice bakterije odnosno imati će



baktericidno djelovanje (smanjenje broja stanica). Naravno baktericidno djelovanje puno je efikasnije jer ima trajni učinak te i nakon prestanka djelovanja određenog sredstva mikrobnе stanice neće biti sposobne za preživljavanje i daljnji rast, dok kod bakteriostatskog djelovanja određeno sredstvo bi bilo učinkovito samo kada bi konstantno tretirali jer bi se u suprotnome bakterijske stanice vrlo brzo oporavile i počele se razmnožavati. (21)

Prevenција bolesti uzrokovanih hranom i vodom dovela je do izgradnje sofisticiranih sustava sigurnosti hrane i kontrole hrane, uglavnom u razvijenim zemljama, ali i širom svijeta, većina zemalja je svjesna da bolest koja se prenosi vodom i hranom nastavlja biti glavno pitanje javnog zdravlja. Teške implikacije na zdravlje pojedinaca i na razvoj modernog društvo može nastati iz ovih istih bolesti. (21)

Od antičkih vremena antimikrobni učinak eteričnih ulja i njihovih komponenata izoliranih iz aromatskih i prepoznatih ljekovitih biljaka, ima pozitivan učinak kako na zdravlje tako i na očuvanje namirnica i vode. (21)

Kontroliranje i spriječavanje kvarenje hrane i spriječavanje kontaminacije vode za piće sa patogenim mikroorganizama postiže se uglavnom uporabom kemijskih sredstava, ali uporaba sintetičkih kemikalija je ograničena zbog pojave brojnih nepoželjnih aspekata na ljudsko zdravlje koji uključuju karcinogenost, teratogenost, akutnu toksičnost. (21)

Svijest današnjih modernih potrošača o tim problemima rezultiralo je javljanjem tako zvanog "zelenog" profila potrošača koji zahtijeva odsutnost sintetičkih kemikalija uz očuvanju hrane i produljenjem roka trajanja u većini prehrambenih proizvoda. Znanstvenici, farmaceutska industrija već godinama istražuju i traže prirodne spojeve koji će udovoljiti zahtjevima potrošača, a sama eterična ulja mogu biti uključena u ovu skupinu (21)

Upotreba eteričnih ulja u hrani i vodi, osim što je prepoznata kao GRAS praksa (Općenito prihvaćena kao sigurna) (22), mora se primjenjivati s oprezom i prvo odobriti. Pitanje je osobito osjetljivo zbog različitih percepcija o toksičnim učincima koje je većina

puta se odnose na masovnu uporabu eteričnih ulja (23). Korištenje eteričnih ulja u borbi protiv bolničkih infekcija i za kontrolu epidemijskih multirezistentnih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin je obećavajući. Eterična ulja eukaliptusa, čajevca, lavande, limunski eukaliptus, cimeta, grejpa, klinčića, paprene metvice su testirana protiv nekoliko sojeva MRSA, sojeva *Streptococcus* i *Candida* te su se ulja pokazala djelotvornima u borbi protiv ovih problematičnih mikroorganizama. (21)

## **2.6. Određivanje interakcije između različitih antibakterijskih tvari**

Frakcijska inhibitorska koncentracija (FIC) je test kojim se izražava interakcija između dva ili više antimikrobna agensa koji se namjeravaju koristiti u kombinaciji. Svrha ispitivanja FIC koncentracija novih antimikrobnih sredstava u kombinaciji s postojećim služi nam za određivanje sinergističkog, aditivnog ili pak indiferentnog ili antagonističkog učinka. Sinergija označuje različite simultane reakcije pojedinih agensa koji imaju veći efekt zajedničkim djelovanjem nego suma njihovih pojedinačnih djelovanja. (24)

Kada se dva lijeka koriste u kombinaciji. Barem jedan od dva lijeka mora pokazati minimalno 4 puta povećanje antibakterijskih aktivnosti (ili smanjenje minimalne inhibicijske koncentracije, MIC do  $\frac{1}{4}$ ). Kada se koriste dva antimikrobna sredstva s istim mehanizmima djelovanja, učinak je obično aditivan. (25)

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovoga rada bio je ispitati kombinirano djelovanje eteričnog ulja čajevca i eteričnog ulja limunskog eukaliptusa u razaranju i inhibiciji stvaranja biofilma bakterije *L. pneumophila* te ispitivanju potencijalnog sinergističkog učinka ova dva ulja na adheziju na polistiren.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

- precizna vaga: "PB602-S"(METTLER TOLEDO, SAD)
- inkubator
- mikroeprovete (Eppendorf, Njemačka)
- automatske pipete:
  - 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L i 100-1000 $\mu$ L "GilsonPipetman" (Gilson, USA)
  - nastavci za pipete (Gilson, USA)
- mikrobiološke ušice ("eze")
- Spektrofotometar: Biofotometar, "Eppendorf", Njemačka
- Mikrotitar pločice
- Plamenik
- tresilice: "Unimax 1010"(Heidolph, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj sa tresilicom:Bacto Sonic 14, Bandelin
- sterilna voda iz slavine
- Suplementi
- BCYE agar bez suplemenata

#### 4.1.1. Hranjiva podloga

Za uzgoj legionela korištena je hranjiva kruta BCYE-podloga sastava (pH 6,9): 10 g/l N-[2-acetamido]-2-aminoetan sulfonske kiseline (ACES) 10 g/l kvašćevog ekstrakta, 2 g/l aktivnog ugljena, 20 g/l agara te 1g/l alfa-ketoglutarat uz dodatak 10 ml/l 0,1 M željezovog (III) nitrata te 10 ml/l 0,33 M L-cisteina i tekuća podloga AYE sastava (pH 6,9): 10 g/l kvašćev ekstrakt, 10 g/l ACES, 1 g/l alfa-ketoglutarat uz dodatak 3,3 ml/l 1M L-cisteina i 3,3 ml/l 1M željezovog pirofosfata.

#### 4.1.2. Bakterijski soj

U pokusu su korištene bakterije: *L. pneumophila* (soj 130b), koji je dobiven ljubaznošću prof. dr.sc. E. Hartland sa Sveučilišta u Melbourne, u Australiji. Bakterije su čuvane u zamrzivaču na - 80°C. Nakon uzgoja 3 – 5 dana na BCYE podlozi pri 37°C u atmosferi obogaćenoj 4 – 5 % CO<sub>2</sub>, bakterija se koristila u pokusima. Legionele su suspendirane u 10 % - tnom glicerol bujonu. Suspenzija je zatim alikvotirana i zamrznuta na -80 °C.

#### 4.1.3. Eterična ulja

Eterična ulja dobivena su iz firme Dea Flores d.o.o., a osnovna suspenzija eteričnog ulja otopljena je u sterilnoj vodovodnoj vodi i ¼ AYE bujona. Eterična ulja koja su se koristila u radu su Čajevac (*Melaleuca alternifolia*) i Limunski eukaliptus (*Corymbia citriodora*).

#### 4.1.4. Karakteritacija ulja

Tablica 2. Glavne karakteristike eteričnih ulja korištenih u ovome radu

	<b>Limunski eukaliptus</b>	<b>Čajevac</b>
<b>Botanički naziv</b>	<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>
<b>Zemlja podrijetla</b>	Madagaskar	Australija
<b>Način dobivanja</b>	destilacija vodenom parom listova	destilacija vodenom parom listova
<b>Glavne kemijske sastavnice</b>	citronelal, citronelol, i-pulegol, citronelil -acetat, beta-kariofilen, linalol, trans-pinokarveol	terpinen-1-ol-4, alfa-terpineol, p-cimen, 1,8-cineol, alfa-,gama-terpinen

#### 4.1.5. Voda iz slavine

U pokusu je korištena voda iz slavine (vodovodna voda), koja je za potrebe pokusa sterilizirana autoklaviranjem pri 120°C tijekom 20 minuta.

## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma**

Napravljena je bakterijska suspenzija legionele u sterilnoj vodi s ¼ AYE bujona. Broj bakterija određen je spektrofotometrijski. Optička gustoća namještena je na 1 što označava  $10^9$  CFU/ml (prema engl. *colony-forming unit*). Zatim su napravljena deseterostruka razrjeđenja do  $10^6$  CFU/ml. Broj bakterija u inokulumu potvrđen je nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja na BCYE podlogu.

### **4.2.2. Priprema štok otopine eteričnih ulja**

Računski je određeno koliko mililitara eteričnog ulja iz originalnog pakiranja je potrebno da bi se napravila štok otopina koncentracije 200 mg/mL. Koncentracija eteričnog ulja koje se primjenjivalo za rad iznosila je 51,2 mg/ml.

### **4.2.3. Određivanje MEK za eterična ulja**

U mikrotitarsku ploču stavljeno je u prve dvije jažice po 200 µl eteričnog ulja koncentracije 51,2 mg/ml te su napravljena dvostruka razrjeđenja koja su potom inkubirana na 37 °C te nakon 24 sata nasađeno je 10 µl svakog razrjeđenja na BCYE agar. Nakon 72 sata inkubacije na 37 °C očitani su rezultati, te je određen MEK oba ulja koji nam je potreban za daljnja računanja. MEK je definiran kao najniža koncentracija ulja koja je pokazala baktericidni učinak.

### **4.2.4. Metoda određivanja interakcije između eteričnog ulja limunskog eukaliptusa i čajevca**

Pomoću spremnih štok otopina eteričnih ulja pripremljene su mikrotitarske ploče prema metodi šahovnice. Tokom pripreme korištene su dvije mikrotitarske ploče, za svako eterično ulje jedna, koje su na kraju spojene. Postupak pripreme je išao u nekoliko koraka. Prvo je u sve jažice prve mikrotitarske ploče stavljeno po 50 µl otapala odnosno sterilne vode s ¼ AYE bujona, osim u red H i stupac 1. Potom je ista količina eteričnog ulja čajevca koncentracije

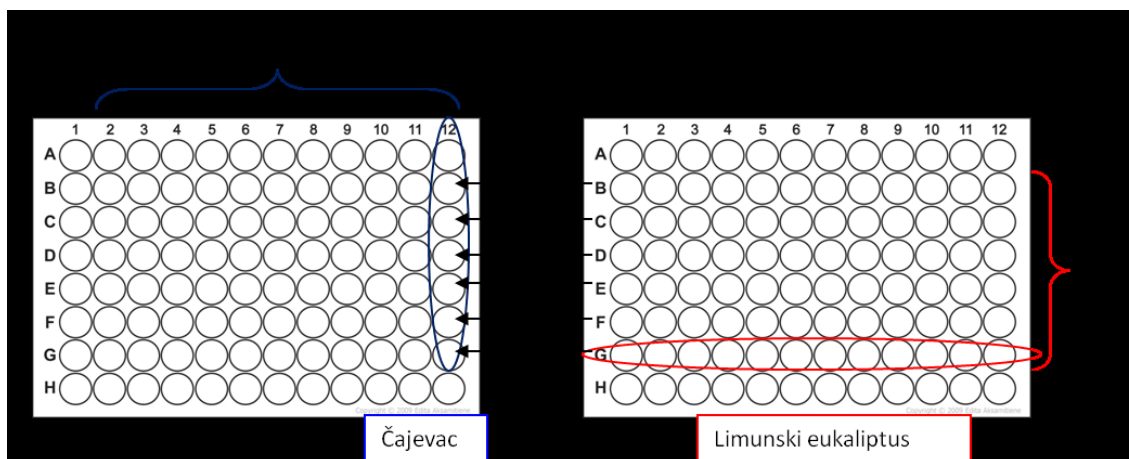
51,2 mg/ml, dodana u cijeli stupac 12. Potom su rađena dvostruka razrijeđenja od stupca 12 do stupca 2.

U drugoj mikrotitarskoj pločici pripremljena su razrijeđenja eteričnog ulja limunskog eukaliptusa na način da se u sve jažice dodalo 100  $\mu$ l otapala odnosno sterilne vode s  $\frac{1}{4}$  AYE bujona osim u red H i red A. Potom se ista količina eteričnog ulja limunskog eukaliptusa koncentracije 51,2 mg/ml dodalo u svaku jažicu reda G. Rađena su dvostruka razrijeđenja od reda G do reda B.

Nakon što su pripremljene ploče sa eteričnim uljima, te dvije ploče su spojene na način da se po 50  $\mu$ l suspenzije iz ploče 2 prenese na isto mjesto u ploču 1. Odnosno red B druge ploče u red B prve ploče i tako svaka jažica.

Tako smo na mikrotitarskoj ploči 1 sa ravnim dnom dobili u svakoj pojedinoj jažici različite kombinacije koncentracija dvaju eteričnih ulja. U redu A bio je isključivo čajevac sam, a u stupcu 1 isključivo limunski eukaliptus. Na kraju se u svaku jažicu dodala još po 100  $\mu$ l bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  CFU/ml. U redu H nalazila nam se kontrola. Dobivena kocka sadrži svaku kombinaciju dvaju eteričnih ulja, s jažicama koje sadrže najveću koncentraciju svakog eteričnog ulja u suprotnim kutovima. Spojena ploča ide na inkubaciju na 37 °C i 24 sata.

Sljedeći dan suspenzije iz jažica nakapavane su na BCYE podlogu po 10  $\mu$ l, te ponovno stavljene na inkubaciju na 37 °C 72 sata. Na kraju su se zabilježile jažice u kojima nije bilo porasta bakterije.



**Slika 4.** Prikaz načina izrade ploča i spajanje ploča

#### **4.2.5. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na inhibiciju adhezije na polistiren**

U mikrotitarskoj pločici ravnoga dna smješana je kombinacija koncentracija eteričnih ulja na identičan način kao i u prvoj metodi. U ploči 1 pripravljena su razrijeđenja čajevca, u drugoj limunskog eukaliptusa i potom su spajane opet na isti način. Na kraju smo još dodali 100  $\mu$ l bakterijske suspenzije u svaku jažicu. U redu H nalazila nam se kontrola odnosno bakterijska suspenzija. Takva pločica stavljena je na 24 - satnu inkubaciju na 37 °C. Drugi dan ploča je isprana dva puta sa sterilnom vodom te stavljena 1 minutu na ultrazvučnu kupelj kako bi došlo do razaranja biofilma. Tek nakon ovog postupka slijedi nakapavanje suspenzije na BCYE agar po 10  $\mu$ l. Podloge se potom stavljaju na inkubaciju 72 sata na 37 °C. Nakon toga slijedi očitavanje rezultata na način da se prebroje bakterije na mjestima gdje je to bilo moguće.

#### **4.2.6. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na inhibiciju stvaranja biofilma**

Postupak primjenjen na ovoj metodi identičan je prethodnom postupku, jedina je razlika u vremenu inkubacije mikrotitarske pločice u kojoj je smješana kombinacija koncentracija eteričnih ulja. U prethodnom postupku inkubacija je 24 sata dok je u ovom postupku inkubacija 72 sata na 37 °C. Nakon inkubiranja mikrotitarska pločica dva puta je isprana



sterilnom vodom te tretirana na ultrazvučnom kupelji jednu minutu. Zatim je nasadeno 10 µl suspenzije na BCYE agar uz jako miješanje. Agar je stavljen na inkubaciju od 24 sata na 37 °C, nakon čega su očitani rezultati.

#### **4.2.7. Metoda određivanja utjecaja eteričnih ulja na razaranje biofilma**

Pripremljena suspenzija bakterija od  $10^6$  CFU/ml stavljena je po 200 µl u svaku jažicu mikrotitarske pločice sa ravnim dnom te je stavljeno na inkubaciju 72 sata. Nakon 72 sata iz svih jažica je uklonjena tekućina, te nam ona predstavlja ploču 1 u kojoj su napravljena razrijeđenja čajevca po istom principu kao i u prethodnim metodama. U drugoj ploči su napravljena razrijeđenja limunskog eukaliptusa. Ploče su potom spojene opet na isti način. Razlika ove metode od prethodnih je to što smo u prethodnim metodama bakterijsku suspenziju dodavali nakon miješanja koncentracija dok smo u ovoj metodi najprije inkubirali bakterijsku suspenziju kako bi stvorili biofilm. Tako smo na mikrotitarskoj pločici sa ravnim dnom (gdje je prvotno razvijen biofilm) dobili u svakoj pojedinoj jažici različite kombinacije koncentracija dvaju eteričnih ulja dok je u redu A bio isključivo čajevac sam, a u stupcu 1 isključivo limunski eukaliptus. Na kraju smo još dodali 100 µl otopine u svaku jažicu kako bi jažica bila nadopunjena do 200 µl. U redu H nalazila nam se kontrola odnosno razvijen biofilm i 200 µl otapala. Takva pločica termostatirana je 24 sata na 37 °C, te je nakon toga ploča dva puta isprana, tretirana na ultrazvučnoj kupelji 1 minutu te potom nasadena iz svake jažice 10 mikrolitara na BCYE agar. Zatim su agari stavljeni na inkubaciju 72 sata na 37 °C te su potom očitavani rezultati na agaru.

## 5. REZULTATI

### 5.1. MEK koncentracija pojedinačnih eteričnih ulja

Za izračunavanje FIC – a bilo nam je potrebno odrediti pojedinačne MEK koncentracije svakog eteričnog ulja. MEK je najniža koncentracija nekoga agensa koji djeluje antimikrobno u cilju postizanja željenog efekta odnosno baktericidnog učinka. Nakon 72 – satne inkubacije očitili smo najmanje koncentracije pri kojima nismo mogli utvrditi rast legionele. Za eterično ulje čajevca MEK koncentracija iznosila je 12,8 mg/ml, a za limunski eukaliptus 6,4 mg/ml.

### 5.2. Određivanje interakcije između eteričnog ulja limunskog eukaliptusa i čajevca metodom šahovnice

Kako bi ispitali interakciju između eteričnih ulja koristili smo metodu šahovnice. Za svaku pojedinu kombinaciju eteričnih ulja gdje nije došlo do porasta bakterija izračunat je FIC pomoću kojeg smo odredili tip interakcije između koncentracija dva ulja. FIC su izračunati na sljedeći način:

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B},$$

$$\text{FIC A} = \frac{\text{MEK (eteričnog ulja A u kombinaciji s uljem B)}}{\text{MEK (eteričnog ulja A)}}$$

$$\text{FIC B} = \frac{\text{MEK (eteričnog ulja B u kombinaciji s uljem A)}}{\text{MEK (eteričnog ulja B)}}$$

Kombinacija se smatra:

SINERGIJSKOM ako je  $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ ,

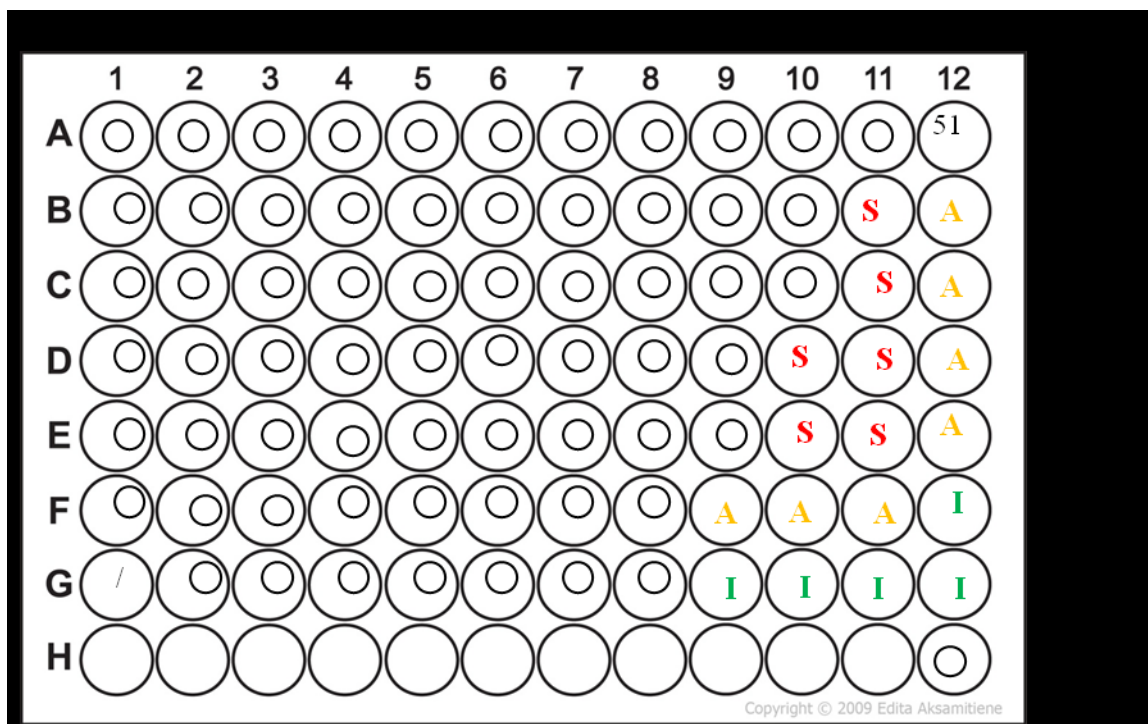
ADITIVAN ako je  $\Sigma\text{FIC} > 0.5$  i  $< 1.0$


INDIFERENTAN ako je  $\Sigma\text{FIC} > 1.0$  i  $< 4.0$

ANTAGONISTIČKI ako je  $\Sigma\text{FIC} > 4.0$

**Tablica 3.** Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između eteričnog ulja limunskog eukaliptusa i čajevca

MEK (eteričnog ulja) mg/ml		MEK (kombinacija ulja) mg/ml		FIC (eteričnog ulja)		Interakcija između eteričnih ulja	
Č (A)	LE (B)	MEK (AB)	MEK (BA)	FIC (Č) (A)	FIC (LE) (B)	FIC = FIC(A) + FIC(B)	UČINAK
12,8	6,4	3,2	0,2	0,25	0,03125	0,28125	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	6,4	0,2	0,5	0,03125	0,53125	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	3,2	0,4	0,25	0,0625	0,3125	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	6,4	0,4	0,5	0,0625	0,5625	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	1,6	0,8	0,125	0,125	0,25	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	3,2	0,8	0,25	0,125	0,375	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	6,4	0,8	0,5	0,125	0,625	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	1,6	1,6	0,125	0,25	0,375	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	3,2	1,6	0,25	0,25	0,5	<b>SINERGIJA</b>
12,8	6,4	6,4	1,6	0,5	0,25	0,75	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	0,8	3,2	0,0625	0,5	0,5625	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	1,6	3,2	0,125	0,5	0,625	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	3,2	3,2	0,25	0,5	0,75	<b>ADITIVAN</b>
12,8	6,4	6,4	3,2	0,5	0,5	1	<b>INDIFERENTAN</b>
12,8	6,4	0,8	6,4	0,0625	1	1,0625	<b>INDIFERENTAN</b>
12,8	6,4	1,6	6,4	0,125	1	1,125	<b>INDIFERENTAN</b>
12,8	6,4	3,2	6,4	0,25	1	1,25	<b>INDIFERENTAN</b>
12,8	6,4	6,4	6,4	0,5	1	1,5	<b>INDIFERENTAN</b>

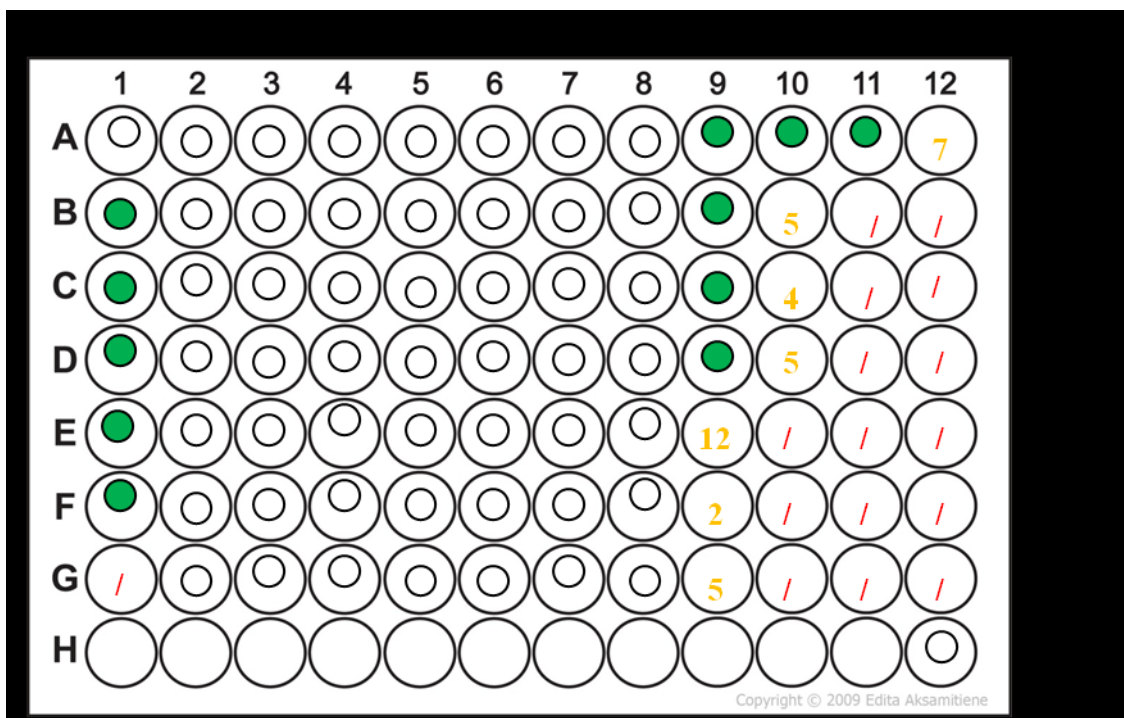


**Slika 5.** Prikaz mjesta sa tipom interakcije koji se javlja između eteričnih ulja limunskog eukaliptusa i čajevca.  – porast legionele; **S** – sinergistički učinak; **A** – Aditivan učinak; **I** – indiferentan učinak.

U ukupno 19 jažica nije došlo do porasta bakterije. 30 % od toga pokazuje sinergistički učinak odnosno točnije 6 kombinacija eteričnih ulja. U većini jažica, točnije u njih 7 javio se aditivan učinak, a u samo 4 njih indiferentan učinak. Ono što je vidljivo kada djelujemo pojedinačno samo sa jednim uljem potrebna je puno veća koncentracija toga ulja to vidimo po MEK eteričnih ulja koji iznose 12.8 mg/ml i 6.4 mg/ml, dok u kombinaciji smanjujemo koncentraciju potrebnog ulja za isti učinak, npr 1,6 mg/ml i 1,8 mg/ml. Odnosno dobiven je veći antilegionela efekt kombinacijom dvaju ulja manjih koncentracija u odnosu na njihove pojedinačne antimikrobne efekte. Ovaj podatak nam ukazuje da je kombinacijom ovih dvaju ulja došlo do interakcije glavnih antimikrobnih komponenti ulja čajevca sa komponentama limunskog eukaliptusa te ta akcija vodi do očitog sinergističkog djelovanja.

### 5.3. Rezultati inhibicije adhezije na polistiren

Djelovanjem ultrazvučne kupelji na mikrotitarsku pločicu odvojili smo adherirane bakterije sa podloge. Tako smo odredili broj bakterija koje se uspijelo inhibirati odnosno odredili smo inhibicijsko djelovanje kombinacija ulja na adheziju bakterija koje predstavlja ključni korak u formiranju biofilma. Dobivene rezultate smo očitali brojanjem bakterija na mjestima gdje je to bilo moguće te smo ih prikazali tablično.



**Slika 6.** Inhibicijsko djelovanja kombinacije eteričnih ulja na adheziju na polistiren. **●** – gust rast prikazan u tablici (nema djelovanja); **BROJ** – smanjen broj bakterija (bakteriostatsko djelovanje); **/** - nema vidljivog porasta bakterije (baktericidno djelovanje)

**Tablica 4.** Učinak eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na inhibiciju adhezije na polistiren; **zeleno** - gust rast; **žuto** – smanjen broj bakterija; **crveno** – nema porasta

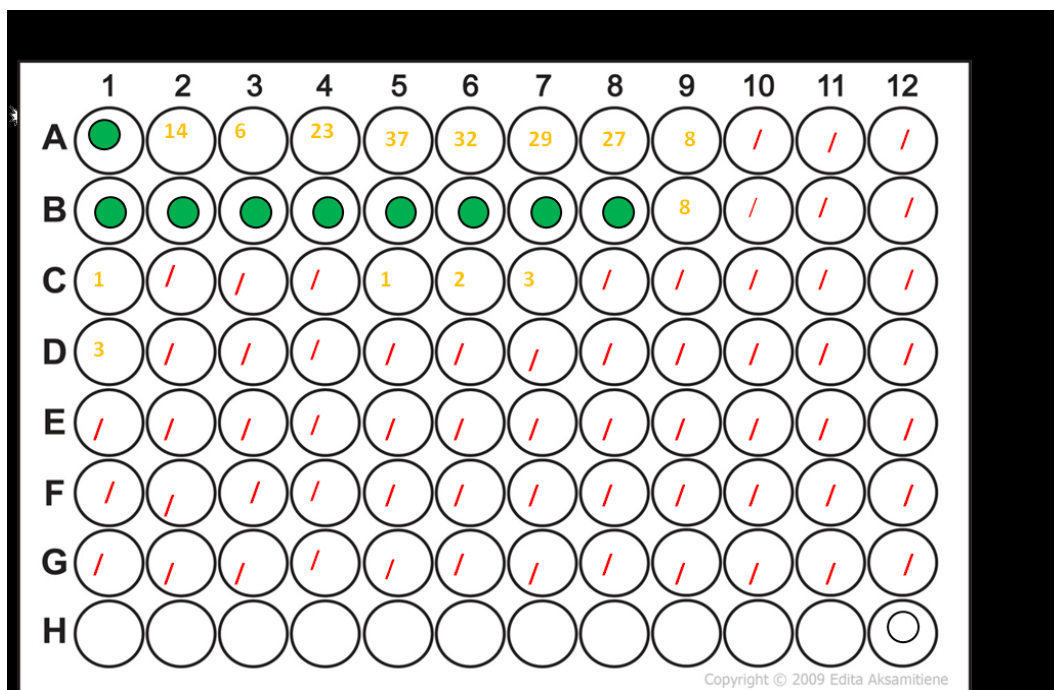
Broj bakterija (CFU/ml)		Koncentracija (Č)				
		mg/ml				
		/	0,8	1,6	3,2	6,4
Koncentracija (LE) mg/ml	/	(kontrola) $10^6$	$10^6$	$10^6$	$5,1 \times 10^4$	$7 \times 10^3$
	0,2	$10^6$	$10^6$	$5 \times 10^3$	0	0
	0,4	$10^6$	$10^6$	$4 \times 10^3$	0	0
	0,8	$10^6$	$10^6$	$5 \times 10^3$	0	0
	1,6	$10^6$	$1,2 \times 10^4$	0	0	0
	3,2	$4,3 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	0	0	0
	6,4	0	$5 \times 10^3$	0	0	0

U tablici je prikazan samo dio kombinacija eteričnih ulja, ostale kombinacije nisu imale inhibicijsko djelovanje na legionelu. U tablici su prikazani rezultati samog eteričnog ulja limunskog eukaliptusa u prvom stupcu i samog eteričnog ulja čajevca u prvom redu. Ostali rezultati prikazuju kombinacije djelovanja na inhibiciju adhezije legionele na polistiren. Čajevac sam nije postigao željeni efekt, čak ni u najvećoj koncentraciji od 6,4 mg/ml, dok je ulje limunskog eukaliptusa pokazalo inhibiciju, ali tek u koncentraciji od 6,4 mg/ml. S druge strane u 15 različitih kombinacija ova dva eterična ulja dobili smo željenu inhibiciju adhezije. Najmanje koncentracije koje su pokazale efekt su 1,6 mg/ml sa 1,6 mg/ml.

#### 5.4. Učinak kombinacije eteričnih ulja na inhibiciju legionele nakon trodnevne inkubacije

Ovom metodom dobiveni su rezultati koji ukazuju na inhibicijsko djelovanje eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na sam proces stvaranja biofilma.

Ispitano je djelovanje eteričnog ulja bez korištenja ultrazvučne kupelji kako bi se utvrdio broj bakterija koje se nalaze u slobodnom stanju odnosno bakterije koje ne tvore biofilm.



**Slika 7.** Dobiveni rezultati inhibicijskog djelovanja kombinacije eteričnih ulja na legionelu nakon 72 sata inkubacije na 37 °C. ■ – gust rast (nema djelovanja); **BROJ** – smanjen broj bakterija (bakteriostatsko djelovanje); / - nema vidljivog porasta bakterije (baktericidno djelovanje)

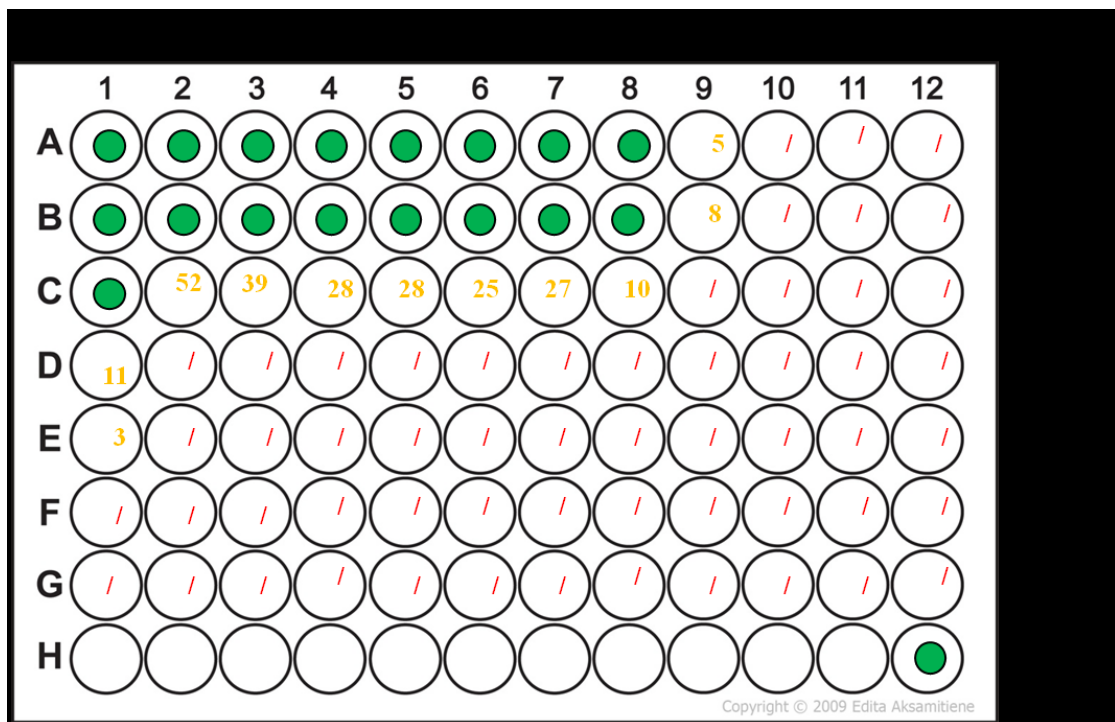
**Tablica 5.** Prikaz rezultata inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa pojedinačno i u kombinaciji na stvaranje biofilma. **Zeleno** - gust rast; **žuto** – smanjen broj bakterija; **crveno** – nema porasta

Broj bakterija (CFU/ml)		Koncentracija (Ć) mg/ml								
		/	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Koncentracija (LE) mg/ml	/	(Kontrola) $10^6$	$3.7 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$8 \times 10^3$	0	0	0
	0,2	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$8 \times 10^3$	0	0	0
	0,4	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	0	0	0	0	0
	0,8	$3 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

U tablici nisu prikazani svi rezultati, ali ono što je vidljivo je da eterično ulje čajevca i eterično ulje limunskog eukaliptusa pojedinačno u koncentracijama od 1.6 mg/ml inhibiraju legionelu. Dok se u kombinaciji, koncentracija eteričnih ulja koja inhibira legionelu, smanjila za tri puta i iznosi 0.4 mg/ml. Vidljivo je i da se koncentracija 1.6 mg/ml limunskog eukaliptusa koja inhibira legionelu smanjuje upola ukoliko se doda samo 0.05 mg/ml eteričnog ulja čajevca.

### 5.5 Učinak kombinacije eteričnih ulja na inhibiciju stvaranja biofilma

Nakon prvog nasađivanja ploča je tretirana na ultrazvučnoj kupelji kako bi se ukoliko je došlo do nastajanja biofilma on odvojio od podloge. Time smo dobili rezultate koji nam govore kako kombinacije eteričnih ulja djeluju na inhibiciju stvaranja biofilma. Dobivene porasle bakterije su prebrojane i rezultati su prikazani tablično.



**Slika 8.** Dobiveni rezultati inhibicijskog djelovanja kombinacije eteričnih ulja na stvaranje biofilma. ● – gust rast (nema djelovanja); **BROJ** – smanjen broj bakterija (bakteriostatsko djelovanje); / - nema vidljivog porasta bakterije (baktericidno djelovanje)



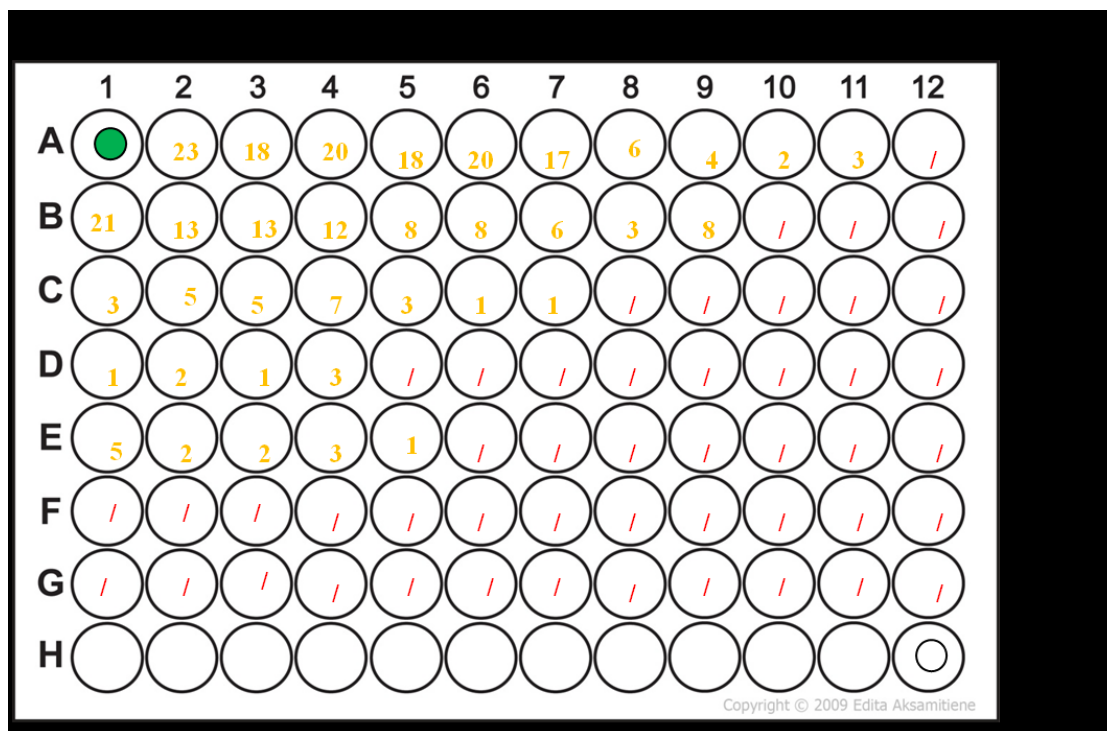
**Tablica 6.** Prikaz rezultata za inhibicijsko djelovanje kombinacija koncentracija eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na stvaranje biofilma. **Zeleno** - gust rast; **žuto** – smanjen broj bakterija; **crveno** – nema porasta

Broj bakterija (CFU/ml)		Koncentracija (Č) mg/ml								
		/	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Koncentracija (LE) mg/ml	(kontrola)	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>5 x10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	/	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>8 x10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0,2	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>8 x10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0,4	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>2,8 x10<sup>4</sup></b>	<b>2,5 x10<sup>4</sup></b>	<b>2,8 x10<sup>4</sup></b>	<b>2,8x10<sup>4</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0,8	<b>1,1 x10<sup>4</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	1,6	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	3,2	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
6,4	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

Nakon što je ploča bila tretirana sa ultrazvučnom kupelji vidimo da je došlo do povećanja broja bakterija tamo gdje je bakterija bilo i prije, odnosno možemo zaključiti da je došlo do odvajanja bakterija od biofilma. No tamo gdje nije bilo porasta bakterija prije ultrazvučne kupelji uglavnom nije bilo niti nakon. Limunski eukaliptus inhibira stvaranje biofilma u koncentraciji od 3,2 mg/ml, a čajevac u koncentraciji 1,6 mg/ml. Kombinacijom ulja dobivamo inhibicijsko djelovanje pri koncentracijama od 0,8 mg/ml i samo 0,05 mg/ml.

### 5.5. Učinak eteričnih ulja na razaranje biofilma

Posljednjom metodom dobiveni su rezultati koji ukazuju na djelovanje kombinacije eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na razaranje već stvorenog biofilma. Rezultati su prikazani tablično.



Slika 9. Dobiveni rezultati učinka eteričnih ulja limunskog eukaliptusa i čajevca na razaranje biofilma. **■** – gust rast (nema djelovanja); **BROJ** – smanjen broj bakterija (bakteriostatsko djelovanje); / - nema vidljivog porasta bakterije (baktericidno djelovanje)

Tablica 7. Prikaz očitanih rezultata djelovanja eteričnih ulja limunskog eukaliptusa i čajevca na razaranje biofilma. **Zeleno** - gust rast; **žuto** – smanjen broj bakterija; **crveno** – nema porasta

Broj bakterija (CFU/ml)	Koncentracija (Č) mg/ml									
	/	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	
Koncentracija (LE) mg/ml	(kontrola)	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>1,8 x 10<sup>4</sup></b>	<b>2,0 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1,7 x 10<sup>4</sup></b>	<b>6 x 10<sup>3</sup></b>	<b>4 x 10<sup>3</sup></b>	<b>2 x 10<sup>3</sup></b>	<b>3 x 10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>
	0,2	<b>3 x 10<sup>3</sup></b>	<b>8 x 10<sup>3</sup></b>	<b>8 x 10<sup>3</sup></b>	<b>6 x 10<sup>3</sup></b>	<b>3 x 10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0,4	<b>1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>3 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1 x 10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0,8	<b>5 x 10<sup>3</sup></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	1,6	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	3,2	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	6,4	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Rezultati koji su dobiveni u ovom postupku ukazuju na to da samo eterično ulje čajevca ima učinak u razaranju biofilma pri koncentraciji od 6,4 mg/ml i većim dok samo eterično ulje limunskog eukaliptusa razara biofilm u koncentracijama većim od 1,6. No, kada ta dva ulja djeluju u kombinaciji potrebna je manja koncentracija oba ulja. Odnosno u koncentracijama eteričnog ulja čajevca od 0,8 mg/ml (0.8, 1.6, 3.2 i 6.4), zajedno sa svim kombinacijama koncentracija limunskog eukaliptusa (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 i 6.4) nije primjećen rast legionele. Iako nisu prikazani svi rezultati u tablici iz slike 14. je vidljivo da je broj bakterija u svim jažicama smanjen u odnosu na kontrolu što znači da kombinacijom ova dva ulja u vrlo malim koncentracijama postiže se maksimalan učinak u razaranju biofilma.

## 1. RASPRAVA

*Legionella pneumophila*, glavni uzročnik legionarne bolesti, nalazi se u slatkovodnoj okolini u bliskoj vezi sa slobodnim živim amebama i višestrukim biofilmima, što dovodi do postojanosti, širenja, otpornosti na biocide i povišene virulentnosti bakterije. Zapravo, epidemije legioneloze uglavnom su posljedica sposobnosti ove bakterije da se kolonizira i nastavi zadržati u vodenim objektima, usprkos oštrim fizikalnim i kemijskim tretmanima. Međutim, ti tretmani nisu posve djelotvorni i nakon odsutnog razdoblja, legionela može biti u mogućnosti brzo ponovno kolonizirati ove sustave. U literaturi je nedavno opisano nekoliko prirodnih spojeva (biosurfaktanti, antimikrobni peptidi...) s anti-legionela svojstvima, ističući njihove specifične aktivnosti protiv tog patogena. Legionela je ubikvatorna bakterija sveprisutna u prirodnim i antropogenim vodenim sustavima, u kojima je u stanju dugoročno preživjeti unutar biofilmova (26). Biofilmovi su definirani kao složene mikrobne zajednice koje su karakterizirane stanicama pričvršćenima na podlogu ili neku faznu granicu i međusobno jedna s drugom, te su kao takve ugrađene u matricu samostalno proizvedenih izvanstaničnih polimernih supstanci (27). Biofilmovi pružaju sklonište i hranjive tvari, pokazuju izuzetnu otpornost na mnoge čimbenike stresa i time predstavljaju interesantnu ekološku nišu kojom legionela uzrokuje epidemije.

Da bi se spriječio rast same legionele, koriste se različiti tretmani (npr., fizički, toplinski i kemijski) u vodenim sustavima (28). Međutim, oni nisu u potpunosti učinkoviti, a nakon određenog razdoblja, legionela može biti u mogućnosti ponovno kolonizirati sustav. Okruženje pronađeno u biofilmovima legionele je izuzetno otporno na liječenje biocidima. Kada je ova bakterija izložena stresnim okolnostima, uključujući biocide unutar biofilmova, može doći do održivog, ali nekultivabilnog stanja.

Najčešći biocidi koji se koriste za kontrolu vodenih patogena su uglavnom klorni derivati. (29) Dok je pokazano da je hiperklorinacija pitke vode prikladna za uklanjanje

planktonskih kultura legionele, ona ipak ostaje neučinkovita protiv zajednica u biofilmovima. Izloženost kloru u pravilnim vremenskim razmacima pokazalo se kao metoda koja povećava, ionako sve veću toleranciju bakterija prema različitim dezinficijensima, čime se potiče otpornost bakterija. Klor-dioksid je vjerojatno učinkovitiji od klora zbog svoje vrhunske oksidativne snage i učinka na biofilme. (30) Kloramin, snažan biocid derivata klora, preporučuje se za dezinfekciju rashladnih tornjeva. Ipak, pokazalo se da ne iskorijenjuje potpuno legionelu iz biofilмова (31).

Ultrazvuk se samostalno nije pokazao kao najbolja metoda u borbi protiv legionela, ali kombiniran sa periodičnim mehaničkim gibanjima sonde odnosno sa tresilicom prenosi ultrazvučnu energiju u tekući medij i uzrokuje promjene u tlaku, što posljedično dovodi do nastanka malih brzo rastućih mjehurića. Mjehurić se naprije počinje širiti kada prevladava negativni tlak, a puca kada nastane pozitivan tlak i time dovodi do porasta temperature, tlaka i sile. Dolazi do nastanka kavitacije odnosno pojave isparavanja vode i stvaranja mjehura vodene pare. Kavitacija koja nastaje zbog promjena u tlakovima ima baktericidni učinak na principu stanjivanja staničnih membrana bakterija, zagrijavanju i stvaranju radikala.

Eterična ulja su aromatske uljne tekućine dobivene od biljnog materijala kao što su cvjetovi, pupoljci, sjemenke, lišće, grančice, kora, voće bilja ili korijena, a uglavnom se sastoje od mješavine terpenoida i aromatskih spojeva. Od terpena najčešće se nalaze monoterpeni, diterpeni. Eterična ulja su klasificirana prema kemijskoj prirodi njihovih glavnih aktivnih komponenata. Poznato je da eterična ulja posjeduju širok spektar antagonističkih aktivnosti kao što su antibakterijski, antivirusni, antifungalni, antiparazitski ili akaricidni, te čak insekticidne aktivnosti. (32)

U ovome istraživanju provedena su tri različita eksperimentalna postupka, sve u svrhu sprječavanja stvaranja biofilma legionele i time omogućavanje korištenja eteričnih ulja kao alternativnih sredstava za tretiranje vode u distribucijskim sustavima. Prvi postupak

odnosio se na ispitivanje interakcije dvaju eteričnih ulja na biofilm legionele. Kada kombiniramo dva antimikrobna sredstva oni zajedno mogu imati različiti efekt, a to uključuje aditivno, sinergistično, indiferentno i antagonističko djelovanje. Indiferentno djelovanje se pojavljuje ukoliko antimikrobno sredstvo ima identičan efekt samostalno i u kombinaciji sa drugim sredstvom. U slučaju aditivnog djelovanja mješavina antimikrobnih sredstava ima aktivnost jednaku zbroju pojedinačnih aktivnosti istih antimikrobnih sredstava. Sinergistički efekt se pojavljuje kada kombinacijom antimikrobnih sredstava dobijemo veći efekt od zbroja pojedinačnih efekata antimikrobnih sredstava. Antagonistički efekt uočava se kada se kombinacijom dvaju antimikrobnih sredstava dobije manja aktivnost od one sa najjačim djelovanjem. Ti efekti mogu se odrediti i kvantificirati korištenjem FIC (fractional inhibitory concentration) metode za koju je potrebno odrediti MIK svakog ulja pojedinačno.

U jednom istraživanju provedena je studija za određivanje antimikrobnog učinka eteričnog ulja čajevca protiv 22 vrste *L. pneumophila* različitih serotipova i izvora izolacije. Rezultati su pokazali da je *L. pneumophila*, bez obzira na serumske skupine i izvore izolacije, vrlo osjetljiva na eterično ulje čajevca, s MIC u rasponu od 0.125 do 0.5 mg /ml, i minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBC<sub>100</sub>) od 0.5 mg/ml (33) što su puno bolji rezultati od onih koje smo mi dobili u ovom istraživanju. Minimalna efektivna koncentracija za čajevac u ovom istraživanju je iznosila 12,8 mg/ml.

Učinci para citrusnog eteričnog ulja testirani su na različitim vrstama *Legionella* u sustavima vode i tla. (34) Od svih ispitanih sojeva na legionele u biofilmovima i drugim zajednicama najveći antibakterijski učinak uočen je na legioneli u vodi. Identificirane su komponente para eteričnih ulja (Linalool,  $\beta$ -pinene i citral) i određena njihova antimikrobna učinkovitost. Ono što je zamjećeno je da je došlo do smanjenja 5-log stanica / ml kod legionele nakon tretiranja. Vidljivo je da je dobiven puno bolji rezultat nego u našem ispitivanju za limunski eukaliptus kada djeluje sam. Moguće je da hlapive komponente

eteričnih ulja djeluju bolje nego li samo ulje u kontaktu sa bakterijom. No kada se kombiniraju dva ulja zajedno dobije se bolji rezultat inhibicije sa znatno manjom koncentracijom.

Što se tiče eteričnih ulja, njihova antibakterijska aktivnost nije uzrok samo jednog specifičnog mehanizma kao što je to slučaj kod lijekova. Eterična ulja mogu djelovati degradacijom stanične stijenke uzrokujući štetu citoplazmatskoj membrani i membranskim proteinima, uzrokujući propuštanje i koagulirajući citoplazmu (35). Eksperimenti elektronske mikroskopije pokazali su da su tretirane *L. pneumophila* stanice manje homogene i manje elektronske gustoće od netretirane kontrole, što upućuje na gubitak integriteta membrane. (36) Upravo iz tog razloga što svako ulje djeluje drugačije na svaku bakteriju, manja je mogućnost razvoja otpornosti bakterije na ovu vrstu prevencije.

*Legionella pneumophila* je osjetljiva na različite biomolekule. Nije jasno ima li *L. pneumophila* specifičnost koja bi mogla objasniti tu osjetljivost. Budući da su svi ovi spojevi aktivni na membrani, možda je dio odgovora skriven u sastavu oмотnice *L. pneumophila*. (37) LPS ima jedinstvenu strukturu u usporedbi s LPS drugim Gram-negativnim bakterijama. Zbog visoke razine dugih razgranatih masnih kiselina i povišenih razina O- i N-acetilnih skupina, ovaj LPS je vrlo hidrofoban. Međutim, važno je imati na umu da *L. pneumophila* nije rutinski upotrebljena bakterija kada govorimo o ispitivanju antimikrobne snage raznih produkata za razliku od *E. coli*, *S. aureus* ili *P. aeruginosa*. Stoga je lako shvatiti zašto postoji malo poznatih antilegionela sredstva dostupnih u literaturi. S druge strane, eterična ulja su vrlo aktivni protiv legionele, pogotovo kada se koriste u kombinacijama kada je potrebna puno manja koncentracija eteričnih ulja.

U svakom slučaju, potrebni su dodatni eksperimentalni podatci o mehanizmima djelovanja antimikrobnih sredstava na legionelu.

## 2. ZAKLJUČAK

Dobiveni podaci ovoga istraživanja ukazuju na veliku moć eteričnih ulja u razaranju i sprječavanju nastanka biofilmova legionele. Kombinacijom korištenja eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa reducirala se prisutnost i rast legionele u biofilmu u puno većoj mjeri nego li tretiranjem biofilma samo jednim od navedenih eteričnih ulja. Računanjem FIC vrijednosti odredio se tip interakcije između eteričnog ulja čajevca i limunskog eukaliptusa. Time dobivamo određene informacije koje govore u prilog tome da bi se eterična ulja u manjim koncentracijama, kombinirano mogla koristiti kao alternativna sredstva u tretiranju voda distribucijskog sustava. Osim razarajućeg učinka eteričnih ulja čajevca i limunskog eukaliptusa na biofilm ovim istraživanjem zamjećen je i inhibicijski učinak na samo stvaranje biofilma.

Nije ni čudno zašto se, s obzirom na visoku cijenu zdravstvenih računa i nuspojave konvencionalnih lijekova, dodavanjem eteričnih ulja u medicinu može napraviti velika razlika i napredak. To je osobito važno jer su prednosti eteričnih ulja velike i njihova se upotreba kreće u širokom spektru od aromaterapije, proizvoda za čišćenje kućanstva, njege, ljepote i tretmana prirodne medicine.

Međutim, kritička analiza ovdje prikazane literature otkriva da prirodne biomolekule mogu predstavljati snažne alate za biološku kontrolu *L. pneumophila* i njezinih prirodnih domaćina u industriji za pročišćavanje vode, iako su potrebni dodatni eksperimenti kako bi se pokazala učinkovitost tih antagonista u stvarnom okruženju.



### 3. LITERATURA

- (1) Victor L. Yu. Legionella Surveillance: Political and Social Implications—A Little Knowledge Is a Dangerous Thing. *The Journal of Infectious Diseases* 2002;185, str. 259
- (2) Mena Abdel-Nour, Carla Duncan, Donald E. Low, Cyril Guyard. Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*, *Int J Mol Sci.* 2013 Nov; 14(11): 21660–21675.
- (3) Thomas Hindré, Holger Brüggemann, Carmen Buchrieser, Yann Héchard. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. 2008, *Microbiology* 154: 30-41
- (4) en.wikipedia.org Dostupno na:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Legionella#Sources\\_of\\_Legionella](https://en.wikipedia.org/wiki/Legionella#Sources_of_Legionella)
- (5) Washington C. Winn Jr. **Legionella**. U: *Medical Microbiology*, 4th edition. Baron S, ur. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Poglavlje 40.
- (6) European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease (EWGLI). EWGLI Technical Guidelines for the Investigation, Control and Prevention of travel associated Legionnaires' diseases. UK: 2011, Str. 1-4.
- (7) World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis. Švicarska: World Health Organization; 2007. Str. 1-38.
- (8) Katie Laird, Elena Kurzbach, Jodie Score, Jyoti Tejpal, George Chi Tangyie, Carol Phillipsb. Reduction of *Legionella* spp. in Water and in Soil by a Citrus Plant Extract Vapor, *Appl Environ Microbiol.* 2014 Oct; 80(19): 6031–6036.
- (9) Tea Durjava. Določanje bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici. Diplomsko delo, univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odelek za živilstvo, Ljubljana 2016
- (10) Priscilla Declerck. Biofilms: the environmental playground of Legionella, *Environmental Microbiology* (2010) 12(3), 557–566

- (11) Antonija Mikrut. Značaj nadzora nad legionelama u turizmu, Turizam i zdravlje, Vol 3, Broj 10, 7. Travanj 2007.
- (12) "essential oil". Oxford English Dictionary (online, American English ed.). Dostupno na: [https://en.oxforddictionaries.com/definition/us/essential\\_oil](https://en.oxforddictionaries.com/definition/us/essential_oil)
- (13) Mallappa Kumara Swamy, Mohd Sayeed Akhtar, Uma Rani Sinniah. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review, Evid Based Complement Alternat Med. 2016; 2016: 3012462.
- (14) en.wikipedia.org Dostupno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Tea\\_tree\\_oil](https://en.wikipedia.org/wiki/Tea_tree_oil)
- (15) Thomas, J; Carson, C. F; Peterson, G. M; Walton, S. F; Hammer, K. A; Naunton, M; Davey, R. C; Spelman, T; Dettwiller, P; Kyle, G; Cooper, G. M; Baby, K. E (2016). "Therapeutic Potential of Tea Tree Oil for Scabies". The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (Review). 94 (2): 258–266.
- (16) "Tea tree oil". National Center for Complementary and Integrative Health, US National Institutes of Health.
- (17) Pazyar, N; Yaghoobi, R; Bagherani, N; Kazerouni, A (July 2013). "A review of applications of tea tree oil in dermatology". *International Journal of Dermatology*. **52** (7): 784–90.
- (18) en.wikipedia.org Dostupno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Cymbopogon\\_citratus](https://en.wikipedia.org/wiki/Cymbopogon_citratus)
- (19) Blanco MM, Costa CA, Freire AO, Santos JG, Costa M (March 2009). "Neurobehavioral effect of essential oil of Cymbopogon citratus in mice". *Phytomedicine*. **16** (2-3): 265–70.
- (20) Baby P. Skaria; P.P. Joy; Samuel Mathew; Gracy Mathew; Ancy Joseph; Ragina Joseph (2007). Aromatic Plants. 1. New Delhi, India: New India Publishing Agency. p. 103.

- (21) M. L. Faleiro. The mode of antibacterial action of essential oils, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Formatex 2011
- (22) Kabara JJ. Phenols and chelators. In: Russell NJ, Gould GW, eds. Food Preservatives. Glasgow, UK, Blackie, 1991: 200–214
- (23) Eisenhut M. The toxicity of essential oils. International Journal of Infectious Diseases. 2007; 11: 365-375.
- (24) Struna.hr Dostupno na: <http://struna.ihjj.hr/naziv/sinergija/18015/>
- (25) Gani Orhan, Aysen Bayram, Yasemin Zer, Iclal Balci. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*, J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43(1): 140–143.
- (26) Rogers J., Dowsett A. B., Dennis P. J., Lee J. V., Keevil C. W. (1994). Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol. 60 1585–1592.
- (27) Donlan R. M., Costerton J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15 167–193. 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- (28) Jjemba P. K., Johnson W., Bukhari Z., LeChevallier M. W. (2015). Occurrence and control of *Legionella* in recycled water systems. Pathogens 4 470–502. 10.3390/pathogens4030470
- (29) Kim B. R., Anderson J. E., Mueller S. A., Gaines W. A., Kendall A. M. (2002). Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res.* 36 4433–4444.

- (30) Cooper I. R., Hanlon G. W. (2010). Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J. Hosp. Infect.* 74 152–159.
- (31) Sanli-Yurudu N. O., Kimiran-Erdem A., Cotuk A. (2007). Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 147–153
- (32) Dorman H. J., Deans S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 308–316.
- (33) 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.
- (34) Laird K., Kurzbach E., Score J., Tejpal J., Chi Tangyie G., Phillips C. (2014). Reduction of *Legionella* spp. in water and in soil by a citrus plant extract vapor. *Appl. Environ. Microbiol.* 806031–6036.
- (35) Jean-Marc Berjeaud, Sylvie Chevalier, Margot Schlusshuber, Emilie Portier, Clémence Loiseau, Willy Aucher, Olivier Lesouhaitier, and Julien Verdon. *Legionella pneumophila: The Paradox of a Highly Sensitive Opportunistic Waterborne Pathogen Able to Persist in the Environment.* *Front Microbiol.* 2016; 7: 486.
- (36) Chaftar N., Girardot M., Quellard N., Labanowski J., Ghrairi T., Hani K., et al. (2015b). Activity of six essential oils extracted from tunisian plants against *Legionella pneumophila*. *Chem Biodivers.* 121565–1574.
- (37) Shevchuk O., Jager J., Steinert M. (2011). Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol.* 2:74

#### 4. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Lucia Bićanić, rođena sam 21.04.1994. u Rijeci, Republika Hrvatska. Živim u Rijeci, na Srdočima pod adresom Vladimira Čerine 21, 51000 Rjeka. E-mail adresa mi je [lucia.bicanic@gmail.com](mailto:lucia.bicanic@gmail.com).

Godine 2009. upisala sam Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju koju sam završila 2013. godine. Nakon položene mature, 2013/14. godine upisala sam preddiplomski sveučilišni studiji sanitarnog inženjerstva na Medicinskom Fakultetu u Rijeci. U 9. Mjesecu 2016 godine obranom rada stekla sam titulu bacc.san.ing, te sam upisala diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na istom fakultetu.

Od 2016. Godine vodila sam projekt „Čiste ručice“. Sudjelovala sam kao aktivni sudionik na Internom simpoziju MEDRI znanstveni PIKNIK 2016.godine, dok sam 2017. Godine sudjelovala kao pasivni sudionik na istoimenom simpoziju. Radila sam kao organizator na „Sedma Nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – Kako dalje?“. Bila sam dopredsjednica organizacijskog odbora STUDENTSKOG KONGRESA ZAŠTITE ZDRAVLJA – SANITAS 2018, aktivno sudjelovala na istoimenom kongresu te sam dobila nagradu za najbolju poster prezentaciju na Studentskom kongresu zaštite zdravlja Sanitas 2018.