

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE UNIVERZALNOG SREDSTVA ZA ČIŠĆENJE THIEVES NA BAKTERIJE RODA Staphylococcus I Acinetobacter

Kancijan, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:184:752593>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Kancijan

**ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE UNIVERZALNOG SREDSTVA ZA ČIŠĆENJE
THIEVES NA BAKTERIJE RODA *Staphylococcus* I *Acinetobacter***

Završni rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Kancijan

**ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE UNIVERZALNOG SREDSTVA ZA ČIŠĆENJE
THIEVES NA BAKTERIJE RODA *Staphylococcus* I *Acinetobacter***

Završni rad

Rijeka, 2020.

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

ZAHVALE

U prvom redu zahvaljujem se svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Gobin, dipl.sanit.ing., na brojnim idejama, smjernicama i savjetima te ukazanom strpljenju i vremenu. Hvala joj na velikoj pomoći, znanju koje je prenijela te mogućnosti da od nje učim.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, dečku i prijateljima koje su studiranje učinili puno ljepšim, zabavnijim i lakšim.

Sažetak

Alternativna antimikrobna sredstva koja posjeduju dezinfekcijska svojstva zauzimaju sve veću pažnju u usporedbi s tradicionalnim dezinfekcijskim sredstvima. Alternativna sredstva često se smatraju manje toksičnima, ekološki prihvatljivijima i prirodnijima. U ovu skupinu spada i Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje. Ključni sastojci ovog sredstva su neionski površinski aktivni agensi, anionski tenzidi i esencijalno ulje Thieves. Eterično ulje Thieves je terapijska kombinacija 5 esencijalnih ulja: *Eugenia caryophyllus* (klinčić), *Citrus limon* (limun), *Cinnamomum zeylanicum* (cimet), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin) i *Eucalyptus radiata* (eukaliptus). Ova koncentrirana formula pogodna za gotovo svaku površinu uključujući tepihe, podove, staklo i zidove.

Cilj ovoga rada bio je ispitati antibakterijsko djelovanje univerzalnog sredstva za čišćenje Thieves na bakterije roda *Staphylococcus aureus* i *Acinetobacter baumannii*.

Korištene su dvije metode: metoda difuzije u agar iz rupica i metoda određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu u kojem je mjerena je djelotvornost tri različito pripremljene otopine u vremenskom rasponu od 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 minuta. Ispitivale su se tri različita pripravka, Thieves i ocat, Thieves i voda te voda i ocat. Sva tri pripravka pokazuju različite antimikrobni učinak. Otopina a) (Thieves i voda) pokazuje najslabije antibakterijsko svojstvo, dok otopina b) (Thieves i ocat) pokazuje najjače antibakterijsko svojstvo prema svim sojevima.

Zaključno, Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje pokazuje značajni antimikrobni učinak na bakterije roda *Staphylococcus* i *Acinetobacter*, posebice kombinacija Thieves-a i octa te samim time ima veliki potencijal kao alternativno sredstvo za čišćenje koje može zamijeniti grube kemikalije.

Ključne riječi

Thieves, antibakterijski učinak, eterična ulja

Summary

Compared with traditional disinfectants, alternative antimicrobials have been given increasingly more attention. Alternative agents are often considered less toxic, more environmentally friendly and more natural. This group includes Thieves Household Cleaner. The key ingredients of this cleaner are non-ionic surface active agents, anionic surfactants and Thieves Essential Oil. Thieves Essential Oil is a therapeutic combination of 5 essential oils: *Eugenia caryophyllus* (clove), *Citrus limon* (lemon), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) i *Eucalyptus radiata* (eucalyptus). This concentrated formula is suitable for almost every surface, including carpets, floors, glass and walls.

The aim of this research was to examine the antibacterial effect of the universal cleaning agent Thieves on bacteria of the genera *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*.

Two methods were used: the method of diffusion into agar from the holes and the method of determining antimicrobial activity at a given time in which the efficacy of three differently prepared solutions was measured in a time range of 1, 3, 5, 10, 15, 20, and 30 minutes. Three different solutions were used: Thieves and vinegar, Thieves and water, and water and vinegar. All three solutions show different antimicrobial effects. Solution a) (Thieves and water) exhibits the weakest antibacterial property, while solution b) (Thieves and vinegar) exhibits the strongest antibacterial properties for all strains.

In conclusion, Thieves Household Cleaner shows significant antimicrobial effects on bacteria of the genera *Staphylococcus* and *Acinetobacter*, especially the combination of Thieves and vinegar, and thus has great potential as an alternative cleaning agent that can replace coarse chemicals.

Keywords

Thieves, antibacterial effect, essential oils

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1	Sredstva za čišćenje (dezinficijensi).....	1
1.2	Eterična ulja.....	2
1.2.1	Kemijski sastav esencijalnih ulja.....	2
1.2.2	Antimikrobni učinci esencijalnih ulja	4
1.2.3	Mehanizam antibakterijskog djelovanja esencijalnih ulja.....	4
1.3	Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje.....	6
1.4	Rod <i>Staphylococcus</i>	9
1.5	Rod <i>Acinetobacter</i>	10
2.	Cilj istraživanja	11
3.	Materijali i metode	12
3.1	Materijali	12
3.1.1	Laboratorijski pribor i uređaji	12
3.1.2	Thieves i njegova priprema	12
3.1.3	Mikroorganizmi.....	13
3.2	Metode.....	13
3.2.1	Priprema bakterijske suspenzije	13
3.2.2	Metoda difuzije (rupe u agaru).....	13
3.2.3	Metoda određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu (testiranje efikasnosti sredstva)	14
3.2.4	Očitavanje dobivenih rezultata.....	15
3.2.5	Računanje postotka inhibicije za 30 minuta.....	16
4.	Rezultati	17
4.1	Određivanje antibakterijskog djelovanja Thieves-a metodom difuzije u agar iz rupica	17
4.2	Određivanje antibakterijskog djelovanja Thieves-a testiranjem efikasnosti sredstva u određenom vremenu	18
4.3	Cjelokupni pregled rezultata.....	23
5.	Rasprava	25
6.	Zaključak	27
7.	Literatura	28
8.	Životopis	30

1. UVOD

Početak korištenja dezinfekcijskih sredstva seže u prošlost, kada se počinje otkrivati bitna primjena u preventivnoj medicini, a i dalje u općoj praksi. Shvaćanje dezinfekcijskih postupaka i sredstva nužnim unaprijedilo je higijenu i poboljšalo životni standard te na taj način spasilo živote velikog broja ljudi.

1.1 Sredstva za čišćenje (dezinficijensi)

Cilj kemijske dezinfekcije je svesti broj patogenih mikroorganizama na prihvatljivu razinu bilo inaktivacijom ili ubijanjem. Idealan univerzalni dezinficijens trebao bi imati određena i poželjna obilježja, a Bodenschatz (1989) ih navodi kao: brz i jak mikrobicidan učinak sa širokim spektrom djelovanja; stabilan prema fizikalnim, kemijskim i biološkim utjecajima; ne smije biti toksičan i ne smije imati izražen miris; mora biti dobro topljiv, dobro reagirati s različitim tvarima te mora biti cjenovno prihvatljiv.(1) Pri izboru dezinficijensa treba obratiti pažnju na nekoliko bitnih kriterija koje je sustavno složio Bodenschatz (1989):

1. širina područja i spektar učinka
2. područje uporabe
3. toksičnost i podnošljivost kože i sluznica
4. ekološka podnošljivost
5. oblici uporabe
6. koncentracija
7. odnos prema bjelančevinama
8. odnos prema zaštitnoj tvari
9. vrijeme učinka
10. odnos prema pH
11. odnos prema temperaturi
12. inaktivacija sredstvima za čišćenje
13. odnos prema vlazi
14. stabilnost
15. korozivnost

Sve veću pažnju zauzimaju alternativna antimikrobna sredstva koja posjeduju dezinfekcijska svojstva usporediva s tradicionalnim dezinfekcijskim sredstvima i klasičnim sredstvima za dezinfekciju. Alternativni agensi često se smatraju manje toksičnima, ekološki prihvatljivijima i prirodnijima. Alternativni agensi koji se mogu koristiti uključuju: ulje čajevca, ulje timijana, vodu s elektrolizom, ozoniranu vodu, proizvode na bazi srebra, ocat (octena kiselina), limunov sok (limunska kiselina), sodu bikarbonu i krpe od mikrofibre. Naravno, za svaki navedeni alternativni agens postoje prednosti i nedostaci. Za razliku od registriranih dezinfekcijskih sredstava, mnoga alternativna sredstva nemaju identifikacijski broj lijeka (DIN).(2)

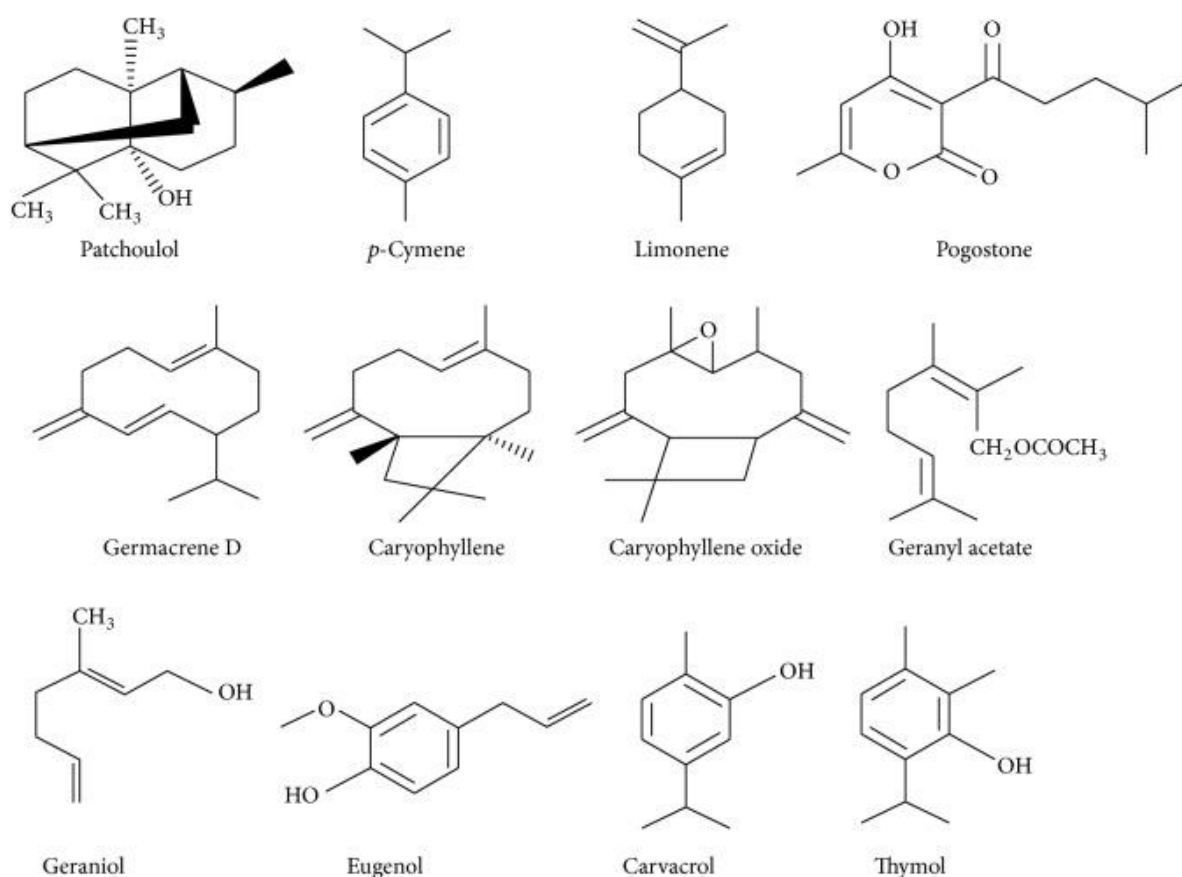
1.2 Eterična ulja

Eterična ulja su koncentrirane, biološki aktivne i hlapljive tekućine obično topljive u alkoholu, nepolarnim ili slabo polarnim otapalima, voskovima i uljima. Eterična ulja je moguće izolirati iz različitih biljaka i različitih dijelova biljke. Najčešće su to korijen, stabljika, list, cvijet i plod. Najveći dio njihovog sastava čine terpeni, ugljikovodici ugodnog mirisa. Na njihov sastav utječe više faktora kao što su mjesto rasta, kultivacija i uvjeti rasta. Upravo zbog toga su postavljeni rasponi tj. norme kojima se definira koliko glavnih ili karakterističnih spojeva neko ulje u sebi treba sadržavati. Veliku ulogu igra vrijeme kada se biljke ubiru za proizvodnju eteričnog ulja. Osim vremena, važna je osunčanost biljke, gnojivo u kojem raste, temperatura i klima i sama obrada biljke nakon ubira.(3) Aromatična priroda esencijalnih ulja dobivenih iz biljaka nastaje zbog mješavine različitih kemijskih tvari koje pripadaju različitim kemijskim porodicama, uključujući terpene, aldehide, alkohole, estere, fenolne, etere i ketone. Antimikrobni učinci esencijalnih ulja i njihovih kemijskih komponenti prepoznali su u prošlosti od strane nekoliko istraživača (4). Nadalje, studije su pokazale sinergistički učinak bilo koja dva ili više sastojaka esencijalnih ulja protiv različitih ljudskih patogena (3).

1.2.1 Kemijski sastav esencijalnih ulja

Eterična ulja imaju sposobnost spriječiti rast velikog spektra patogenih mikroorganizama zbog prisutnosti prirodnih spojeva koje proizvode biljni organi. Ono što je bitno, jedinstvena aroma i druga bioaktivna svojstva esencijalnog ulja ovise o njegovim kemijskim sastojcima. Općenito, kemijski sastav esencijalnih ulja je vrlo složen. Većina esencijalnih ulja sastoji se od terpena, terpenoida i drugih aromatičnih i alifatskih sastojaka s niskom molekularnom težinom.(3)

Terpeni se sastoje od izoprenskih jedinica čija je kemijska formula $(C_5H_8)_n$. Zbog velike raznolikosti u kemijskoj strukturi terpeni su svrstani u nekoliko skupina kao što su monoterpeni ($C_{10}H_{16}$), seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$), diterpeni ($C_{20}H_{32}$) i triterpeni ($C_{30}H_{40}$). Monoterpeni čine glavnu komponentu (~90%) bioaktivnih esencijalnih ulja. Kemijski sastojci biljnih esencijalnih ulja razlikuju se po vrstama. Neki čimbenici koji mogu utjecati na te sastavne dijelove uključuju zemljopisni položaj, okoliš i stadij zrelosti. Ova kemijska razlika izravno je povezana s razlikama u antimikrobnim aktivnostima protiv različitih patogenih mikroorganizama. Na primjer, pokazalo se da se glavni kemijski sastojci eteričnog ulja origana (karvakrol i timol) razlikuju po podrijetlu, kao i prema antimikrobnim svojstvima.(3)



Slika 1. Strukture nekih važnih kemijskih spojeva esencijalnih ulja

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206475/>)

1.2.2 Antimikrobni učinci esencijalnih ulja

Rezistencija bakterija, upotreba dezinficijensa i moguće toksično djelovanje na ljude potaknulo je znanstvenike da istražuju nove alternativne protiv različitih bakterijskih sojeva. U tom smislu, biljna esencijalna ulja i njihovi glavni kemijski sastojci potencijalni su kandidati kao antibakterijska sredstva. Učinak antibakterijskog djelovanja esencijalnih ulja može se odvijati na dva načina: inhibicija rasta bakterija (bakteriostatski) ili uništavanje bakterijske stanice (baktericidno). Bakteriostatsko djelovanje ima reverzibilan karakter što znači da će se nakon prestanka djelovanja eteričnog ulja stanice mikroorganizama oporaviti i ponovno početi razmnožavati. S druge strane, baktericidno djelovanje imat će trajni učinak jer će se time mikroorganizmi u potpunosti uništiti i neće biti sposobni za ponovan rast i razmnožavanje. Nekoliko je faktora koji će utjecati na samu aktivnost eteričnih ulja, a to su: medij kulture, mikrobne vrste, metoda ekstrakcije, pH vrijednost, topljivost eteričnog ulja u kulturi i temperatura. Od izuzetne je važnosti imati spoznaju o ciljnom mjestu komponenta eteričnog ulja na stanicu.(5)

Učinkovitost esencijalnih ulja razlikuje se od vrste do vrste, kao i protiv različitih ciljnih bakterija, ovisno o njihovoj strukturi (gram-pozitivne i gram-negativne bakterije). Na primjer, ulja sandalovine i vetivera pokazuju veću inhibitornu aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija; međutim, oni ne uspijevaju inhibirati gram-negativne bakterijske sojeve. Pokazalo se da esencijalna ulja cimeta, klinčića, pimento, timijan, origano i ružmarin posjeduju snažno antibakterijsko djelovanje protiv *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ulje klinčića pronađeno je kao najefikasnije među svim ispitivanim esencijalnim uljima. Antimikrobni učinak ovih ulja povezan je s nastankom glavnih spojeva kao što su karvakrol, timol, cinamaldehyd, eugenol i p-cimen. Inhibicijski učinak ovih ulja uglavnom je povezan s pojavom eugenola i cinamaldehyda u esencijalnim uljima.(3)

1.2.3 Mehanizam antibakterijskog djelovanja esencijalnih ulja

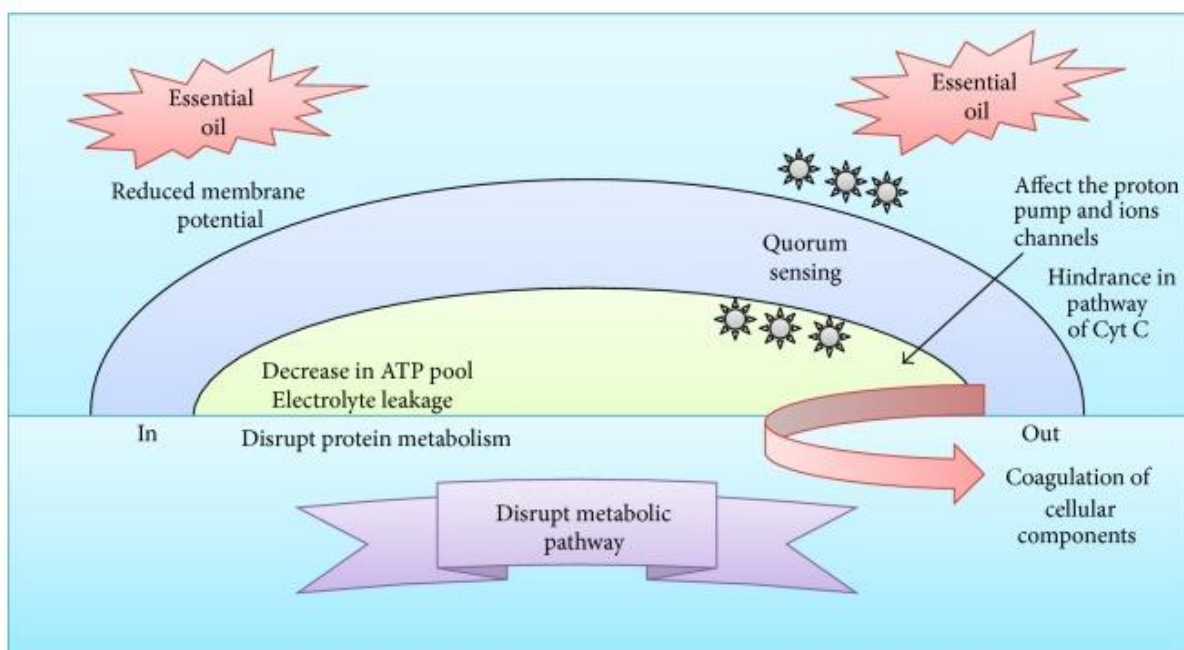
Esencijalna ulja sadrže nekoliko vrsta kemijskih sastojaka s antimikrobnim svojstvima, a sintetizirani su kako bi zaštitili biljke od mikroorganizama. Antimikrobna svojstva esencijalnih ulja uglavnom ovise o njihovim kemijskim sastojcima i količini glavnih pojedinačnih spojeva. Ovi kemijski spojevi se izlučuju nizom molekulskih interakcija pod specifičnim uvjetima biotičkog/abiotičkog stresa. Svaki spoj može pokazati različit mehanizam djelovanja protiv mikroorganizama. Mehanizam antibakterijskog djelovanja odvija se nizom biokemijskih

reakcija u bakterijskoj stanici, koje ovise o vrsti kemijskih sastojaka koji se nalaze u esencijalnom ulju. Antibakterijsko djelovanje esencijalnih ulja također se razlikuje zbog različite bakterijske strukture, poput gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, koje se razlikuju po sastavu stanične membrane.(3)

Predloženi su različiti mehanizmi antibakterijskog djelovanja esencijalnih ulja. Esencijalna ulja u prvom redu destabiliziraju staničnu strukturu, što dovodi do uništavanja membrane i povećane propusnosti na taj način narušavajući mnoge stanične aktivnosti kao na primjer: proizvodnju energije, transport kroz membranu i druge metaboličke regulatorne funkcije. Poremećaj stanične membrane esencijalnim uljima može usporiti ili u potpunosti prekinuti razne vitalne procese kao što su procesi pretvorbe energije, obrada hranjivih tvari, sinteza strukturnih makromolekula i izlučivanje regulatora rasta. Eterična ulja mogu utjecati i na vanjsku ovojnica stanice i na citoplazmu. Zbog svoje lipofilne prirode esencijalna ulja vrlo lako mogu prodrijeti kroz stanične membrane bakterija. Zabilježeno je da esencijalna ulja različitih biljaka uzrokuju povećanu propusnost bakterijske stanice što dovodi do istjecanja staničnih komponenata i gubitka iona. Antibakterijski učinak esencijalnih ulja povezan je i sa smanjenim membranskim potencijalima, poremećajem protonskih pumpi i iscrpljivanjem ATP-a. Ova promjena u staničnoj organizaciji može uzrokovati kaskadni učinak, uslijed čega mogu nastradati i ostale stanične organele. Također, esencijalna ulja prolaze kroz staničnu stijenu i citoplazmatsku membranu, što može poremetiti raspored različitih molekula masnih kiselina, fosfolipida i polisaharida.(3)

Antibakterijski učinak sastojaka esencijalnog ulja poput timola, mentola i linalil acetata nastaje zbog poremećaja lipidnih frakcija bakterijskih membrana plazme što može utjecati na propusnost membrane i izazvati istjecanje unutarstaničnih materijala. Karvakrol je hidrofobni spoj koji utječe na stanične membrane mijenjajući sastav masnih kiselina, koji tada utječu na fluidnost i propusnost membrane, ali još uvijek nije u potpunosti jasan njegov mehanizam djelovanja. Još jedan učinak esencijalnih ulja na stanične membrane je inhibicija izlučivanja toksina. Ultee i Smid (6) istražili su da je izloženost *B. cereus* karvakrolu rezultirala inhibicijom proizvodnje toksina, a primjena esencijalnog ulja origana potpuno je ukinula proizvodnju enterotoksina *S. aureus*. Izlučivanje toksina može se spriječiti modifikacijama u bakterijskoj membrani zbog utjecaja spojeva esencijalnog ulja na proces transmembranskog transporta u plazma membrani što ograničava oslobađanje toksina u vanjsko okruženje. Na proteine vanjske membrane također utječu komponente esencijalnog ulja. Karvakrol također može inhibirati sintezu flagelina, mikrobnog proteina potrebnog za bakterijsku pokretljivost. Fenilpropen i

eugenol, također pokazuje modificirajuću aktivnost zbog koje dolazi do promijene citoplazmatske membrane različitih bakterija. Pored toga, on može uništiti različite bakterijske enzime kao što su ATP-aza, amilaza, histidin karboksilaza i proteaze. Isto tako, istraženo je da cinamaldehyd inhibira enzime ATP-aze i remeti vanjsku staničnu membranu. Druge studije otkrile su da vanilin pokazuje antimikrobno djelovanje ometajući puteve bakterijskog disanja i ometajući protok K^+ iona i gradijent pH. Uz sve to, neka esencijalna ulja mogu inhibirati mrežu za prepoznavanje kvoruma između stanica posredovanih različitim signalnim molekulama bakterija.(3)



Slika 2. Antimikrobni mehanizmi esencijalnih ulja na mikrobe

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206475/>)

1.3 Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje

Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje nastalo je pod utjecajem američke kompanije Young Living. Cilj ovog sredstva za čišćenje je pranje, odmaščivanje, čišćenje mrlja, prašine i ostalog, a sve bez grubih i štetnih kemikalija. Proizvođač navodi da je Thieves sredstvo za čišćenje sigurno za djecu, kućne ljubimce, pa i okoliš. Ključni sastojci ovog sredstva su neionski površinski aktivni agensi (alkilni poliglukozid), anionski tenzidi (natrijev metil-2 sulfolaurat, dinatrijev 2-sulfolaurat) i esencijalno ulje Thieves. Eterično ulje Thieves je terapijska

kombinacija 5 esencijalnih ulja: klinčić, cimet, limun, ružmarin i eukaliptus. Sam proizvođač navodi sastojke ovog univerzalnog sredstva za čišćenje, a to su: voda, alkil poliglukozid, natrijev metil-2 sulfolaurat, *Eugenia caryophyllus* (klinčić), *Citrus limon* (limun), tetrasodium glutamat diacetat, *Cinnamomum zeylanicum* (cimet), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Eucalyptus radiata* (eukaliptus), dinatrijev 2-sulfolaurat. Ova koncentrirana formula pogodna za gotovo svaku površinu uključujući tepihe, podove, staklo i zidove. Proizvođač navodi da je ovo sredstvo neabrazivno, učinkovito i korisno za čišćenje bez opasnih kemikalija. Formula je na bazi biljaka i sigurna za septičke sustave. Potrebno je izbjegavati kontakt s očima te čuvati na hladnom i tamnom mjestu.(7)

Tablica 1. Eterična ulja i njihove karakteristike

Eterično ulje		Dio koji se koristi	Kemijski sastav	Mikroorganizam i protiv kojih djeluje	Mehanizam djelovanja	Reference
Latinski naziv	Hrvatski naziv					
<i>Eugenia caryophyllus</i>	klinčić	Cvjetni pupovi, listovi, stabljika	eugenol, acetil eugenol, β -kariofil, vanilin, tanini	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> <i>P. aeruginosa</i>	Izaziva lizu bakterija unutar biofilma; promjena citoplazmatske membrane; uništavanje različitih bakterijskih enzima (ATPaza, amilaza, histidin karboksilaza i proteaze)	(3) (10)
<i>Citrus limon</i>	limun	Kora	D-limonen, β -pinen, γ -terpinen, citral	<i>E. faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>H. pylori</i>	Inhibira enzime potrebne za proizvodnju energije u bakterijskoj stanici; mijenja propusnost stanice; inhibira sintezu RNA	(14) (15) (17)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	cimet	Kora, lišće	cinamaldehyd	<i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Razara staničnu membranu	(3) (11)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	ružmarin	Lišće, cvjetni vrhovi biljke	kamfor, α -pinen, 1,8-cineol, verbenon, borneol	<i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Inhibira stvaranje biofilma; sprječava adheziju planktonskih stanica; blokira kolonizaciju mikroba	(3) (16) (17)
<i>Eucalyptus radiata</i>	eukaliptus	Lišće, grančice	1,8-cineole, α -pinen, 3-metilbutanal, izoamil izovalerat	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i>	Inhibitor quorum sensinga	(12) (13) (17)

1.4 Rod *Staphylococcus*

Stafilokoki su gram-pozitivni koki koji najčešće formiraju nakupine u obliku grozdova. Ne posjeduju flagele, nepokretni su i asporogeni te za razliku od streptokoka produciraju katalazu. Otporni su na isušivanje zbog stanične stijenke u kojoj se nalaze peptidoglikan i teikoična kiselina. Oni su fakultativni anaerobi, ali najbolje rastu aerobno na temperaturi između 18 i 40°C. Najčešći bakterijski patogen u ljudi je *Staphylococcus aureus* koji se može naći u nosnom vestibulu, na vlažnim dijelovima kože te kao normalna mikrobiota u probavnom sustavu. Karakteristika koja ga izdvaja od ostalih vrsta u rodu *Staphylococcus* je produkcija koagulaze. *S. aureus* je osjetljiv na povišenu temperaturu, na dezinficijense koji se primjenjuju u bolnicama, ali mogu preživjeti duže vrijeme na suhim površinama. Stafilocoki mogu rasti u prisustvu visokih koncentracija soli, kao i u prisustvu visokih koncentracija šećera, što omogućuje rast u različitoj vrsti hrane. Sposobnost lučenja egzotoksina *S. aureus* u hrani uzrokuje gastrointestinalne simptome, primarno povraćanje. Lako se prilagođava na različite situacije, a osobito lako stječe rezistenciju na antibiotike kao npr. na penicilin. Također, po svojoj rezistenciji je poznata i MRSA, odnosno, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* koji je postao velik problem u bolničkom liječenju i zdravstvenoj skrbi. Čest je uzročnik bakterijemije s ishodištem u plućima, mokraćnom sustavu, probavnom sustavu te nakon kirurških zahvata. Ostali koagulaza negativni stafilocoki nalaze se kao dio normalne mikrobiote na koži, u probavnom i spolno-mokraćnom sustavu, ali mogu uzrokovati bolest u imunokompromitiranih osoba. Mogu kontaminirati proteze tijekom implantacije ili se proširiti u krv.(8)



Slika 3. *S. aureus* na krvnom agaru (<https://www.researchgate.net/figure/>)

1.5 Rod *Acinetobacter*

U rod *Acinetobacter* ubrajamo gram-negativne, aerobne, nepokretne kokobacile koji su prisutni u vodi i tlu. Oni su katalaza pozitivni, oksidaza negativni te posjeduju polisaharidnu kapsulu koja im zajedno s fimbrijama omogućuje adheraciju na ljudske epitelne stanice. Ne posjeduju flagele što znači da su nepokretni. Uzgajaju se na hranjivim podlogama poput krvnog agara na 37°C, inkubiraju se u vremenu od 18 do 24 sata. *Acinetobacter* spp. je ubikvitarni mikroorganizam, uzročnik je hospitalnih infekcija, naročito u jedinicama intenzivnog liječenja. Jedna od njegovih karakteristika je da ima iznimnu mogućnost stvaranja rezistencije. Mnogi sojevi *Acinetobacter* spp. rezistentni su na -laktame širokog spektra poput cefalosporina treće generacije, karboksipeniciline i karbapeneme. Među najčešće izoliranom vrstom je *Acinetobacter baumannii*, uzročnik različitih bolničkih infekcija i najrezistentnija je među pripadnicima roda. *Acinetobacter* spp. je oportunistički patogen koji uzrokuje urinarne i respiratorne infekcije, također infekcije rana te može uzrokovati postoperativni meningitis i sepsu. Kao što je već spomenuto, *Acinetobacter* spp je ubikvitaran, što znači da se može naći u gotovo svim uzorcima tla i vode, a također mogu dio mikrobiote kože i sluznica u ljudi. Imaju mogućnost preživljavanja na vlažnim, ali također i na suhim površinama poput kože ili čestica prašine, što je uobičajena karakteristika gram-negativnih bakterija. S obzirom na osobine ovog najprije bolničkog patogena, pozornost je usmjerena na sprječavanje širenja provođenjem kontrole infekcija i obavezne mjere prevencije.(8)



Slika 4. *Acinetobacter* spp. na krvnom agaru
(<http://www.medical-labs.net/acinetobacter-1839/>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada bio je ispitati antibakterijsko djelovanje tri prethodno pripremljene otopine koje se sastoje od univerzalnog sredstva za čišćenje Thieves, vode i octa, pripremljene u različitim omjerima i koncentracijama. U izradi ovog završnog rada koristile su se bakterije roda *Staphylococcus* (*S. aureus* i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) i *Acinetobacter* (*A. baumannii* ATCC 1605 i *A. baumannii* ATCC 19606).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Laboratorijski pribor i uređaji

- Sterilni brisni štapići
- Epruvete
- Mikrobiološke ušice (“eze”)
- Petrijeve zdjelice
- Metalni cilindar
- Spektrofotometar
- Inkubator
- Plamenik
- Tresilica
- Automatske pipete: 10-1000 μL i 0,5-10 μL , 2-20 μL , 20-100 μL , 20-200 μL
- Nastavci za automatske pipete

3.1.2 Thieves i njegova priprema

Za provedbu pokusa korišteno je Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje, a uzorci su pripremljeni na sljedeće načine:

a) Thieves i voda

U sterilnu pipetu s čepom volumena 50 mL dodano je 0,5 mL Thieves-a i 49,5 mL vode, odnosno do oznake. Zatim je otopina sterilizirana filtriranjem.

b) Thieves i ocat

U sterilnu pipetu s čepom volumena 50 mL dodano je 0,5 mL Thieves-a, 10 mL octa i 39,5 mL vode, odnosno do oznake. Zatim je otopina sterilizirana filtriranjem.

c) Ocat i voda

U sterilnu pipetu s čepom volumena 50 mL dodano je 10 mL octa i 40 mL vode, odnosno do oznake. Zatim je otopina sterilizirana filtriranjem.

3.1.3 Mikroorganizmi

Za istraživanje su se koristile bakterije roda *Staphylococcus* – *Staphylococcus aureus* i MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) te bakterije roda *Acinetobacter* – *Acinetobacter baumannii* ATCC 1605 i *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Oba bakterijska soja su nasadljena na Müeller Hinton agar te se skladište u tami i na temperaturi od 4 °C. Nasađivane su na krvne agare i Müeller Hinton agar te inkubirane 24 sata/37°C. Kako bi se bakterije koristile u ispitivanju potrebno ih je pomoću plastične mikrobiološke ušice (eze) pokupiti s hranjive podloge te prenijeti u medij kako bi se napravila bakterijska suspenzija.

3.2 Metode

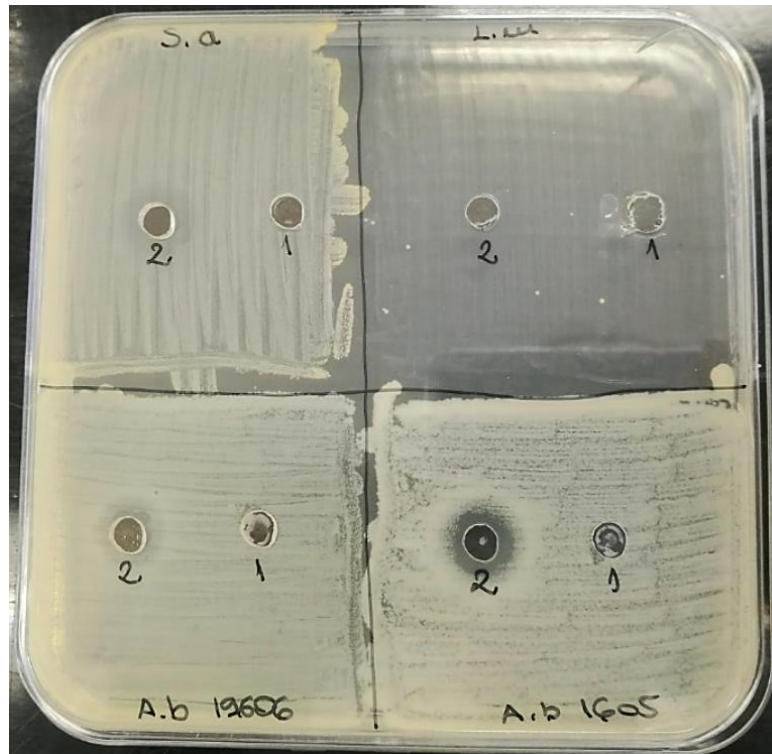
3.2.1 Priprema bakterijske suspenzije

Nakon što su porasle kolonije na Müeller Hinton agaru, 1-5 kolonija je pikirano ezom i razmućeno u 2 mL vode iz slavine. Izmjeren je turbiditet suspenzije kako bi se odredila količina bakterija na sljedeći način: u plastičnu kivetu za spektrofotometriju dodano je 500 µL sterilne vode te je ta kiveta očitana kao slijepa proba. Nakon toga u drugu plastičnu kivetu za spektrofotometriju dodano je 500 µL pripremljene bakterijske suspenzije kako bi se izmjerila apsorbancija, odnosno optička gustoća. Turbiditet se mjeri spektrofotometrom na 500 nm, a apsorbancija određuje gustoću, odnosno količinu bakterija u suspenziji, a konačna suspenzija mora biti 10^5 bakterija. Konačna suspenzija od 10^5 bakterija dobila se miješanjem 990 µL vode iz slavine i 10 µL primarne suspenzije. Takva suspenzija se dalje koristi u metodi difuzije u agar iz rupica i u metodi određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu.

3.2.2 Metoda difuzije (rupe u agaru)

Koristi se Müeller Hintonov agar. Na Müeller Hintonov agar se pomoću brisnog štapića nasadila ispitivana bakterijska kultura te se podloga inkubirala 30 minuta kako bi se suspenzija upila u podlogu. Rupe na agaru su napravljene metalnim cilindrom koji je prethodno steriliziran na plamenu, a promjer rupe iznosi 6 mm. U izbušene rupe dodano je 30 µl prethodno pripremljenih otopina i zatim je slijedila inkubacija od 24 sata na 37°C. Nakon inkubacije očitavaju se zone inhibicije u milimetrima. U slučaju inhibitornog djelovanja određene otopine na rast bakterija, područje oko otvora bit će veće od 6 mm. Rezultati su kvalitativni, a služe

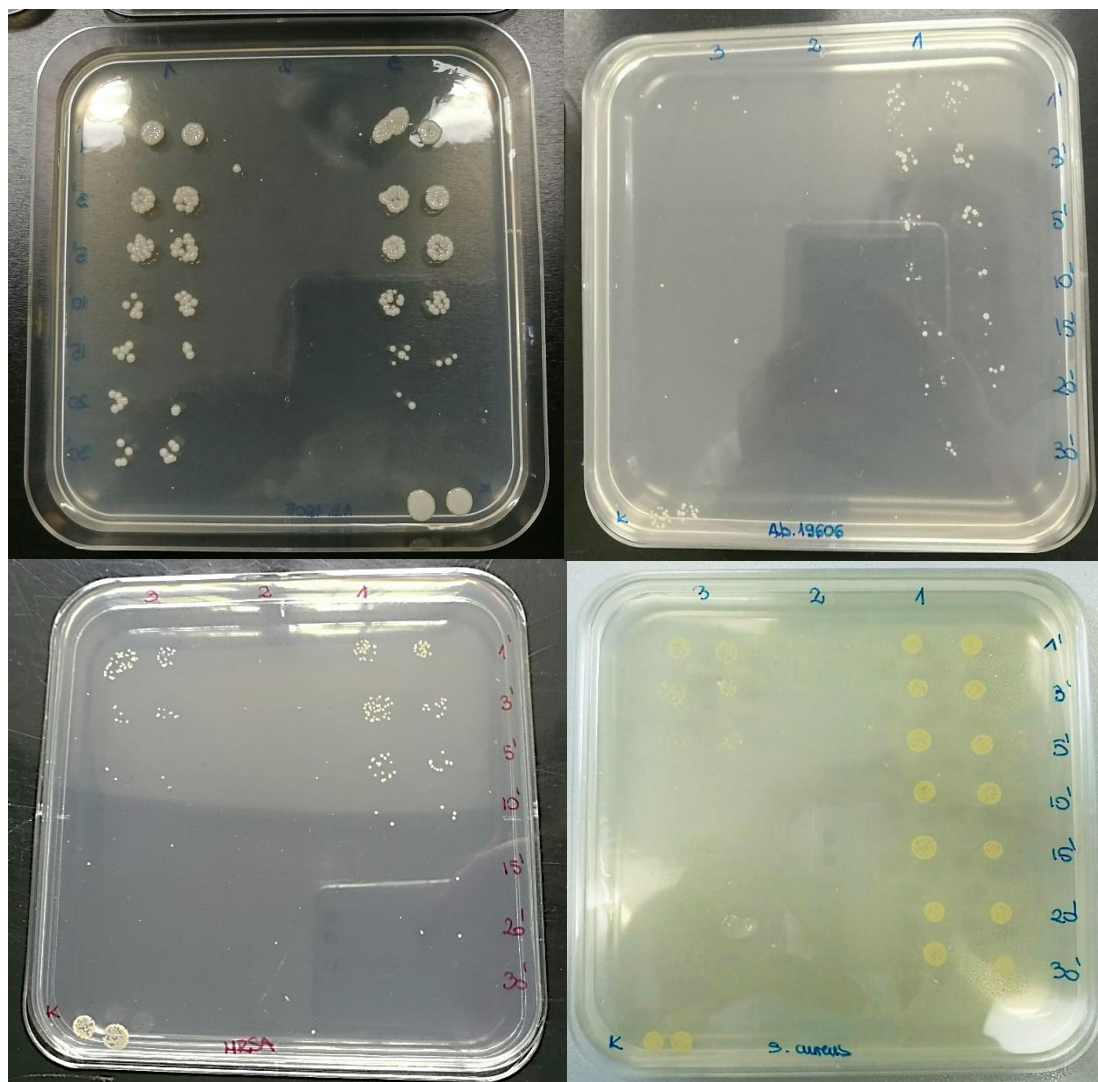
samo kako bi vidjeli pokazuje li mikroorganizam osjetljivost ili otpornost na ispitivanu tvar. Rezultati se očitavaju na način da se mjeri zona inhibicije oko rupice s otopinom (Slika 5.).



Slika 5. Prikaz metode difuzije u agar iz rupica

3.2.3 Metoda određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu (testiranje efikasnosti sredstva)

Pripremljena je radna otopina koja se sastojala od 0,5 mL otopine i 0,5 mL bakterijske suspenzije. Na Müller Hintonov agar, podijeljenom u 3 dijela (stupca), nanoseno je 10 μ L radne otopine nakon 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 30 minuta. Prvi stupac je sadržavao kombinaciju Thievs-a i vode, drugi stupac je sadržavao kombinaciju Thieves-a i octa razrijeđenog s vodom, dok je treći stupac je sadržavao kombinaciju octa i vode. U samom donjem uglu na agaru se nalazi kontrola (oznaka K) da bi mogli lakše uočiti djelotvornost samih otopina. Nakon toga hranjiva podloga je stavljena na inkubaciju 24 sata na 37°C.



Slika 6. Prikaz metode određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu za bakterije *A. baumannii* 1605, *A. baumannii* 19606, MRSA i *S. aureus*

3.2.4 Očitavanje dobivenih rezultata

Nakon 24-satne inkubacije očitani su dobiveni rezultati na hranjivima agarima na kojima su bili nasađeni *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Acinetobacter baumannii* ATCC 1605 i *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Očitavanje se sastojalo od mjerenja promjera zone inhibicije ispod diska nastale inhibitornim djelovanjem gore navedenih kombinacija otopina na već spomenute bakterijske rodove. Za svaku otopinu se izmjerio promjer zone inhibicije i rezultat se izrazio u milimetrima. Što se tiče određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu odnosno testiranja efikasnosti sredstva, nakon 24-satne inkubacije očitani su dobiveni rezultati na hranjivima agarima za gore navedene bakterijske sojeve. Očitavanje se

sastojalo od brojanja poraslih kolonija u određenom vremenskom periodu i rezultat se izrazio u CFU/mL.

3.2.5 Računanje postotka inhibicije za 30 minuta

Nakon očitanih rezultata i obrade podataka, izračunat je postotak inhibicije za 30 minuta za određene otopine i bakterije. Postotak inhibicije računa se na način da uzmemo broj bakterije nakon 30 minuta i taj iznos podijelimo s brojem 100 000 i nakon toga taj dobiven rezultat pomnožimo s brojem 100. Dobiven rezultat predstavlja postotak živih bakterija nakon 30 minuta.

$$\left(\frac{x}{100000}\right) \times 100 = a$$

x - broj bakterija nakon 30 minuta

a - postotak živih bakterija nakon 30 minuta

$$100\% - a = b$$

b – postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta

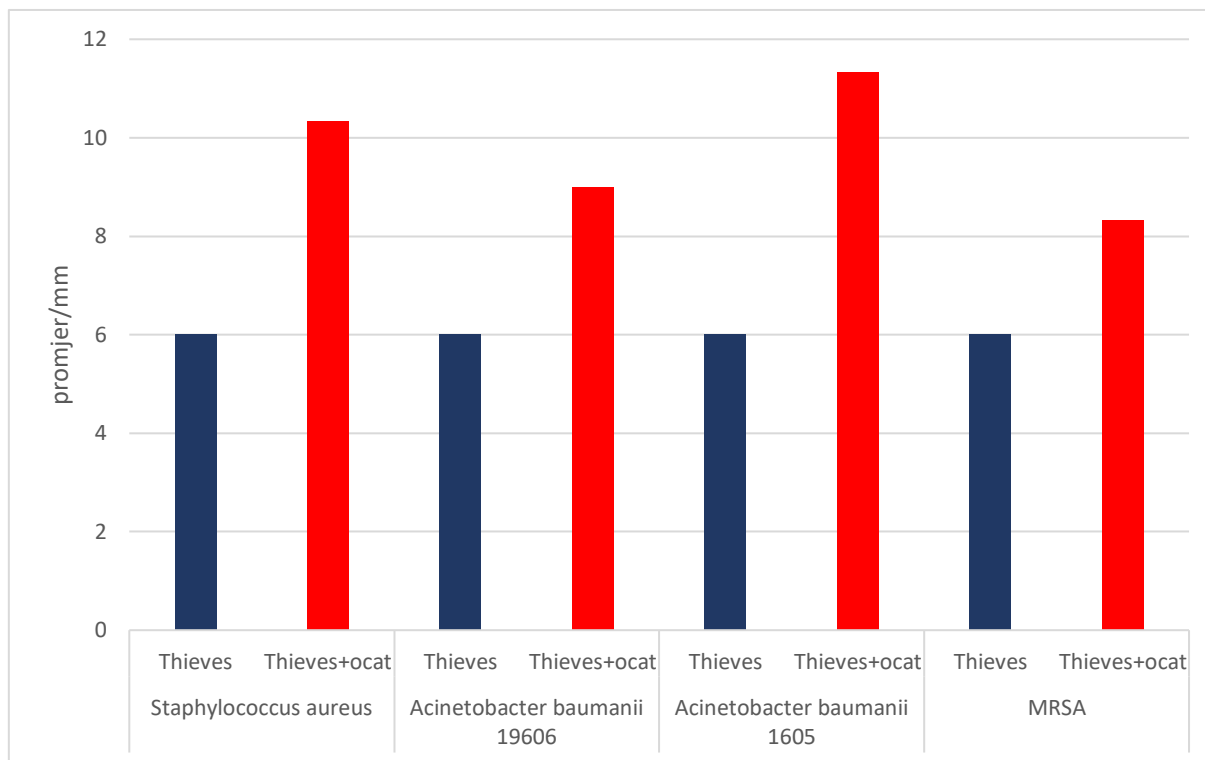
Postotak mrtvih bakterija (**b**) dobije se na način da 100% oduzmemo od dobivenog postotka (naznačen s **a**) koji predstavlja postotak živih bakterija nakon 30 minuta.

4. REZULTATI

Nakon inkubacije mjereni su rezultati inhibicije određenih otopina na porast bakterijskih rodova *Staphylococcus* i *Acinetobacter*. Zona je izmjerena primjenom ravnala. Djelovanjem korištenih otopina u rupicama koje su izbušene u agaru nalazi se inhibicijska zona - zona u kojoj nema porasta bakterija. Što je ta zona veća, to je djelotvornost odnosno antibakterijski učinak pripremljenih otopina veći. Na kraju je rezultat prikazan kao aritmetička sredina dvaju i više ponovljenih eksperimentalnih postupaka. Što se tiče druge metode, mjerena je učinkovitost sredstva za čišćenje odnosno djelotvornost tri različito pripremljene otopine u vremenskom rasponu od 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 minuta. Očitavanje se sastojalo od brojanja poraslih kolonija u određenom vremenskom periodu i rezultat se izrazio u CFU/mL.

4.1 Određivanje antibakterijskog djelovanja Thieves-a metodom difuzije u agar iz rupica

Orijentacijsko antimikrobno djelovanje navedenih otopina napravljeno je metodom difuzije u agar iz rupica, a ispitane su četiri bakterijske vrste te se kod svih bakterijskih vrsta zapaža zona inhibicije u slučaju kad su u otopini pomiješani Thieves i ocat, dok kod korištene otopine Thieves-a i vode nije uočena zona inhibicije. Kod sva četiri soja bakterija otopina Thievsa i vode nije pokazala rezultate, što znači da je promjer ostao 6 mm kao i prethodno napravljena rupica. Otopina Thievsa i octa pokazala je rezultate, a najveća zona inhibicije izmjerena je kod *A. baumannii* 1605 (11,33 mm), zatim slijedi *S. aureus* (10,33), nakon toga slijedi *A. baumannii* 19606 (9,00 mm) i na samom kraju najmanja zona inhibicije je izmjerena kod bakterije MRSA (8,33 mm). Rezultati su prikazani u Grafikonu 1.



Grafikon 1. Antimikrobni učinak odabranih otopina. Prikazana zona inhibicije izražena je u mm. Prikazana je srednja vrijednost tri ponovljena mjerenja.

4.2 Određivanje antibakterijskog djelovanja Thievs-a testiranjem efikasnosti sredstva u određenom vremenu

Sudeći po rezultatima koji su dobiveni metodom difuzije u agar iz rupica, otopina Thievs-a i vode nije pokazivala nikakav antimikrobni učinak, ali slijedeći izveden test pokazao je suprotne rezultate. Slijedeći dio pokusa bio je istražiti antimikrobna svojstva univerzalnog sredstva za čišćenje Thievs te je mjerena djelotvornost tri različito pripremljene otopine u vremenskom rasponu od 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 minuta. S obzirom da su u pokusu korištene tri različite otopine, sve tri pokazuju različite rezultate. Sve vrijednosti su prikazane u grafikonima 2, 3, 4 i 5.

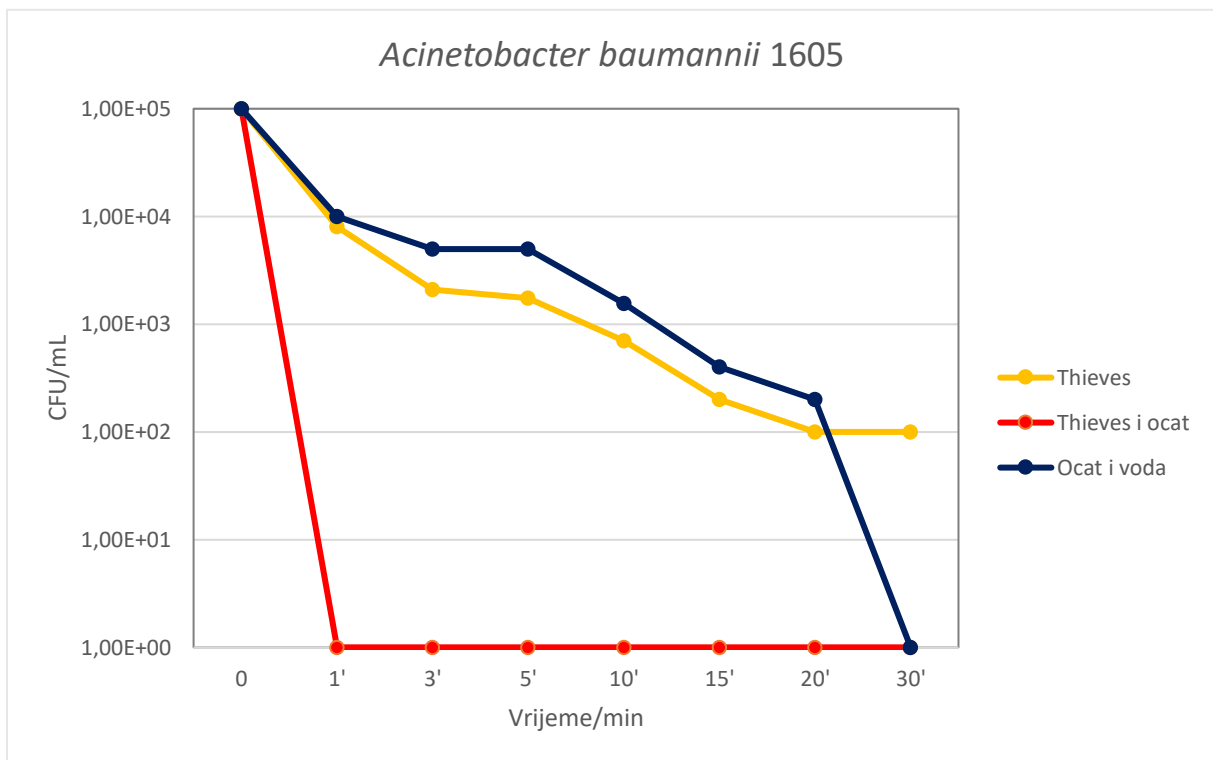
Otopina a) (Thievs i voda) pokazuje općenito najslabije antibakterijsko svojstvo, a iščitavanjem iz grafikona, najslabije djeluje na *A. baumannii* 1605 i *S. aureus*.

Otopina b) (Thievs i ocat) pokazuje najjače antibakterijsko svojstvo prema svim sojevima.

Otopina c) (ocat i voda) pokazuje srednje jako djelovanje, a najjaču antibakterijsku moć prema *A. baumannii* 19606, a najslabiju prema *A. baumannii* 1605.

Grafikon 2. prikazuje antibakterijsko djelovanje tri različito pripremljene otopine (otopine a), b) i c)) na bakteriju *Acinetobacter baumannii* 1605. Iz grafikona je odmah uočljivo da kombinacija Thievs-a i octa (crvena krivulja) ima najjače djelovanje, odnosno, već nakon 1 minute djelovanja dolazi do potpune inaktivacije navedene bakterije. S druge strane, kombinacija Thieves-a i vode (žuto) i kombinacija octa i vode (plavo) imaju slično djelovanje, samo što kod kombinacije octa i vode (plavo) nakon 30 minuta dolazi do inaktivacije bakterije, što kod kombinacije Thievs-a i vode nije slučaj.

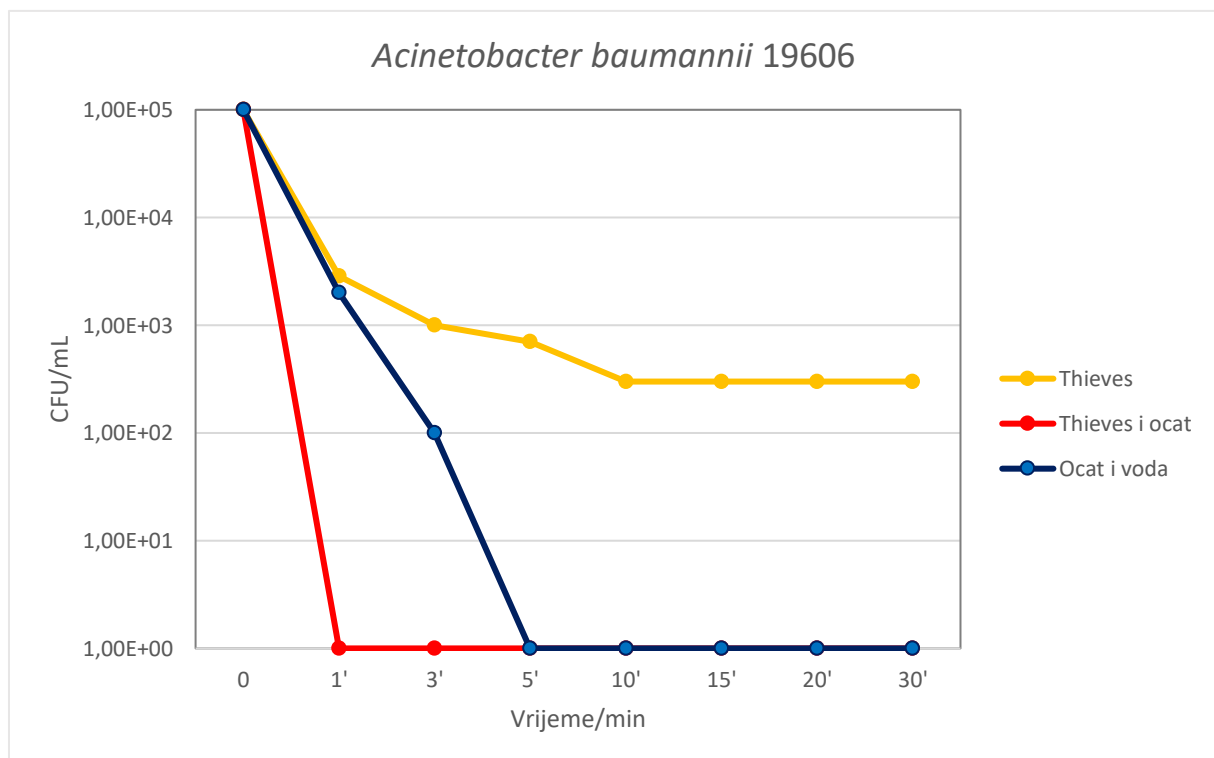
Također, izračunat je postotak živih bakterija nakon 30 minuta koji u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 0.1%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 99,9%. Što se tiče otopine b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%.



Grafikon 2. Antimikrobni učinak tri različito pripremljene otopine na bakteriju *A. baumannii* 1605. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Grafikon 3. prikazuje antibakterijsko djelovanje tri različito pripremljene otopine (otopine a), b) i c)) na bakteriju *Acinetobacter baumannii* 19606. Kao i kod prethodnog slučaja iz grafikona je uočljivo da kombinacija Thieves-a i octa (crvena krivulja) ima najjače djelovanje, odnosno, već nakon 1 minute djelovanja dolazi do potpune inaktivacije navedene bakterije. Kombinacija Thieves-a i vode (žuto) i kombinacija octa i vode (plavo) nemaju slično djelovanje, razlika je ta što kod kombinacije octa i vode (plavo) nakon 5 minuta dolazi do inaktivacije bakterije, a kod kombinacije Thievsa i vode ni u vremenu od 30 minute nije došlo do potpune inaktivacije bakterije.

Izračunat je postotak živih bakterija nakon 30 minuta koji u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 0.3%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 99,7%. Što se tiče otopine b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%.

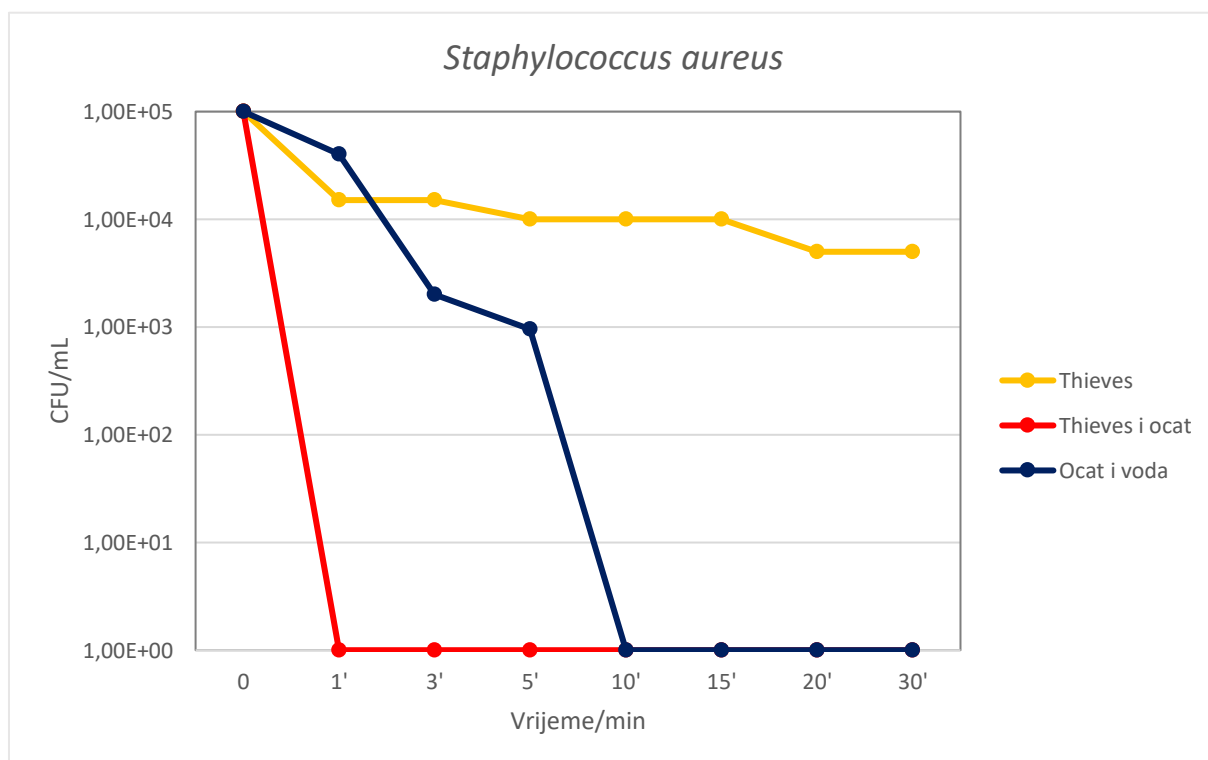


Grafikon 3. Antimikrobni učinak tri različito pripremljene otopine na bakteriju *A. baumannii* 19606. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Uspoređujući rezultate ovih dvaju sojeva bakterija *A. baumannii* 1605 i *A. baumannii* 19606, iščitavanjem iz grafikona 2. i 3. možemo reći da je u ovom slučaju rezistentnija bakterija *A. baumannii* 1605.

Grafikon 4. prikazuje antibakterijsko djelovanje tri različito pripremljene otopine (otopine a), b) i c)) na bakteriju *Staphylococcus aureus*. Kao i u dva prijašnja grafikona, uočljivo je da kombinacija Thievs-a i octa (crvena krivulja) ima najjače djelovanje, odnosno, već nakon 1 minute djelovanja dolazi do potpune inaktivacije navedene bakterije. S druge strane, u ovom slučaju, kombinacija Thievs-a i vode (žuto) i kombinacija octa i vode (plavo) nemaju slično djelovanje. Kod kombinacije octa i vode nakon 10 minuta dolazi do inaktivacije bakterije, a kod kombinacije Thievs-a i vode ni u vremenu od 30 minuta nije došlo do potpune inaktivacije bakterije.

Izračunat je postotak živih bakterija nakon 30 minuta koji u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 5%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 95%. Što se tiče otopine b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%.

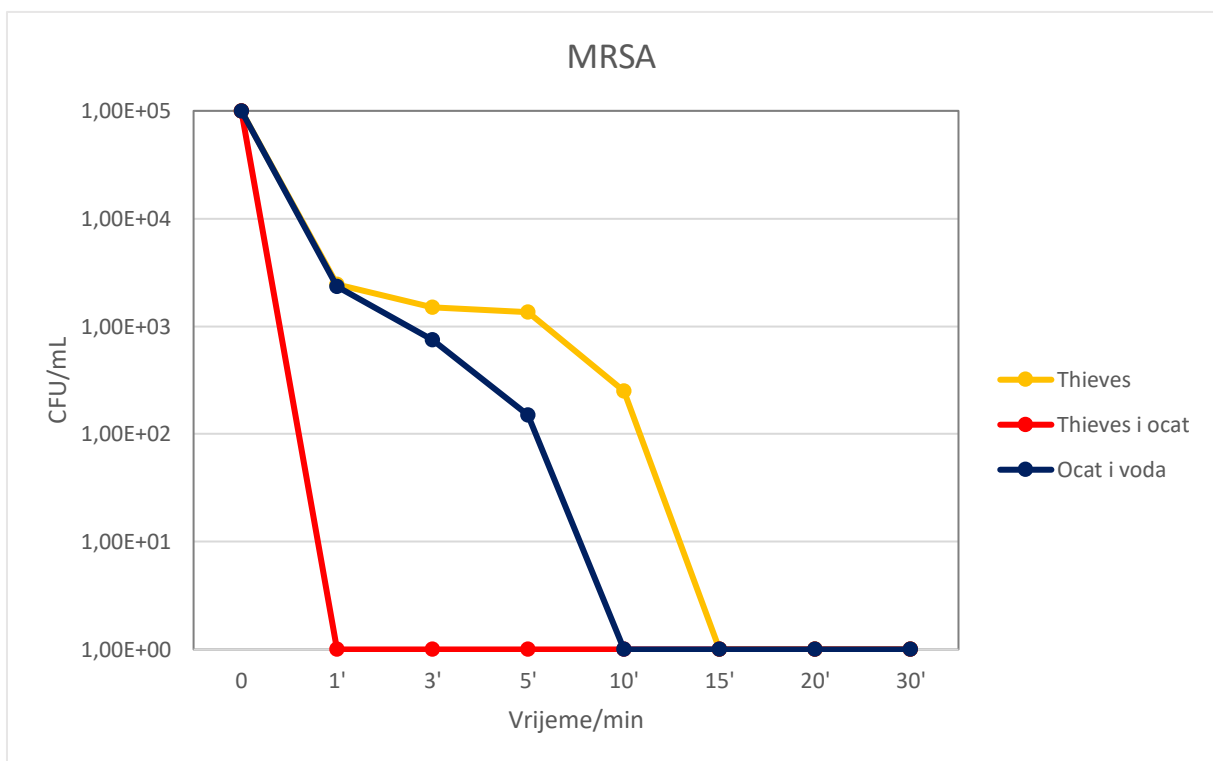


Grafikon 4. Antimikrobni učinak tri različito pripremljene otopine na bakteriju *S. aureus*.

Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Grafikon 5. prikazuje antibakterijsko djelovanje tri različito pripremljene otopine (otopine a), b) i c)) na bakteriju MRSA. Kao i kod prethodnih grafikona, odmah je uočljivo da kombinacija Thievs-a i octa (crvena krivulja) ima najjače djelovanje, odnosno, već nakon 1 minute djelovanja dolazi do potpune inaktivacije navedene bakterije. S druge strane, kombinacija Thievs-a i vode (žuto) i kombinacija octa i vode (plavo) imaju slično djelovanje, samo što kod kombinacije octa i vode (plavo) nakon 10 minuta dolazi do inaktivacije bakterije, a kod kombinacije Thievs-a i vode potpuna inaktivacije se postiže za 30 minuta.

Izračunat je postotak živih bakterija za sve tri otopine nakon 30 minuta i iznosi 0%, dok postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta u slučaju sve tri otopine a), b) i c) iznosi 100%.



Grafikon 5. Antimikrobni učinak tri različito pripremljene otopine na bakteriju MRSA.

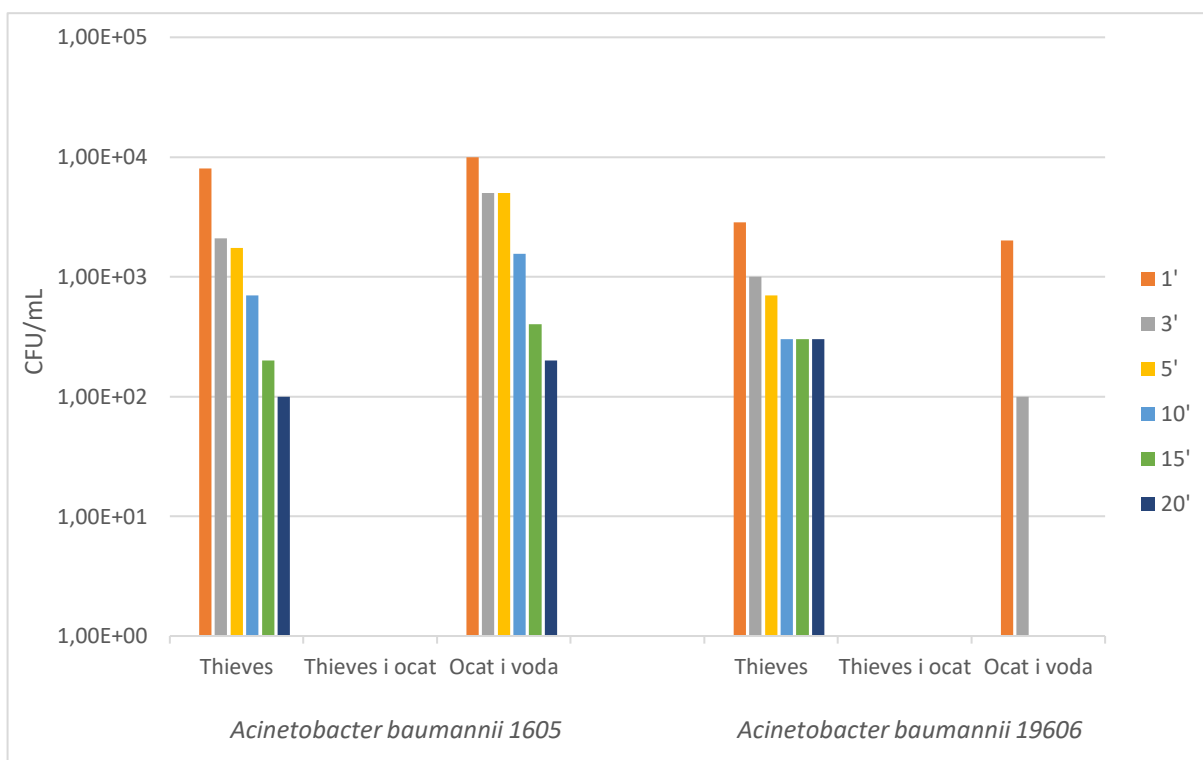
Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Uspoređujući rezultate ovih dvaju sojeva bakterija *S. aureus* i MRSA, iščitavanjem iz grafikona 4. i 5. možemo reći da je u ovom slučaju rezistentnija bakterija *S. aureus*, zato što u slučaju s otopinom Thievs-a i vode nije došlo do potpune inaktivacije, kao što se to dogodilo s bakterijom MRSA.

4.3 Cjelokupni pregled rezultata

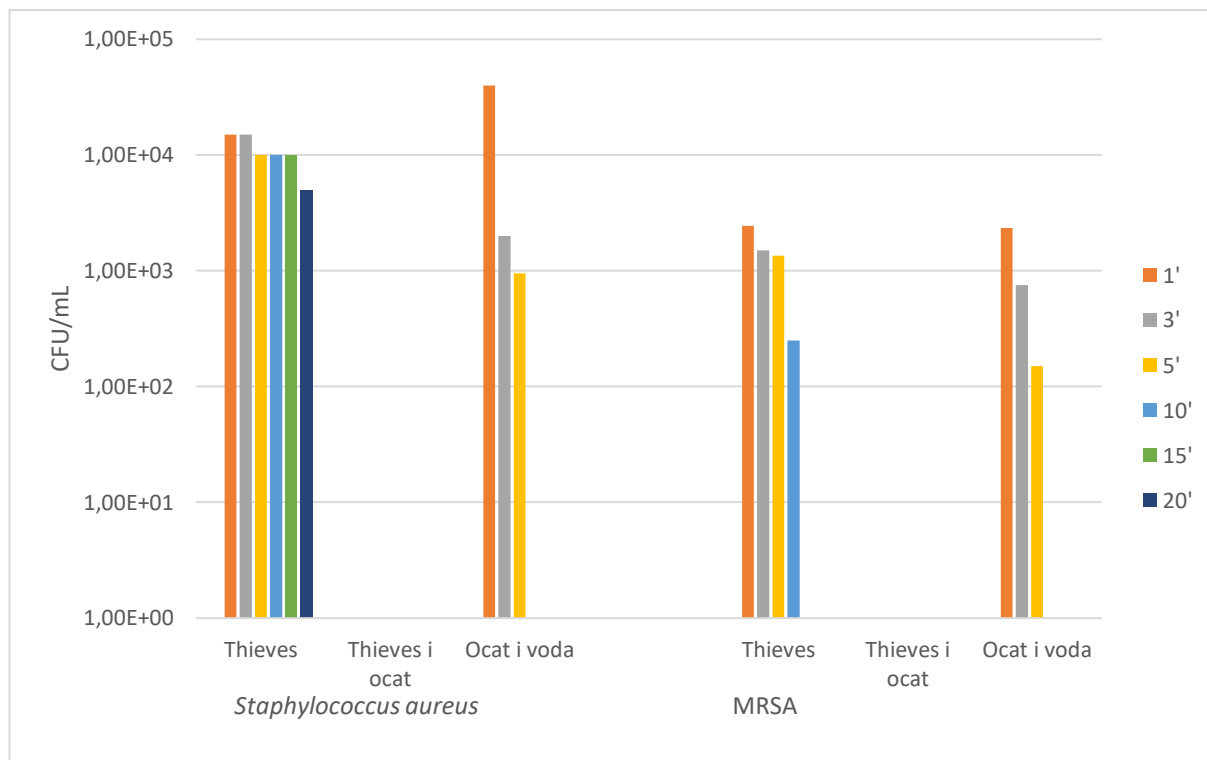
Najbolje rezultate u sva četiri mjerenja pokazala je otopina b), tj. kombinacija Thievesa i octa. Kombinacija koja je imala najslabiji učinak je Thieves i voda, odnosno otopina a), a zatim slijedi otopina c), kombinacija octa i vode koja je imala srednje dobar učinak.

Uspoređujući rezultate sojeva bakterija *A. baumannii* 1605 i *A. baumannii* 19606, iščitavanjem iz grafikona 6. možemo reći da je u ovom slučaju rezistentnija bakterija *A. baumannii* 1605.



Grafikon 6. Usporedba rezultata između bakterija *A. baumannii* 1605 i *A. baumannii* 19606

Uspoređivanjem rezultata sojeva bakterija *S. aureus* i MRSA te iščitavanjem iz grafikona 7. možemo reći da je u ovom slučaju rezistentnija bakterija *S. aureus*. Prilikom uspoređivanja sva četiri soja bakterija, možemo reći da je najrezistentnija bakterija *S. aureus*, zbog relativno slabe inaktivacije bakterija u korištenim otopinama a) (Thieves i voda) i c) (ocat i voda).



Grafikon 7. Usporedba rezultata između bakterija *S. aureus* i MRSA

5. RASPRAVA

Eterična ulja su koncentrirane, biološki aktivne i hlapljive tekućine obično topljive u alkoholu, nepolarnim ili slabo polarnim otapalima, voskovima i uljima, a moguće ih je izolirati iz različitih biljaka i različitih dijelova biljke. Ona također pokazuju antimikrobno djelovanje na stanice mikroorganizama. Trenutno nije poznat točan način djelovanja eteričnih ulja na mikrobne stanice, ali onaj najčešći je prodiranje hidrofobnih molekula ulja u stanicu mikroorganizama, na taj način povećavajući njezinu propusnost. U tom slučaju dolazi do ometanja različitih funkcija u toj stanici te na posljetku umiranja stanice. Spomenut je još niz različitih djelovanja eteričnih ulja na stanice mikroba, stoga možemo zaključiti da do uništavanja stanice neće doći samo zbog djelovanja jednog zasebnog mehanizma, već je to skup povezanih procesa. Biljna esencijalna ulja i njihovi glavni kemijski sastojci potencijalni su kandidati kao antibakterijska sredstva. S obzirom da je Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje relativno novo na tržištu, a proizvođač navodi brojne pozitivne strane, Thieves je postao predmetom brojnih zanimanja i pokušaja da se grube i teške kemikalije zaobiđu. Naime, ovo univerzalno sredstvo za čišćenje je na bazi pet eteričnih ulja: *Eugenia caryophyllus* (klinčić), *Citrus limon* (limun), *Cinnamomum zeylanicum* (cimet), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin) i *Eucalyptus radiata* (eukaliptus). Upravo zbog toga cilj ovog istraživanja bio je istražiti i utvrditi antibakterijsko djelovanje univerzalnog sredstva za čišćenje, pritom koristeći tri različite otopine. Antibakterijski učinak bio je usmjeren na bakterije roda *Staphylococcus* i *Acinetobacter*, koje predstavljaju opasnost u bolničkim sustavima, a većinski se javljaju kod imunokompromitiranih osoba te u vidu bolničkih infekcija. Ispitane su četiri vrste bakterija s tri različito pripremljene otopine Thieves-a i vode, Thieves-a i octa te octa i vode. Istraživanje je provedeno u *in vitro* uvjetima, a korištene metode su metoda difuzije u agar iz rupica i metoda određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu. Metoda difuzije u agar iz rupica je orijentacijska metoda te se na taj način provjerava osjetljivost bakterija na ispitivanu tvar, a rezultati su kvalitativni. Pri pokusu, nijedna od ispitivanih bakterijskih vrsta nije pokazala primjetnu zonu inhibicije kad je bila tretirana s otopinom a) u kojoj se nalazio Thieves pomiješan s vodom. Tretiranjem bakterijskih vrsta s otopinom b) koja se sastojala od Thieves-a pomiješanog s octom i vodom, došlo je do nastanka zone inhibicije. Najveća zona inhibicije izmjerena je kod *A. baumannii* 1605 (11,33 mm), zatim slijedi *S. aureus* (10,33), nakon toga slijedi *A. baumannii* 19606 (9,00 mm) i na kraju najmanja zona inhibicije izmjerena je kod bakterije MRSA (8,33 mm). Pokus se dalje nastavlja metodom određivanja antimikrobnog djelovanja u određenom vremenu, odnosno ispitujemo djelotvornost tri otopine. To je metoda

koja se temelji na nasađivanju ispitivane tvari na agar nakon 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 30 minuta te se prati rast mikroorganizama, a nakon inkubacije 24 sata na 37°C očitavaju se vrijednosti. Nakon toga izračunat je postotak inhibicije nakon 30 minuta. Za *A. baumannii* 1605 postotak živih bakterija nakon 30 minuta u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 0.1%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 99,9%. Kod otopina b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%. Za *A. baumannii* 19606 postotak živih bakterija nakon 30 minuta u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 0.3%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 99,7%. Što se tiče otopine b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%. Za bakteriju *S. aureus* postotak živih bakterija nakon 30 minuta u slučaju otopine a) (Thieves i voda) iznosi 5%, a postotak mrtvih bakterija iznosi 95%. Što se tiče otopine b) i otopine c), postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta iznosi 100%. za bakteriju MRSA postotak živih bakterija za sve tri otopine nakon 30 minuta i iznosi 0%, dok postotak mrtvih bakterija nakon 30 minuta u slučaju sve tri otopine a), b) i c) iznosi 100%. Kao što je već spomenuto, sve tri otopine su različite, pa je i za očekivati da će dati i različite rezultate. Najbolje rezultate u sva četiri mjerenja pokazala je kombinacija Thievesa i octa. Kombinacija koja je imala najslabiji učinak je Thieves i voda, što znači da ima slab antibakterijski učinak, pa se može zaključiti kako ostale bakterije nisu povoljno reagirale na antibakterijska svojstva otopine Thievesa i vode te samo u slučaju s MRSA ne pokazuju otpornost prema istome. Uspoređujući rezultate sojeva bakterija *A. baumannii* 1605 i *A. baumannii* 19606, u ovom slučaju rezistentnija bakterija je *A. baumannii* 1605, a vjerojatni razlog tome je da *A. baumannii* 1605 prirodno rezistentniji soj. Uspoređivanjem rezultata sojeva bakterija *S. aureus* i MRSA u ovom je slučaju rezistentnija bakterija *S. aureus*. Od ukupno četiri različite bakterije najmanje rezistentna je *Acinetobacter baumannii* 19606, dok se najviše rezistentna pokazalo *Staphylococcus aureus*. Do danas Thieves univerzalno sredstvo za čišćenje još uvijek nije poznat i primijećen brend sredstva za čišćenje upravo zbog toga što nije zastupljen na hrvatskom tržištu, a i cijena može igrati veliku ulogu. Smatram da bi se u skoroj budućnosti upravo ovo sredstvo trebalo još bolje istražiti i dati prednost u odnosu na univerzalna sredstva za čišćenje koja sadrže velike količine štetnih tvari, što za okoliš, što za čovjeka.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja može se zaključiti kako su od tri različito pripremljene otopine, sve četiri bakterije pokazale osjetljivost na otopinu b) odnosno Thieves i ocat. Otopine koje su pokazale znatno slabiju osjetljivost su otopina a) tj, Thieves i voda i otopina c) tj. ocat i voda. U sva četiri slučaja otopina Thieves-a i vode i otopina octa i vode djelovali su malo slabije, ali svejedno učinkovito nakon 30 minuta. Najbolje rezultate postigla je otopina Thieves-a i octa čiji je rezultat u svim pokusima nakon 1 minute djelovanja potpuno inaktivirao ispitivane bakterije. Prema tome možemo zaključiti da sam učinak Thieves-a i octa ovisi o njihovom sinergističkom djelovanju.

Zaključno, provedenim pokusima i dobivenim rezultatima može se potvrditi antimikrobni svojstvo te mogućnost korištenja ove alternative za čišćenje površina. To, naravno, ovisi o koncentraciji te individualnoj pripremi otopina. Što se tiče samog Thieves-a, nema velik antimikrobni utjecaj, ali dodatkom octa njegova antimikrobna moć počinje rasti što mu daje brojne mogućnosti pri korištenju.

7. LITERATURA

1. Asaj A., Dezinfekcija, Zagreb: Medicinska naklada, 2000. Str. 17-20
2. Fong D, Gaulin C, Lê M-L, Shum M (2014.) Effectiveness of Alternative Antimicrobial Agents for Disinfection of Hard Surfaces, National Collaborating Centre for Environmental Health, URL: <https://ncceh.ca/documents/evidence-review/effectiveness-alternative-antimicrobial-agents-disinfection-hard-surfaces> (12.07.2020)
3. Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2016, 3012462. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
4. Al-Mariri, A., & Safi, M. (2014). In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iranian journal of medical sciences*, 39(1), 36–43.
5. Faleiro M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. FORMATEX; 2011. Str. 1143-1151.
6. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*. 2001;64(3):373-378. doi:10.1016/s0168-1605(00)00480-3
7. https://static.youngliving.com/en-US/PDFS/ThievesHouseholdCleaner_PIP_2019_US.pdf (12.07.2020.)
8. Kalenić S. i sur., Medicinska mikrobiologija, Zagreb: Medicinska naklada, 2019. Str. 134-137, 140-143, 249-252
9. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
10. Uddin MA, Shahinuzzaman M, Rana MS and Yaakob Z: Study of chemical composition and medicinal properties of volatile oil from clove buds (*Eugenia caryophyllus*). *Int J Pharm Sci Res* 2017; 8(2): 895-99. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).895-99.

11. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
12. Barbosa, L. C., Filomeno, C. A., & Teixeira, R. R. (2016). Chemical Variability and Biological Activities of Eucalyptus spp. Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(12), 1671. <https://doi.org/10.3390/molecules21121671>
13. Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A. P. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of Eucalyptus globulus and Eucalyptus radiata essential oils. *Industrial Crops and Products* Volume 79, January 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>
14. Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). *Citrus limon* (Lemon) Phenomenon-A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 119. <https://doi.org/10.3390/plants9010119>
15. Makni, M., Jemai, R., Kriaa, W., Chtourou, Y., & Fetoui, H. (2018). *Citrus limon* from Tunisia: Phytochemical and Physicochemical Properties and Biological Activities. *BioMed research international*, 2018, 6251546. <https://doi.org/10.1155/2018/6251546>
16. de Oliveira, J. R., Camargo, S., & de Oliveira, L. D. (2019). Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of biomedical science*, 26(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8>
17. Bowles J., Eterična ulja, Zagreb, Veble commerce, 2012. Str. 68-69, 88-89,

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime / Prezime Barbara Kancijan

Adresa Zinke Kunc 4, 40 000 Čakovec

Telefonski broj 0919409064

Državljanstvo Hrvatsko

Datum rođenja 09. svibnja 1998.

Spol ženski

Obrazovanje i osposobljavanje

2017. – 2020. Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000, Rijeka

2013. – 2017. Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec, Vladimira Nazora 34, 40 000 Čakovec

2005. – 2013. II. Osnovna škola Čakovec

Studentski poslovi – Metss Čakovec

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski **Strani jezik:** engleski, njemački

Komunikativna, radišna i željna za učenjem.

Dodatne informacije

Dio organizacijskog odbora i sudionik 2. i 3. studentskog kongresa zaštite zdravlja – „Sanitas“.
Sudjelovanje u projektu „Čiste ručice“.