

Filip Penava

**Antimikrobni učinak koloidnih otopina
nanočestica elementarnih metala i metalnih
oksida na *E.coli***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Ivana Kosalca i izv.prof.dr.dr.sc. Ive Rezić i suvoditeljstvom Vanje Ljoljić Bilić, mag.pharm.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc.Ivanu Kosalcu, izv.prof.dr.dr.sc. Ivi Rezić i mag.pharm.Vanji Ljoljić Bilić te cijelom osoblju Zavoda za mikrobiologiju na pristupačnosti, velikodušnoj pomoći, korisnim savjetima te uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebice želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi pomagali tijekom cijelog studiranja i učinili ga lijepim i ugodnim.

Veliko hvala od srca želim izraziti svojoj djevojci Sari što mi je studiranje učinila lijepim i ugodnim i bila uz mene tijekom cijelog studiranja, a osobito kada je bilo najpotrebnije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Povijest nanočestica i primjena.....	1
1.2. Antimikrobno djelovanje nanočestica.....	2
1.2.1. Nanočestice srebra (Ag nanočestice).....	5
1.2.2. Nanočestice cinkova oksida (ZnO nanočestice).....	6
1.2.3. Nanočestice titanova dioksida (TiO ₂ nanočestice).....	7
1.3. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Bakterijske vrste.....	17
3.2. Mikrobiološki i drugi materijal.....	17
3.3. Nanočestice.....	17
3.4. Uzgoj bakterijske vrste.....	17
3.5. Priprava inokuluma.....	17
3.6. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) koloidnih nanočestica	18
3.7. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica.....	18
3.8. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode.....	19
4. REZULTATI	21
4.1. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini na bakterijsku vrstu <i>E.coli</i> ATCC 10536.....	21
4.2. Ispitivanje postojanja sinergizma između koloidnih otopina nanočestica.....	23
4.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode.....	28
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	32
7. LITERATURA	33
8. SAŽETAK / SUMMARY	41
8.1. Sažetak.....	41
8.2. Summary.....	42
9. Temeljna dokumentacijska kartica Basic documentation card	

1. UVOD

1.1. Povijest nanočestica i primjena

Od 1980-ih godina počelo je brzo širenje i napredak u području znanosti koje se zove nanoznanost (eng. *nanoscience*). Ovo područje znanosti vrlo je široko i obuhvaća fiziku, kemiju, biologiju, medicinu, strojarstvo i elektrotehniku, znanost o materijalima itd. Pojam nanotehnologija koristi se kada se govori o praktičnoj primjeni nanočestica, za razliku od pojma nanoznanost koji se više koristi u temeljnim znanostima poput fizike, biologije, kemije itd. Nanotehnologija se definira kao sposobnost proizvodnje i upravljanja predmetima veličine 1-100 nm s ciljem stvaranja novih materijala koji imaju specifična svojstva. Nanoznanost nije ništa novo jer još je Faraday proučavao koloidne čestice zlata s ciljem obrazloženja zašto zlatne čestice imaju svoju uobičajenu žutu boju u svom krutom obliku, a kada su u obliku koloidnih čestica imaju crvenu boju. Metalne čestice manje od 100 nm korištene su za proizvodnju dekorativnih ukrasa na prozorima crkvi ili u lončarstvu još u srednjovjekovno doba i ranije (Blackman, 2009). Riječ „nano” dolazi od grčke riječi koja znači patuljak ili iznimno malen (Rai i Duran, 2011), a zbog svoje veličine i velike površine imaju specifična fizikalna i kemijska svojstva (Khan i sur., 2017). Koncept nanotehnologije dao je fizičar Richard Feynman u svom govoru „There’s plenty of room at the bottom” 1959. godine, iako je sam pojam nanotehnologije uveo profesor Norio Taniguchi (Tokyo Science University, Japan) 1974.godine. Napredak u području nanotehnologije iznimno je brz zbog uvođenja novih metoda sinteze, iako i dalje većina metoda sinteze nanočestica ima ograničenja jer rezultiraju malom količinom nanočestica i lošom morfologijom. Kemijske i fizikalne metode sinteze obično rezultiraju stvaranjem smjese nanočestica loše morfologije, a te metode su i štetne za okoliš zbog korištenja štetnih i zapaljivih kemikalija, te visokih temperatura potrebnih za proces sinteze. Veličina nanočestica omogućuje im specifičnu interakciju s biološkim entitetima (stanice, proteini, nukleinske kiseline, virusi i dr.) jer su slične veličine; pa je tako naprimjer veličina stanice 5-100 nm, proteina 1-50 nm, virusa 10-500 nm, a nukleinska kiselina je 2 nm široka i 5-100 nm dugačka. Navedena usporedivost veličina nanočestica i bioloških entiteta omogućuje njihovu međusobnu interakciju što dovodi do bolje integracije nanotehnologije i biotehnologije (napredak slikovne dijagnostike, detekcije bioloških molekula, terapije raka, dovođenje lijeka i RNA/DNA i dr.). Interakcija nanočestica s nukleinskim kiselinama vrlo je velika zbog prisutnosti aktivnih funkcionalnih skupina na njihovoj površini, dok je interakcija s ugljikohidratima i lipidima mnogo manja (Rai i Duran,

2011). Nanočestice imaju sposobnost dovođenja optimalne doze terapeutika na ciljno mjesto što rezultira povećanom učinkovitosti terapije i smanjenjem nuspojava (Alexis i sur., 2008). Za upotrebu nanočestica u biomedicinske svrhe, nužno je da su one jako magnetske, manje od 100 nm i da imaju usku distribuciju veličine čestica (Laurent i sur., 2008). U biomedicinske svrhe, najkorištenije su nanočestice željezovih oksida kao što su magnetit (Fe_3O_4) ili njegov oksidirani oblik magemit (Fe_2O_3) (Ali i sur., 2016). Neke hidrofilne nanočestice pokazale su se kao izvrsne u svrhu dostave lijeka na ciljno mjesto pa su tako razvijene polietilen oksidne (PEO) nanočestice i nanočestice polilaktatne kiseline (PLA) za intravensku dostavu lijekova (Calvo i sur., 1997). Superparamagnetične čestice željezovog oksida koriste se kao pojačivači kontrasta u MRI (eng. *magnetic resonance imaging*), popravku tkiva, imunokemijskim testovima, dovođenju lijekova i dr. Većina poluvodičkih i metalnih nanočestica imaju velik potencijal u dijagnostici i terapiji raka zbog svoje površinske plazmonske rezonancije (SPR-eng. *surface plasmon resonance*) koja im daje sposobnost raspršenja i apsorpcije svjetlosti (Khan i sur., 2017). Nanočestice zlata mogu učinkovito pretvoriti apsorbiranu svjetlost u lokaliziranu toplinu što se može koristiti u terapiji raka (Jain i sur., 2007). Toksičnost nanočestica nije još u potpunosti poznata stoga su potrebna daljnja ispitivanja kako bi se utvrdila njihova toksičnost. Toksičnost nanočestica ovisi o više parametara kao što su veličina, oblik, površinski naboj, sastav i struktura kristala i stabilnost nanočestice, a također toksičnost ovisi i o primijenjenoj dozi, načinu primjene i ciljanom tkivu na kojeg želimo terapijski djelovati. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA-eng. *US Food and Drug Administration*) odobrila je primjenu nekoliko vrsta nanočestica primjerice Ag i Titan dioksid nanočestice u proizvodima poput antibakterijskih kožnih losiona i u kremama za sunčanje (Fernando i sur., 2018).

1.2. Antimikrobno djelovanje nanočestica

Nanočestice se sve više upotrebljavaju kao alternativa antibioticima, a istraživanja govore u prilog njihovim brojnim prednostima u liječenju i sprječavanju bakterijskih infekcija. Primjenjuju se kao antibakterijski premazi na medicinskom materijalu i uređajima za ugradnju u organizam (srčani zalisci, dentalni implantati i dr.), u svrhu poticanja zacjeljivanja rana, sprječavanja infekcija, dovođenja antibiotika na ciljno mjesto i dr. Antibakterijski mehanizmi nanočestica nisu osobito proučeni, ali prema trenutnim spoznajama prihvaćeni su mehanizmi koji uključuju: indukciju oksidativnog stresa, oslobađanje metalnih iona i neoksidativne mehanizme. Vrlo je teško bakterijama razviti rezistenciju na nanočestice zbog višestrukih

antibakterijskih mehanizama koji se odvijaju istovremeno. Zbog višestrukih istovremenih antibakterijskih mehanizama, bakterijska stanica bi morala razviti višestruke istovremene genske mutacije da bi se postigla otpornost na nanočestice (Wang i sur., 2017). Prekomjerna upotreba antibiotika dovela je do razvitka MDR (eng. *multidrug-resistant*) bakterijskih sojeva koji su otporni na gotovo sve antibiotike, a dokazano je da takve bakterije nose gen za super-otpornost koji se zove NDM-1 (eng. *New Delhi metallo-β-lactamase-1*) (Hsueh, 2010). Većina trenutno dostupnih antibiotika ima antibakterijsko djelovanje temeljeno na 3 ciljna mjesta: sinteza stanične stijenke, translacija i DNA replikacija, a bakterijske stanice razvile su otpornost na svaki od ovih mehanizama (Kohanski i sur., 2010). Ovi mehanizmi otpornosti bakterijskih stanica ne odnose se na nanočestice jer se većina njihovih antibakterijskih mehanizama temelji na izravnom kontaktu sa staničnom stijenkom bakterijskih stanica bez potrebe za ulazak u bakterijsku stanicu (Fernando i sur., 2018). Zbog toga izglednim se čini da će bakterije puno teže razviti otpornost na nanočestice nego na antibiotike. Nanočestice su pokazale antibakterijsko djelovanje i na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Naprimjer, ZnO nanočestice su pokazale antimikrobni učinak na *Staphylococcus aureus*, a Ag nanočestice pokazale su antimikrobni učinak na bakteriju *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Ramalingam i sur., 2016). Većina bakterija postoji u obliku biofilma na čvrstim površinama koji omogućava komunikaciju između bakterijskih stanica i njihove okoline, a struktura biofilma čini bakterije vrlo otpornima na strane tvari (primjerice antibiotike) i čini izvorište sustavnih kroničnih infekcija. Biofilm je sastavljen od nakupina bakterija i njihovih izvanstaničnih polimernih produkata (eng. *extracellular polymeric substances*), a osim izvanstaničnih polimernih produkata tu se nalaze i proteini i DNA (Romero i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da mnoge vrste nanočestica mogu spriječiti ili prevladati nastanak biofilma zbog svoje iznimno male veličine, velike površine čestica i oblika čestica, naprimjer nanočestice temeljene na zlatu, srebru (inhibiraju proizvodnju izvanstaničnih polimernih produkata što rezultira uništenjem biofilma MDR sojeva *E.coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Ansari i sur., 2012)), magneziju, NO nanočestice, ZnO nanočestice, Fe₃O₄ nanočestice (Wang i sur., 2017). Što se tiče oblika nanočestica, pokazano je da nanočestice štapićastog oblika su učinkovitije u uništavanju biofilma od nanočestica sferičnog oblika (Slomberg i sur., 2013).

Nanočestice imaju antibakterijsko djelovanje koje se temelji na: 1) narušavanju bakterijske membrane; 2) stvaranju ROS (eng. *reactive oxygen species*); 3) prolasku kroz bakterijsku membranu; 4) indukciji unutarstaničnih antibakterijskih učinaka, uključujući međudjelovanje s DNA i proteinima (Wang i sur., 2017). Nanočestice moraju biti u izravnom

dodiru s bakterijskim stanicama da bi se postigao željeni antibakterijski učinak (Fernando i sur., 2018). U tom kontaktu nanočestica i bakterijske stanice sudjeluju razne vrste međudjelovanja: elektrostatsko međudjelovanje, van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije, receptor-ligand međudjelovanje (Wang i sur., 2017). Nanočestice zatim mogu proći kroz staničnu membranu bakterija i stupiti u međudjelovanje s dijelovima bakterijske stanice kao što su DNA, lizosomi, ribosomi i enzimi što dovodi do oksidativnog stresa, promjena u propusnosti stanične membrane, neravnoteže elektrolita, inhibicije enzima, deaktivacije proteina i promjene genske ekspresije (Xu i sur., 2016; Shrivastava i sur., 2007). Istraživanja su pokazala da nanočestice imaju izraženiji učinak protiv Gram-pozitivnih bakterija nego protiv Gram-negativnih bakterija jer je stanična stijenka Gram-negativnih bakterija sastavljena od lipopolisaharida (LPS), lipoproteina i fosfolipida koji čine prepreku koja omogućava prolaz samo makromolekula. S druge strane, Gram-pozitivne bakterije imaju u sastavu stanične stijenke tanki sloj peptidoglikana kao i teihoičnu kiselinu (ekspimirana samo u staničnoj stijenci Gram-pozitivnih bakterija) i pore koje omogućavaju stranim molekulama ulazak u stanicu što rezultira oštećenjem stanične membrane i smrti bakterijske stanice (Lesniak i sur., 2013). Gram-pozitivne bakterije imaju i velik negativni naboj na površini stanične stijenke koji također privlači nanočestice metala (Wang i sur., 2017).

Postoje četiri tipa ROS: superoksidni radikal (O_2^-), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), vodikov peroksid (H_2O_2) i kisik (O_2). (Schieber i Chandel, 2014). Metalni ioni se sporo otpuštaju iz metalnih oksida i apsorbiraju kroz staničnu membranu, nakon čega slijedi međudjelovanje sa funkcionalnim skupinama proteina i nukleinskih kiselina, naprimjer merkaptu (-SH), amino (-NH) i karboksilnom (-COOH) skupinom. Te interakcije sa funkcionalnim skupinama proteina i nukleinskih kiselina dovode do promjene enzimske aktivnosti, promjene strukture stanice i promjene normalne fiziologije stanice što posljedično uzrokuje inhibiciju mikroorganizama (Wang i sur., 2017). Neoksidativni antibakterijski mehanizmi odnose se na smanjenje unutarstaničnih metaboličkih procesa, uključujući metabolizam aminokiselina, ugljikohidrata i nukleotida (Leung i sur., 2014). Ključni čimbenici koji utječu na antibakterijsko djelovanje nanočestica su fizikalno-kemijska svojstva samih nanočestica (veličina, naboj, oblik, struktura kristala) i okolišni uvjeti (bakterijski soj, vrijeme izloženosti nanočesticama i dr.) (Wang i sur., 2017). Manje nanočestice imaju veću specifičnu površinu što rezultira većom vjerojatnosti da dođu u dodir s bakterijskom membranom i prođu kroz nju nego nanočestice većih dimenzija, što je pokazano u eksperimentu s TiO_2 nanocijevima i silika nanočesticama (Pan i sur., 2013). U usporedbi s negativno nabijenim i neutralnim nanočesticama, pozitivno nabijene nanočestice imaju izraženiju proizvodnju ROS, a time i

jači antimikrobni učinak (Wang i sur., 2017). Temperatura okoline ima izrazit utjecaj na antibakterijsku aktivnost nanočestica zbog učinka na stupanj proizvodnje ROS, što je pokazano u znanstvenom istraživanju sa ZnO nanočesticama u kojem su one imale jači antibakterijski učinak na višoj temperaturi. pH okoline također ima učinak na in vitro antibakterijsku aktivnost nanočestica pa tako sniženjem pH raste antibakterijska aktivnost ZnO nanočestica (Saliani i sur., 2015). Na antibakterijsku aktivnost nanočestica utječe i stopa rasta bakterijskih stanica pa je tako pokazano da su brzo-rastuće bakterije osjetljivije na nanočestice nego sporo-rastuće bakterije, a pretpostavka je da su sporo-rastuće bakterije otpornije zbog ekspresije određenih stress-response gena (Hajipour i sur., 2012)

1.2.1. Nanočestice srebra (Ag nanočestice)

Prema literaturi, Ag nanočestice su najpopularnije i najviše korištene anorganske nanočestice koje se koriste kao antimikrobne tvari (Zinjarde, 2012). Primjenjuju se u raznim plastičnim proizvodima, tekstilu i kao premaz na raznim uređajima (medicinski, elektronski, kućanski uređaji i dr.) (Egger i sur., 2009). U usporedbi s ionskim oblikom srebra, nanočestice posjeduju veću antimikrobnu aktivnost (Jo i sur., 2009). Također je pokazano da antibakterijski učinak Ag nanočestica dolazi od oštećenja vanjske membrane bakterijskih stanica (Lok i sur., 2006), a neki pretpostavljaju da Ag nanočestice uzrokuju sitne otvore u bakterijskoj membrani, a zatim fragmentiraju stanicu (Yun i sur., 2013; Iavicoli i sur., 2013). Srebrovi ioni ulaze u međudjelovanje sa disulfidnim i sulfhidrilnim skupinama bakterijskih enzima što dovodi do promjene metaboličkih procesa i posljedično do smrti bakterijske stanice (Egger i sur., 2009). Hernández-Sierra i suradnici proveli su istraživanje u kojem su koristili Ag, ZnO i Au nanočestice i ispitivali baktericidni učinak na *Streptococcus mutans* i došli do zaključka da Ag nanočestice imaju najveći baktericidni učinak na *S. mutans* pa predlažu njegovu moguću primjenu u liječenju zubnog karijesa koji je obično uzrokovan *S. mutans* (Hernández-Sierra i sur., 2008). Zarei i suradnici istražili su antibakterijski učinak Ag nanočestica na bakterije koje uzrokuju trovanja hranom, a to su *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *Vibrio parahaemolyticus*. Došli su do zaključka da Ag nanočestice imaju vrlo dobar antibakterijski učinak na spomenute patogene i da bi Ag nanočestice mogle biti vrlo dobra alternativna opcija za čišćenje i dezinfekciju opreme i površina u prostorijama u kojima se priprema hrana (Zarei i sur., 2014). Antimikrobni učinak Ag nanočestica ovisi o veličini čestica što je pokazalo istraživanje u kojem je pokazano da manje čestice imaju veći antimikrobni učinak na *E.coli* od većih čestica što je objašnjeno time što manje čestice imaju veći omjer površine i volumena (Baker i sur., 2005). Antimikrobni

učinak Ag nanočestica također ovisi i o obliku čestica. Pal i suradnici ispitali su razlike u antimikrobnom učinku Ag nanočestica različitog oblika (sferični, štapićasti i trokutasti) i zaključili da Ag nanočestice trokutastog oblika imaju najveći antimikrobni učinak zahvaljujući velikoj gustoći atoma na površini čestica (Pal i sur., 2007). Ag nanočestice povećavaju i učinkovitost raznih antibiotika primjerice penicilina G, amoksicilina, eritromicina i vankomicina protiv *Staphylococcus aureus* i *E. coli* (Shahverdi i sur., 2007).

1.2.2. Nanočestice cinkova oksida (ZnO nanočestice)

Nanočestice cinkova oksida izrazito su korištene u medicini, ponajprije zbog njihovog antimikrobnog i antikancerogenog učinka. Ti učinci nanočestica cinkova oksida povezani su s njihovim sposobnostima da stvaraju ROS i induciraju apoptozu. A osim ovih učinaka, ZnO nanočestice također se koriste kao nosači lijekova čime se smanjuju neželjena toksičnost i nuspojave, a pružaju i sinergistički učinak u kombinaciji s lijekom (Mishra i sur., 2017). ZnO nanočestice imaju odlično svojstvo apsorpcije UV svjetla što im daje odličnu primjenjivost u kremama za sunčanje (Sruthi i sur., 2017). ZnO nanočestice veće od 100 nm smatraju se biokompatibilnima što ide u prilog njihovoj upotrebi u svrhu dostave lijeka na ciljno mjesto u organizmu (Hanley i sur., 2008). I druge nanočestice metala također se koriste kao nosači lijekova i imaju antikancerogena svojstva, ali ZnO nanočestice imaju prednost nad njima jer su jeftinije, biokompatibilne i relativno manje toksične u usporedbi s drugim nanočesticama metala (Shokri i Javar, 2015). Upotreba ZnO nanočestica u biomedicinske svrhe temelji se na njihovoj sposobnosti stvaranja ROS što dovodi do stanične smrti mikroorganizama ukoliko je narušen antioksidativni kapacitet mikrobne stanice (Ryter i sur., 2007). ROS uzrokuju i nekrozu i apoptozu jer oštećuju DNA nakon čega se aktiviraju apoptotički putevi otpuštanjem apoptogenih faktora iz mitohondrijskog međumembranskog prostora (Alarifi i sur., 2013). Antikancerogeno djelovanje ZnO nanočestica osim zbog stvaranja ROS i indukcije apoptoze dolazi i od elektrostatskih interakcija ZnO nanočestica sa stanicama raka. Stanice raka imaju veliku koncentraciju anionskih fosfolipida (fosfatidilserina) u svojoj vanjskoj membrani što im daje negativan naboj, a ZnO nanočestice u fiziološkim uvjetima nose veliki pozitivan naboj na svojoj površini što omogućava elektrostatsko međudjelovanje sa stanicama raka i dovodi do fagocitoze ZnO nanočestica i citotoksičnosti (Rasmussen i sur., 2010). ZnO nanočestice također su bile testirane i u kombinaciji sa raznim kemoterapeutikama poput doksorubicina, cisplatine i paklitaksela i rezultati su pokazali značajno jači antikancerogeni učinak ovih kemoterapeutika u kombinaciji sa ZnO nanočesticama (Sharma i sur., 2016; Hackenberg i sur., 2012). Antibakterijski učinak ZnO nanočestica također dolazi od njihove

sposobnosti stvaranja ROS odnosno indukcije oksidativnog stresa. Kada bakterijska stanica dođe u kontakt s ZnO nanočesticama, one otpuštaju Zn^{+} ione koji ulaze u stanicu i stupaju u međudjelovanje s tiolnim skupinama respiratornih enzima bakterijske stanice inhibirajući njihov učinak nakon čega se stvaraju ROS i dolazi do oksidativnog oštećenja bakterijske membrane, DNA i mitohondrija što rezultira staničnom smrću bakterijske stanice (Dwivedi i sur., 2014). Padmavathy i suradnici istražili su razlike u antibakterijskom učinku ZnO nanočestica različitih veličina (12 nm, 45 nm i 2 μ m) na *E.coli* i došli do zaključka da smanjenjem veličine ZnO nanočestica zapaža se veći baktericidni učinak. Uzevši u obzir da je prosječna stanica *E.coli* veličine oko 2 μ m, lako je uvidjeti da se u stanicu takve veličine može smjestiti puno veći broj čestica veličine 12 nm nego čestica veličine 45 nm i iz ovoga proizlazi razlika u baktericidnom učinku ZnO nanočestica različite veličine (Padmavathy i Vijayaraghavan, 2008). Do istog zaključka došli su i Emami-Karvani i suradnici proučavanjem antibakterijskog učinka ZnO nanočestica na *E.coli* i *S.aureus* (Emami-Karvani i Chehrazi, 2011). ZnO nanočestice imaju tendenciju privlačenja elektrona na svoju površinu nakon čega elektron biva zarobljen na površini u obliku anionskog radikala O^{-} , a ta tendencija povećana je sa smanjenjem veličine čestice i povećanjem omjera površine i volumena čestice. Pretpostavka je da ZnO nanočestice apsorbiraju svjetlo i pritom O^{-} s površine se otpušta i reagira sa O_2 iz okolnog medija donirajući elektron i stvarajući O_2^{-} što dalje dovodi do stvaranja H_2O_2 i ROS (Joshi i sur., 2012). ZnO nanočestice također imaju i antidijabetički učinak zbog toga što cink igra ulogu u sintezi inzulina, pohrani i njegovoj sekreciji (Nazarizadeh i Asri-Rezaie, 2016). Prema istraživanju Wahbe i suradnika ZnO nanočestice učinkovite su u reverziji oštećenja gušterače uzrokovanog dijabetesom što je dokazano analizom strukture gušterače i potvrđeno normalizacijom koncentracije glukoze u krvi i inzulina u serumu (Wahba i sur., 2016).

1.2.3. Nanočestice titanova dioksida (TiO_2 nanočestice)

Nanočestice titanova dioksida jedne su od najviše korištenih vrsta nanočestica, a također spadaju i među one koje se najviše proizvode (Jomini i sur., 2015). TiO_2 je dobro poznati poluvodič, a kristalna struktura mu može imati tri oblika, a to su anatas, rutil i brukit (Markowska-Szczupak i sur., 2011), a fotokatalitička svojstva dolaze do izražaja samo kada je obasjan UV svjetlom (Shah i sur., 2017). Anatas i rutil imaju velik industrijski značaj, dok je brukit rijetko korišten, a općenito gledano, anatas je toksičniji od rutila (veća indukcija oksidativnog stresa), ali nažalost i daleko korišteniji (Iswarya, 2015; Wu i sur., 2010). Godišnja proizvodnja TiO_2 nanočestica predviđa se da će dosegnuti i do 2.5 milijuna tona do

2025.godine (Robichaud i sur., 2009). Gotovo 70% proizvedenog TiO₂ koristi se kao pigment u bojama zbog svojih svojstava kao što su svjetlina, visok refraktorni indeks i otpornost na diskoloraciju, ali također se koristi i kao pigment u plastici, papiru, vlaknima, hrani, farmaceutskim preparatima, kozmetici i pastama za zube. Ostale primjene TiO₂ uključuju antimikrobnu primjenu, katalizator za pročišćavanje zraka i vode i dr. (Weir i sur., 2012). Istraživanja o toksičnosti TiO₂ nanočestica govore da postoji rizik od intoksikacije inhalacijom nanočestica što je povezano s nastankom astme i upalom dišnih puteva, a ukoliko dođe do intoksikacije peroralnim unosom moguć je razvitak Chronove bolesti, a također je TiO₂ klasificiran i kao karcinogen 2B (Shi i sur., 2013; Hussain i sur., 2011; Fadeel i sur., 2010; Lomer i sur., 2002). Fotokatalitičko svojstvo TiO₂ nanočestica tj. sposobnost produkcije ROS pod UV svjetlom omogućuje im antibakterijsku primjenu. Prema istraživanju Carré i suradnika antibakterijska fotokatalitička aktivnost TiO₂ nanočestica je praćena lipidnom peroksidacijom što dovodi do povećanja permeabilnosti bakterijske membrane i narušavanja staničnog integriteta (stvaraju pore u staničnoj stijenci stanice) (Carré i sur., 2014). Međutim, upotreba TiO₂ nanočestica pod UV svjetlom je ograničena zbog toga što mogu nastati oštećenja DNA stanica i tkiva čovjeka pa je u tu svrhu preporučeno dodavati metalne ione TiO₂ nanočesticama jer im to poboljšava antibakterijska i fotokatalitička svojstva zbog toga što TiO₂ nanočestice tada apsorbiraju i vidljivo svjetlo pa nema potrebe za primjenom UV svjetla (Allahverdiyev i sur., 2011). Prema trenutno dostupnoj literaturi, TiO₂ nanočestice pokazale su se učinkovite u antimikrobnoj terapiji u kombinaciji s antibioticima protiv meticilin-rezistentnog oblika *S.aureus* (MRSA) (Roy i sur., 2010). TiO₂ nanočestice veličine 33 nm pokazale su se učinkovite protiv *S.aureus* i *E.coli* uz pripadajuće MIK-ove od 30 µg/ml za *S. aureus* i 40µg/ml za *E. coli* (Mahdy i sur., 2017).

1.3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

E.coli je gram-negativna bakterija štapićastog oblika koju je prvi opisao Theodor Escherich 1885. godine (Lim i sur., 2010), a pripada porodici bakterija *Enterobacteriaceae* i najučestaliji je komenzal gastrointestinalnog sustava čovjeka (sastavni dio normalne crijevne mikroflore), ali i jedan od najvažnijih patogena (neki sojevi *E.coli* dobili su virulentne faktore putem plazmida, transpozona i bakteriofaga) (Allocati i sur., 2013). *E.coli* jedan je od najučestalijih uzročnika bakterijskih infekcija kod ljudi i životinja. Uzročnik je enteritisa, infekcija mokraćnog sustava, septikemija i drugih infekcija primjerice neonatalnog meningitisa. Zbog prekomjerne primjene antibiotika širom svijeta došlo je do razvoja MDR

sojeva *E.coli* što je postala ozbiljna prijetnja javnom zdravstvu. *E.coli* ima osobine poput lakoće rukovanja, poznavanja potpunog slijeda nukleotida u genomu, mogućnosti rasta u aerobnim i anaerobnim uvjetima (fakultativni anaerobni organizam) što ju čini važnim organizmom u biotehnologiji (Allocati i sur., 2013). Optimalni rast *E.coli* događa se na 37 °C, ali neki laboratorijski sojevi mogu rasti i na temperaturama do 49 °C (Fotadar i sur., 2005).

Bakterijski stanični ciklus podijeljen je na tri perioda i na svaki od njih utječu dostupnost hranjivih tvari i stopa rasta bakterijske stanice (Wang i Levin, 2009) :

1) B period - dio ciklusa između dijeljenja stanice i početka replikacije DNA

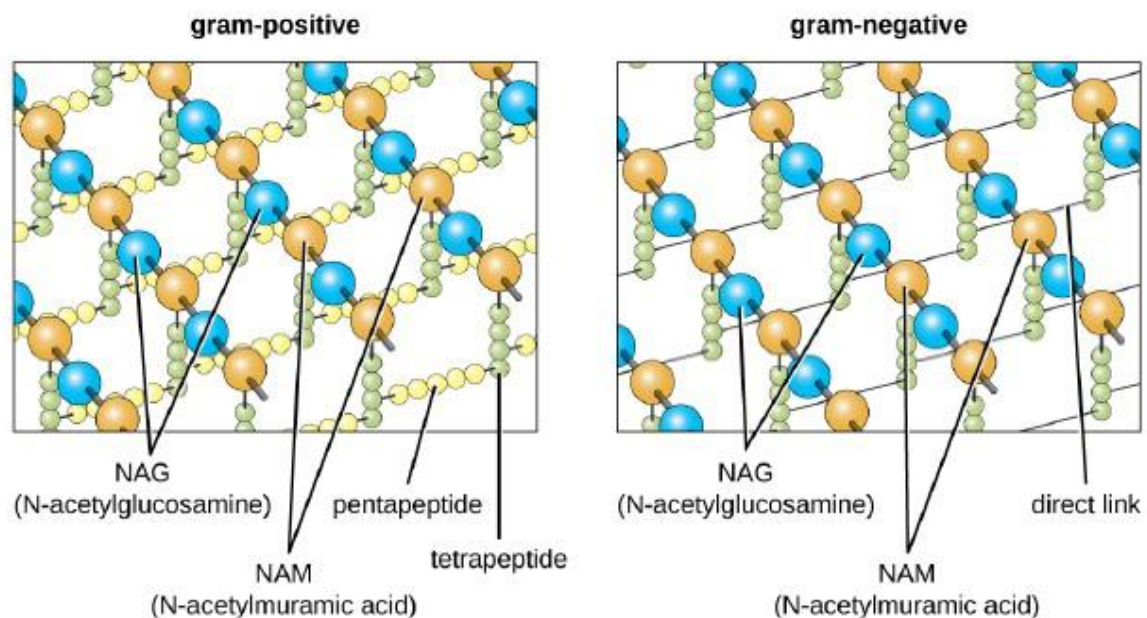
2) C period - dio ciklusa u kojem se odvija replikacija DNA

3) D period - dio ciklusa između završetka replikacije DNA i završetka dijeljenja stanice

DNA replikacija počinje na *oriC* mjestu na kružnom kromosomu i nastavlja se u dva smjera i prekida na regiji suprotnoj od *oriC* mjesta. Kromosom tijekom replikacije ostaje u kondenziranom obliku koji se zove nukleoid (Wang i Levin, 2009). Enzim DNA giraza (topoizomeraza II) ima ulogu u opuštanju superuzvijene bakterijske DNA što je nužno za početak replikacije. Enzim helikaza (DnaB) zatim razdvaja dvolančanu DNA u regiji bogatoj AT (adenin-timin) baznim parovima (ovi bazni parovi imaju slabije interakcije od GC baznih parova jer stvaraju manje vodikovih veza) (Parker i sur., 2017). DnaA protein, član AAA+ obitelji ATPaza, veže se na specifična mjesta na mjestu početka replikacije, a ima ulogu u odmatanju regije DNA bogate AT na *oriC* mjestu što omogućuje početak replikacije (Wang i Levin, 2009). Početak replikacije DNA određen je koncentracijom DnaA koja se nakuplja tijekom rasta bakterijske stanice pa je iz tog razloga nužno da bakterijska stanica postigne određenu veličinu da bi započela replikacija (Foster i Slonczewski, 2009). Nakon započete replikacije slijedi proces elongacije koji zahtjeva veliku količinu staničnih resursa, posebice deoksinukleozid-5'trifosfate (dNTP) pa zbog toga dNTP *pool* stanica treba konstantno obnavljati, a to ovisi o dostupnosti hranjivih tvari. Dostupnost hranjivih tvari također utječe i na inicijaciju replikacije i na odvajanje kromosoma (Wang i Levin, 2009). Nakon replikacije slijedi dioba stanica koja započinje na mjestu odvajanja kromosoma stvaranjem citokinetkog prstena (Z-prsten). Tubulinu-sličan protein FtsZ (eng. *filamenting temperature-sensitive mutant Z*) temelj je strukture citokinetkog prstena i neophodan je za odvijanje diobe stanica (Wang i Levin, 2009). Z-prsten sastavljen je od filamenata koji su sastavljeni od ponavljajućih jedinica FtsZ proteina (Erickson i sur., 2010; Dajkovic i Lutkenhaus, 2006; Margolin, 2005) i ima ulogu izgradnji stanične stijenke između dviju stanica koje se razdvajaju, a također i veže druge proteine stvarajući kontraktilnu silu koja razdvaja dvije stanice na području septuma (Bisson-Filho i sur., 2017; Osawa i sur., 2008). Baš kao i replikacija tako je i dioba stanica je

povezana s rastom i veličinom bakterijske stanice što je nužno da bi se održala prosječna veličina stanice nakon diobe jer stanice podijeljene prije nego im se masa udvostručila postaju iznimno malene nakon nekoliko generacija (Wang i Levin, 2009).

Bakterijska stanica *E.coli* ima ovojnici građenu iz tri sloja: unutarnja membrana (citoplazmatska membrana), stanična stijenka s tankim slojem peptidoglikana (mureina) i vanjski sloj u kojem se nalaze lipopolisaharidi (LPS). Peptidoglikan je strukturno građen u nekoliko slojeva, a svaki sloj sastavljen je od dugačkih lanaca naizmjenično povezanih molekula N-acetilglukozamina (NAG) i N-acetilmuraminske kiseline (NAM) kao što je prikazano na Slici 1. Kod *E.coli* ali i drugih gram-negativnih bakterija NAM molekule slojeva međusobno su direktno povezane tetrapeptidima, dok kod gram-pozitivnih bakterija NAM molekule nisu direktno povezane tetrapeptidima nego preko pentaglikanskih stuktura. LPS ima funkciju endotoksina što je karakteristično za infekcije s gram-negativnim bakterijama i uzrokuje razne simptome kao što su temperatura, hemoragija i septički šok. Svaka LPS molekula građena je od lipida A, sržnog polisaharida i O-bočnog lanca (O-polisaharid). *E.coli* obavijena je kapsulom s vanjske strane koja je građena od polisaharida. S vanjske strane *E.coli* ima fimbrije i pile koji su proteinske građe po strukturi a razlikuju se po tome što su pili dulji od fimbrija i ima ih samo nekolicina po svakoj stanici, a također *E.coli* ima i flagelarne filamente (Parker i sur., 2017).



Slika 1. Razlika strukture peptidoglikana gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Parker i sur., 2017).

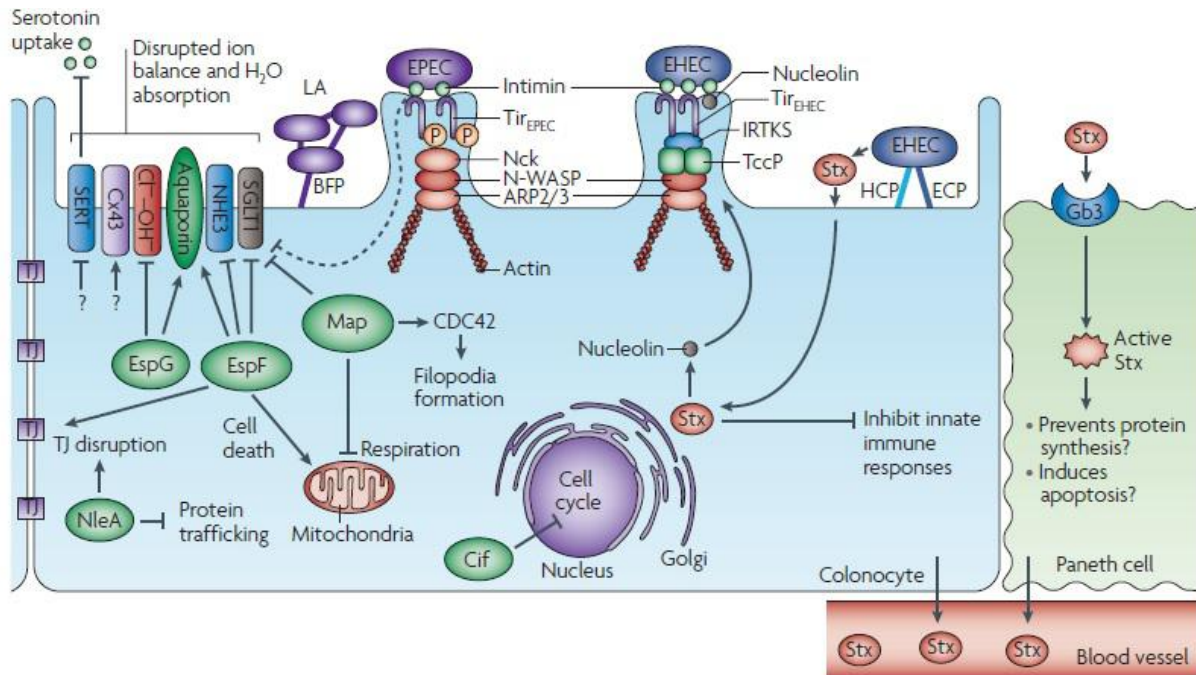
E.coli je ujedno i komenzal gastrointestinalnog sustava i jedan od najvažnijih patogena kod ljudi (Vila i sur., 2016). S obzirom na faktor virulencije i kliničke simptome koje uzrokuju, patogene sojeve *E.coli* klasificira se u različite patogene tipove koji mogu biti intestinalni (enterički) i ekstraintestinalni (ExPEC) što je detaljnije prikazano na **Slici 2**.

PATOGENI TIP	BOLESTI	SIMPTOMI	FAKTORI VIRULENCIJE
Crijevna <i>E.coli</i> (eng. Enteric <i>E.coli</i>)			
Enteropatogena <i>E.coli</i> (eng. <i>Enteropathogenic E.coli</i> , EPEC)	dijareja kod djece	vodenasta dijareja i povraćanje	Bfp (<i>Bundle-forming pili</i>), intimin, LEE (<i>Locus for enterocyte effacement</i>)
Enterohemoragična <i>E.coli</i> (eng. <i>Enterohaemorrhagic E.coli</i> , EHEC)	hemoragični kolitis, hemolitičko-uremički sindrom	krvava dijareja	Shiga toksin, intimin, Bfp (<i>Bundle-forming pili</i>)
Enterotoksična <i>E.coli</i> (eng. <i>Enterotoxigenic E.coli</i> , ETEC)	putnička dijareja	vodenasta dijareja i povraćanje	temperaturno nestabilni toksini, CFA (<i>Colonization factor antigen</i>)
Enteroagregativna <i>E.coli</i> (eng. <i>Enteraggregative E.coli</i> , EAEC)	dijareja kod djece	dijareja sa mukusom i povraćanje	AAF (<i>Aggregative adherence fimbria</i>), citotoksini
Difuzno prijanjajuća <i>E.coli</i> (eng. <i>Diffusely Adherent E.coli</i> , DAEC)	akutna dijareja kod djece	vodenasta dijareja i infekcije mokraćnih puteva	Daa (<i>Diffuse adhesin</i>), AIDA (<i>Adhesin involved in diffuse adherence</i>)
Enteroinvazivna <i>E.coli</i> (eng. <i>Enteroinvasive E.coli</i> , EIEC)	šigelozni slična infekcija	vodenasta dijareja i dizenterija	Shiga toksin, hemolizin, stanična invazija, Ipa (<i>Invasion plasmid antigen</i>)
Invazivno prijanjajuća <i>E.coli</i> (eng. <i>Adherent Invasive E.coli</i> , AIEC)	infekcija povezana sa Crohnovom bolesti	trajna intestinalna upala	fimbrije tipa 1, stanična invazija
Ekstraintestinalna <i>E.coli</i> (eng. Extraintestinal <i>E.coli</i>, ExPEC)			
Uropatogena <i>E.coli</i> (eng. <i>Uropathogenic E.coli</i> , UPEC)	infekcije donjih mokraćnih puteva i sustavne infekcije	cistitis, pijelonefritis	fimbrije tipa 1 i P, AAF (<i>Aggregative adherence fimbria</i>), hemolizin
<i>E.coli</i> uzročnik neonatalnog meningitisa (eng. <i>Neonatal Meningitis E.coli</i> , NMEC)	neonatalni meningitis	akutni meningitis, sepsa	fimbrije tipa S, kapsula K1
Patogena ptičja <i>E.coli</i> (eng. <i>Avian Pathogenic E.coli</i> , APEC)	bolesti uzrokovane hranom	-	fimbrije tipa 1 i P, kapsula K1

Slika 2. Patogeni tipovi *E.coli* (preuzeto i prilagođeno: Allocati i sur., 2013).

Horizontalni prijenos gena je važan mehanizam pomoću kojeg bakterije međusobno vrlo brzo razmjenjuju nove osobine pa tako primjerice nepatogena bakterija može postati patogena ukoliko dobije određeni set gena za virulenciju putem bakteriofaga, transpozona ili plazmida, a u slučaju EPEC (enteropatogena *E.coli* radi se o setu gena LEE (eng. *locus of enterocyte effacement*) na kromosomu. Patogeneza enteropatogene *E.coli* (EPEC) započinje početnim pričvršćivanjem bakterije za enterocite tankog crijeva pomoću pila (eng. *bundle-forming pili-BFP*) koji se nalaze na površini EPEC (Croxen i Finlay, 2010). Takvi pili omogućuju bakterijskoj stanici interakciju s drugim EPEC bakterijama i pomažu pri stvaranju lokaliziranih mikrokolonija, ali i omogućuju interakciju s receptorima na enterocitima koji sadrže N-acetil-laktozamin, (Hyland i sur., 2008). Glavno i temeljno obilježje patogeneze EPEC je sposobnost stvaranja A/E lezija (eng. *attaching and effacing*) (Nataro i Kaper, 1998), a svojstvo A/E lezija je čvrsto prijanjanje za stanicu domaćina putem intimina (protein vanjske membrane bakterijske stanice), a zatim narušavanje površine stanica što dovodi do odumiranja mikrovila (Ochoa i Contreras, 2011). Intimin stupa u interakciju s translociranim receptorom za intimin koji se nalazi na površini stanice domaćina (Croxen i Finlay, 2010). EPEC koristi T3SS (eng. *type III secretion system*) kako bi translocirao Tir u citoplazmu stanice domaćina, a Tir se zatim prebacuje na površinu stanice domaćina i služi kao receptor za intimin (Kenny i sur., 1997). Nakon vezanja intimina i Tir dolazi do fosforilacije Tir domaćinskim tirozin-kinazama što privlači Nck na mjesto vezanja Tir i intimina, a takav kompleks aktivira neuralni Wiskott-Aldrich protein (N-WASP) i ARP2/3 kompleks (eng. *actin-related protein 2/3*) što posreduje preraspodjeli aktina u citosketu stanice (Kalman i sur., 1999). Osim Tir, EPEC ima veliki broj drugih efektorskih proteina koje translocira u stanicu domaćina putem T3SS, a ti proteini narušavaju procese stanice domaćina, primjerice narušavaju strukturu citoskeleta, strukturu i funkciju mitohondrija, transport vode i iona, uzrokuju imunomodulaciju i doprinose nastanku dijareje i dr. Najvažniji efektorski proteini uključeni u nastanak dijareje su Map, EspF, EspG, EspG2 (Croxen i Finlay, 2010). EspF pridonosi narušavanju tijesnih spojeva (eng. *tight junction*) (Guttman i sur., 2006), a također smanjuje aktivnost Na/H transportera 3 (NHE3) (glavni posrednik apsorpcije natrija) (Hodges i sur., 2008). EspG i EspG2 smanjuju aktivnost transportera za Cl⁻ i OH⁻ (Gill i sur., 2007). EspF i EspG uzrokuju delokalizaciju akvaporina (Guttman i sur., 2007) i inhibiciju aktivnosti kontransportera za natrij i glukozu (SGLT1) (Dean i sur., 2006) i intestinalnog transportera za serotonin (SERT) (Esmaili i sur., 2009). Sve ove promjene koje uzrokuju efektorski proteini skupno dovode do narušavanja transporta i apsorpcije vode što rezultira dijarejom (Croxen i Finlay, 2010). EPEC je klasificiran na tipične i atipične sojeve ovisno o prisustvu plazmida

EAF (eng. *E.coli adherence factor*). Na ovom plazmidu postoje dva važna operona, a to su BFP (eng. *bundle-forming pilus*) i operon koji kodira transkripcijski aktivator koji se zove Per (eng. *plasmid encoded regulator*). No bez obzira na prisustvo EAF plazmida, nijedan EPEC soj nema gene koji proizvode shiga toksin (stx) (Ochoa i Contreras, 2011). Sve navedeno o patogenezi EPEC prikazano je na **Slici 3**.



Slika 3. Patogenetski mehanizam EPEC i EHEC (Croxen i Finlay, 2010).

Intestinalni patogeni šire se fekalno-oralnim putem ingestijom zaražene hrane ili vode (Allocati i sur., 2013). Iako je *E.coli* najčešće povezana s infekcijama mokraćnog trakta, može uzrokovati infekciju bilo kojeg ekstraintestinalnog mjesta što dovodi do meningitisa, infekcija kože, miozitisa, osteomijelitisa, epididimo-orhitisa i dr. Teške infekcije uzrokovane *E.coli* uključuju infekciju krvotoka (eng. *bloodstream infection*) što često rezultira SIRS-om (eng. *systemic inflammatory response syndrome*) koji je uzrok više od 40 000 smrti godišnje u SAD-u (Russo i Johnson, 2003).

U novije vrijeme, veliku pažnju privukla je ESBL (eng. *extended spectrum beta-lactamase*)-producirajuća *E.coli* (Shaikh i sur., 2015). Ovaj soj u genomu sadrži gene koji kodiraju za enzime koji pridonose rezistenciji na širok spektar β -laktamskih antibiotika uključujući penicilin, cefalosporine prve, druge i treće generacije i aztreonam, a geni za rezistenciju na te antibiotike prenose se plazmidom (Gao i sur., 2015; Malloy i Campos, 2011). ESBL sojevi *E.coli* često sadrže i gene za rezistenciju i na druge vrste antibiotika, primjerice fluorokinolone, aminoglikozide i tetraciklin, što dodatno smanjuje terapijske mogućnosti (Kürekci i sur., 2017). Tijekom zadnjih nekoliko godina, ESBL-producirajući sojevi *E.coli*

izolirani su iz raznih izvora primjerice iz kliničkih uzoraka, hrane i vode za piće (Kürekci i sur., 2017). Mnogi ESBL sojevi *E.coli* imaju u genomu gene koji kodiraju CTX-M enzime koji su odgovorni za β -laktamaznu aktivnost, a takvih CTX-M enzima ima više od 80 različitih vrsta (Bonnet, 2004). Drugi manje zastupljeni enzimi su TEM, SHV, VEB i GES enzimi (Canton i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Metali su korišteni od davnina za borbu protiv infekcija jer su globalna prijetnja ljudskom zdravlju, a s uvođenjem nanotehnologije, metalnim nanočesticama pridodaje se sve veća važnost kao antimikrobnom sredstvu jer dokazano djeluju na širok spektar bakterija i gljivica. Prekomjerna i neprimjerena uporaba antibiotika kao antimikrobnog sredstva dovela je do razvitka sve većeg broja mikroorganizama za koje nedostaje učinkovito sredstvo s kojim bi ih tretirali te na taj način spriječili razvitak bolesti i njeno daljnje širenje. Potraga za nekim drugim antimikrobnim sredstvom koje bi nadvladalo otpornost novih mikrobnih sojeva, koje bi prije svega bilo sigurnije za upotrebu od antibiotika, dovela je do razvoja nanotehnologije i upotrebe metalnih nanočestica u tu svrhu. Njihova prednost u odnosu na druge načine borbe protiv mikroorganizama je u istovremenom djelovanju više mehanizama što znatno otežava mikroorganizmima razvoj otpornosti prema nanočesticama pa stoga ni ne treba čuditi njihova sve veća popularnost i primjena kao antimikrobnog sredstva što je potkrijepljeno brojnim istraživanjima navedenima u prošlom poglavlju. Mnoge vrste nanočestica metala pokazale su izvrstan antimikrobni učinak prema širokom spektru mikroorganizama, a sukladno tome u ovom radu cilj je bio ispitati antimikrobni učinak koloidnih otopina nanočestica srebra (čestice veličine 10 nm), nanočestica cinkova oksida (promjera 100 nm) i nanočestica titanova dioksida (promjera 150 nm) na bakteriju *Escherichia coli* (ATCC soj i ESBL+ soj). *E.coli* izvrstan je modelni organizam za proučavanje antimikrobnog učinka nanočestica jer spada u najviše proučenu bakteriju, a najčešći je uzročnik urogenitalnih infekcija kod ljudi, no također i infekcija drugih organskih sustava koje mogu biti i smrtonosne. Zbog učestalosti infekcija uzrokovanih s *E.coli* i stalnih pokušaja borbe protiv nje na razne načine, primjerice antibioticima, došlo je do razvoja vrlo otpornih spojeva protiv kojih se teško boriti trenutno dostupnim terapeutima. Stoga je potrebno pristupiti novim načinima liječenja infekcija uzrokovanih s *E.coli*, a nanočestice metala imaju itekako obećavajuće rezultate.

Koncept eksperimentalnog dijela podijeljen je u nekoliko koraka:

- 1) Odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) i minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK) koloidnih otopina nanočestica srebra (promjera 10 nm), cinkova oksida i titanova dioksida na bakteriju *Escherichia coli* ATCC 10536 korištenjem modificirane metode dvostruke serijalne mikrodilucije.

- 2) Ispitati postojanje sinergističkog učinka navedenih koloidnih otopina nanočestica na bakteriju *E.coli* ATCC 10536 soj i *E.coli* ESBL+ MFBF 12794 soj koristeći računalno optimiziranu smjesu na način da se izračunaju indeksi djelomične baktericidne koncentracije (FBK) i djelomične inhibitorne koncentracije (FIK).
- 3) Ispitati antimikrobni učinak u vremenu koristeći računalno optimiziranu smjesu navedenih koloidnih otopina nanočestica impregniranu na komadiće tekstila primjenom tzv. *time-kill* metode. Ispitan je antimikrobni učinak na *E.coli* ATCC 10536 soj i *E.coli* ESBL+ MFBF 12794 soj.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijske vrste

Bakterijska vrsta ispitivana u ovom radu je *Escherichia coli* (*E.coli*), sojevi ATCC (*American Type Culture Collection*, SAD) 10536 i ESBL+ (eng. *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) MFBF 12794 uzeti iz Zbirke mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Mikrobiološki i drugi materijal

Od mikrobioloških hranjivih podloga, u radu je korišten triptikaza-sojin agar (TSA). Fiziološka otopina pH 7.0 (0.9 % NaCl) priređena je „*in house*“. Sav mikrobiološki materijal steriliziran je autoklaviranjem 15 minuta pri temperaturi 121 °C i tlaku 1.2 bar.

3.3. Nanočestice

U radu su korištene koloidne otopine nanočestica elementarnog srebra promjera 10 nanometara, cinkova oksida promjera 100 nanometara i titanova (IV) oksida promjera 150 nanometara, proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Navedene koloidne otopine nanočestica čuvale su se na +4°C do izvođenja pokusa.

3.4. Uzgoj bakterijske vrste

Sojevi ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 vrste *E.coli* nasađeni su na triptikaza-sojin agar (TSA), a zatim inkubirani 18-24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan).

3.5. Priprava inokuluma

Inokulumi u gornjem tekstu navedenih sojeva pripremljeni su suspendiranjem u fiziološkoj otopini pH 7.0 (0.9 % NaCl) tako da optička gustoća konačne suspenzije bude 0,5 McFarlandovih jedinica što odgovara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL te je navedena suspenzija razrijeđena fiziološkom otopinom u omjeru 1 naprema 9 volumnih jedinica. Optička gustoća određena je nefelometrijski na uređaju DEN-1 McFarland Densitometer, tvrke Kisker Biotech GmbH&Co, Steinfurt, Njemačka.

3.6. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) koloidnih nanočestica

Minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije na vrsti *E.coli* (sojevi ATCC 10536 i ESBL+ MFBBF 12794) određivale su se pomoću modificirane metode dvostruke serijalne mikrodilucije prema EUCAST smjernicama. Metoda je “modificirana” jer se umjesto standardnog Mueller-Hinton bujona koristila fiziološka otopina. Razrjeđenja ispitivanih koloidnih otopina nanočestica vršila su se pomoću navedene fiziološke otopine u mikrotitarskim pločicama ravnog dna napravljene od polisterena s 96 mjesta tako da je konačni volumen svake jažice bio 100 μ L, a koncentracija ispitivane nanočestice u određenoj jažici bila upola manja od koncentracije ispitivane nanočestice u prethodnoj jažici. U svaku jažicu uneseno je 100 μ L inokuluma opisanog u **poglavlju 3.5.**, dok je kao pozitivna kontrola služila smjesa 100 μ L fiziološke otopine i 100 μ L navedenog inokuluma. Mikrotitarske pločice inkubirane su 18 - 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan). Nakon inkubacije, 10 μ L pojedinog razrjeđenja nanosilo se na sektore krute hranjive podloge triptikaza-sojinog agara (TSA) pomoću sterilne eze te inkubiralo pri navedenim uvjetima. MBK je određena kao najmanja koncentracija pri kojem nije bilo porasta bakterija na krutoj hranjivoj podlozi, dok je MIK određen kao najmanja koncentracija pri kojem je gustoća bakterija na krutoj hranjivoj podlozi upola smanjena u odnosu na kontrolu.

3.7. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica

U svrhu ispitivanja postojanja sinergističkog učinka pripremila se jedna smjesa triju koloidnih nanočestica (elementarno srebro promjera 10 nm, cinkov dioksid promjera 100 nm, titanov dioksid promjera 150 nm) pripremljena koristeći računalni program Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1) pomoću kojeg se predvidjela optimalna koncentracija pojedinih nanočestica. Sastav korištene smjese je 0.794 ppm nanočestica srebra, 683.217 ppm nanočestica titanova dioksida i 15.989 ppm nanočestica cinkova oksida baš kao što je prikazano u **Tablici 1.**

Tablica 1. Sastav smjese optimizirane pomoću računalnog programa Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1).

	Ag / ppm	TiO ₂ / ppm	ZnO / ppm	Ukupno / ppm
smjesa 1	0.794	683.217	15.989	700.000

Za potrebe utvrđivanja postojanja sinergizma navedenih koloidnih otopina nanočestica na bakterijsku vrstu *E.coli*, soj ATCC 10536, računat je indeks djelomične (frakcionarne) inhibitorne koncentracije (FIK_{indeks}) i djelomične (frakcionarne) baktericidne koncentracije (FBK_{indeks}) za navedenu smjesu prema formuli :

$$FIK_{\text{indeks}}(\text{smjesa}) = \sum_{i=1}^n \frac{MIK_{\text{kombinacija}}(i)}{MIK_{\text{samostalno}}(i)}$$

Gdje $MIK_{\text{kombinacija}}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u smjesi nanočestica dok $MIK_{\text{samostalno}}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u fiziološkoj otopini. MIK i MBK vrijednosti za pojedine nanočestice i za smjesu nanočestica određivale su se postupkom dvostruke serijalne mikrodilucije koji je opisan u poglavlju 3.6.

FIK indeks koristi se za opisivanje interakcija među lijekovima u smjesi tj. za utvrđivanje sinergizma odnosno antagonizma određenih lijekova koji je proširen i na utvrđivanje sinergizma odnosno antagonizma i baktericidnog djelovanja nanočestica. Ukoliko je FIK indeks niži od 1 to ukazuje na postojanje sinergizma, ukoliko je viši od 1 ukazuje na antagonizam, a ukoliko je FIK indeks 1 to ukazuje na aditivnost (ukoliko kombiniramo neki lijek sam sa sobom učinak može biti jedino aditivan jer lijek ne može stupiti u interakciju sam sa sobom (Berenbaum, 1989)). Sinergizam lijekova ili nanočestica označava da je svakog lijeka / nanočestice u smjesi potrebno manje da se postigne isti učinak kao lijek / nanočestice samostalno. Antagonizam lijekova ili nanočestica označava da je svakog lijeka / nanočestice u smjesi potrebno više da se postigne isti učinak kao lijek / nanočestice samostalno.

3.8. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode

Tkanina dimenzije 1cm² impregnirana je slojem prethodno navedene smjese 1 koristeći sol-gel postupak. Postupak obuhvaća reakciju hidrolize i kondenzacije metalnih alkoksida pri čemu nastaje neprekinuta trodimenzijska metaloksidna mreža, odnosno iz koloidne se otopine (sol) dobiva mreža u kontinuiranoj tekućoj fazi (gel).

U svrhu ispitivanja antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u ovisnosti o vremenu korištena je „time-kill“ metoda (Peran i sur., 2017). Na navedene tkanine nanoseno je 100 µL inokuluma sojeva ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12974 vrste *E.coli* u sterilnim Petrijevim zdjelicama, dok je kao pozitivna kontrola služila tkanina bez impregniranog sloja smjese koloida nanočestica. Antimikrobna učinkovitost ispitivana je u trenutku kontakta tkanine sa mikroorganizmima (t_0) te nakon inkubacije (37°C pri aerobnim

uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan)) u trajanju od 1 (t_1), 3 (t_3), 6 (t_6), 12 (t_{12}), 18 (t_{18}) i 24 (t_{24}) sata. Nakon navedenih vremena inkubacije, tkanina je prenešena pomoću sterilne pincete u sterilnu Falcon epruvetu u koju se potom dodalo 1 mL fiziološke otopine. Sadržaj epruvete miješao se na tresilici (proizvođač IKA, Njemačka) 30 sekundi te se 100 μ L otopine razrijedilo do 1 mL u sterilnoj Eppendorf epruveti pomoću fiziološke otopine. Postupak je ponovljen još 3-7 puta (ovisno o vremenu prekida inkubacije tkanine) tako da ukupno bude najmanje 3-7 serijalnih desetorostrukih razrjeđenja. Sva razrjeđenja su se pripremala u duplikatu. Iz sterilnih Falcon i Eppendorf epruveta uzelo se 100 μ L alikvota te se ravnomjerno razmazalo pomoću staklenog L-štipića na TS agar i inkubiralo 18 - 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan).

Broj kolonija izražen u logaritmu broja CFU (eng. *Colony forming unit*) po mililitru otopine računao se prema sljedećoj jednadžbi :

$$\log_{10} \left[\text{broj kolonija} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) \right] = \log_{10} (\text{broj izbrojanih kolonija} \times 10^{\text{broj razrjeđenja}+1})$$

Konačni rezultat izražen je kao graf ovisnosti broja kolonija (izraženih kao logaritam broja CFU/mL) o vremenu te kao graf ovisnosti postotka redukcije broja kolonije naspram maksimalnog broja mikroorganizma u vremenu.

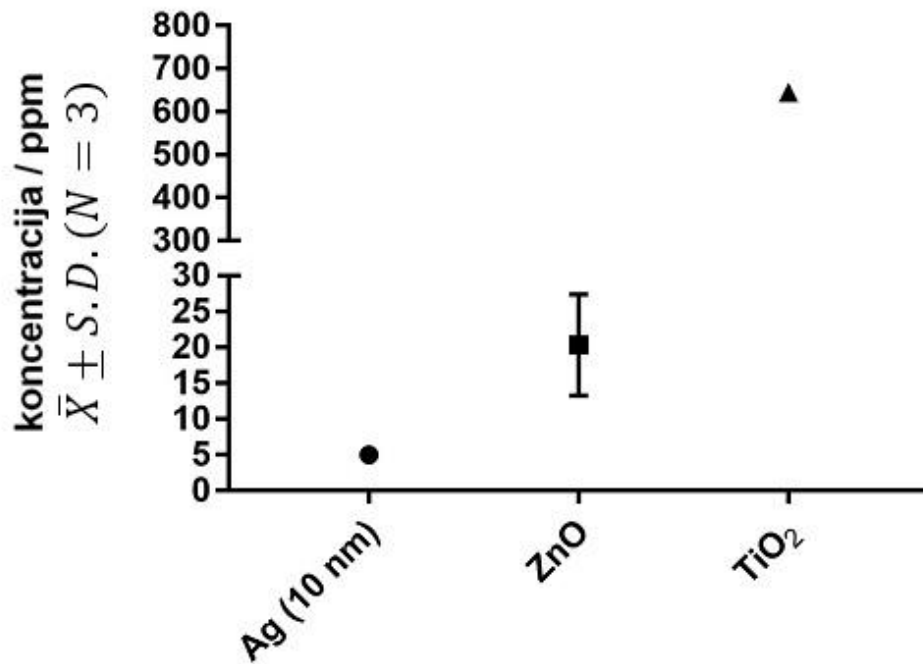
4. REZULTATI

4.1. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini na bakterijsku vrstu *E.coli* ATCC 10536

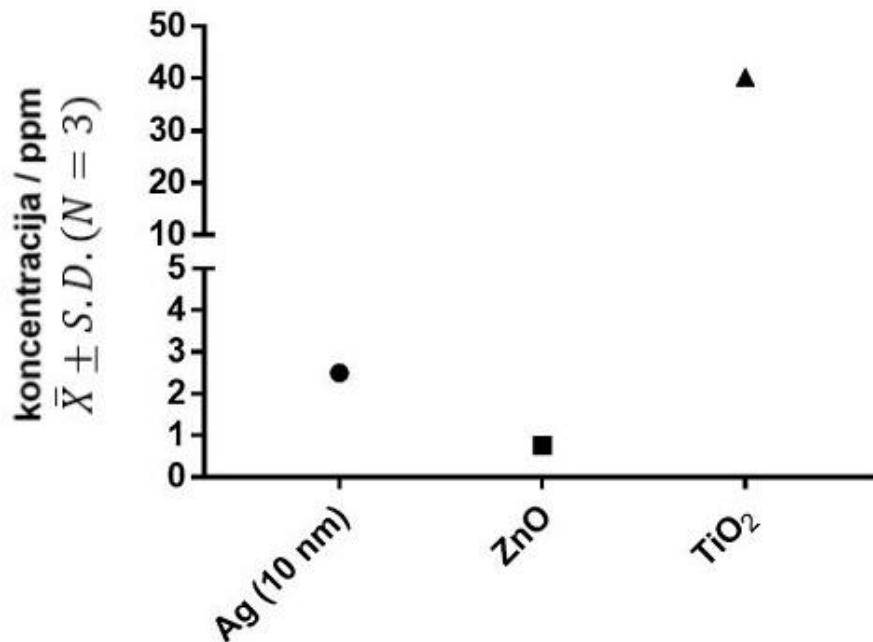
Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini prikazane su u **Tablici 2.** i izražene su kao koncentracije (ppm) s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima, a **grafovima 1. i 2.** vizualno je prikazan sadržaj Tablice 2. Uspoređujući MBK vrijednosti triju vrsta koloidnih nanočestica, TiO₂ nanočestice u fiziološkoj otopini imaju najveću MBK vrijednost dok Ag nanočestice imaju najnižu MBK vrijednost što govori da su Ag nanočestice najpotentnije u smislu baktericidnog djelovanja od navedene tri vrste nanočestica za *E.coli* ATCC 10536. Zanimljivo je za istaknuti da unatoč tome što Ag nanočestice imaju najveći baktericidni učinak, ZnO nanočestice imaju najizraženiji bakteriostatski učinak što je vidljivo iz MIK vrijednosti triju koloidnih otopina nanočestica. Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između MIK i MBK vrijednosti koloidnih nanočestica (Kruskal-Wallisov test, $\alpha=0.05$, $p < 0.05$).

Tablica 2. MIK i MBK vrijednosti koloidnih otopina nanočestica za bakterijsku vrstu *Escherichia coli* ATCC 10536.

	MIK / ppm	MBK / ppm
	$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$	$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$
Ag nanočestice (10 nm)	2.500 ± 0.000	5.000 ± 0.000
ZnO nanočestice	0.763 ± 0.000	20.345 ± 7.048
TiO₂ nanočestice	40.280 ± 0.000	644.530 ± 0.000



Graf 1. MBK vrijednosti koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini izražene kao koncentracija s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima za *E.coli* ATCC 10536.



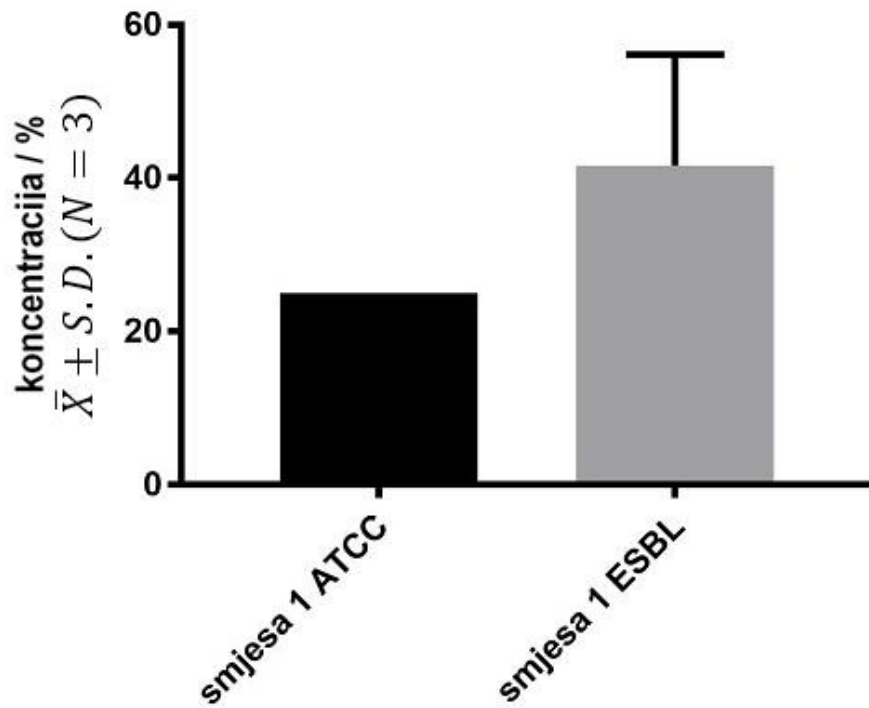
Graf 2. MIK vrijednosti koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini izražene kao koncentracija s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima za *E.coli* ATCC 10536.

4.2. Ispitivanje postojanja synergizma između koloidnih otopina nanočestica

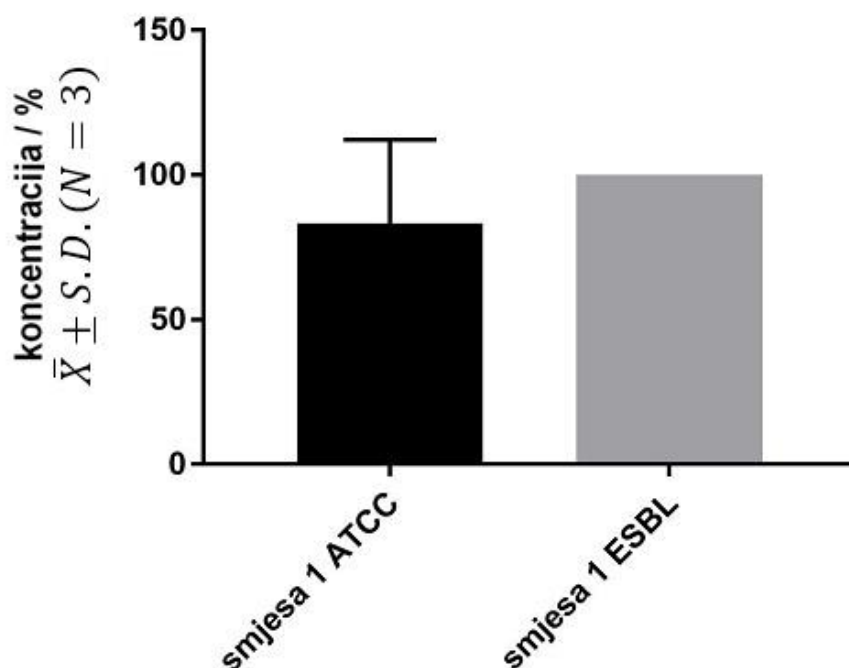
U **tablici 1.** poglavlja 3.7. naveden je sastav optimirane smjese korištene za ispitivanje postojanja synergističkog učinka smjese koloidnih otopina nanočestica. Smjesa je optimirana pomoću računalnog programa Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1). U **Tablicama 3., i 4.** prikazane su MBK i MIK vrijednosti optimirane smjese za sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794 bakterijske vrste *E.coli*. **Grafovima 3., 4., 5., i 6.** vizualno su prikazani tablični podaci za MBK i MIK vrijednosti korištene smjese. Statističkom analizom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u antimikrobnom učinku (MBK i MIK vrijednostima izraženima i kao postotak razrjeđenja smjese i kao ukupna koncentracija izražena u ppm-ima) ispitivane smjese na sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794 (Mann-Whitney test, p-vrijednosti > 0.05 i za MIK i za MBK).

Tablica 3. MBK i MIK vrijednosti korištene optimirane smjese za bakterijsku vrstu *E.coli* sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794. MBK i MIK vrijednosti izražene su kao postotak razrjeđenja smjese.

	<i>E.coli</i> ATCC 10536		<i>E.coli</i> ESBL+ MFBB 12794	
	$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$		$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$	
	MBK / %	MIK / %	MBK / %	MIK / %
smjesa 1	83.33 ± 28.87	25 ± 0.00	100 ± 0.00	41.67 ± 14.43



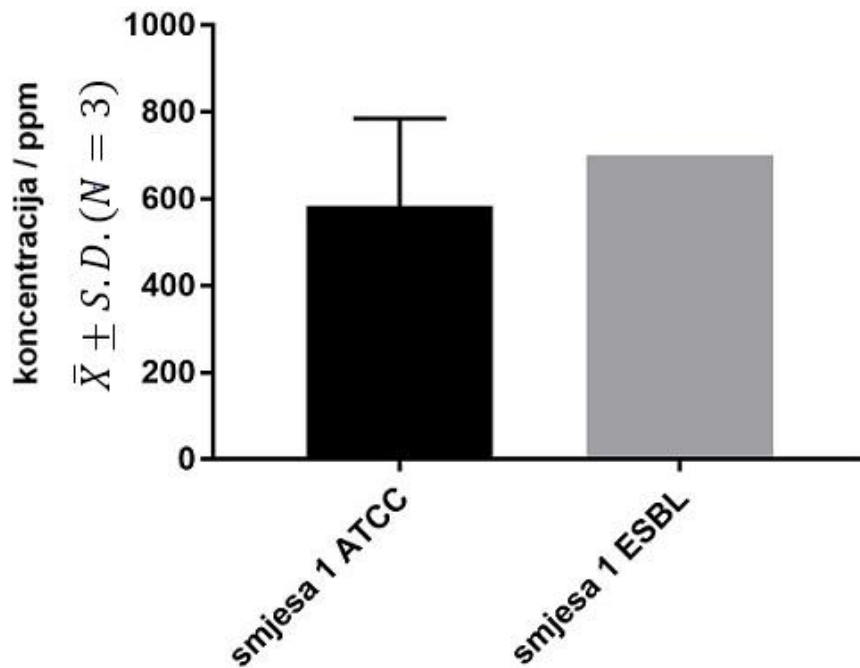
Graf 3. MIK vrijednosti korištene smjese za sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794. Koncentracije su izražene u postotku razrjeđenja smjese s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima.



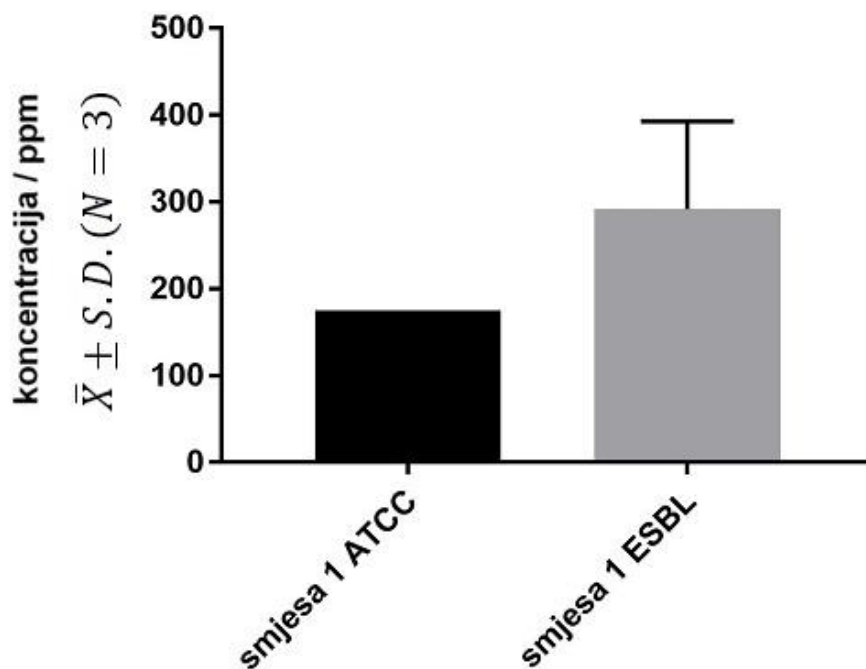
Graf 4. MBK vrijednosti korištene smjese za sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794. Koncentracije su izražene u postotku razrjeđenja smjese s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima.

Tablica 4. MBK i MIK vrijednosti korištene optimirane smjese za bakterijsku vrstu *E.coli* sojeva ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794. MIK i MBK vrijednosti izražene su kao ukupna koncentracija svih nanočestica u smjesi.

	<i>E.coli</i> ATCC 10536		<i>E.coli</i> ESBL+ MFBB 12794	
	$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$		$\bar{X} \pm S.D.(N = 3)$	
	MBK / ppm	MIK / ppm	MBK / ppm	MIK / ppm
smjesa 1	175 ± 0.00	583.33 ± 202.0	291.67 ± 101.04	700 ± 0.00



Graf 5. MIK vrijednosti korištene smjese za sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794. Koncentracije su izražene kao ukupna koncentracija svih nanočestica smjese s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima.



Graf 6. MBK vrijednosti korištene smjese za sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794. Koncentracije su izražene kao ukupna koncentracija svih nanočestica smjese s pripadajućim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima.

Za potrebe utvrđivanja postojanja sinergizma navedenih koloidnih otopina nanočestica na bakterijsku vrstu *E.coli*, soj ATCC 10536, računat je indeks djelomične (frakcionarne) inhibitorne koncentracije (FIK_{indeks}) i djelomične (frakcionarne) baktericidne koncentracije (FBK_{indeks}) za navedenu smjesu prema formuli :

$$FIK_{indeks}(smjesa) = \sum_{i=1}^n \frac{MIK_{kombinacija}(i)}{MIK_{samostalno}(i)}$$

Gdje $MIK_{kombinacija}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u smjesi nanočestica dok $MIK_{samostalno}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u fiziološkoj otopini.

MIK i MBK vrijednosti za pojedine nanočestice i za smjesu nanočestica određivale su se postupkom dvostruke serijalne mikrodilucije koji je opisan u **poglavlju 3.6**.

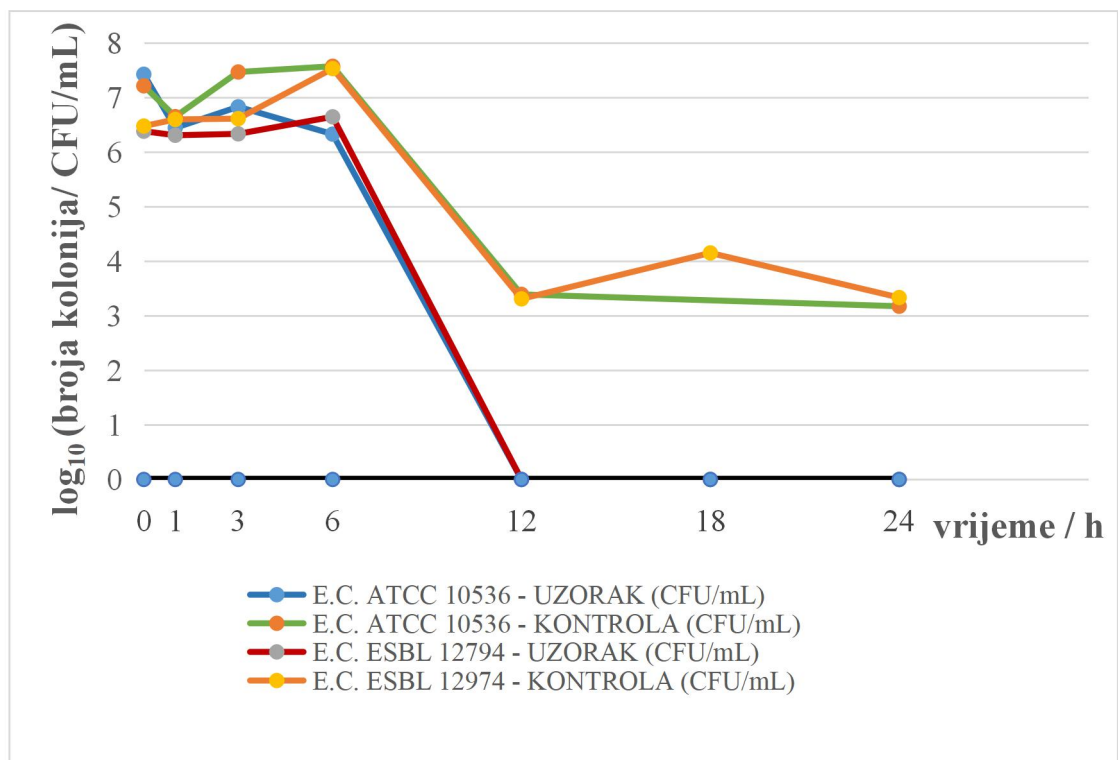
U **Tablici 5**, prikazane su izračunate FIK i FBK vrijednosti za soj *E.coli* ATCC 10536, a te izračunate vrijednosti govore u prilog antagonizmu koloidnih otopina nanočestica u smjesi odnosno smanjen je baktericidan učinak i izrazito smanjen bakteriostatski učinak.

Tablica 5. FIK i FBK vrijednosti korištene smjese s pripadajućom interpretacijom za soj *E.coli* ATCC 10536.

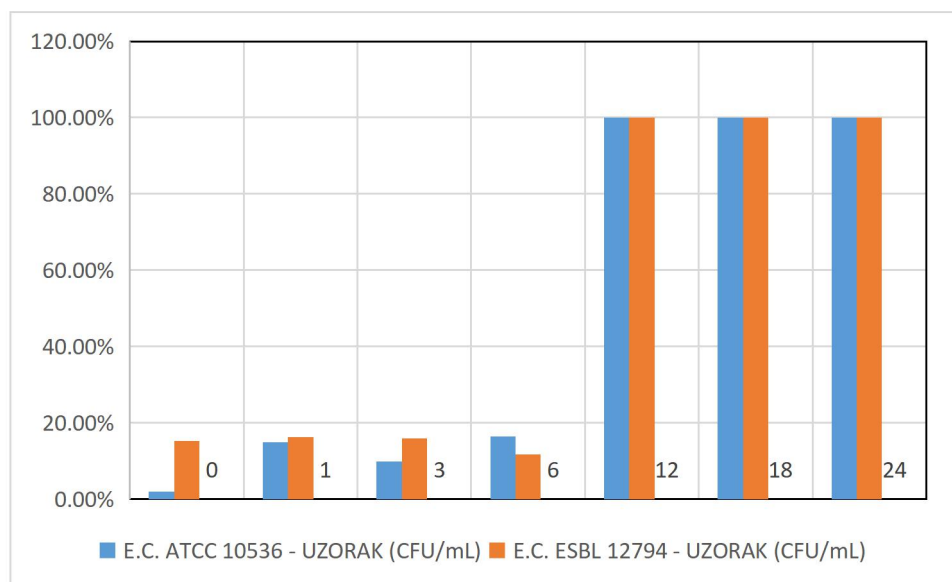
	<i>E.coli</i> ATCC 10536	
	FBK	FIK
smjesa 1	1.67	9.56
interpretacija	antagonizam	antagonizam

4.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode

Na **Grafu 7.** prikazani su rezultati ispitivanja antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica. Broj kolonija izražen je kao \log_{10} (broj kolonija / CFU/mL), a analiza je provedena odmah nakon kontakta inokuluma mikroorganizama s tkaninom (t_0) te nakon inkubacije u trajanju od 1 (t_1), 3 (t_3), 6 (t_6), 12 (t_{12}), 18 (t_{18}) i 24 (t_{24}) sata. Statistički značajna razlika broja kolonija u usporedbi s kontrolom soja (Mann-Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$) za oba soja uočava se nakon 12 sati. Na **grafu 8.** prikazan je postotak redukcije broja kolonija u odnosu na maksimalan broj mikroorganizama pojedinog soja (nulto vrijeme inkubacije). Nema statistički značajne razlike između sojeva (Mann-Whitney test, $\alpha=0.05$, $p > 0.05$) što se tiče postotka redukcije broja kolonija u vremenu.



Graf 7. Grafički prikaz ovisnosti logaritma broja kolonija o vremenu za sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12974 vrste *E.coli* inokulirane na tkaninu.



Graf 8. Ovisnost postotka redukcije broja kolonija o vremenu izraženom u satima za sojeve ATCC 10536 i ESBL+MFBF 12974 inokulirane na ispitivanu tkaninu u usporedbi s maksimalnim brojem mikroorganizama određenog soja.

5. RASPRAVA

Koloidne nanočestice metala i metalnih oksida u ovom eksperimentu, kao i u brojnim drugima do sada, pokazale su zavidnu, čak štoviše i odličnu razinu antimikrobne aktivnosti što je vidljivo ako pogledamo njihove MIK i MBK vrijednosti kada se nalaze u fiziološkoj otopini, ali i kada se nalaze u smjesi. Uspoređujući MBK vrijednosti triju vrsta koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini, TiO₂ nanočestice imaju najveću MBK vrijednost (644.530 ± 0.000 ppm) dok Ag nanočestice imaju najnižu MBK vrijednost (5.000 ± 0.000 ppm) što govori da su Ag nanočestice najpotentnije u smislu baktericidnog djelovanja od navedene tri vrste nanočestica za *E.coli* ATCC 10536. Zanimljivo je za istaknuti da unatoč tome što Ag nanočestice imaju najveći baktericidni učinak, ZnO nanočestice imaju najizraženiji bakteriostatski učinak što je vidljivo iz MIK vrijednosti triju koloidnih otopina nanočestica (ZnO imaju najniži MIK među proučavanim koloidima nanočestica). Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između MIK i MBK vrijednosti koloidnih nanočestica (Kruskal-Wallisov test, $\alpha=0.05$, $p < 0.05$). Međutim, ukoliko uspoređujemo samo ZnO i Ag koloidne otopine nanočestica koje imaju MIK vrijednosti u rasponu 0.76-2.50 ppm i MBK vrijednosti u rasponu 5.0-25.0 ppm, statistički gledano nema značajne razlike u njihovom bakteriostatskom i baktericidnom djelovanju (Mann-Whitney test, $p > 0.05$ i za MBK i za MIK vrijednosti).

U daljnjem eksperimentu korištena je smjesa dobivena uz pomoć računalnog programa Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1), a sastojala se od 0.794 ppm nanočestica srebra, 683.217 ppm nanočestica titanova dioksida i 15.989 ppm nanočestica cinkova oksida što ukupno čini smjesu od 700.000 ppm. Ispitivan je antibakterijski učinak na sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 bakterijske vrste *E.coli*. Rezultati govore da nema statistički značajne razlike u antimikrobnom učinku (MBK i MIK vrijednostima izraženima i kao postotak razrjeđenja smjese i kao ukupna koncentracija izražena u ppm-ima) ispitivane smjese na sojeve *E.coli* ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 (Mann-Whitney test, p -vrijednosti > 0.05 i za MIK i za MBK). U svrhu ispitivanja sinergizma koloidnih nanočestica u smjesi računale su FIK odnosno FBK vrijednosti za soj ATCC 10536 vrste *E.coli*, a iznosile su 9.56 odnosno 1.67 što govori kako ne postoji sinergizam koloidnih nanočestica u smjesi (FIK / FBK vrijednosti > 1).

Što se tiče ispitivanja antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese nanočestica na sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 bakterijske vrste *E.coli*, statistički značajna razlika broja kolonija u usporedbi s kontrolom (Mann-Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$) za oba soja uočava se nakon 12 sati. Redukcija broja kolonija je potpuna odnosno stopostotna nakon 12 sati te u daljnim točkama nije uočen porast bakterijskih kolonija. Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u postotku redukcije broja kolonija između korištenih sojeva (Mann-Whitney test, $\alpha=0.05$, $p > 0.05$).

Tijekom ispitivanja pojavio se problem s kontrolnim uzorkom jer je uočen pad broja kolonija za više od tri logaritamske jedinice u odnosu na početne vrijednosti. To se može objasniti time što je za inokulaciju tkanine korišteno samo 100 μL inokuluma svakog soja, a inkubacija nije provedena u tekućem mediju pa je moguće da je došlo do isparavanja mikroorganizama s tkanine ili da se dio mikroorganizama zbog svog oblika i svojstava tijekom inkubacije vezao za tkaninu pa ga nije bilo moguće odvojiti s nje vorteksiranjem. Također je moguće i da sama tkanina posjeduje slabi antimikrobni učinak.

Antagonizam u smislu bakteriostatske i baktericidne aktivnosti koloidnih nanočestica u smjesi govori da iako navedene nanočestice imaju vrlo slične nespecifične antimikrobne mehanizme da bez obzira na to one ne djeluju sinergistički kada su u smjesi zbog mogućeg stupanja u međusobne interakcije ili međudjelovanje s mikroorganizmom i okolinom. Stoga su potrebna daljnja istraživanja koloidnih nanočestica metala i metalnih oksida kako bi se detaljnije proučio njihov mehanizam djelovanja i ponašanje tj. njihovo međudjelovanje u smjesi kako bi se izbjegla potencijalna toksičnost i nepredviđen učinak na zdravlje čovjeka. No bez obzira na to, pokazano je kako su koloidne nanočestice metala i metalnih oksida vrlo djelotvorno sredstvo stalne i neprestane borbe protiv mikroorganizama i kada se nalaze samostalno u otopini, ali i kada je više njih u smjesi te svakako imaju obećavajuću primjenu u biomedicini i biotehnologiji kao sredstvo borbe protiv infekcija.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Koloidne otopine nanočestica srebra, titanova dioksida i cinkova dioksida u fiziološkoj otopini pokazale su izvrsno antimikrobno djelovanje soj *E.coli* ATCC 10536, a među navedenima najpotentnije u smislu baktericidnog djelovanja pokazale su se koloidne nanočestice srebra.
- 2) Nema značajne razlike u antimikrobnom učinku korištene smjese na sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 vrste *E.coli*.
- 3) Sinergizam između koloidnih nanočestica u smjesi nije uočen odnosno FIK i FBK vrijednosti govore u prilog antagonizmu.
- 4) Ispitivanjem antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese nanočestica uočava se stopostotna redukcija broja kolonija nakon 12 sati.
- 5) Nije uočena statistički značajna razlika u postotku redukcije broja kolonija između sojeva ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 vrste *E.coli*.

7. LITERATURA

- Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Verma A, Ahamed M, Ahmed M, Alhadlaq HA. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8, 983-993.
- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*, 2008, 5(4), 505-515.
- Ali A, Zafar H, Zia M, Ul Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*, 2016, 9, 49-67.
- Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol*, 2011, 6(8), 933-940.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int J Environ Res Publ Health*, 2013, 10(12), 6235-6254.
- Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Sultan A, Azam A. Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital of north India. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(2), 467-477.
- Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005, 5(2), 244-249.
- Berenbaum MC. What is synergy?. *Pharmacol Rev*, 1989, 41(2), 93-141.
- Bisson-Filho AW, Hsu YP, Squyres GR, Kuru E, Wu F, Jukes C, Sun Y, Dekker C, Holden S, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Garner EC. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 2017, 355(6326), 739-743.
- Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 1-14.
- Blackman J. *Metallic Nanoparticles*. Reading, Elsevier B.V., 2009, str. 1-2.
- Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, 1997, 63(1), 125-132.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, 2012, 3, 110.

Carré G, Hamon E, Ennahar S, Estner M, Lett MC, Horvatovich P, Gies JP, Keller V, Keller N, Andre P. TiO₂ photocatalysis damages lipids and proteins in *Escherichia coli*. *J Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(8), 2573-2581.

Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1), 26-38.

Dajkovic A, Lutkenhaus J. Z ring as executor of bacterial cell division. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2006, 11(3-5), 140-151.

Dean P, Maresca M, Schüller S, Phillips AD, Kenny B. Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(6), 1876-1881.

Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng*, 2014, 44, 278-283.

Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. *PLoS One*, 2014, 9(11), e111289.

Egger S, Lehmann RP, Height MJ, Loessner MJ, Schuppler M. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9), 2973-2976.

Emami-Karvani Z, Chehrazi P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram positive and gram-negative bacteria. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5(12), 1368-1373.

Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(4), 504-528.

Esmaili A, Nazir SF, Borthakur A, Yu D, Turner JR, Saksena S, Singla A, Hecht GA, Alrefai WA, Gill RK. Enteropathogenic *E. coli* infection inhibits intestinal serotonin transporter (SERT) function and expression. *Gastroenterology*, 2009, 137(6), 2074-2083.

Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(3), 362-374.

Fernando SSN, Gunasekara TDCP, Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan J Inf Dis*, 2018, 8(1), 2-11.

Foster JB, Slonczewski J. Microbiology: an evolving science. New York: W.W. Norton & Co., 2009.

Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *J Basic Microbiol*, 2005, 45(5), 403-404.

Gao, L, Tan, Y, Zhang, X, Hu, J, Miao, Z, Wei, L, Chai, T. Emissions of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamase resistance from pig farms to the surrounding environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015, 12, 4203-4213.

Gill RK, Borthakur A, Hodges K, Turner JR, Clayburgh DR, Saksena S, Zaheer A, Ramaswamy K, Hecht G, Dudeja PK. Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl^-/OH^- exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Invest*, 2007, 117(2), 428-437.

Guttman JA, Li Y, Wickham ME, Deng W, Vogl AW, Finlay BB. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo*. *Cell Microbiol*, 2006, 8(4), 634-645.

Guttman JA, Samji FN, Li Y, Deng W, Lin A, Finlay BB. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol*, 2007, 9(1), 131-141.

Hackenberg S, Scherzed A, Harnisch W, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R, Kleinsasser N. Antitumor activity of photo-stimulated zinc oxide nanoparticles combined with paclitaxel or cisplatin in HNSCC cell lines. *J Photochem Photobiol B*, 2012, 114, 87-93.

Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M. Antibacterial properties of Nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(10), 499-511.

Hanley C, Layne J, Punnoose A, Reddy KM, Coombs I, Coombs A, Feris K, Wingett D. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, 2008, 19(29), 295103.

Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, Tapia-Pérez H, Castañón GM. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine*, 2008, 4(3), 237-240.

Hodges K, Alto NM, Ramaswamy K, Dudeja PK, Hecht G. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity. *Cell Microbiol*, 2008, 10(8), 1735-1745.

Hong X, Wen J, Xiong X, Hu Y. Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23 (5), 4489-4497.

Hsueh PR. New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae. *J Formos Med Assoc*, 2010, 109(10), 685-687.

Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, Nemery B, Hoet PH. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J*, 2011, 37(2), 299-309.

Hyland RM, Sun J, Griener TP, Mulvey GL, Klassen JS, Donnenberg MS, Armstrong GD. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an *N*-acetylglucosamine specific lectin. *Cell Microbiol*, 2008, 10(1), 177-187.

Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Bergamaschi A. The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors. *Int J Molecular Sci*, 2013, 14(8), 16732-16801.

Iswarya V, Bhuvaneshwari M, Alex SA, Iyer S, Chaudhuri G, Chandrasekaran PT, Bhalerao GM, Chakravarty S, Raichur AM, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Combined toxicity of two crystalline phases (anatase and rutile) of Titania nanoparticles towards freshwater microalgae: *Chlorella* sp. *Aquat Toxicol*, 2015, 161, 154-169.

Jain PK, ElSayed IH, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nanotoday*, 2007, 2(1), 18-29.

Jo YK, Kim BH, Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis*, 2009, 93, 1037-1043.

Jomini S, Clivot H, Bauda P, Pagnout C. Impact of manufactured TiO₂ nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. *Environ Pollut* 2015, 202, 196-204.

Joshi P, Chakraborti S, Chakrabarti P, Singh SP, Ansari ZA, Husain M, Shanker V. ZnO Nanoparticles as an Antibacterial Agent Against *E.coli*. *Sci Adv Mater*, 2012, 4(1), 173-178.

Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JW, Finlay BB, Abo A, Bishop JM. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(6), 389-391.

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 1997, 91(4), 511-520.

Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem*, 2017, 1-5, 17.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(6), 423-435.

Kürekci C, Aydin M, Yipel M, Katouli M i Gündoğdu A. Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *J Water Health*, 2017, 15(5), 788-798.

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 2008, 108(6), 2064-2110.

Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Åberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nano-particle uptake efficiency. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(4), 1438-1444.

Leung YH, Ng AM, Xu X, Shen Z, Gethings LA, Wong MT, Chan CM, Guo MY, Ng YH, Djurišić AB, Lee PK, Chan WK, Yu LH, Phillips DL, Ma AP, Leung FC. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*, 2014, 10(6), 1171-1183.

Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(1), 5-14.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*, 2006, 5(4), 916-924.

Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc*, 2002, 61(1), 123-130.

Mahdy SA, Mohammed WH, Emad H, Kareem HA, Shamel R, Mahdi S. The antibacterial activity of TiO₂ nanoparticles. *J Babylon Univ*, 2017, 25(3).

Malloy AM i Campos JM. Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update. *Pediatr Infect Dis J.*, 2011, 30(12), 1092-1093.

Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(11), 862-871.

Markowska-Szczupak A, Ulfig K, Morawski AW. The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: An overview. *Catal Today*, 2011, 169(1), 249-257.

Mishra PK, Mishra H, Ekielski A, Talegaonkar S, Vaidya B. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(12), 1825-1834.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(1), 142-201.

Nazarizadeh A, Asri-Rezaie S. Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(4), 834-843.

Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Curr Opin Infect Dis*, 2011, 24(5), 478-483.

Osawa M, Anderson DE, Erickson HP. Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. *Science*, 2008, 320(5877), 792-794.

Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mater*, 2008, 9(3), 035004.

Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6), 1712-1720.

Pan X, Wang Y, Chen Z, Pan D, Cheng Y, Liu Z, Lin Z, Guan X. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5 (3), 1137-1142.

Parker N, Schneegurt M, Thi Tu AH, Forster BM, Lister P. Microbiology. Rice University, Open Stax, 2017, str. 449.

Peran J, Ercegović Ražić S, Kosalec I, Ziberi F. Antimicrobial Effectiveness of Cellulose Based Fabrics Treated With Silver Nitrate Solutions Using Plasma Processes. *Tekstilec*, 2017, 60(4), 247-253.

Rai M, Duran N. Metal Nanoparticles in Microbiology. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2011, str. 1-5, 135.

Ramalingam B, Parandhaman T, Das SK. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nano-mechanical properties of gram-negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(7), 4963-4976.

Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7(9), 1063-1077.

Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(12), 4227-4233.

Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(5), 2230-2234.

Roy AS, Parveen A, Koppalkar AR, Prasad MVNA. Effect of Nano-Titanium Dioxide with Different Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2010, 1, 37-41.

Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlooked epidemic. *Microbes Infect*, 2003, 5(5), 449-456.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(1), 49-89.

Saliani M, Jalal R, Kafshdare Goharshadi E. Effects of pH and temperature on antibacterial activity of zinc oxide nanofluid against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur J Microbiol*, 2015, 8(2), e17115.

Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*, 2014, 24(10), 453-462.

Shah SNA, Shah Z, Hussain M, Khan M. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem. *Bioinorg Chem Appl*, 2017, 4101735.

Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine*, 2007, 3(2), 168-171.

Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22(1), 90-101.

Sharma H, Kumar K, Choudhary C, Mishra PK, Vaidya B. Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(2), 672-679.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10.

Shokri N, Javar HA. Comparison of calcium phosphate and zinc oxide nanoparticles as dermal penetration enhancers for albumin. *Indian J Pharm Sci*, 2015, 77(6), 694-704.

Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced anti-bacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2007, 18(22).

Slomberg DL, Lu Y, Broadnax AD, Hunter RA, Carpenter AW, Schoenfisch MH. Role of size and shape on biofilm eradication for nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(19), 9322-9329.

Sruthi S, Millot N, Mohanan PV. Zinc oxide nanoparticles mediated cytotoxicity, mitochondrial membrane potential and level of antioxidants in presence of melatonin. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103, 808-818.

Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(4), 437-463.

- Wahba NS, Shaban SF, Kattaia AA, Kandeel SA. Efficacy of zinc oxide nanoparticles in attenuating pancreatic damage in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Ultrastruct Pathol*, 2016, 40(6), 358-373.
- Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(11), 822-827.
- Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12, 1227-1249.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(4), 2242-2250.
- Wu J, Sun J, Xue Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett*, 2010, 199(3), 269-276.
- Xu Y, Wei MT, Ou-Yang HD, Walker SG, Wang HZ, Gordon CR, Guterman S, Zawacki E, Applebaum E, Brink PR, Rafailovich M, Mironava T. Exposure to TiO₂ nanoparticles increases *Staphylococcus aureus* infection of HeLa cells. *J Nanobiotechnology*, 2016, 14, 34.
- Yun H, Kim JD, Choi HC, Lee CW. Antibacterial Activity of CNT-Ag and GO-Ag Nanocomposites Against Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Bul. Korean Chem Soc*, 2013, 34(11), 3261-2364.
- Zarei M, Jamnejad A, Khajehali E. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Against Four Foodborne Pathogens. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7(1), e8720.
- Zinjarde SS. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. *Chronicles Young Sci*, 2012, 3, 1-74.

8. SAŽETAK / SUMMARY

8.1. Sažetak

Koloidne nanočestice metala i metalnih oksida se sve više upotrebljavaju kao alternativa antibioticima zbog njihovih brojnih prednosti u svrhu liječenja i sprječavanja bakterijskih infekcija, a osobito su popularne koloidne nanočestice srebra, titanova dioksida i cinkova oksida zbog svoje široke primjene u biomedicini, industriji i biotehnologiji. *Escherichia coli* vrlo je zanimljiv modelni organizam za proučavanje jer pripada najviše istraženim bakterijama na svijetu, no i dalje je vrlo čest uzročnik bakterijskih infekcija raznih organskih sustava koje mogu biti i životno ugrožavajuće. Stalnom borbom protiv infekcija uzrokovanih *E.coli* raznim načinima, primjerice antibioticima, došlo je do razvitka otpornih sojeva protiv kojih se vrlo teško boriti uobičajenim načinima pa se stoga treba okrenuti i novim sredstvima. Upravo je to i cilj ovog rada, pokazati da su koloidne nanočestice ta nova opcija, tj. sredstvo borbe protiv bakterijskih infekcija. MIK i MBK vrijednostima koloidnih nanočestica srebra, cinkova oksida i titanova dioksida na *E.coli* ATCC 10536 pokazano je kako su one vrlo potentno antimikrobno sredstvo, a među njima najpotentniji baktericidni učinak imaju koloidne nanočestice srebra. U svrhu ispitivanja mogućeg postojanja sinergizma navedenih koloidnih nanočestica, pripremljena je optimirana smjesa koja se sastojala od 0.794 ppm nanočestica srebra, 683.217 ppm nanočestica titanova dioksida i 15.989 ppm nanočestica cinkova oksida što ukupno čini smjesu od 700.000 ppm. Rezultati govore u prilog antagonizmu, ali i da nema statistički značajne razlike u antimikrobnoj aktivnosti na sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 bakterijske vrste *E.coli*. Zadnji korak je ispitati antimikrobnu aktivnost tkanine impregnirane slojem navedene smjese koloidnih nanočestica, a rezultati govore da kod oba soja dolazi do potpune odnosno stopostotne redukcije broja kolonija nakon 12 sata inkubacije tkanine na koju su inokulirani ispitivani sojevi. Međutim, nema statistički značajne razlike u postotku redukcije broja kolonija između ispitivanih sojeva sojeva.

8.2. Summary

Metal and metal oxide colloidal nanoparticles are increasingly used as an alternative to antibiotics because of their many advantages (in comparison to antibiotics) for treatment and prevention of bacterial infections. The most popular colloidal nanoparticles are silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles because they are used in various fields such as biotechnology and biomedicine. *Escherichia coli* (*E.coli*) is the most finely understood and extensively studied free-living organism on our planet. However, despite being the most extensively studied organism, *E.coli* is still to this day a very common cause of diseases of various organs and therefore *E.coli* is a very interesting model organism for this study. Resistance to antibiotics emerges in bacteria due to genetic mutations and consecutive selection of resistant mutants through selective pressure of antibiotics and because of that, antibiotic resistance has become one of the leading problems in modern medicine. Therefore, currently available options (such as antibiotics) against bacterial infections are limited and it is advised to turn to new and improved antimicrobial agents. Metal and metal oxide colloidal nanoparticles are exactly that, the new and improved antimicrobial agents. MIC and MBC values of silver, zinc oxide and titanium colloidal nanoparticles against *E.coli* ATCC 10536 suggest that these nanoparticles are very potent antimicrobial agents with silver nanoparticles being the most potent of them. A mixture of nanoparticles (0.794 ppm of silver, 683.217 ppm of titanium dioxide and 15.989 ppm of zinc oxide) was prepared to determine a possible synergism between them. Results suggest that there is no synergism observed between silver, zinc oxide and titanium colloidal nanoparticles in the mixture and that there is no statistically significant difference in terms of antimicrobial efficiency against the two *E.coli* strains (ATCC 10536 i ESBL+ MFBB 12794). Lastly, antimicrobial efficiency of a textile fabric impregnated with the mixture of nanoparticles was evaluated using the time-kill method. Results suggest that after 12 hours of incubation there were no growth of bacterial colonies observed (complete reduction of bacterial colonies) for both *E.coli* strains. However, no statistically significant difference in terms of reduction of bacterial colonies was observed between the two *E.coli* strains.

9. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANTIMIKROBNI UČINAK KOLOIDNIH OTOPINA NANOČESTICA ELEMENTARNIH METALA I METALNIH OKSIDA NA *E. COLI*

Filip Penava

SAŽETAK

Koloidne nanočestice metala i metalnih oksida se sve više upotrebljavaju kao alternativa antibioticima zbog njihovih brojnih prednosti u svrhu liječenja i sprječavanja bakterijskih infekcija, a osobito su popularne koloidne nanočestice srebra, titanova dioksida i cinkova oksida zbog svoje široke primjene u biomedicini, industriji i biotehnologiji. *Escherichia coli* vrlo je zanimljiv modelni organizam za proučavanje jer pripada najviše istraženim bakterijama na svijetu, no i dalje je vrlo čest uzročnik bakterijskih infekcija raznih organskih sustava koje mogu biti i životno ugrožavajuće. Stalnom borbom protiv infekcija uzrokovanih *E. coli* raznim načinima, primjerice antibioticima, došlo je do razvitka otpornih sojeva protiv kojih se vrlo teško boriti uobičajenim načinima pa se stoga treba okrenuti i novim sredstvima. Upravo je to i cilj ovog rada, pokazati da su koloidne nanočestice ta nova opcija, tj. sredstvo borbe protiv bakterijskih infekcija. MIK i MBK vrijednostima koloidnih nanočestica srebra, cinkova oksida i titanova dioksida na *E. coli* ATCC 10536 pokazano je kako su one vrlo potentno antimikrobno sredstvo, a među njima najpotentniji baktericidni učinak imaju koloidne nanočestice srebra. U svrhu ispitivanja mogućeg postojanja sinergizma navedenih koloidnih nanočestica, pripravljena je optimirana smjesa koja se sastojala od 0.794 ppm nanočestica srebra, 683.217 ppm nanočestica titanova dioksida i 15.989 ppm nanočestica cinkova oksida što ukupno čini smjesu od 700.000 ppm. Rezultati govore u prilog antagonizmu, ali i da nema statistički značajne razlike u antimikrobnoj aktivnosti na sojeve ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794 bakterijske vrste *E. coli*. Zadnji korak je ispitati antimikrobnu aktivnost tkanine impregnirane slojem navedene smjese koloidnih nanočestica, a rezultati govore da kod oba soja dolazi do potpune odnosno stopostotne redukcije broja kolonija nakon 12 sata inkubacije tkanine na koju su inokulirani ispitivani sojevi. Međutim, nema statistički značajne razlike u postotku redukcije broja kolonija između ispitivanih sojeva sojeva.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranica, 8 grafičkih prikaza, 5 tablica i 100 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antibakterijski učinak, koloidne nanočestice, *Escherichia coli*

Mentor: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr.dr.sc. Iva Rezić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Tekstilno-tehnološkog fakulteta*
Dr. sc. Ivan Kosalec, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr.sc. Davor Šakić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Josipa Vlanić, *znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

ANTIMICROBIAL EFFICIENCY OF METAL AND METAL OXIDE COLLOIDAL NANOPARTICLES AGAINST *E. COLI*

Filip Penava

SUMMARY

Metal and metal oxide colloidal nanoparticles are increasingly used as an alternative to antibiotics because of their many advantages (in comparison to antibiotics) for treatment and prevention of bacterial infections. The most popular colloidal nanoparticles are silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles because they are used in various fields such as biotechnology and biomedicine. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most finely understood and extensively studied free-living organism on our planet. However, despite being the most extensively studied organism, *E. coli* is still to this day a very common cause of diseases of various organs and therefore *E. coli* is a very interesting model organism for this study. Resistance to antibiotics emerges in bacteria due to genetic mutations and consecutive selection of resistant mutants through selective pressure of antibiotics and because of that antibiotic resistance has become one of the leading problems in modern medicine. Therefore, currently available options (such as antibiotics) against bacterial infections are limited and it is advised to turn to new and improved antimicrobial agents. Metal and metal oxide colloidal nanoparticles are exactly that, the new and improved antimicrobial agents. MIC and MBC values of silver, zinc oxide and titanium colloidal nanoparticles against *E. coli* ATCC 10536 suggest that these nanoparticles are very potent antimicrobial agents with silver nanoparticles being the most potent of them. A mixture of nanoparticles (0.794 ppm of silver, 683.217 ppm of titanium dioxide and 15.989 ppm of zinc oxide) was prepared to determine a possible synergism between them. Results suggest that there is no synergism observed between silver, zinc oxide and titanium colloidal nanoparticles in the mixture and that there is no statistically significant difference in terms of antimicrobial efficiency against the two *E. coli* strains (ATCC 10536 i ESBL+ MFBF 12794). Lastly, antimicrobial efficiency of a textile fabric impregnated with the mixture of nanoparticles was evaluated using the time-kill method. Results suggest that after 12 hours of incubation there were no growth of bacterial colonies observed (complete reduction of bacterial colonies) for both *E. coli* strains. However, no statistically significant difference in terms of reduction of bacterial colonies was observed between the two *E. coli* strains.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 8 figures, 5 tables and 100 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Antibacterial efficiency, colloidal nanoparticles, *Escherichia coli*

Mentor: **Ivan Kosalec, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Iva Rezić, Ph.D.PhD., Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Textile Technology

Reviewers: **Ivan Kosalec, Ph.D.** Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Davor Šakić, Ph.D. Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Josipa Vlainić, Ph.D. Scientific associate, Ruđer Bošković Institute

The thesis was accepted: September 2018.