

# SINERGISTIČKI UČINAK ČESTICA CINKOVOG OKSIDA I UV-A ZRAČENJA NA KINETIKU RASTA REZISTENTNIH BOLNIČKIH PATOGENA

---

**Mežnarić, Silvestar**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:012138>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Silvestar Mežnarić

**SINERGISTIČKI UČINAK ČESTICA CINKOVOG OKSIDA I UV-A ZRAČENJA NA  
KINETIKU RASTA REZISTENTNIH BOLNIČKIH PATOGENA**

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Silvestar Mežnarić

**SINERGISTIČKI UČINAK ČESTICA CINKOVOG OKSIDA I UV-A ZRAČENJA NA  
KINETIKU RASTA REZISTENTNIH BOLNIČKIH PATOGENA**

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

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

Komentor rada: izv.prof.dr.sc. Gabriela Ambrožić, dipl.chem.

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

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

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Rad ima 52 stranica, 3 slike, 15 grafikona, 1 tablicu i 52 literaturna navoda.

## ZAHVALA

Ovaj je diplomski rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Priprema poroznih tankoslojnih materijala za pročišćavanje vode koristeći tehniku Depozicije atomskih slojeva (ALD)“ (IP-2016-06-3568).

Od srca se zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Gobin dipl.sanit.ing. na iskazanom povjerenju te prilici da uz nju rastem. Svojim savjetima i smjernicama nesebično pomaže i olakšava, ne samo izrađivanje ovog rada, već i nošenje sa ostalim fakultetskim obavezama i na tome joj velika hvala. Također se zahvaljujem i komentorici izv.prof.dr.sc. Gabrijeli Ambrožić na ukazanom povjerenju te cijelom timu sa Odjela za fiziku Sveučilišta u Rijeci. Zahvaljujem se i mojim najmilijima na neizmjernej potpori na akademskom i životnom putu.

*„Bolesti ima na tisuće, a zdravlje je samo jedno“*

*Ludwig Börne*

## SAŽETAK

Rezistentni bolnički patogeni predstavljaju izazov u održavanju higijenskih i aseptičkih uvjeta bolničkih sredina. Rezistencije na antibiotike i različite kemijske dezinficijense bakterije razvija brzo, a jedini način za praćenje rezistencije i otkrivanje novih načina suzbijanja takvih patogena je istraživanje novih pristupa inhibiciji i suzbijanju rezistentnih patogena. U ovom radu istražena je sinergistička inhibitorna aktivnost čestica cinkova oksida i UV-A zračenja na kinetiku rasta MRSA, *E.coli* i *K. pneumoniae*. Disperzija čestica cinkovog oksida napravljena je dodavanjem čestica u sterilnu vodu iz slavine te sonifikacijom. Fotoaktivacija čestica učinjena je 30-minutnim osvjetljavanjem UV-A zračenjem na 366 nm. Za prikaz rezultata mjerena je apsorbancija bakterijske suspenzije kroz 24 sata nakon različitih tretmana. Rezultati su pokazali da sinergija čestica cinkova oksida i UV-A zračenja značajno inhibira rast bakterija nakon određenog vremena

## **SUMARRY**

Resistant nosocomial pathogens pose a challenge in maintaining the hygienic and aseptic conditions in hospital environments. Bacterial resistance to antibiotics and various chemical disinfectants is evolving rapidly, and the only way to monitor resistance and discover new ways to control such pathogens is to explore new approaches to inhibiting and suppressing resistant pathogens. In this reasearch, the synergistic inhibitory activity of zinc oxide particles and UV-A irradiation on the growth kinetics of MRSA, *E. coli* and *K. pneumoniae* was investigated. The dispersion of zinc oxide particles was made by adding the particles to sterile tap water and sonication. Particle photoactivation was performed by 30-minute UV-A irradiation at 366 nm. To show the results, the absorbance of the bacterial suspension was measured for 24 hours after different treatments. The results showed that the synergy of zinc oxide particles and UV-A radiation significantly inhibits the growth of bacteria after a certain time

## SADRŽAJ

ZAHVALA.....	I
SAŽETAK.....	II
SUMARRY.....	III
1. UVOD.....	6
1.1 Dezinfekcija.....	6
1.2 Čestice Cinkova oksida.....	7
1.2.1 Mehanizam antibakterijskog djelovanja cinkova oksida.....	8
1.3 Ultraljubičasto zračenje.....	9
1.4 Mikrobna rezistencija.....	11
1.4.1 Rezistencija na UV zračenje.....	11
1.5 Modelni organizmi.....	13
1.5.1 Meticilin-rezistentan <i>Staphilococcus aureus</i> .....	13
1.5.2 <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.5.3 <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	15
2. CILJ RADA.....	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1 Pribor i uređaji.....	17
3.2 Čestice cinkovog oksida.....	18
3.2.1 Priprema mikroporoznih supstrata.....	18
3.2.2 ALD depozicije.....	18
3.2.3 Kalcinacija uzorka.....	18
3.3 Bakterijski sojevi.....	19
3.4 Bakterijski inokulum.....	19
Priprema disperzije čestica cinkovog oksida.....	19
3.5 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).....	19
3.6 Određivanje inhibicije rasta bakterija.....	20
3.7 Statistička obrada rezultata i matematičko modeliranje.....	21
4. REZULTATI.....	22
4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija.....	22
4.2 Inhibicija rasta bakterija.....	23
4.2.1 ESBL-producirajući soj <i>Escherichia coli</i> .....	27
4.2.2 Karbapen rezistentna <i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA-48.....	31
4.2.3 Matematički model.....	35
5. DISKUSIJA.....	39



6.	ZAKLJUČCI.....	42
7.	LITERATURNI NAVODI.....	43
8.	DODACI .....	48
	8.1 Tablica Slika i grafikona.....	48
	8.2. Popis tablica .....	49
9.	ŽIVOTOPIS .....	50

## 1. UVOD

Sve velike epidemije zaraznih bolesti modernog doba bile su uzrokovane prijenosom uzročnika u zdravstvenim ustanovama i zajednici. Aktualna pandemija bolesti COVID-19 upoznala je čovječanstvo sa pojmovima kao što su asimptomatsko kliconštvo, kontaminacija, samoizolacija te brojnim drugim. U zdravstvenim institucijama ovi pojmovi moraju biti svakodnevnica. Opasnost od rezistentnih patogena prijete u svakom kutu zdravstvene ustanove, a već rezistentni patogeni samo pojačavaju svoju rezistentnost. Ovakvi patogeni predstavljaju najveći rizik imunokompromitiranim bolesnicima za koje ovakve infekcije mogu biti kobne. Kako bi se znanstvena i stručna zajednica uspješno borile sa ovim uzročnicima bolesti potrebno je neprestano istraživanje novih pristupa uklanjanju istih. Hipoteza o sinergističkom učinku temelji se na kombiniranom djelovanju kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) koji se otpuštaju u vodi prilikom UV zračenja i vodikovog peroksida i  $Zn^{+}$  iona koje cinkovog oksid stvara aktivacijom UV zračenjem.

### 1.1 Dezinfekcija

Dezinfekcija podrazumijeva postupak kojim se smanjuje broj mikroorganizama na razinu koja ne predstavlja štetu po zdravlje. Taj postupak, međutim, ne inaktivira bakterijske spore, prione i neke viruse te ne uklanja u potpunosti biofilm (1). Pravilnik o sprječavanju i suzbijanju bolničkih infekcija u članku 8. navodi kako se dezinfekcija provodi mehanički – čišćenjem i filtriranjem, fizikalnim mjerama – toplinom i UV zračenjem te kemijskim otopinama (2). Dezinfekcija je oduvijek važan operativni oblik higijene i preventivne medicine (3). Kroz povijest svijeta higijena se razvija paralelno sa razvojem društva i kulture. U antici Rimljani spoznaju važnost osobne higijene, opskrbe vodom za piće i skrbi o otpadu. U srednjem vijeku svijest o higijeni opada te razvoj društva stagnira. Razne epidemije kao što su epidemija kuge, boginja, kolere, malarije te širenje tuberkuloze dovode do velikog broja žrtava. Opasnost od širenja infekcije dovodi do potrebe za izolacijom oboljelih. Ljudi su tada vjerovali da je za širenje bolesti kriv „loš“ zrak pa je zaštita od lošeg zraka uključivala nošenje kljunastih maski, paljenje vatre oko gradova te uporabu mirisnih tvari. Preventivna medicina na području današnje Republike Hrvatske započinje odlukom Velikog vijeća Dubrovačke Republike iz 1377. o kontroliranoj izolaciji brodova kao postupku zaštite od unošenja kuge (4). Odluka je glasila: „Svi dolazeći moraju se izolirati kroz 40 dana“ (5). Tako prva karantena u svijetu nastaje upravo na području današnje Hrvatske. Pojam karantene se i danas dobro poznaje pogotovo u vremenima pandemije COVID-19. Dezinfekcija se razvija drugom polovicom 18. stoljeća.

Godine 1774. otkriven je klor koji se i danas uvelike koristi u dezinfekciji. Početkom 19. stoljeća otkriven je vodikov peroksid dok se hipoklorit počinje koristiti kao antiseptik za toaletu otvorenih rana. Započinje se s prokuhavanjem vode za piće i počinju se koristiti jodna tinktura i klorno vapno. Tridesetih godina 19. stoljeća objavljen je prvi službeni dokument u konceptu uredbe o dezinfekciji kao pravni dokument. Ignaz Semmelweis (1818. – 1965.) educira o važnosti dezinfekcije ruku otopinom klornog vapna. Otkrivene su kvartarne amonijeve soli i formaldehid koji se i danas koriste u svrhu dezinfekcije. Započinje dezinfekcija suhom toplinom u stanicama za oboljele od kolere. Louis Pasteur (1822. – 1865.) upoznaje zdravstvene djelatnike s fizikalom dezinfekcijom i sterilizacijom – autoklav, i danas jedan od najvažnijih uređaja za sterilizaciju. Počinje opisivanje bakteriostatskih osobina srebra i kalijevog permanganata u vodi za ljudsku upotrebu. Krajem 19. stoljeća utvrđen je dezinfekcijski učinak etanola. Georg Gaffky, Robert Koch i Friedrich Löffler koriste vodenu paru za dezinfekciju. Godine 1889. uveden je lizol, spoj koji je odigrao važnu ulogu u dezinfekciji pri epidemiji kolere u Hamburgu. Ludwig Traube (1818. – 1876.) predlaže kloriranje vode za ljudsku upotrebu. Početkom 20. stoljeća opisani su peroctena kiselina i kloramin. Joseph Lister (1827. – 1912.) uvodi antisepsu u kiruršku praksu te obrada fenolom postaje standardna kirurška obrada rane. Carl Flügge uvodi razliku između kirurške i higijenske dezinfekcije ruku. Narednih godina se otkrivaju i razvijaju novi spojevi s baktericidnim učinkom. Razvoj antibiotika dovodi do prekomjernog korištenja što rezultira sve većim brojem rezistentnih sojeva.

Nedostatak vremena i osoblja, velika cirkulacija pacijenata te visoka cijena pojedinih kemijskih agenasa predstavljaju problem u bolničkim ustanovama u sferi dezinfekcije te se tome priskabe brzim korištenjem istih otopina na koje pojedine bakterije stvaraju rezistentnost zahvaljujući dugoj izloženosti malim i razrijeđenim količinama korištenih otopina. Upravo iz tog razloga u ovom radu je ispitan sinergistički učinak čestica cinkovog oksida kao novog jakog kemijskog dezinficijensa te ultraljubičastog zračenja kao fizikalne mjere dezinfekcije koja se već neko vrijeme koristi u dezinfekciji predmeta opće uporabe, vode i prostora.

## 1.2 Čestice Cinkova oksida

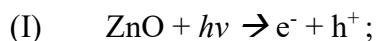
Čestice cinkova oksida uvelike su korištene u industriji, kozmetici i biomedicini (6). Cinkov oksid je i komercijalno dostupan, a na tržištu se u velikoj mjeri prodaje u kozmetičke, odnosno, protektivne svrhe. Navodi se njegova apsorpcijska moć za UV zračenje te antifungalno djelovanje te je zbog toga vrlo popularan sastojak krema za sunčanje. Biološka aktivnost ovog spoja ispitana je u nekoliko velikih istraživanja ali njihova vrijednost u suzbijanju rezistentnih patogena je visoka fotokatalitička aktivnost bez rezidualnog djelovanja i ekotoksičnog učinka

(7). Razvoj nanotehnologije rezultirao je sve većim korištenjem nanočestica cinkova oksida kao antimikrobnog agensa. Nanočestice pokazuju atraktivna antibakterijska svojstva zbog povećane specifične površine dok je veličina čestica smanjena što dovodi do povećane reaktivnosti površine čestica (7).

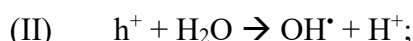
### 1.2.1 Mehanizam antibakterijskog djelovanja cinkova oksida

Antibakterijska djelotvornost cinkova oksida koja podrazumijeva inhibiciju rasta bakterija ili njihovo potpuno uklanjanje dokazana je brojnim studijama. Upotreba cinkovog oksida kao fotokatalizatora proizlazi iz velike reaktivnosti potaknute apsorpcijom energije, odnosno, UV zračenja. Temelj antibakterijskog djelovanja ovog spoja predstavlja mehanizam podijeljen u nekoliko podmehanizama. Cinkov oksid u vodi apsorpcijom UV zračenja stvara reaktivne hidroksi radikale koji uzrokuju oštećenja na stanici bakterije. Takvi radikali i vodikov peroksid uzrokuju oksidativni stres koji oštećuje DNK, staničnu membranu i stanične proteine. Rupturu staničnog zida uzrokuje površinska aktivnost ZnO što izaziva curenje staničnog sadržaja te rezultira staničnom smrću (8). Cinkov oksid se u ovom slučaju ponaša kao poluvodič te su taj mehanizam predstavili Padmavathy i Vijayaraghavan (9) :

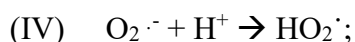
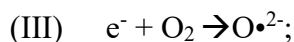
Energija iz UV svjetlosti aktivira ZnO stvarajući parove elektron – šupljina<sup>1</sup> (I):



Hidroksi radikali nastaju direktno preko reakcija šupljina valentne vrpce s vodom (II):



Vodikov peroksid nastaje u višestupanjskom mehanizmu s inicijalnom stvaranjem superoksidnog iona s redukcijom kisika elektronima vodljive vrpce ZnO (III), stvaranjem perhidroksi radikala s protonacijom  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (IV) koji se u slijedećem koraku protonira i veže elektron vodljive vrpce stvarajući vodikov peroksid (V).



Vodikov peroksid zatim penetrira staničnu membranu i ubija bakteriju. Drugi dio antimikrobnog učinka bazira se na otpuštanju  $\text{Zn}^+$  iona iz amfoternog ZnO u kiselom ili

---

<sup>1</sup> Navodi se i pojam je eksciton koji opisuje elektron i šupljinu kao zajedno vezane u kvazičesticu

lužnatom mediju. Mišljenje je da cinkov kation ima sličan učinak kao i vodikov peroksid, odnosno da penetrira staničnu membranu te ubija bakteriju (8).

### 1.3 Ultraljubičasto zračenje

Ultraljubičasto zračenje ili UV<sup>2</sup> zračenje dio je spektra elektromagnetskog zračenja koje na spektru zauzima valne duljine od 200 do 400 nm. Prirodni izvor ovog zračenja je sunce. Ultraljubičasto zračenje podijeljeno je na tri osnovna tipa s obzirom na valnu duljinu: UV–C s valnim duljinama od 200 nm do 280 nm, UV– s valnim duljinama od 280 nm do 315 nm te UV–A zračenje u rasponu valnih duljina od 315 nm do 400 nm. Ta podjela ne govori samo o valnim duljinama zračenja već i o utjecaju na organizam te prirodi zračenja, tako je UV–A dio UV zračenja koje u najvećem djelu dopire do zemljine površine od sunca jer ga ozonski omotač ne apsorbira te je zaslužno za tamnjenje kože, UV–B u puno manjoj mjeri dolazi od sunca uz UV–A zračenje no znatno je štetnije, izaziva crvenilo kože te je prilikom dugog izlaganja odgovorno za razvijanje karcinoma kože. Treći dio ovog spektra je UV–C zračenje koje ima dokazani antibakterijski učinak te se koristi u sustavima za dezinfekciju, vrlo mali postotak prolazi kroz ozonski omotač te ovo zračenje ne predstavlja opasnost iz prirodnog izvora (sunce). Širi spektar UV zračenja dijeli se na bliski, srednji, daleki, vodik Lyman  $\alpha$ , vakuum te ekstremni UV (10). Ova podjela se odnosi na UV zračenje dobiveno iz artificalnih izvora kao što su UV kvarcne lampe, elektrolučno zavarivanje, lampe sa različitim plinovima i metalnim parama te UV LED lampe.

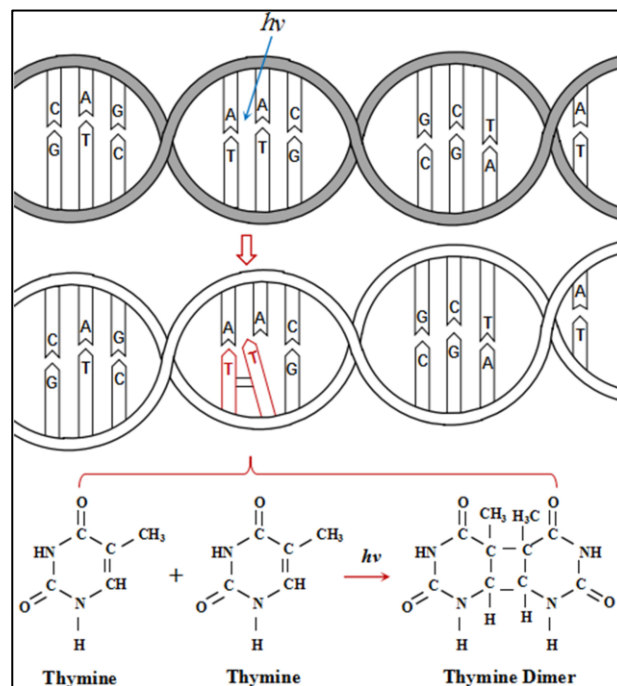
#### 1.3.1 Mehanizam antibakterijskog djelovanja UV zračenja

Ultraljubičasto zračenje uzrokuje promjene na DNK ili RNK molekuli mikroorganizma koje onemogućuju replikacije te u konačnici uzrokuju smrt stanice (11). Brojne studije pozabavile su se mutagenim utjecajem UV zračenja na DNK lezije. Prema mikrobiološkim ispitivanjima djelovanje UV zračenja na DNK temelji se na dvije glavne značajke. Prva značajka je stvaranje dimera ciklobutan timin pirimidina (slika 1.) i 6 – 4 fotoprodukta. Budući

---

<sup>2</sup> eng. UV- Ultraviolet

da je manji udio 6 – 4 fotoprodukt izomera, osnovni mehanizam djelovanja (čak 75 %) spada na stvaranje dimera ciklobutan timin pirimidina (12).



Slika 1. Prikaz narušavanja DNK lanca stvaranjem dimera ciklobutan timin pirimidina.

Izvor: X. Li et al./Science of the total Environment 659 (2019)

Maksimum apsorpcije UV svjetlosti za DNK je postignuta na valnim duljinama od oko 260 nm (UV-C), no u većini je slučajeva apsorpcijski pik u spektru valnih duljina promjenjiv s obzirom na ciljani organizam (12). Osim oštećenja genetskog materijala, UV zračenje može uzrokovati oštećenje i drugih komponenti stanice kao što su proteini i stanična membrana (13). Akcijski spektar primarno dolazi fotonom kojeg apsorbira DNK molekula te se poklapa sa relativnom apsorbancom DNK molekule izoliranom iz organizma. Kao primjer može se spomenuti akcijski spektar *S. typhimurium* koji odgovara relativnoj apsorbancom molekule DNK izoliranom iz bakterije. Iako je glavna značajka antibakterijskog djelovanja UV zračenja oštećivanje genetskog materijala, fotoni koje apsorbiraju ostale stanične tvorbe nisu zanemarivi i moguće je da i oni imaju ulogu u antibakterijskom učinku UV zračenja (14). Hijenen i suradnici su u svome radu antibakterijski učinak opisali matematičkom modelu koristeći Crick – Watsonovu jednadžbu prvog reda:  $\log(N_0/N) = K \times UV \text{ doza}^3$  (11). Konstanta inaktivacije

<sup>3</sup>  $N_0$  označava početni broj kolonija (CFU/mL),  $N$  označava broj nakon ozračivanja (CFU/mL), UV doza ( $mJ/cm^2$ ) i  $K$  ( $cm^2/mJ$ ) je proporcionalni koeficijens koji opisuje konstantu inaktivacije.

može ovisiti o vremenu i o dozi, Oguma i suradnici navode kako su i vremenska i dozimetrijska konstanta UV – LED zračenja za E. coli značajno više od onih koje su izračunate za druge vrste bakterija i različite viruse (11).

## 1.4 Mikrobna rezistencija

Važan problem u borbi protiv mikroorganizama predstavlja i razvoj rezistencije. Pojedini mikroorganizmi imaju sposobnost razviti rezistenciju na tvari koje im predstavljaju opasnost kao što su antimikrobni lijekovi, kemijska i fizikalna sredstva za dezinfekciju. Putem različitih razvojnih mehanizama bakterije mogu stvoriti rezistentnost na spojeve ili faktore stresa kojima su duže vremena izloženi. Tako mikroorganizmi zahvaljujući pretjeranom i često nepotrebnom uzimanju antimikrobnih lijekova razvijaju rezistenciju na njih, mikroorganizmi koji su prirodno izloženi sunčevoj svjetlosti, a samim time i UV zračenju, svojim se pigmentima prilagođavaju istom. Istim mehanizmom bakterije stvaraju rezistenciju prema različitim kemijskim agensima. Mikroorganizmi mogu postati rezistentni na nekoliko načina kao što su promjene u mjestu vezivanja spoja ili nestanak tih mjesta koju mogu postići promjenom jednog jedinog specifičnog proteina na 30S podjedinici ribosoma (genetski). Bakteriju postižu i stvaranjem raznih enzima koji razgrađuju molekule npr. penicilaze, beta-laktamaze ili alkohol dehidrogenaze (negenetski). U tijelu mogu koristiti alternativne putove kako bi „pobjegli“ antimikrobnim lijekovima (15). Pojedini mikroorganizmi razvijaju rezistenciju kombinirajući genetske i negenetske mehanizme (16).

Inicijalna faza baktericidnog djelovanja je adsorpcija na površinu bakterijske stanice nakon čega baktericidni pripravak mora proći bakterijski zid ili vanjsku membranu kako bi došao do stanične membrane ili citoplazme. U gram pozitivnih bakterija nema specifičnog receptora koji bi blokirao penetraciju baktericida pa je prirodna rezistencija niska dok u gram negativnih bakterija stanična membrana sadrži specifične regulatore prolaska raznih komponenti u i iz stanice. Iz ovog razloga je jedan od načina obrane bakterija od baktericidnih agenasa stvaranje biofilma (17). Smatra se da je jedan od načina obrane u biofilmu otpuštanje glikokaliksa koji stvara difuznu barijeru baktericidnim agensima (18).

### 1.4.1 Rezistencija na UV zračenje

Izlaganje biološkog materijala UV-A zračenju stvara oksidativni stres i oštećenje stanice koje može biti ispravljeno molekularnim mehanizmima ili umanjeno raznim strategijama kao što je formiranje spora ili sintezom pigmenata koji apsorbiraju UV-A (19). Važnu ulogu u rezistenciji na zračenje imaju i fiziološke prilagodbe. Konkretno  $Mn^{2+}$  ioni spojeni sa

unutarstaničnim metabolitima mogu pružiti zaštitu od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje nastaju u vodi prilikom zračenja (20). Različiti ciljani organizmi pokazuju različitu osjetljivost na UV zračenje. Osjetljivost mikroorganizama proizlazi iz genetskom materijalu koji može biti jednolančana (ss DNK) ili dvolančana DNK i jednolančana ili dvolančana RNK. Te razlike su najviše vidljive među virusima (13). Bez obzira na različitost među vrstama organizama, u smislu rezistencije na UV zračenje mora se usporediti doza zračenja koje mikroorganizam mora apsorbirati za inaktivaciju (21). Većina reparacijskih mehanizama koje uključuju fotoreaktivaciju i popravak u mraku događaju se pod niskom dozom ultraljubičastog zračenja. U vrlo bitnom popravnom mehanizmu - fotoreaktivaciji, fotoenzimi ciljano pronauđu i zamjene nastale ciklobutan pirimidin timin dimere apsorbiranjem energije svjetlosti valnih duljina između 310 i 480 nm (UV-A i dio vidljive svjetlosti). Dok je procesu fotoreaktivacije potrebna svjetlost, enzimi u mehanizmu popravka u mraku bez prisustva svjetlosti pronauđu oštećene nukleotide i zamjene ih neoštećenima te tako smanje efekte zračenja (12). Iako UV-a potiče fotoreplikaciju, istraživanja pokazuju kako u kombinaciji sa drugim dijelovima UV zračenja ili kemijskim agensima pokazuje visoki antibakterijski potencijal (22). Oštećenja na genetskom materijalu mogu se popraviti popravnim mehanizmima, no nema dokaza da postoje popravni mehanizmi za oštećenja na staničnoj membrani uzrokovana UV-A zračenjem (22).

#### 1.4.2 Rezistencija na cinkov oksid

Iako je cinkov oksid predstavljen kao vrlo potentan antibakterijski agens, u nekih organizama se javlja rezistencija. U razumijevanju mehanizama rezistencije valja poznavati homeostatsku kontrolu koju stanica postiže uzimanjem i održavanjem potrebne količine metala te upravljanje viškom. Kao što je već spomenuto, cink je povezan s nizom procesa bitnih za rast i metabolizam, ali u višim koncentracijama postaje toksičan za stanice (23). Budući da se radi o fiziološko esencijalnom metalu kao što je cink, odabrani mehanizam kontrole će vjerojatno biti inducibilni sustav kontrole ekspresije kako se ne bi narušila homeostaza jer prevelika ekspresija, kao i premala, mogu biti pogubne po stanicu (24). Otpornost bakterijske stanice na toksične količine cinka može biti posljedica izvanstaničnih nakupina metalotioneina – proteina bogatih cisteinom koji imaju veliku moć vezana esencijalnih metala i ksenobiotika (25) (26) (27). Biološke funkcije metala i njihov prolazak kroz stanice su povezani s postojanjem specifičnih makromolekula koje vežu metal. Brojni enzim i mnogi neenzimski metaloproteini i drugi biopolimeri koji vežu metal služe u regulatorne svrhe i kontroliraju metabolizam esencijalnih i neesencijalnih metalnih iona (28).



Drugi mehanizam rezistencije na cink je stanični izljev (23). Ovaj mehanizam istražen je u Gram-negativnoj zemljanoj bakteriji roda *Ralstonia*. Takozvani kadmij-cink-kobalt sustav pruža otvor ovim metalima jer funkcionira kao protu-nosač za katione i anione tako što ih izljeva iz stanice. Taj sustav koji je operon plazmida pMOL30 sastoji se od tri strukturna gena čiji produkti tvore kompleks koji nazivamo izljevna pumpa (29) (30).

## 1.5 Modelni organizmi

### 1.5.1 Meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* pripada u skupini najprilagodljivijih i najzastupljenijih humanih patogena. Rezistenciju postiže usvajanjem gena te je otporan na sve dosad primjenjivane antibiotike, a svakodnevno se nalaze novi geni u postojećem rasponu gena virulencije. Meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA) vodeći je problem u kontroli i spriječavanju bolničkih infekcija i u provođenju higijensko-epidemioloških mjera u zdravstvenim ustanovama, a sve je češće spominjana i njegova prisutnost u izvanbolničkome okruženju (31). O važnosti ove bakterije najbolje govori činjenica da su 2008. godine u Liječničkom vjesniku tiskane smjernice za liječenje bolesnika zaražene ovim rezistentnim patogenom. Prema nekim procjenama broj infekcija koje uzrokuje MRSA iznosi oko 170 000 godišnje, u zemljama EU, Norveškoj i Islandu. Taj broj predstavlja gotovo polovinu svih infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi u spomenutim zemljama. Problem kolonizacije i infekcije MRSE nedavno se prenio i na druge ekološke niše tako da danas postoje MRSA izolati u izvanbolničkoj populaciji (CA MRSA) te u uzorcima domaćih životinja (LA MRSA). Već spomenute novine u genetskoj osnovi rezistencije podrazumijevaju otkrivanje *mecC* gena koji je homolog *mecA* genu – glavnom genu nosiocu rezistencije. Homologija ova dva gena relativno je mala pa molekularni testovi koji otkrivaju *mecA* gen ne mogu otkriti *mecC* što predstavlja problem u molekularnom istraživanju rezistencije. Izraziti trend smanjenja prevalencije MRSA u ovim zemljama javlja se kao rezultat prilagođenog pristupa higijeni bolničkih sredina (32). MRSA se u Hrvatskoj spominje prvi put 70-ih godina 20. stoljeća, nakon što je u Europi otkrivena desetak godina ranije. Budući da je izolirana u rijetkim slučajevima, nije bilo potrebe za sistematičnim pregledom broja i postotka slučajeva. Uzlazni trend počinje se primjećivati u Domovinskom ratu, a nadzor nad infekcijama MRSE započinje Odbor za rezistenciju Hrvatske akademije za medicinske znanosti 1998. godine (32). U slijedećem šestogodišnjem razdoblju postotak MRSA infekcija iznosio je 18 – 24 % bez značajnih promjena (33). Od 2001. godine Hrvatska sudjeluje u Europskom praćenju antimikrobne rezistencije (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, EARSS) (32). Kako bi

se karakterizirali sojevi MRSA koriste se molekularne metode kao što su elektroforeza u pulsirajućem polju i tipizacija djela gena koji kodira stafilokokni protein A (34). Među najznačajnije genske varijante sojeva MRSA spadaju Arhaični (ST250), Berlinski (ST45), Brazilski/Mađarski klon (ST239), nadalje Iberijski klon (ST 247), New York /Japan (ST5), Pedijatrijski (ST5) i Južnonjemački klon (ST228) kao i epidemijski klonovi iz Ujedinjenog Kravljevstva: UK EMRSA 2/6, UK EMRSA 3, 15 i 16 dok u najvažnije izvanbolničke klonove spadaju Europski (ST80), Južnopacifički (ST30) i USA300 (ST8), 400 (ST1) i USA 1000 (ST59) (35). U Republici Hrvatskoj je potvrđena dominacija bolničkih MRSA a tipizacijom je utvrđeno da je glavnina MRSA klonova izoliranih iz hemokultura varijanta ST111 za kojeg se smatra da je evoluirao iz Južnonjemačkog klona (36). Općenito su u rodu *Staphylococcus* do sad identificirane 23 različite vrste, a samo vrsta *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu koji omogućuje konverziju fibrinogena u fibrin te se zbog prisustva tog enzima *S. aureus* može nazvati i koagulaza pozitivni stafilokok dok se ostalim pridodaje naziv koagulaza negativni stafilokok (37). Ova bakterija je vrlo rasprostranjena, a nalazi se u vodi, tlu, zraku, hrani i na predmetima opće uporabe. Ovaj je fakultativni anaerob gram-pozitivan, ne sporulira te na specifičnim podlogama formira karakteristične neprozirne, okrugle, glatke i uzdignute kolonije, koje su pod mikroskopom vidljive kao grozdane nakupine koka od kud dolazi i ime. *S. aureus* je hemolitička bakterija pa se na krvnom agaru oko kolonije uočava uža ili šira zona  $\beta$ -hemolize, a postoje i nehemolitički sojevi (37). Bakterije ovog roda prirodno su otporne na sušenje i povišene količine šećera i NaCl-a te na visoke temperature (60 °C kroz 1 sat). Osoba ih može prenijeti na koži ili sluznicama. Iako ova bakterija ne predstavlja visoki rizik za zdrave osobe, njen enteotoksin može ozbiljno narušiti zdravlje imunokompromitirane osobe, a toksin koji luči na hrani jedan je od glavnih uzoraka alimentarnih toksoinfekcija (38).

### 1.5.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pripada obitelji *Enterobacteriaceae*. U prirodi se može pronaći u tlu i vodi, a u ljudi i životinja je dio crijevne mikrobiote. U crijevima razlaže ugljikohidrate i proteine te zbog toga igra važnu ulogu u metabolizmu. Luči spojeve koji antagonistički djeluju na druge bakterije te kobalamin (vitamin B12) i vitamin K koji sudjeluju u metabolizmu (39). Ima složenu antigensku građu te se preko nje poznaje preko 700 serotipova. Posjeduje antigene O, H i K (37). Ovo je gram negativna bakterija koja posjeduje peritrihe flagele koje joj omogućuju kretanje, ne formira spore, no pojedini sojevi posjeduju kapsulu. Fakultativni je anaerob te proizvodi brojne enzime. Sposobnost *E. coli* da razlaže laktozu uvelike pomaže u identifikaciji. Ove bakterije pokazuju veliku otpornost i mogu duže vrijeme preživjeti u vodi, zemlji ili na

površini predmeta opće uporabe. Dugo zadržavaju u raznim namirnicama u kojima se i razmnožavaju. Osjetljive su prema povišenoj temperaturi, nekim bojama i kemijskim spojevima te ultraljubičastom zračenju (38). *E. coli* je oportunistički patogen te iako je dio prirodne crijevne mikrobiote, u drugim organskim sustavima može uzrokovati infekciju kao što su sepsa, dojenjački meningitis, uroinfekciju i dr. zahvaljujući lučenju raznih toksina (38). Charles Mubita i suradnici su istraživali antibiogram *E. coli* te su rezistenciju 83 izolata određivali na panelu od 10 antibiotika. Rezultati su pokazali visoku rezistenciju na penicilin, eritromicin, kotrimoksazol i nitrofurantoin u većini izolata (40).

### 1.5.3 *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* je gram-negativna inkapsulirana bakterija obitelji *Enterobacteriaceae*. Ova bakterija je prirodni stanovnik crijevne mikrobiote, a u osoba sa slabom oralnom higijenom može se pronaći kao dio oralne mikrobiote. Patogena postane kada se nađe u alveolama (41). *K. pneumoniae* rijetko se izolirao kao uzročnik izvanbolničkih upala pluća, no često upravo ova bakterija uzrokuje bolničke pneumonije (42). Rizične skupine su stariji i alkoholičari kod kojih smrtnost od ove bakterije iznosi 64 % dok u općoj populaciji smrtnost iznosi 21 % što nadmašuje smrtnost od pneumokokne pneumonije (42). U zdravstvenim ustanovama *K. pneumoniae* se može prenositi kontaktno od kontaminiranih ruku ili iz kontaminiranog okoliša. Pacijenti su također izloženi prilikom ventilacije (maska ili bronhoskop) ili tijekom uvođenja intravenskog katetera (43). Bakterije ovog roda postale su vrlo rezistentne, a problem postaju kada luče enzim karbapenemazu OXA-48 koja inaktivira antibiotik karbapenem koji je često zadnja linija u obrani protiv rezistentnih gram-negativnih bakterija (43). OXA-48 karbapenemaza klase D, jedna je od najraširenijih karbapenemaza na Mediteranu (44). Ova karbapenemaza kodirana je genom *bla<sub>oxa-48</sub>*. Gen je uglavnom detektiran kao dio kompozitnog transpozona Tn 1999 u dvije kopije umetnute sekvence IS1999 (45). Sojevi koji proizvode ove enzime često su rezistentni na cefalosporine treće generacije te u njima postoji prošireni spektar β-laktamaze (ESBL<sup>4</sup>) (44).

---

<sup>4</sup> Eng. Extended spectrum beta-lactamase

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ispitati antibakterijski učinak sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Ishodna hipoteza bila je inhibitorni učinak ove sinergije na rezistentne bolničke patogene te je zbog toga taj učinak praćen mjerenjem OD600 kroz 24 sata. Prilikom mjerenja korištena je doza čestica koja odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije određene eksperimentalno. Kontrolnu skupinu činio je bakterijski inokulum bez dodanih čestica cinkova oksida dok je cijeli eksperiment ponovljen u mraku kako bi se ispitaio sinergistički učinak.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Pribor i uređaji

- Analitička vaga (Nimbus, Adam, Kingston, UK)
- Polipropilenske epruvete s čepom (50 mL)
- Aluminijska folija (Alluminio Brian Roll, Italija)
- Autoklavirana voda iz slavine
- Automatske mikropipete 2 – 20  $\mu\text{L}$  ; 200 – 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
- Čitač mikrotitarskih ploča (Hidex Sense, Turku, Finska)
- Inkubator (Termo-medicinski aparati, Bodalec & Havoic, Zagreb, Hrvatska)
- Krvni agar
- Mikrotitarske pločice (96 well i 24 well, ROLL Piove di Sacco, Italija)
- Müller – Hinton agar (Biolife, Italija)
- Müller – Hinton bujon (Biolife, Italija)
- Multkanalna pipeta 0,5 – 300  $\mu\text{L}$  (Transferpette S-8, Njemačka)
- Nastavci za pipete (Gilson, SAD)
- Plastične kivete za spektrofotometriju
- Plastične mikrobiološke ušice („eze“)
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- Staklene epruvete (15mL) s čepom
- Tresilica (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (BactoSonic, Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV kvarcna lampa sa živinim parama 366nm i 254 nm (CAMAG, Muttenez, Švicarska)
- Vortex (TK3S, technoKartell, Noviglio, Italija)
- Programibilna peć (Carbolite Gero, Sheffield, UK)

## 3.2 Čestice cinkovog oksida

Čestice cinkovog oksida (ZnO) korištene u istraživanju fotokatalitičkog antibakterijskog djelovanja pripremljene su u sklopu diplomskog rada Rafaela Radičić na Odjelu za fiziku Sveučilišta u Rijeci (46)

### 3.2.1 Priprema mikroporoznih supstrata

ZnO supstrat s mikroporoznom strukturom pripremljeni su termičkom razgradnjom celuloznih predložaka na kojima su prethodno naslojeni tanki filmovi ZnO putem Depozicije atomskih slojeva (ALD) sistem Beneq TFS 200. ALD tehnika, koja se temelji na sekvencijalnom pulsiranju primjenjenih prekursora u plinovitoj fazi, omogućila je homogeni rast i kontrolirano oblaganje 50 nm ZnO na 3D površinama celuloznog supstrata (Sodra Green T). Dobivenim hibridnim uzorcima potom su uklonjeni organski polimerni predlošci uz pomoć kontrolirane termalne razgradnje.

### 3.2.2 ALD depozicije

Korišteni su celulozni diskovi promjera 0.6 mm s prosječnom debljinom 0.12 mm. Za depoziciju ZnO na jednoj (izloženoj) strani celuloznog predloška korištena je kombinacija prekursora dietil cinka ( $\text{Et}_2\text{Zn}$ ) i vode pri temperaturi depozicije 130 °C koji se izmjenično uvode u komoru kroz 250 ciklusa. Jedan ciklus se sastoji od početne pulsacije  $\text{Et}_2\text{Zn}$  s trajanjem 200 ms. Nastali sporedni produkti ili neizreagirani prekursori se odstranjuju iz komore dušikom koji se dovodi 1 s. Potom se pulsira voda 180 ms te se opet dovodi dušik 1 s. Da bi osigurali homogenu pokrivenost supstrata s ZnO analogni postupak je ponovljen na drugoj strani celuloznog predloška. Navedeni procesni protokol se primjenjuje za rast 50 nm filma ZnO na silicijevom supstratu.

### 3.2.3 Kalcinacija uzorka

Uzorci ZnO na celuloznim predlošcima kalcinirani su s namjerom dobivanja čistog ZnO. Uzorci se polože u keramičke lađice za pirolizu te se griju jedan sat u programibilnoj peći do 700 °C s brzinom grijanja 10 °C/min. Nakon gašenja grijanja, uzorci su unutar peći pušteni da se preko noći ohlade do sobne temperature.

### 3.3 Bakterijski sojevi

Rezistentni bakterijski sojevi korišteni u istraživanju bili su Meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ESBL ATCC 13353 te *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 361/2020. Bakterijski sojevi su dio kolekcije Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Bakterije su čuvane u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  u 10 %-tnom glicerol bujonu. Da bi se koristile u pokusima bakterije su kultivirane na MH agaru na  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 sata.

### 3.4 Bakterijski inokulum

Plastičnom mikrobiološkom ušicom (ezom) pokupljene su kolonije sa hranjive podloge te su prenesene u 3 mL Müller-Hinton bujon u staklenoj epruveti od 15 mL. Pomoću spektrofotometra se mjerila apsorbancija pri 600 nm što se označava kao OD600 (optical density 600 nm). Iznos  $\text{OD600} = 1,00$  označava broj bakterija u inokulumu 109 CFU/mL te se iz ishodnog inokuluma radi serija deseterostrukog razrjeđenja kako bi se dobio inokulum sa brojem bakterija 106 CFU/mL s kojim se nastavlja istraživanje. Postupak je potom ponovljen za sve modelne organizme.

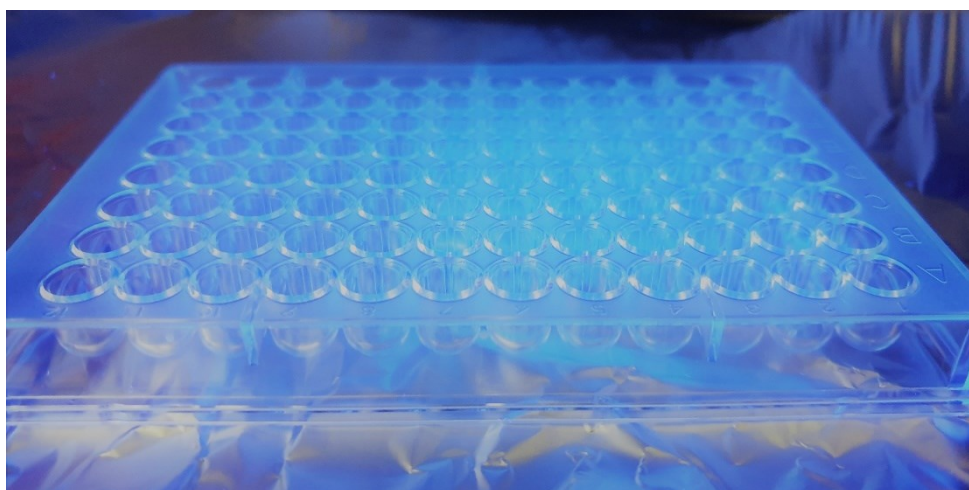
### Priprema disperzije čestica cinkovog oksida

Na analitičkoj vagi izvagano je 31,194 mg čestica cinkovog oksida te su čestice pomoću plastične žlice prenesene u polipropilensku epruvetu od 50 mL u koju je prethodno stavljeno 20 mL sterilne vodovodne vode kako bi se dobila ishodišna disperzija masene koncentracije  $\gamma = 1,5597$  mg/mL. Ishodišna disperzija je potom stavljena u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta kako bi se čestice što više raspršile u disperznom sredstvu. Serijom razrjeđenja su potom dobivene ishodišne suspenzije za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije te ispitivanje inhibicije rasta mjerenjem OD600 kroz 24 sata. Nakon svakog razrjeđenja disperzija je ponovno stavljena u ultrazvučnu kupelj kroz 30 minuta te je svakih 5 minuta dobro protresena na vortexu. Ishodišna disperzija za određivanje MIK-a bila je masene koncentracije  $\gamma = 0,77984$  mg/mL dok je masena koncentracija disperzije za ispitivanje inhibicije rasta bila  $\gamma = 0,0484$  mg/mL i  $\gamma = 0,02437$  mg/mL.

### 3.5 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Minimalna inhibitorna koncentracija se odredila pripremom serije dvostrukih razrjeđenja radne disperzije u MH bujonu. U prvu se jažicu dodalo 100  $\mu\text{L}$  radne disperzije masene koncentracije  $\gamma = 0,77984$  mg/mL, zatim se u svaku jažicu dodala bakterijska suspenzija ( $10^6$  CFU/mL). Posljednja jažica u redu sadrži samo 50  $\mu\text{L}$  bujona i 50  $\mu\text{L}$  bakterijske

suspenzije te ta jažica služi kao kontrola rasta bakterija. Zatim se pripremljena mikrotitarska pločica stavila pod UV lampu kako bi se osvijetlila pod UV-A lampom (366 nm) kroz 30 minuta radi aktivacije cinka. Istovremeno je pripremljena druga mikrotitarska pločica koja nije izlagana UV-A svjetlu, kako bi se dobila kontrola bez UV-A osvjetljavanja. Nakon 24- satne inkubacije pri 37°C se u svaku jažicu osvijetljene i neosvijetljene mikrotitarske pločice dodaje 15  $\mu\text{L}$  rezazurina (0.015 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) te se pločice postavljaju u inkubator na 37 °C kroz 1 sat. Resazurin je oksido-redukcijski indikator plave boje, bez fluorescencije koji se koristi za kontrolu bakterijskog rasta. Mijenja boju u fluorescentno ružičastu nakon redukcije u resorufin (47). Nakon isteka vremena pločice se izvade i inkubatora te se očitava minimalna inhibitorna koncentracija.



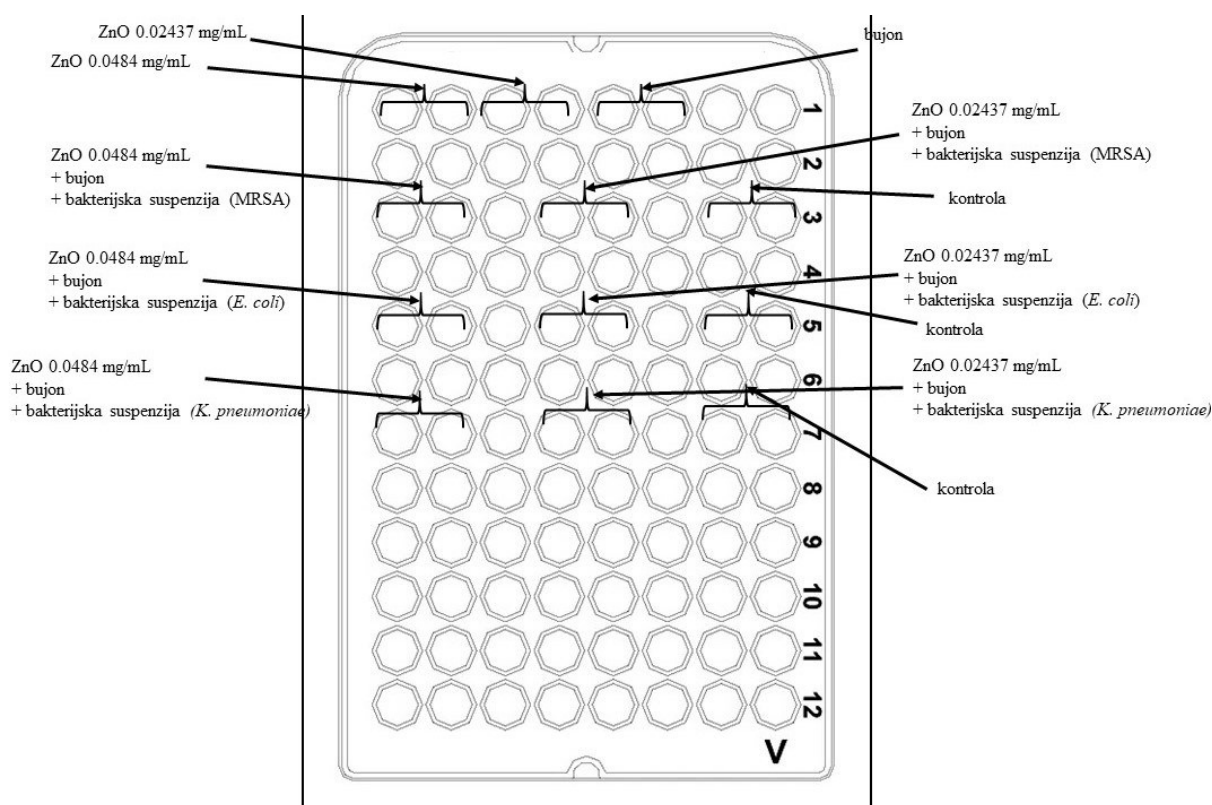
Slika 2. Osvjetljavanje mikrotitarske pločice

### 3.6 Određivanje inhibicije rasta bakterija

Određivanje inhibitorne moći sinergije čestica cinkova oksida i UV-A zračenja učinjeno je pomoću 24-satnog mjerenja apsorbancije na 600 nm (OD600) u čitaču mikrotitarski pločica Hidex sense na Odjelu za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. Mikrotitarska ploča pripremljena je dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  Müller-Hinton bujona u svaku jažicu. Potom se u prve dvije jažice dodaje ishodišna disperzija masene koncentracije  $\gamma=0.09748$  mg/mL te zapravo prva koncentracija iznosi  $\gamma=0.0484$  mg/mL. Nadalje, u druge dvije jažice u kojima je 50  $\mu\text{L}$  bujona doda se 50  $\mu\text{L}$  razrijeđene disperzije iz prvih jažica kako bi se u jažici dobila disperzija masene koncentracije  $\gamma=0.02437$  mg/mL. U posljednje dvije jažice stavlja se samo 100  $\mu\text{L}$  bujona te one služe kao slijepa proba. Nakon pripreme jažica i disperzije, u svaku se jažicu doda 50  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije. Mikrotitarska pločica se potom stavlja pod UV lampu te se osvjetljava UV-A zračenjem (366 nm) kroz 30 minuta kako bi se aktivirao cink iz disperzije čestica cinkova



oksida. Mikrotitarska pločica nakon osvjetljavanja putuje na Odjel za Biotehnologiju gdje se u čitači mikrotitarskih pločica mjeri apsorbancija na 600 nm (OD 600) kroz 24 sata sa postavkama mješanja na 300 rpm, očitavanja OD600 svaki sat te termostiranja na 37 °C kako bi se potaknuo rast bakterija. Postupak se ponovio sa mikrotitarskom pločicom bez osvjetljavanja kako bi se dobila kontrola u mraku, odnosno, bez aktivacije UV-A zračenjem. Mjerenja su ponovljena tri puta u duplikatu. Slika 3. prikazuje shemu mikrotitarske pločice. Kako bi se oduzela apsorbancija čiste disperzije i bujona, u prvom stupcu su jažice koje sadrže samo disperziju i samo bujon.



Slika 3. Shematski prikaz mikrotitarske pločice u kojoj je mjereno OD600 kroz 24 sata

### 3.7 Statistička obrada rezultata i matematičko modeliranje

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Excell platforme Office 365. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom u programu Statistica 10.0 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Matematički model izrađen je u programu Origin® Verzija 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Kao mjera slaganja eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih modelom korišteni su Pearsonov koeficijent korelacije ( $R^2$ ) i  $\chi^2$  test. Za grafički prikaz rezultata korištene su srednje vrijednosti i standardna pogreška.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) disperzije čestica cinkovog oksida u sterilnoj vodovodnoj vodi prikazana je u tablici 1. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korištene su bakterijske suspenzije pripremljene na način opisan u materijalima i metodama, disperzija čestica cinkovog oksida pripremljena po postupku također opisanom u poglavlju materijali i metode.

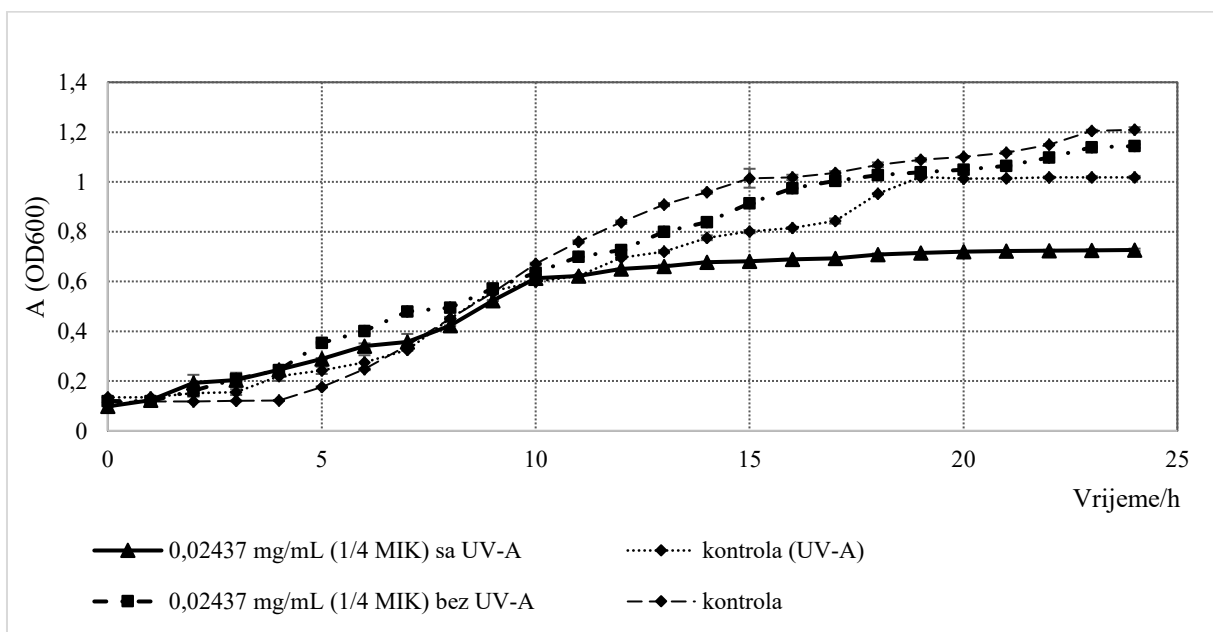
Tablica 1. Minimalna inhibitorna koncentracija čestica cinkovog oksida za MRSU, *E. coli* i *K. pneumoniae*

Bakterije	MIK (mg/mL)
MRSA	0.0974
<i>E. coli</i>	0.0974
<i>K. pneumoniae</i>	0.1948

Disperzija čestica cinkovog oksida u sterilnoj vodovodnoj vodi masene koncentracije  $\gamma=0.0974$  inhibirala je ove bakterije nakon 1 sata inkubacije. Postupak je ponovljen dva puta i oba puta su dobiveni isti rezultati. Poznavanje minimalne inhibitorne koncentracije bilo je potrebno kako bi se znalo s kojim koncentracijama disperzije će se istraživati inhibicija rasta te su odabrane  $\frac{1}{2}$  i  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Kontrola bez aktivacije UV-A zračenjem nije pokazala inhibiciju.

## 4.2 Inhibicija rasta bakterija

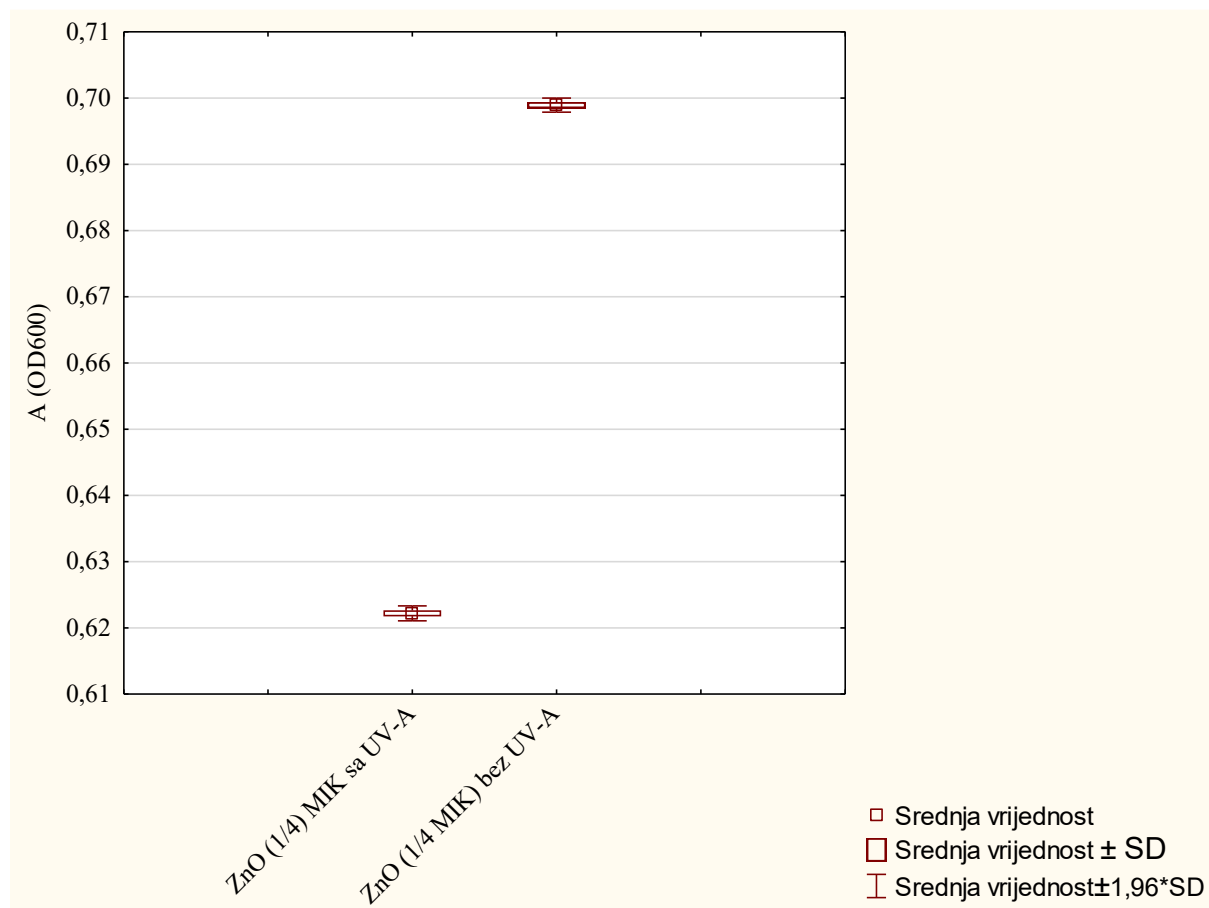
Meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* Na grafikonu 1. prikazana je inhibicija rasta bakterije meticilin-rezistentni *S. aureus* koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.02437$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Na x – osi prikazano je vrijeme u satima te je svaki sat određivana apsorbancija na 600 nm. Na y – osi prikazana je vrijednost apsorbancije na 600 nm (OD600). U svrhu usporedbe dodane su krivulje kontrolnih uzoraka te krivulja apsorbancije bakterijske suspenzije u koju su dodane čestice cinkovog oksida ali nisu fotoaktivirane UV-A zračenjem.



Grafikon 1. Inhibicija rasta bakterije meticilin rezistentnog *S. aureus* tijekom 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 ponavljanja uz odgovarajuću standardnu devijaciju

Iz grafikona 1. se jasno iščitava sinergistička inhibitorna aktivnost čestica cinkova oksida i UV-A zračenja. Krivulja koja prikazuje apsorbancije bakterijske suspenzije kojoj je dodana disperzija čestica cinkovog oksida masene koncentracije koja odgovara  $\frac{1}{4}$  MIK-a te osvijetljene UV-A zračenjem kroz 30 minuta kontinuirano raste do 10. sata kada se rast inhibira te se krivulja od tog vremena značajno ne podiže te nakon 24 sata apsorbancija iznosi 0.727. Krivulja bakterijske suspenziju u koju su dodane čestice bez fotoaktivacije se podiže na više vrijednosti apsorbancije te ona nakon 24 sata iznosi 1.144. Krivulja UV-A zračenje ponaša se kao i kontrole, odnosno, vrijednost apsorbancije se kontinuirano podiže što potvrđuje tezu o

fotoaktivaciji cinkovog oksida UV-A zračenjem. Te dvije krivulje se nako 11 sati počinju statistički značajno razlikovati ( $p=0.002$ ) što je vidljivo na grafikonu 2.

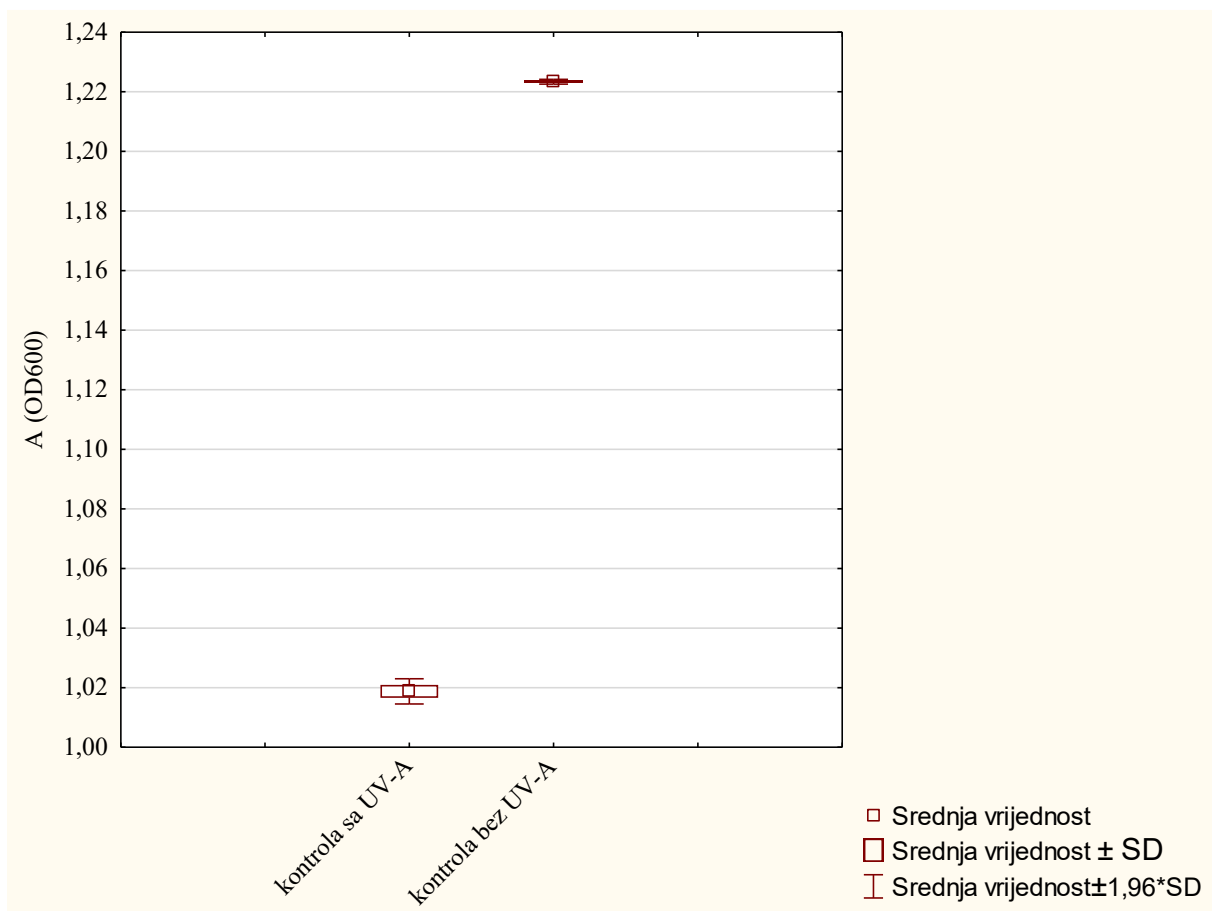


Grafikon 2. Statistička značajnost razlike inhibitorne aktivnosti disperzije čestica cinkovog oksida uz UV-A zračenje i bez UV-A zračenja nakon 12 sati. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %

Na grafikonu 2. vidljivo je da se ova dva tretmana statistički značajno razlikuju u 95 %-tnom intervalu značajnosti. Za izradu grafikona korištene su vrijednosti apsorbancije nakon 11 sati jer grafikon 1. prikazuje poklapanje rezultata do tog vremena. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane fotoaktiviranim česticama cinkova oksida nakon 11 sati iznosi 0.622 do apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane neaktiviranim česticama iznosi 0.699.

Krivulja koja prikazuje kontrolnu skupinu koja je bila osvjetljena UV-A zračenjem 30 minuta kreće se istim trendom kao i krivulja kontrolne skupine koja nije bila osvjetljena, iako su iznosi apsorbancije neznajno manji od neosvijetljene kontrole. Međutim, nakon 24 sata dolazi do statistički značajne razlike što je i prikazano na grafikonu 3.

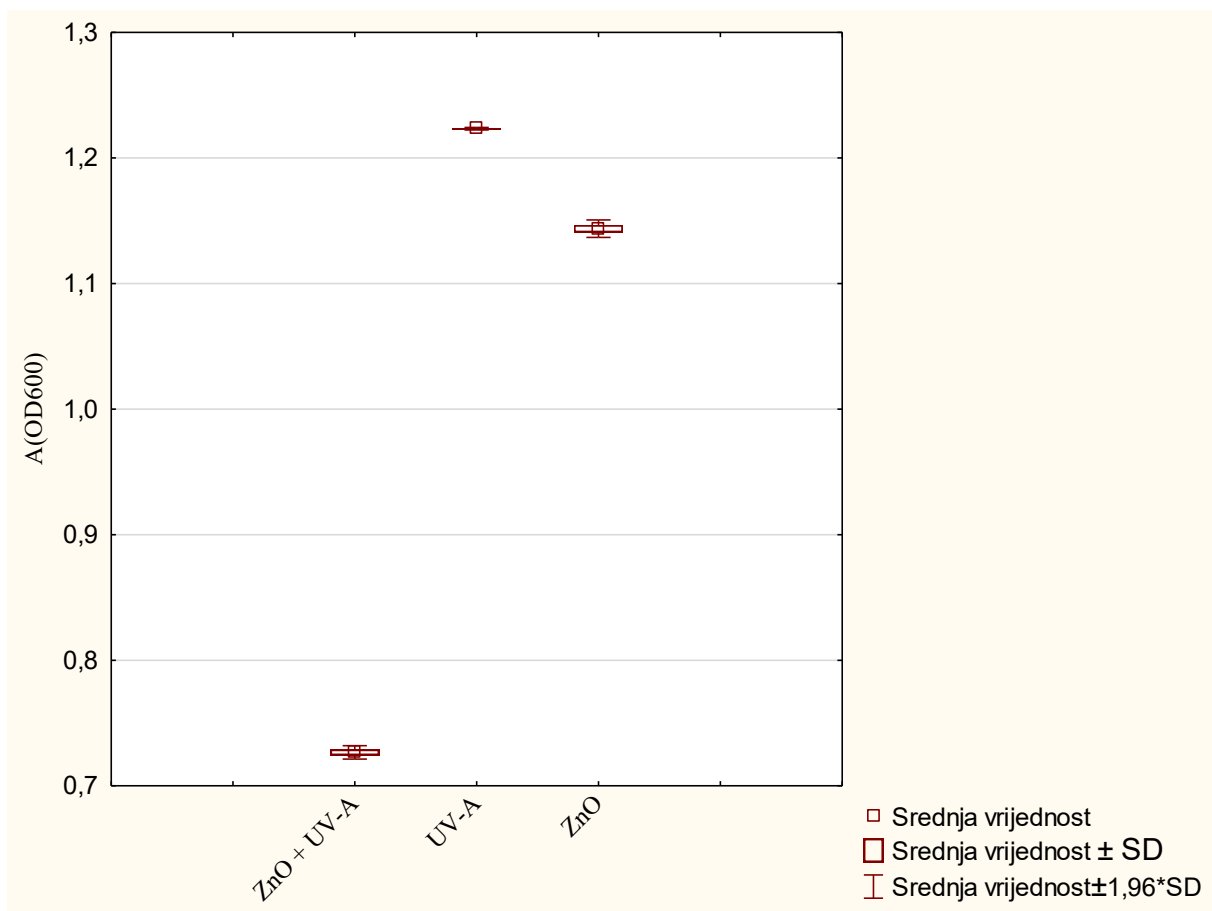
Grafikon 3. prikazuje statistički značajnu razliku između iznosa apsorbancija kontrolnih uzoraka osvjetljenih UV-A svjetlom i neosvijetljenih kontrolnih uzoraka nakon 24 sata.



Grafikon 3. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod bakterije meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* nakon 24 sata. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Na grafikonu 3. može se vidjeti da je razlika između kontrolnih uzoraka osvjetljenih UV-A svjetlom i neosvijetljenih uzoraka statistički značajna ( $p=0.0012$ ). Ovi rezultati prikazuju da je i UV-A zračenje bez čestica cinkova oksida utjecalo na kinetiku rasta bakterija. Ipak najveću inhibitornu aktivnost nakon 24 sata pokazala je sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja što je prikazano na grafikonu 4.

Grafikon 4. prikazuje statističku razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te samih čestica cinkovog oksida.

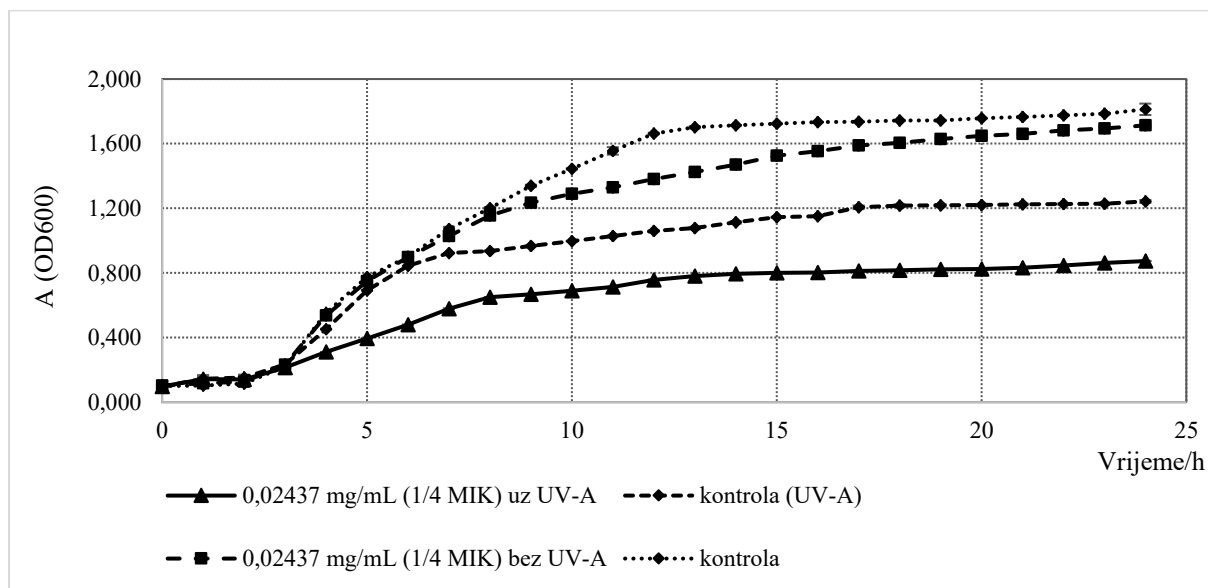


Grafikon 4. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast bakterije meticilin-rezistentan *S. aureus* nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Na grafikonu 4. vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u inhibitornoj aktivnosti sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te samih (neaktiviranih) čestica cinkovog oksida ( $p=0.0011$ ) nakon 24 sata u 95 %-tnom intervalu. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane disperzijom čestica cinkova oksida nakon 24 sata iznosi 0.727, bakterijska suspenzija tretirana samo UV-A zračenjem dostiže apsorbanciju 1.223 dok apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane samo česticama cinkovog oksida iznosi 1,143.

#### 4.2.1 ESBL-producirajući soj *Escherichia coli*

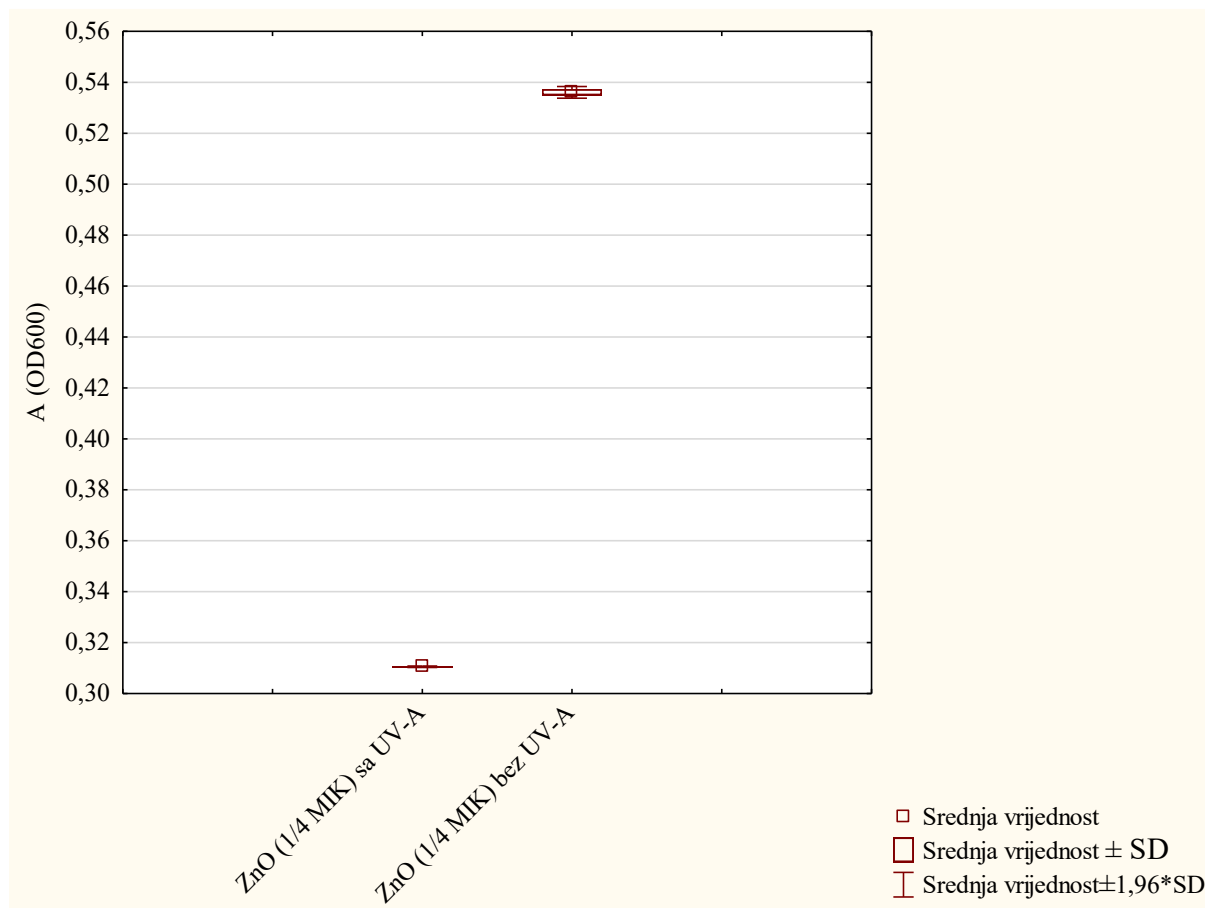
Na grafikonu 5. prikazana je inhibicija rasta bakterije *E. coli* koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.02437$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Na x – osi prikazano je vrijeme u satima te je svaki sat određivana apsorbancija na 600 nm. Na y – osi prikazana je vrijednost apsorbancije na 600 nm (OD600). U svrhu usporedbe dodane su krivulje kontrolnih uzoraka te krivulja apsorbancije bakterijske suspenzije u koju su dodane čestice cinkovog oksida ali nisu fotoaktivirane UV-A zračenjem.



Grafikon 5. Inhibicija rasta bakterije *E. coli* kroz 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti apsorbancija uz standardnu pogrešku

Na grafikonu 5. vidljiva je inhibitorna aktivnost sinergije čestica cinkova oksida i UV-A zračenja. Krivulja koja prikazuje apsorbancije bakterijske suspenzije kojoj je dodana disperzija čestica cinkovog oksida masene koncentracije koja odgovara  $\frac{1}{4}$  MIK-a koje su fotoinaktivirane UV-A zračenjem kroz 30 minuta kontinuirano raste do 8. sata kada se rast inhibira te se krivulja od tog vremena značajno ne podiže te nakon 24 sata poprima vrijednost apsorbancije 0.873. Krivulja koja prikazuje apsorbancije bakterijske suspenzije u koju su dodane čestice cinkovog oksida bez fotoinaktivacije masene koncentracije koja odgovara  $\frac{1}{4}$  MIK-a kreće se sličnim trendom no nakon 24 sata poprima značajno veće vrijednosti apsorbancije te ona nakon 24 sata iznosi 1.713. Vrijednosti apsorbancije ova dva tretmana statistički se razlikuju nakon 4 sata što je i prikazano na grafikonu 6.

Grafikon 6. prikazuje statističku značajnost razlike između apsorbancija bakterijske suspenzije *E. coli* tretirane sinergijom čestica i UV-A zračenja i bakterijske suspenzije tretirane neosvijetljenim česticama UV-A zračenjem u masenoj koncentraciji koja odgovara ¼ MIK-a.

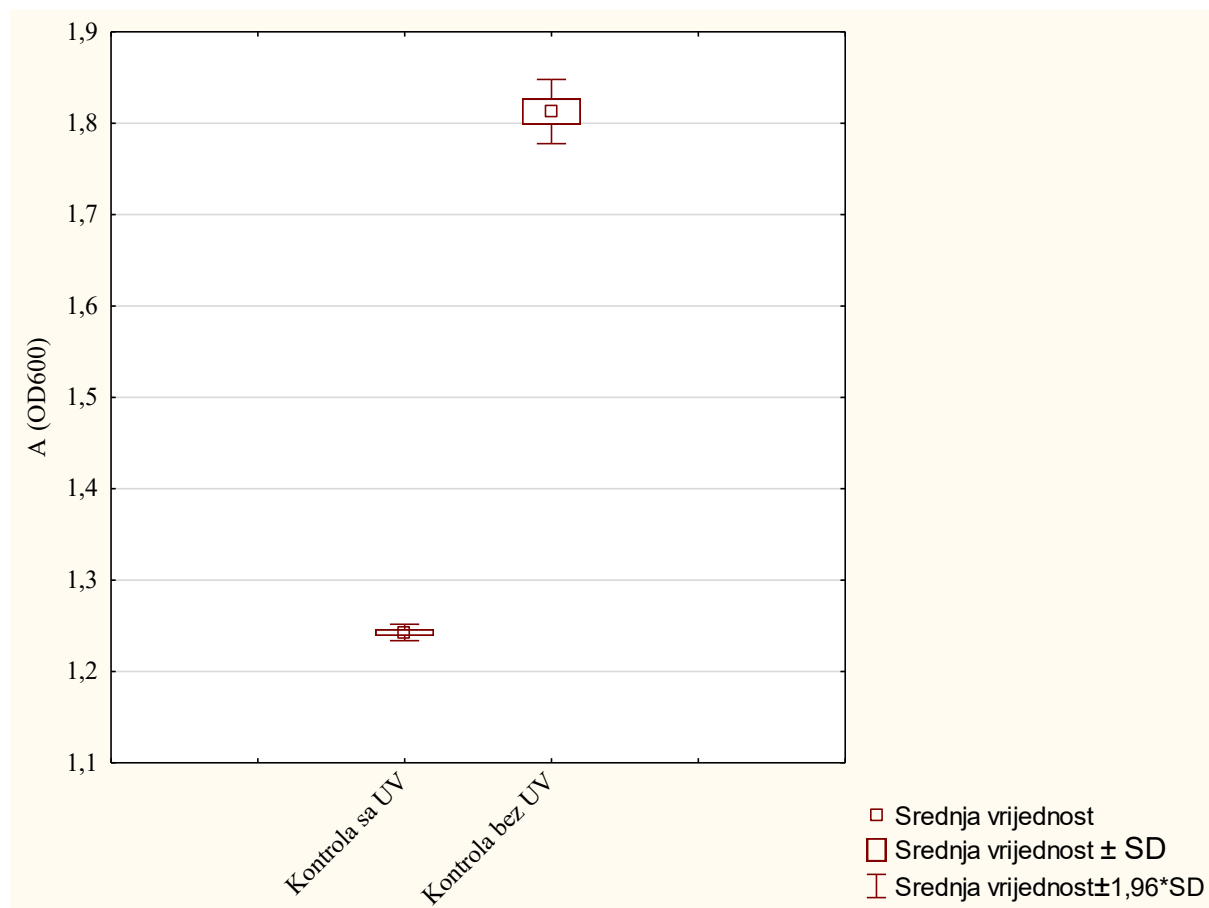


Grafikon 6. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije fotoaktivirani čestica cinkovog oksida i nefotoaktiviranih čestica na rast *E. coli* nakon 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Na grafikonu 6. vidljivo je da se ova dva tretmana statistički značajno razlikuju ( $p=0.0016$ ) u 95 %-tnom intervalu značajnosti. Za izradu grafikona korištene su vrijednosti apsorbancije nakon 4 sat jer grafikon 5. prikazuje poklapanje rezultata do tog vremena. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane fotoaktiviranim česticama nakon 4 sata iznosi 0.311 dok apsorbancija u slučaju neosvijetljenih čestica cinkova oksida iznosi 0.550.



Grafikon 7. prikazuje statistički značajnu razliku između apsorbancija kontrolnih uzoraka osvijetljenih UV-A svjetlom i neosvijetljenih kontrolnih uzoraka nakon 24 sata.

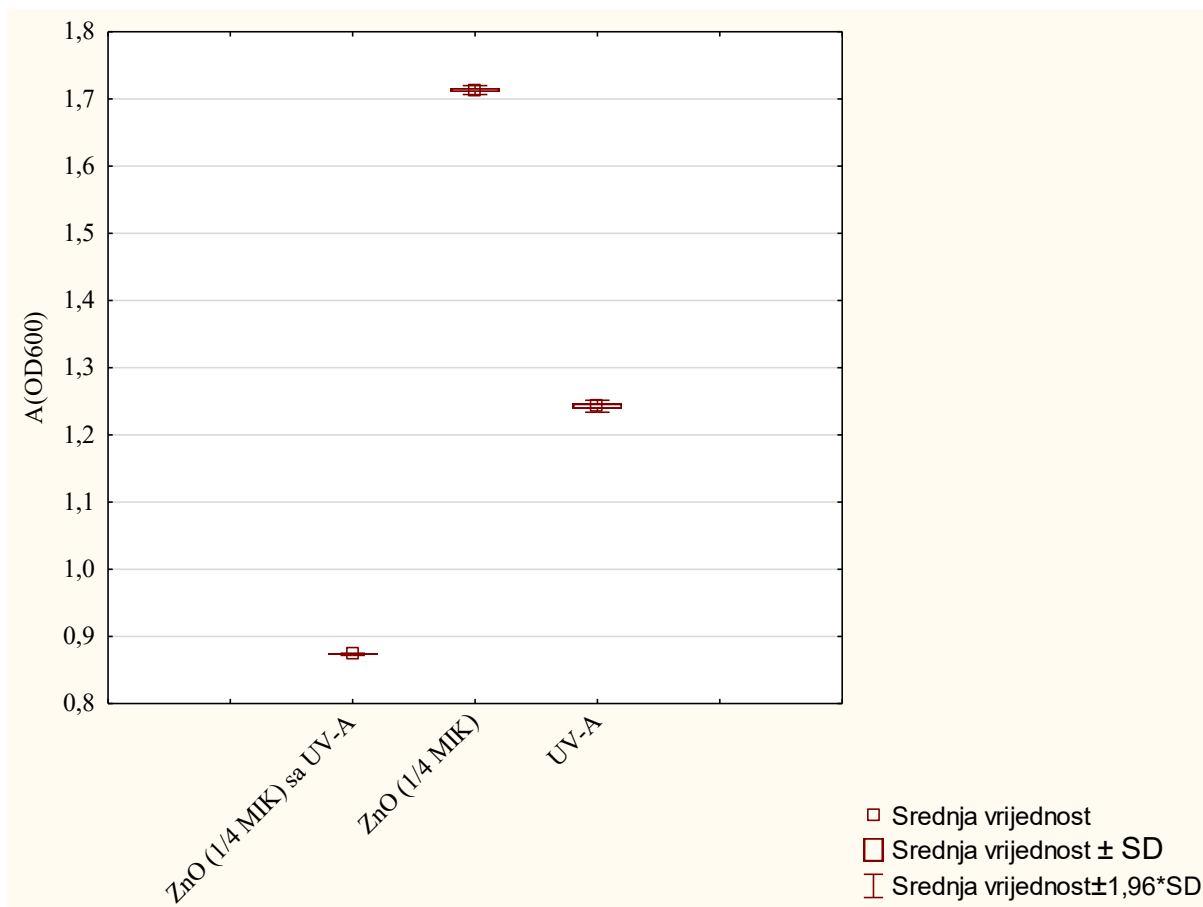


Grafikon 7. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod *E.coli* nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom.

Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Na grafikonu 7. vidljiva je statistički značajna razlika ( $p=0.0021$ ) između kontrolnih uzoraka *E.coli* osvijetljenih UV-A svjetlom i neosvijetljenih uzoraka. Ovi rezultati prikazuju da je i UV-A zračenje bez čestica cinkova oksida utjecalo na kinetiku rasta bakterija. Apsorbancija osvijetljene kontrole nakon 24 sata iznosila je 1.243 dok je apsorbancija neosvijetljene kontrole nakon 24 sata iznosila 1.813. Ipak najveću inhibitornu aktivnost nakon 24 sata pokazala je sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Statistička značajnost prikazana je na grafikonu 8.

Grafikon 8. prikazuje statističku značajnost razlike između apsorbancija bakterijske suspenzije *E. coli* tretirane fotoaktiviranim česticama cinkovog oksida, neaktiviranim česticama i samo UV-A zračenjem.

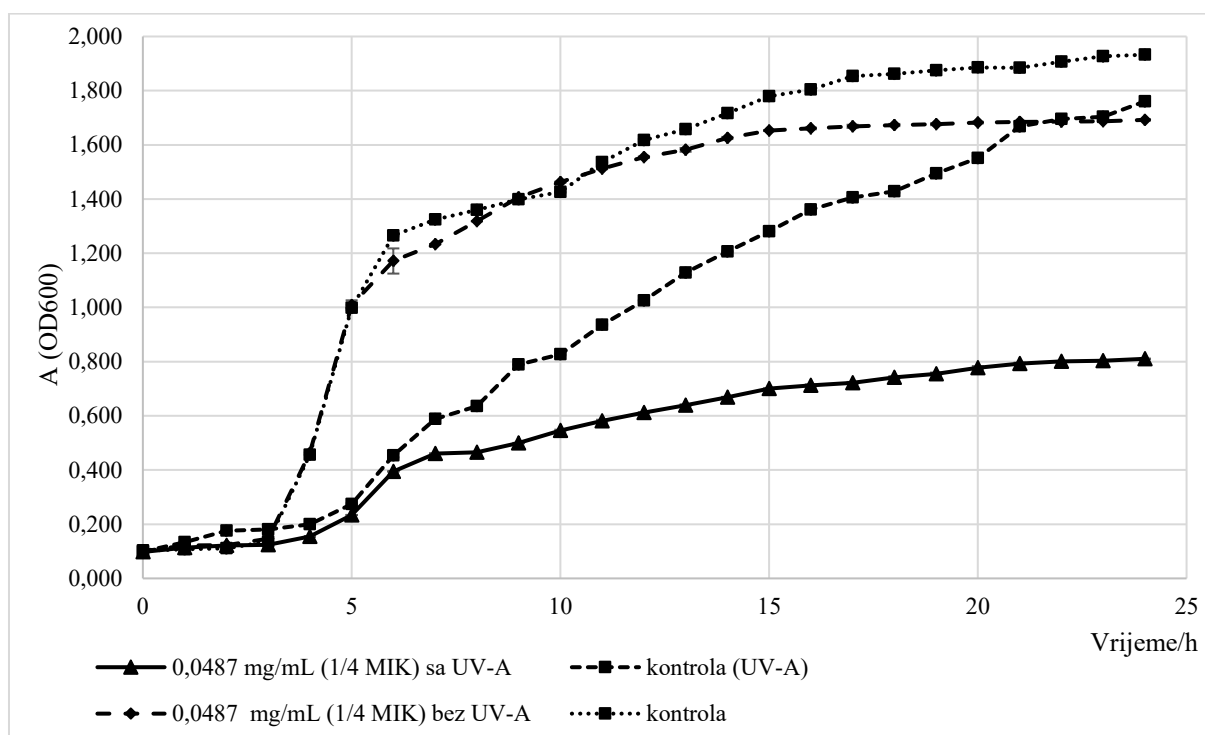


Grafikon 8. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast *E. coli* nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Na grafikonu 8. vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u inhibitornoj aktivnosti sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te samih (neaktiviranih) čestica cinkovog oksida ( $p=0.0018$ ) nakon 24 sata u 95 %-tnom intervalu. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane disperzijom fotoaktiviranih čestica cinkova oksida nakon 24 sata iznosi 0.873, bakterijska suspenzija tretirana samo UV-A zračenjem dostiže apsorbanciju 1.243 dok apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane samo česticama cinkovog oksida iznosi 1,713.

#### 4.2.2 Karbapen rezistentna *Klebsiella pneumoniae* OXA-48

Na grafikonu 9. prikazana je inhibicija rasta bakterije *K. pneumoniae* OXA-48 koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.0487$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Na x – osi prikazano je vrijeme u satima te je svaki sat određivana apsorbancija na 600 nm. Na y – osi prikazana je vrijednost apsorbancije na 600 nm (OD600). U svrhu usporedbe dodane su krivulje kontrolnih uzoraka te krivulja apsorbancije bakterijske suspenzije u koju su dodane čestice cinkovog oksida koje prethodno nisu bile aktivirane UV-A zračenjem.

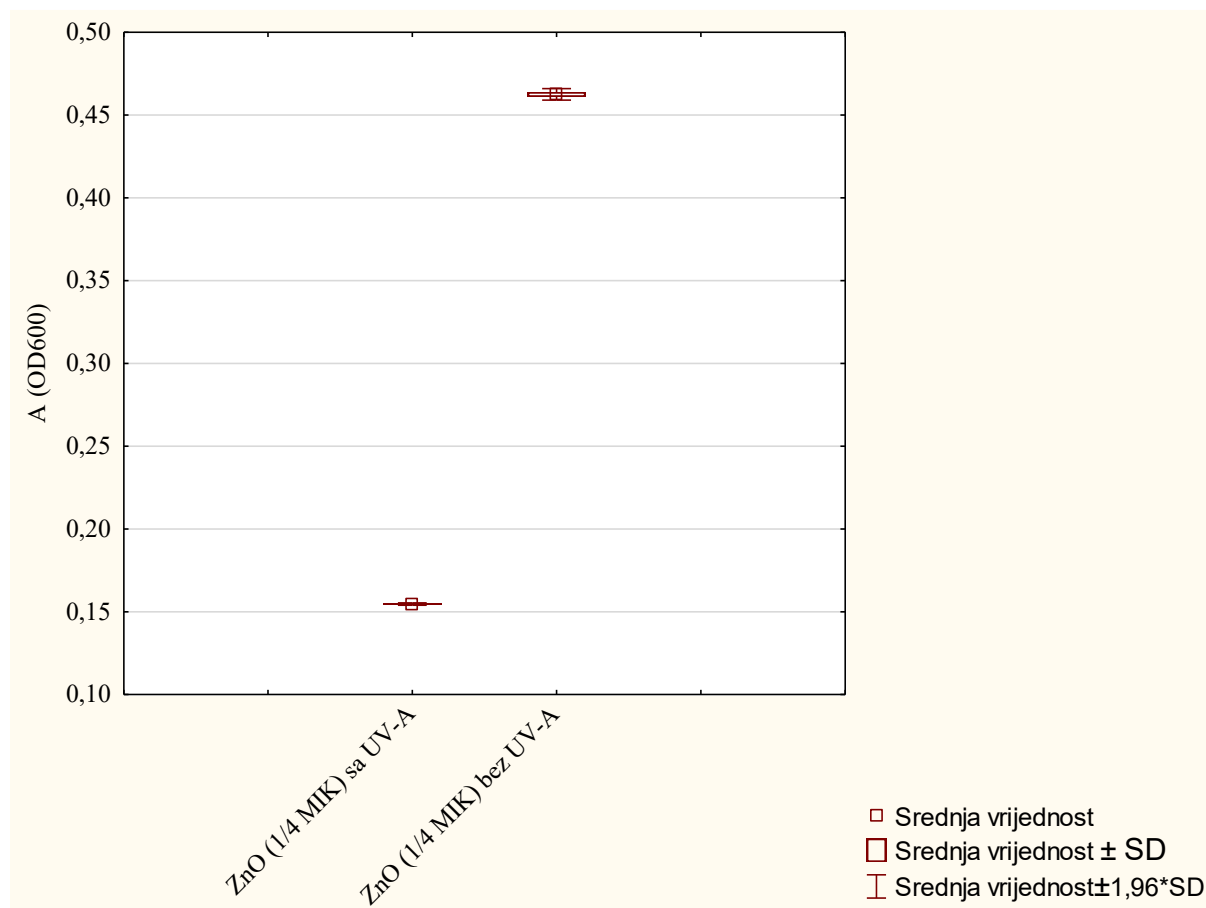


Grafikon 9. Inhibicija rasta bakterije *K. pneumoniae* kroz 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti apsorbancija uz standardnu pogrešku

Iz grafikona 9. vidljivo je da najveću inhibiciju rasta pokazuje krivulja koja prikazuje bakterijsku suspenziju tretiranu sa sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenjem. Nakon 24 sata apsorbancija te krivulje iznosi 0.810, apsorbancija krivulje osvijetljenog kontrolnog uzorka iznosi 1.760, apsorbancija bakterijske suspenzije sa neosvijetljenim česticama cinkovog oksida 1.692 dok apsorbancija neosvijetljene suspenzije (kontrola) iznosi 1.933. Apsorbancije bakterijskih suspenzija tretiranih sa sinergijom čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja te

česticama cinkovog oksida bez prethodne fotoaktivacije UV-A zračenjem počinju se statistički značajno razlikovati nakon 4 sata tretmana što je vidljivo na grafikonu 10.

Grafikon 10. prikazuje statističku značajnost razlike u apsorbancijama bakterijskih suspenzija tretiranih česticama cinkovog oksida fotoaktiviranim UV-A zračenjem i česticama koje prethodno nisu fotoaktivirane UV-A zračenjem.

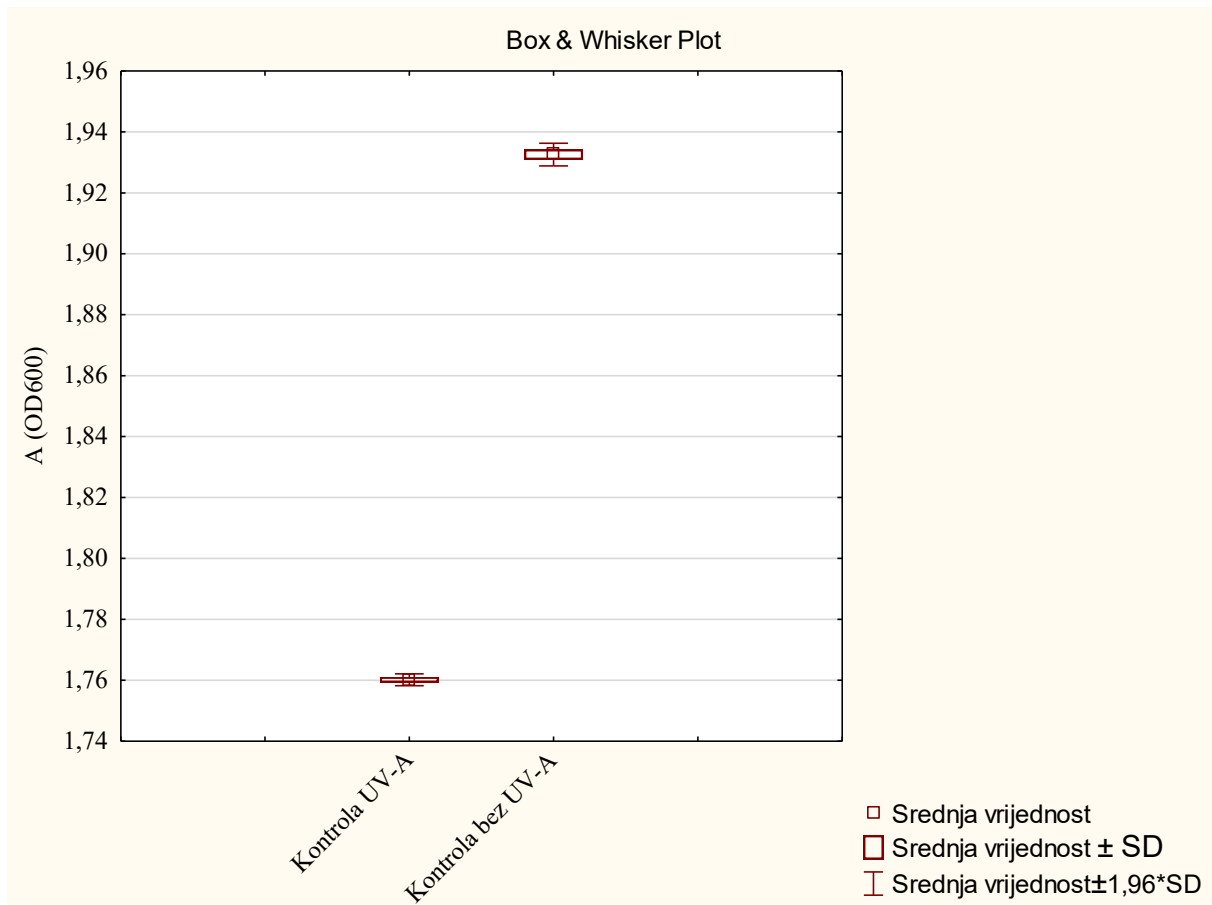


Grafikon 10. Statistička razliku između inhibitorynog učinka sinergije fotoaktivirani čestica cinkovog oksida i nefotoaktiviranih čestica na rast *K. pneumoniae* nakon 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Grafikon 10. prikazuje da je apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane fotoaktiviranim česticama cinkova oksida značajno manja ( $p=0.002$ ) od apsorbancije bakterijske suspenzije tretirane neaktiviranim česticama cinkova oksida nakon 4. sata tretmana. Ovi rezultati ukazuju da je sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja značajno inhibirala rast bakterija *K. pneumoniae* nakon 4 sata tretmana. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane sinergijom čestica i UV-A zračenjem nakon 4 sata iznosi 0.155 dok

apsorbancija kod bakterijske suspenzije tretirane neaktiviranim česticama nakon 4 sata iznosi 0.455.

Grafikon 11. prikazuje statističku značajnost razlike apsorbancija kontrolnih bakterijskih suspenzija tretiranih UV-A zračenja, odnosno, bez UV-A zračenja nakon 24 sata.

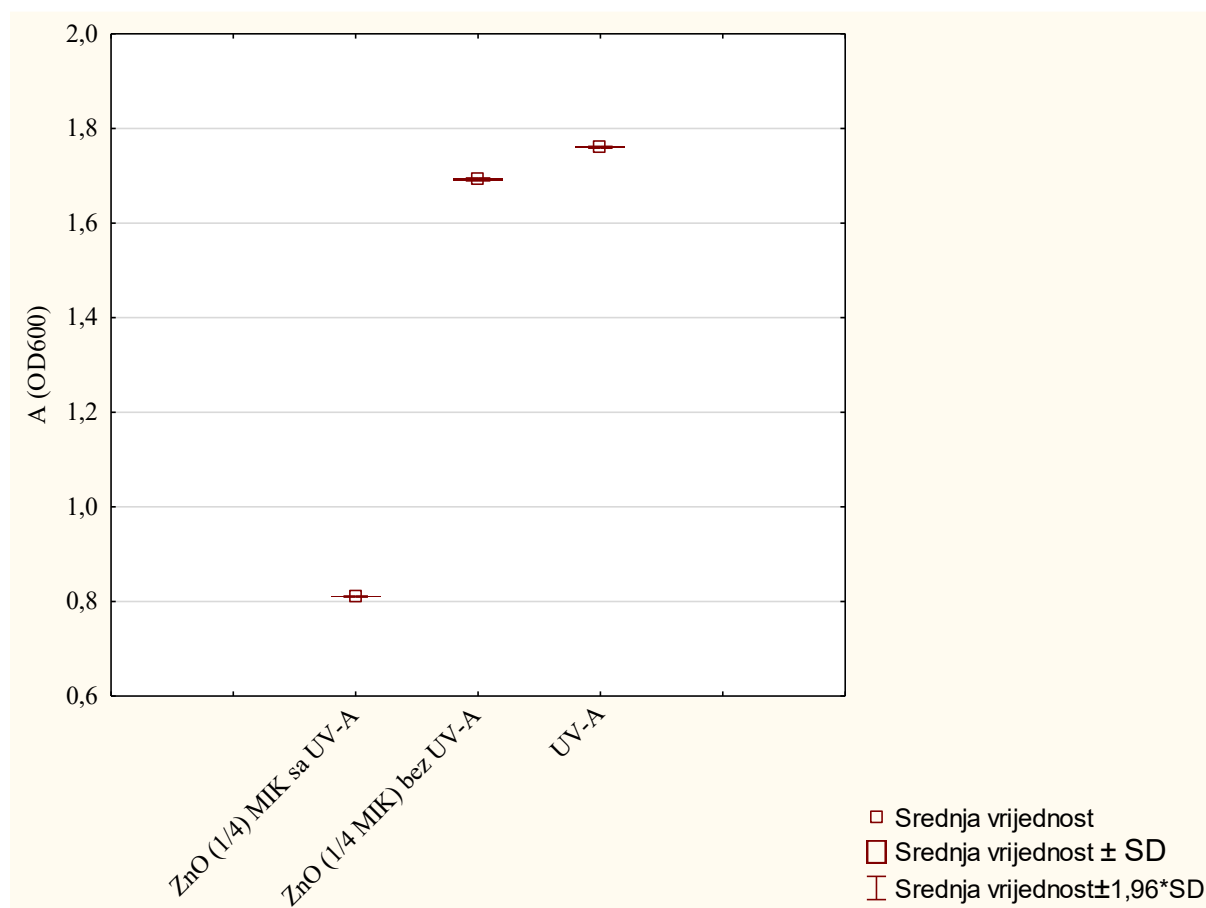


Grafikon 11. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod *K. pneumoniae* nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Grafikon 11. prikazuje da je apsorbancija bakterijske suspenzije 30 minuta osvjetljavane UV-A zračenjem značajno manja od neosvjetljene bakterijske suspenzije ( $p=0.0017$ ) nakon 24 sata. Apsorbancija osvjetljene bakterijske suspenzije nakon 24 sata iznosila je 1.760 dok je apsorbancija neosvjetljene bakterijske suspenzije iznosila 1.933. Tretman UV-A zračenjem kroz 30 minuta inhibirao je rast bakterija u odnosu na kontrolnu bakterijsku suspenziju nakon 24 sata.

Statistička značajnost inhibicije sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja u odnosu na inhibiciju neaktiviranih čestica i samog UV-A zračenja prikazana je na grafikonu 12.



Grafikon 12. Statistička razlika između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast *K. pneumoniae* nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.

Grafikon 12. pokazuje da je sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja statistički značajno ( $p=0.0015$ ) najviše inhibirala rast *K. pneumoniae* u bakterijskoj suspenziji nakon 24 sata. Apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja nakon 24 sata iznosila je 0.810, bakterijske suspenzije tretirane neaktiviranim česticama cinkova oksida 1.690 dok je apsorbancija bakterijske suspenzije tretirane samo 30 minutnim UV-A zračenjem nakon 24 sata iznosila 1.760.

### 4.2.3 Matematički model

Za matematički opis kinetike rasta bakterija korišten je „Rame-rep“ Gompertzov model kinetike (GKM<sup>5</sup>). Ovaj se model temelji na pretpostavci da se mikrobní rast odvija kroz tri različite faze: početnu fazu bez značajnog smanjenja broja bakterija („rame“ na krivulji inaktivacije), nakon čega slijedi eksponencijalna ili log faza rasta bakterija i rezidualna bakterijska populacija – lal faza („rep”Na krivulji inaktivacije). Ovaj model je pokazao najbolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, a rješenje GKM dano je nelinearnom jednađbom:

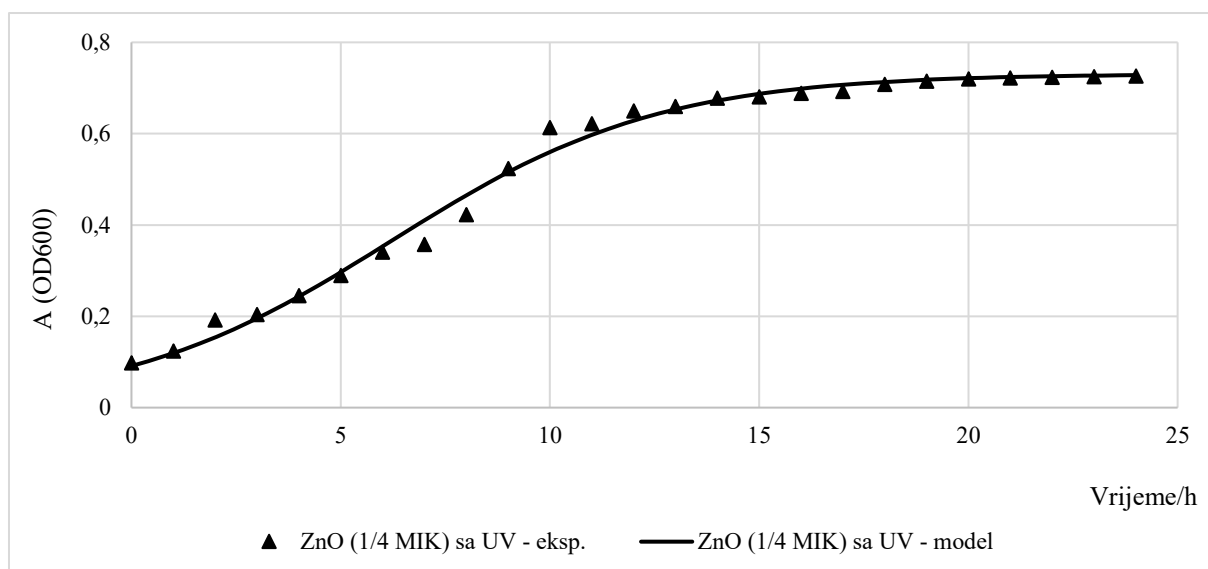
$$I. \quad y(t) = y(0)e^{-e^{-k(t-lagt)}}$$

gdje  $t_{lag}$  označava odgovarajuće vrijeme lag faze,  $y(t)$  označava apsorbanciju u određenom vremenu  $t$ , dok  $y(0)$  označava početnu apsorbanciju. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim matematičkim modelom opisano je Pearsonovim koeficijentom korelacije ( $R^2$ ), te ispitano  $\chi^2$  testom.

Grafikon 13. prikazuje slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju meticilin-rezistentnog *S. aureus* tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja.

---

<sup>5</sup> Eng. – Gompertz kinetics model

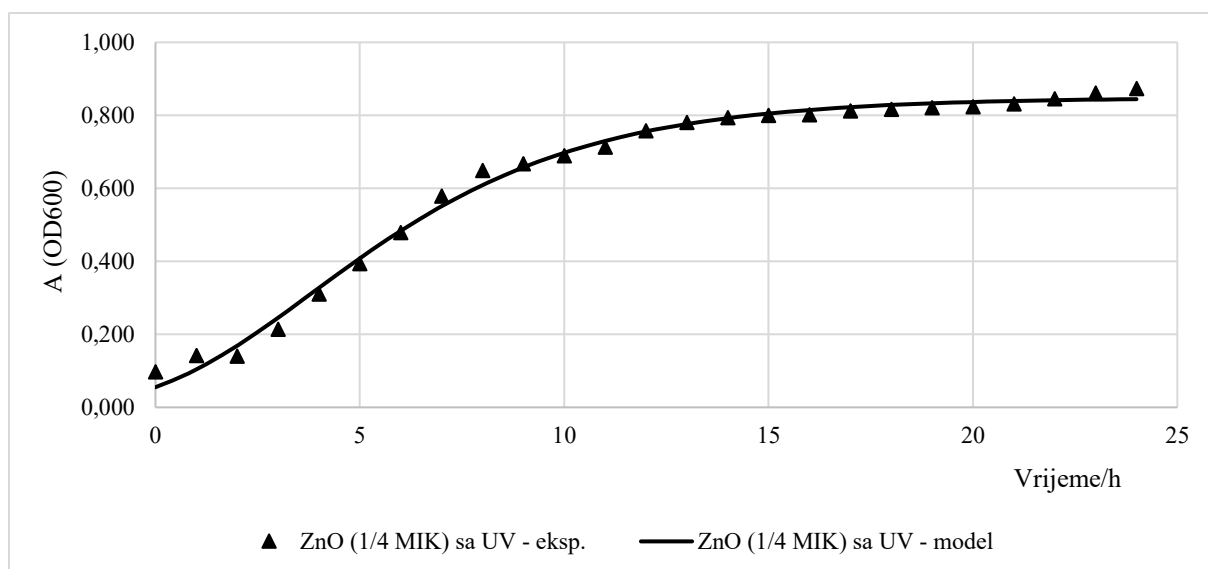


Grafikon 13. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju Meicilin-rezistentnog *S. aureus* tretiranu sinergijom česticama cinkova oksida i UV-A.

Na grafikonu 13. vidljiva je visoka razina slaganja eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je  $R^2 = 0.98133$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.000997$  što upućuje na visoku razinu slaganja rezultata.

Grafikon 14. prikazuje slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju *E. coli* tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja.

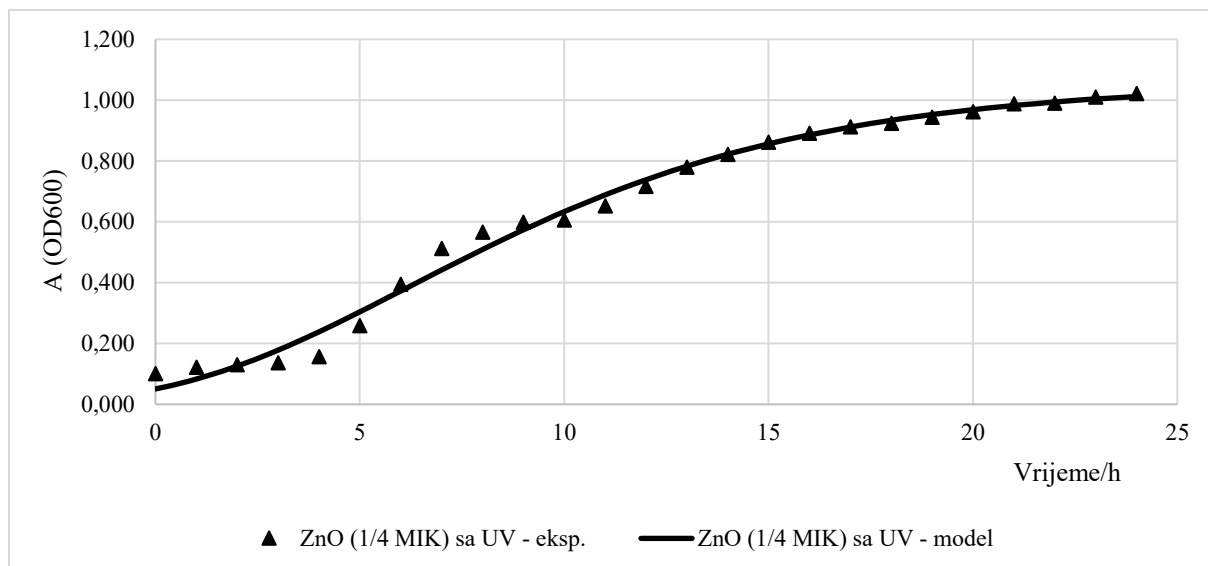




Grafikon 14. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju *E. coli* tretiranu sinergijom česticama cinkova oksida i UV-A.

Iz grafikona 14. vidljivo je da i kod bakterije *E. coli* eksperimentalni rezultati pokazuju visoku razinu slaganja sa Gompertzovim modelom kinetike. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je  $R^2 = 0.99332$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.00048$  što potvrđuje visoku razinu slaganja rezultata.

Grafikon 15. prikazuje slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju *K. pneumoniae* tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja.



Grafikon 15. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju *K. pneumoniae* tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A.

I na grafikonu 15. vidljivo je da eksperimentalni rezultati dobiveni kod tretmana sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja na bakterijsku suspenziju *K. pneumoniae* pokazuju visoku razinu slaganja sa Gompertzovim modelom kinetike kroz 24 sata. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je  $R^2 = 0.989633$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.000483$  što također potvrđuje visoku razinu slaganja rezultata.

## 5. DISKUSIJA

Rezistentni bolnički patogeni predstavljaju izazov u održavanju higijenskih i aseptičnih uvjeta u bolničkom okolišu. Iako nisu visoko patogeni za svih, u imunokompromitiranih osoba uzrokuju akutna stanja koja mogu dovesti do smrti. Osim na antibiotike, bakterije se vrlo brzo prilagođavaju na okolišne faktore stresa među kojima su razni kemijski dezinficijensi koji se koriste na neadekvatan način. Jedan od načina pristupu ovoj problematici je konstantno istraživanje i karakterizacija takvih rezistentnih patogena i ispitivanje novih pristupa suzbijanju istih. Jedan od pristupa istražen u ovom radu je inhibicija rasta rezistentnih bolničkih patogena korištenjem sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja koje je u ovoj sinergiji zaduženo za fotoaktivaciju cinkovog oksida. Ultraljubičasto zračenje alterira genetski materijal dok čestice cinkovog oksida redom reakcija dovode do otpuštanja  $Zn^{2+}$  iona te stvaranja vodikovog peroksida koji uzrokuje oksidativni stres. Djelovanje ove sinergije ispitano je na tri bakterijska soja: meticilin-rezistentni *S. aureus*, *E.coli* i *K. pneumoniae*. Tablica 1. prikazuje eksperimentalno dobivenu minimalnu inhibitornu koncentraciju disperzija čestica cinkovog oksida koja iznosi  $\gamma=0.0974$  mg/mL za bakterije MRSA i *E.coli*, odnosno  $\gamma=0.1948$  mg/mL za bakteriju *K. pneumoniae*. Veća koncentracija čestica cinkovog oksida potrebna za inhibiciju rasta *K. pneumoniae* daje naslutiti kako je upravo ta bakterija najotpornija na ovu sinergiju što potvrđuje i usporedba inhibicija rasta ove tri bakterije. Niske koncentracije čestica korištene su u istraživanju koje su proveli Saphee i suradnici gdje su sa 0.25 %-tnim mikročesticama cinkovog oksida uz 24-satno osvjetljavanje UV i vidljivim svjetlom inhibirali rast *E. coli*, *K. pneumoniae* i *S. pyogenes*. Njihovi rezultati su također pokazali najveću rezistenciju bakterije *K. pneumoniae* (48). Grafikon 1. prikazuje inhibiciju rasta bakterije meticilin-rezistentni *S. aureus* koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.02437$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Vidljivo je da sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja najviše inhibira rast bakterija u bakterijskoj suspenziji u odnosu na tretman neosvijetljenim česticama cinkovog oksida u istoj koncentraciji. Ta dva tretmana statistički se značajno razlikuju nakon 11 sati očitavanja apsorbancije što je vidljivo na grafikonu 2. koji prikazuje statističku značajnost razlike u apsorbancijama ta dva tretmana nakon 11 sati. Statistički značajna razlika potvrđuje fotokatalitički učinak cinkovog oksida, odnosno, mehanizam opisan u literaturi (9). Grafikon 3. prikazuje statističku značajnost razlike između apsorbancija kontrolnih uzoraka osvjetljenih UV-A svjetlom i neosvijetljenih kontrolnih uzoraka nakon 24 sata. Ovakvom obradom rezultata želi se pokazati da i UV-A pokazuje blagi antimikrobni učinak nakon samo 30 minuta osvjetljavanja. Valja napomenuti da

je bakterijska suspenzija napravljena u Müller-Hinton bujon te bakterije imaju optimalne uvjete za rast budući da se apsorbancija očitava pri 37 °C. Iako i UV-A tretman inhibira rast, na grafikonu 4. vidljivo je da statistički značajno najveću inhibitornu moć kod bakterijske suspenzije meticilin-rezistentnog *S. aureus* pokazuje sinergija čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Da UV-A zračenje pospješuje anitbakterijsku aktivnost cinkovog oksida potvrdili su svojim rezultatima Sirelkhatim i suradnici (7). Rezultati pokazuju istu tvrdnju kod bakterije *E. coli*. Grafikon 5. prikazuje inhibiciju rasta bakterije *E. coli* koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.02437$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije. Prikazana su tri tretmana: Sinergija ZnO čestica i UV-A, samo ZnO čestice i samo UV-A zračenje. Na grafikonu je vidljivo da se rast bakterija tretiranih sinergijom ZnO čestica i UV-A zračenja najviše inhibira i kroz 24 sata poprima najmanju vrijednost apsorbancije. Sinergija ZnO čestica i UV-A zračenja već nakon 4 sata značajno inhibira rast *E. coli* što je vidljivo na grafikonu 6. koji prikazuje statistički značajnu razliku između tretmana sa osvjetljenim i neosvijetljenim česticama cinkovog oksida nakon 4 sata tretmana. Grafikon 7. zatim prikazuje da i na *E.coli* značajno djeluje UV-A zračenje u odnosu na kontrolu bez tretmana, no na grafikonu 8. vidljivo je da kao i kod meticilin-rezistentnog *S. aureus* sinergija ZnO čestica i UV-A najviše inhibira rast bakterija. Nadalje, grafikon 9. prikazuje inhibiciju rasta bakterije *K. pneumoniae* koristeći sinergiju čestica cinkova oksida u disperziji masene koncentracije  $\gamma=0.0487$  mg/mL što odgovara  $\frac{1}{4}$  minimalne inhibitorne koncentracije za spomenutu bakteriju. Krivulja koja prikazuje apsorbanciju bakterijske suspenzije tretirane sinergijom ZnO čestica i UV-A zračenja već nakon 4 sata pokazuje značajnu inhibiciju u odnosu na tretman samim ZnO česticama, a u odnosu na tretman UV-A zračenjem apsorbancije su značajno manje nakon 7 sati što kao i kod drugih bakterija pokazuje inhibitornu aktivnost samog UV-a zračenja. I kod *K. pneumoniae* sinergija ZnO čestica prikazuje značajno najjaču inhibitornu aktivnost što se može vidjeti na grafikonu 12. Ukoliko usporedimo ove tri bakterijske suspenzije tretirane sinergijom česticama cinkova oksida i UV-A zračenja nakon 24 sata najveću apsorbanciju postiže *E. coli* (0.873), nešto nižu apsorbanciju dostiže *K. pneumoniae* (0.810) dok najnižu apsorbanciju dostiže MRSA (0.727). Moguće je da se razlog ovakvim rezultatima krije u aktivnosti katalaza ovih bakterija. Peran i suradnici su u radu izolirali katalaze između ostalih i iz ove tri vrste bakterija te u rezultatima dokazali da se katalaza je katalaza iz *E. coli* najstabilnija u uvjetima koji su dosta slični uvjetima u kojima je mjerena apsorbancija (24 h/30 min), aktivnost katalaza *K. pneumoniae* najveća je na nešto nižoj temperaturi dok rezultata konkretno za meticilin rezistentan *S. aureus* nema (49). Kinetika rasta bakterija i inhibicija mogu se matematički modelirati pomoću Gompertzovog modela kinetike.

Grafikon 13. prikazuje slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju meticilin-rezistentnog *S. aureus* tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A zračenja. Slaganje rezultata statistički je analizirano Pearsonovim koeficijentom korelacije te on iznosi  $R^2=0.98133$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.000997$ . Kod bakterije *E. coli* statističkom analizom dobivene su vrijednosti  $R^2 = 0.99332$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.00048$ , poklapanje je grafički prikazano na grafikonu 14. U slučaju bakterijske suspenzije *K. pneumoniae* Pearsonov koeficijent korelacije iznosi  $R^2 = 0.989633$  dok je  $\chi^2$  testom dobivena vrijednost  $\chi^2 = 0.000483$ . Ovakve vrijednosti statističkih pokazatelja upućuju na visoko slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike. Inhibicija rasta bakterija u ovim bakterijskim suspenzijama ima, dakle, matematičku podlogu, što predstavlja temelj za daljnja istraživanja ovog pristupa inhibiciji rasta rezistentnih patogena. Ovo istraživanje pokazuje potencijal sinergije ZnO čestica i UV-A zračenja u inhibiciji rasta rezistentnih bolničkih patogena. Istraživanje valja proširiti na ostale rezistentne sojeve kako bi se optimizirali uvjeti tretmana sinergijom ZnO čestica i UV-A.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Minimalna inhibitorna koncentracija disperzije fotoaktiviranih čestica cinkovog oksida iznosi  $\gamma=0.0974$  mg/mL za meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* ATCC 4330 i *Escherichia coli* ESBL ATCC 13353 dok je za MIK za bakteriju *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 361/2020 iznosio  $\gamma=0.1948$ .
2. Tretman sinergijom čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja značajno inhibira rast meticilin-rezistentnog *S. aureus* ATCC 4330 u usporedbi sa tretmanom UV-A zračenjem i tretmanom neosvijetljenim česticama cinkovog oksida nakon 11 sati.
3. Rast bakterije *E. coli* ESBL ATCC 13353 značajno je inhibiran nakon 4 sata tretmana sinergijom čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja.
4. Osvijetljene čestice cinkovog oksida značajno inhibiraju rast bakterije *K. pneumoniae* OXA-48 361/2020 nakon 4 sata u odnosu na neosvijetljene čestice.
5. U usporedbi ove tri bakterije *K. pneumoniae* OXA-48 361/2020 najotpornija je na sinergiju ZnO čestica i UV-A zračenja te nakon 24 sata dostiže najveće vrijednosti apsorbancije
6. Kinetika rasta bakterija u bakterijskoj suspenziji tretiranoj sinergijom ZnO čestica i UV-A zračenjem može se dobro opisati Gompertzovim modelom kinetike

## 7. LITERATURNI NAVODI

1. **Dani, Nizam.** *Priručnik o prevenciji i kontroli infekcija*. 4. Zagreb : Medicinska naklada, 2019. str. 95.
2. **RH, MINISTARSTVO ZDRAVSTVA.** Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti. *Pravilnik o uvjetima i načinu obavljanja mjera za sprječavanje i suzbijanje bolničkih infekcija*. Zagreb : Narodne Novine. 60/92, 26,93 i 29/94.
3. **Bodenshatz, W.** *Handbuch fur den Desinfektor*. Stuttgart : G Fischer Verlag, 1989.
4. **Asaj, Antun.** *Dezinfekcija*. Zagreb : Medicinska naklada, 2000.
5. **Vodopija, J., Baklaić, Ž. i Ljubičić, M.** *Mala knjiga o velikom nasljeđu hrvatske preventivne medicine*. Zagreb : Imunološki zavod, 1993.
6. **Tada-Oikawa, Saeko, i dr.** Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles suppresses vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. *Toxicology Reports*. 2015, 2.
7. **Sirekhalim , Amna, i dr.** Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity. *Nano-Micro Letters*. 2015.
8. **Dimaphilis, Emelita Asuncion, Hsu, Ching Shan i Mendoza, Rose Marie.** Zinc oxide nanoparticle for water disinfection. *Sustainable Environment Research*. 28, 2018.
9. **Padmavathy, N. i Vijayaraghavan, R.** Napredna bioaktivnost ZnO nanočestica: antimikrobna studija. *Science and technology advanced materials*. 9, 2008.
10. *Ultraviolet Radiation Guide*. **Navy Environmental Health Center**. Norfolk, Virginia : Navy Environmental Health Center, 1992.
11. **Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. i Medema, G. J.** Inactivation credit od UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water. *Water res*. 3, 2006., 3.
12. **Bolton, J. R. i Cotton, C. A.** *The Ultraviolet Disinfection Handbook*. Denever, CO, USA : American Water Works Association, 2008.
13. **Xiaoling, Li, i dr.** Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. *Science of the Total Environment*. 659, 2019., 659.

14. **Chen, R. Z., Craik, S. A. i Bolton, J. R.** Comparison of the action spectra of microorganisms: information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water. *Water Res.* 43, 2009.
15. **Bulat, Marin, Geber, Juraj i Lacković, Zdravko.** *Medicinska farmakologija.* Zagreb : Medicinska naklada, 1999. str. 409-411.
16. **Peterson, Elizabeth i Kaur, Parjit.** Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology.* 2018, 9.
17. **Cloete, T. E.** Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 2003., 51.
18. **Brown, M. R. W. i Gilbert, W.** Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology.* 1993., 74.
19. **Rettberg, P. i Rothschild, L.** Ultraviolet Radiation in Planetary Atmospheres and Biological Implications. [aut. knjige] Greda Horneck i Christa Baumstark-Khan. *Astrobiology: The Quest for the Conditions of Life.* Heidelberg : Springer, 2002.
20. **Culotta, V. C. i Daly, M. J.** Manganese complex: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013., 19.
21. **Bolton, J. R. i Linden, K. G.** Standardization of method for fluence (UV dose) determination in bench - scale UV experiments. *Journal Environment.* 129, 2003.
22. **Chevremont, A. C., i dr.** Effect of the coupled UVA and UVC LED on the both microbiological and chemical pollution of urban water. *Science of the Total Environment.* 426, 2012.
23. **Choudhury, R. i Srivasta, S.** Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current science.* 2001., 81.
24. **Rouch, D. A., Lee, B.T. O. i Morby, A. P. J.** Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance . *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 1995, 14.



25. **Olafson, R. W., McCubbin, W. D. i Kay, C. M.** Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium . *The Biochemical Journal*. 1988, 251,.
26. **Morby, A. P., i dr.** Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Molecular Microbiology*. 1993, 21.
27. **Robinson, N. J., Bird, A. J. i Turner , J. S.** Metallothionein Gene Regulation in Cyanobacteria. [aut. knjige] S. Silver i W. Walden. *Metal Ions in Gene Regulations*. NY : Chapman and Hall, 1998.
28. **Kagi, J. H. R. i Schaffer, A.** Biochemistry of metallothionein. [aut. knjige] H. Neurath. *Perspectives in Biochemistry*. Michigan : American Chemical Society, 1989.
29. **Nies, D. H.** Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*. 1992., 174.
30. **Nies, D. H., i dr.** Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Journal of Bacteriology*. 1989, 86.
31. **Budimir, Ana, i dr.** Otpornost izolata vrste *Staphylococcus aureus* na antibiotike u Hrvatskoj u godini 2004. Zagreb : Medicina, 2007. 43.
32. **Budimir, Ana, Bošnjak, Zrinka i Kalenić, Smilja.** Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) u Hrvatskoj. Zagreb : Infektološki glasnik, 2012. 32.
33. **Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj.** Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Hrvatskoj 2001.-2010. Zagreb : Hrvatska Akademija za medicinske znanosti , 2011.
34. **Pfaller, M. A., Caliendo, A. M. i Versalović, J.** Molecular Methods for Epidemiological Typing of Microorganisms. [aut. knjige] H. D. Isenberg. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington D.C. : ASM Press, 2005.
35. **Deurenberg, R. H., i dr.** The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . *Clinical Microbiology and Infection*. 2007., 13.
36. **Budimir, A., i dr.** A variant of the Southern German clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predominant in Croatia. *Clinical Microbiology and Infectology*. 2010., 16.

37. **Hukić, M.** *Bakteriologija*. Sarajevo : Jež, 2005.
38. **Imišović, Emir, i dr.** Djelovanje Kantarionovog Ulja na Bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2, 2013.
39. **Marković, B. S.** *Mikrobiologija II, bakterije, kvasci i plijesni*. Beograd : Univezitet u Beogradu, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1983.
40. **Mubita, Charles, i dr.** Antibigrams of faecal *Escherichia coli* and *Enterococci* species isolated from pastoral cattle in the interface areas of the Kafue basin in Zambia. *Veterinarski arhiv*. 2008., 78.
41. **Rayan, K. J., i dr.** *Sherris Medical Microbiology*. NY : McGraw-Hill Education , 2004. ISBN 0-8385-8529-9.
42. **Corrin, Bryan i Nicholson, Andrew G.** Infectious disease. *Pathology of the lungs*. London : Churchill Livingstone, 2011.
43. **National center for Emerging and Infectious disease.** *Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)*. Atlanta : CDC, 2011.
44. **Carmeli, Y., Akova, M. i Cornaglia, G.** Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical microbiology and infectiology*. 2010., 16.
45. **Chen, K., Mediavalla, J. R. i Endimiani, A.** Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *K. pneumoniae* carbapenemase gene (*bla* KPC) variants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011., 49.
46. **Radičić, Rafaela.** Fotokatalitična svojstva cinkovog oksida pripremljenog termičkom razgradnjom celuloznog predloška. *Diplomski rad*. Rijeka : Sveučilište u Rijeci, Odjel za Fiziku, 2020.
47. **Sarker, SD, Nahar, L. i Kumarasamy, Y.** Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007., 42.
48. **Sophee, S. S., i dr.** Antibacterial Activity of TiO<sub>2</sub> and ZnO Microparticles. *Journal of Green science and tehnology*. 2012., 1.

49. **Peran, J., Pušić, T. i Soljančić, I.** Značenje katalaza u procesima oplemenjivanja tekstila. *Tekstil*. 2016., 65.

51. **Mežnarić, S., Gobin, I i Ambrožić, G.** Fotokatalitička antibakterijska aktivnost cinkovog oksida na polimernom nosaču. *Završni rad*. Rijeka : Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, 2019.

52. **Sirelkhatim, A., i dr.** Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity. *Nano-micro letters*. 2015.

## 8. DODACI

### 8.1 Tablica Slika i grafikona

Slika 1. Prikaz narušavanja DNK lanca stvaranjem dimera ciklobutan timin pirimidina.....	10
Slika 2. Osvjetljavanje mikrotitarske pločice.....	20
Slika 3. Shematski prikaz mikrotitarske pločice u kojoj je mjeren OD600 kroz 24 sata.....	21
Grafikon 1. Inhibicija rasta bakterije meticilin rezistentnog <i>S. aureus</i> tijekom 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 ponavljanja uz odgovarajuću standardnu devijaciju .....	23
Grafikon 2. Statistička značajnost razlike inhibitorne aktivnosti disperzije čestica cinkovog oksida uz UV-A zračenje i bez UV-A zračenja nakon 12 sati. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	24
Grafikon 3. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod bakterije meticilin-rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i> nakon 24 sata. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %. .....	25
Grafikon 4. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast bakterije meticilin-rezistentan <i>S. aureus</i> nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	26
Grafikon 5. Inhibicija rasta bakterije <i>E. coli</i> kroz 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti apsorbancija uz standardnu pogrešku.....	27
Grafikon 6. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije fotoaktivirani čestica cinkovog oksida i nefotoaktiviranih čestica na rast <i>E. coli</i> nakon 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	28
Grafikon 7. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod <i>E.coli</i> nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	29
Grafikon 8. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast <i>E. coli</i>	

nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	30
Grafikon 9. Inhibicija rasta bakterije <i>K. pneumoniae</i> kroz 24 sata koristeći sinergiju čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti apsorbancija uz standardnu pogrešku.....	31
Grafikon 10. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije fotoaktivirani čestica cinkovog oksida i nefotoaktiviranih čestica na rast <i>K. pneumoniae</i> nakon 4 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	32
Grafikon 11. Statistička značajnost apsorbancija između kontrola sa UV-A i bez UV-A kod <i>K. pneumoniae</i> nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	33
Grafikon 12. Statistička razliku između inhibitornog učinka sinergije čestica cinkovog oksida i UV-A zračenja, samog UV-A zračenja te neaktiviranih čestica cinkovog oksida na rast <i>K. pneumoniae</i> nakon 24 sata. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost ispitana je studentovim t-testom na razini značajnosti 95 %.....	34
Grafikon 13. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju Meicilin-rezistentnog <i>S. aureus</i> tretiranu sinergijom česticama cinkova oksida i UV-A.....	36
Grafikon 14. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju <i>E. coli</i> tretiranu sinergijom česticama cinkova oksida i UV-A.....	37
Grafikon 15. Slaganje eksperimentalnih rezultata sa rezultatima dobivenim Gompertzovim modelom kinetike za bakterijsku suspenziju <i>K. pneumoniae</i> tretiranu sinergijom čestica cinkova oksida i UV-A.....	38

## 8.2. Popis tablica

Tablica 1. Minimalna inhibitorna koncentracija čestica cinkovog oksida za MRSU, <i>E. coli</i> i <i>K. pneumoniae</i> .....	22
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 9. ŽIVOTOPIS

### Silvestar Mežnarić

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum rođenja:** 05/06/1995

**Spol:** Muško

(+385) 992498998

**E-adresa:** [silvestar.meznarić@student.uniri.hr](mailto:silvestar.meznarić@student.uniri.hr)

**E-adresa:** [meznarić.silve@gmail.com](mailto:meznarić.silve@gmail.com)

**Whatsapp Messenger :** +385992498998

**Viber :** +385992498998

**Facebook :** <https://www.facebook.com/silvestarjosip.meznarić>

**Instagram :** <https://www.instagram.com/silvestar.meznarić/>

**Adresa:** Krajevac 31, 51215 Kastav (Hrvatska)

### O MENI

Vedra i komunikativna osoba. Vrlo snalažljiv u složenim zadacima. Željnan novih znanja i iskustava. Vrlo kompetitivan ali naučen raditi u timu. Brzo učim i znanje prenosim u posao.

### RADNO ISKUSTVO

#### Unapređivač prodaje

*Podravka d.d.* [ 01/07/2009 – 01/09/2013 ]

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

Slaganje redovnih i izvrednih izloga. Kontrola stanja u skladištima trgovina.

#### Tehničar u organizaciji događanja

*dBoki, obrt za najam ozvučenja i opreme* [ 01/06/2014 – 01/06/2015 ]

**Mjesto:** Cernik

**Zemlja:** Hrvatska

Tehničar za rasvjetu i razglas. Postavljanje pozornice i organizacija događanja.

#### Savjetnik u osiguranju

*Adriatic osiguranje d.d.* [ 15/06/2016 – 30/09/2016 ]

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

Pomoćnik u poslovima osiguranja od autoodgovornosti, registracije vozila i kasko osiguranja vozila

#### Promotor

*Jadran galenski laboratorij d.d.* [ 01/03/2018 – 01/09/2019 ]

**Mjesto:** Svilno

**Zemlja:** Hrvatska

Promotor farmaceutskih pripravaka.

### **Tehničar u sanitarnoj zaštiti**

*Dezinsekcija Rijeka d.o.o.* [ 01/07/2020 – 30/09/2020 ]

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

Poslovi sanitarne i ekološke zaštite.

### **Zdravstveni radnik u organiziranoj karanteni**

*Grad Rijeka - Odjel za zdravstvo i socijalnu skrb* [ 01/10/2020 – Trenutačno ]

**Mjesto:** Rijeka

Organizacija karantene, logistički poslovi, zdravstvena skrb izolirana.

### **Laboratorijski tehnolog**

*Klinički-bolnički centar Rijeka* [ 01/02/2021 – 30/06/2021 ]

**Mjesto:** Rijeka

Priprema uzorak i provedba molekularne dijagnostike na RT qPCR-u.

## **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE**

### **Administrator**

*Salezijanska Klasična gimnazija s pravom javnosti* [ 06/09/2010 – 15/06/2014 ]

**Adresa:** Vukovarska ul. 62, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<http://gimnazija-klasicna-salezijanska-ri.skole.hr/>

### **Sveučilišni prvostupnik sanitarnog inženjerstva**

*Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet*

**Adresa:** Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<https://www.medri.uniri.hr/hr/>

## **JEZIČNE VJEŠTINE**

Materinski jezik/jezici:

**Hrvatski**

Drugi jezici:

Engleski

## **DIGITALNE VJEŠTINE**

Internet / Društvene mreže / Windows / Rad na računaru / Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) / Informacije i komunikacija (pretraživanje interneta) / Izvrsno sluzenje MS Office paketom (Word Excel PowerPoint) / Osnove rada u programu Berkeley Madonna / obrada podataka u programu

STATISTICA / Izrada web stranice (wordpress)

## **DRUŠTVENE I POLITIČKE AKTIVNOSTI**

### **Civilna zaštita Primorsko-goranske županije**

[ Rijeka, 05/09/2020 – Trenutačno ]

Aktivni član postrojbe za traganje i spašavanje iz ruševina Civilne zaštite PGŽ.

## **KONFERENCIJE I SEMINARI**

### **Nacionalna konferencija o kakvoći pčelinjih proizvoda**

[ Novi vinodolski, 2018 ]

Član organizacijskog odbora.

### **Nacionalna konferencija o kakvoći pčelinjih proizvoda**

[ Novi Vinodolski, 2019 ]

Član Organizacijskog odbora.

### **NeuRi - Studentski kongres neuroznanosti**

[ Rijeka, 2017 ]

Član organizacijskog odbora.

### **NeuRi - Studentski kongres neuroznanosti**

[ Rijeka, 2018 ]

Član organizacijskog odbora.

### **NeuRi - Studentski kongres neuroznanosti**

[ Rijeka, 2019 ]

Član organizacijskog odbora.

Aktivni sudionik: "*Elizabethkingia meningoseptica* as an emerging cause of pediatric meningitis"

Nagrada za najbolje izlaganje.

### **NeuRi - Studentski kongres neuroznanosti**

[ Rijeka, 2020 ]

Član organizacijskog odbora.

### **Sanitas - Studentski kongres zaštite zdravlja**

[ Rijeka, 2018 ]

Član organizacijskog odbora.

### **Sanitas - Studentski kongres zaštite zdravlja**

[ Rijeka, 2019 ]

Član organizacijskog odbora.

### **Sanitas - Studentski kongres zaštite zdravlja**

[ Rijeka, 2020 ]

Predsjednik organizacijskog odbora.

### **Kongres prehrane i kliničke dijetoterapije**



[ Rijeka, 2019 ]

Aktivni sudionik - usmena prezentacija pod nazivom "**UV zračenje kao metoda konzerviranja minimalno procesuirane**

**rukole (Eruca sativa)"**

**Škola znanstvenog istraživanja**

[ Rijeka, 2018 ]

Seminar o uspješnom znanstvenom istraživanju te pisanju znanstveno-istraživačkog rada

**Sanitas - studentski kongres zaštite zdravlja**

[ Rijeka, 2021 – 2021 ]

Predsjednik organizacijskog odbora.

**Mednarodni dnevni sanitarnega inženirstva**

[ Ljubljana, 2020 – 2020 ]

Aktivni sudionik: "Antibacterial bioactivity of UVA photoactivated zinc oxide thin films on cellulose substrate"

## **PROJEKTI**

**U društvu mikroba**

[ 2019 – 2020 ]

Sudjelovanje na projektu Hrvatskog društva mikrobiologa.

**Priprema poroznih tankoslojnih materijala za pročišćavanje vode koristeći tehniku Depozicije atomskih slojeva (ALD)**

Projekt pod pokroviteljstvom Hrvatske zaklade za znanost (IP-2016-06-3568).

## **ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE**

**Sanitas - studentski kongres zaštite zdravlja**

Predsjednik organizacijskog odbora

**Nacionalna konferencija o kakvoći pčelinjih proizvoda**

Dvije godine član organizacijskog odbora

**NeuRi**

Četiri godine član organizacijskog odbora - koordinator tehničke podrške.

## **HOBIJI I INTERESI**

**band "Koktelsi"**

Aktivno sviranje klavijatura u bandu "Koktelsi".

**Sviranje više instrumenata**

Završena Osnovna glazbena škola "Ivan Matetić Ronjgov" u rijeci - smjer Klavir

Završeni pripremni razredi Srednje glazbene škole "Ivan Matetić Ronjgov" u Rijeci - smjer Solo pjevanje

Završena Nadbiskupijska škola za crkvenu glazbu 2.stupanja - smjer Voditelj liturgijske glazbe, Orguljaš

## **KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE**

### **Komunikativan, društven i snalažljiv u timu**

Teorijsku podlogu komunikacijskih vještina sam dobio kroz kolegij "Komunikacijske vještine" na studiju Sanitarnog inženjerstva. Međuljudske vještine sam kasnije nadograđivao sudjelovanjem u mnogobrojnim zborovima i kolektivima.

### **VOLONTIRANJE**

#### **Klinički bolnički centar Rijeka**

[ Rijeka, 23/10/2020 – 31/01/2021 ]

Volontiranje na COVID radilištu (Objedinjeni hitni bolnički prijem).

#### **Civilna zaštita Primorsko-goranske županije**

[ Rijeka, 17/03/2020 – 05/05/2020 ]

Volontiranje na poslovima zaustavljanja širenja 2019-nCoV. Stacioniran u županijskoj karanteni i logistička pomoć pri mobilizaciji novih objekata za karantenu.

### **STUDENTSKA AKTIVNOST**

#### **Demonstrator**

[ 2016 – Trenutačno ]

Student demonstrator na Katedri za Medicinsku fiziku i biofiziku - kolegiji :Medicinska fizika, Biofizika, Biostatistika, Medicinska statistika i informatika, Medical physics

#### **Član fakultetskog vijeća**

[ 2018 – Trenutačno ]

Aktivni član Fakultetskog vijeća te član Studentskog zbora Medicinskog fakulteta u Rijeci kao predstavnik studenata Sanitarnog inženjerstva.

### **TEHNIČKE SPOSOBNOSTI**

#### **Rad u laboratoriju**

Rad u kemijskom laboratoriju. Vještine dobivene kroz kolegije: "Opća i anorganska kemija"; "Analitička kemija" (Gravimetrijske i volumetrijske metode); "Organska kemija"; "Biokemija"; "Fizikalna kemija"; "Higijena zraka"; "Higijena voda"; "Instrumentalne metode" (Spektrofotometrija, HPLC, GC, MS)

Rad u mikrobiološkom laboratoriju. Vještine dobivene kroz kolegije: "Opća mikrobiologija s parazitologijom"; "Mikrobiologija hrane"; "Mikrobiologija vode"

Rad u molekularnom laboratoriju (Izolacija nukleinskih kiselina, PCR, RT-PCR, qPCR). Vještine dobivene kroz

kolegij "Molekularna medicina" te kroz rad na Centru za proteomiku Medicinskog fakulteta i u laboratoriju za brzu molekularnu dijagnostiku KBC-a RI

Rad u Biosafety level 2 laboratoriju.

Rad u fizikalnom laboratoriju. Vještine dobivene kroz kolegij "Biofizika" i demonstrature na Zavodu za medicinsku fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

### **POČASTI I NAGRADE**

**Dekanova nagrada**

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet [ 07/04/2021 ]

Za izniman volonterski rad u Kliničkom bolničkom centru Rijeka za vrijeme COVID-19 pandemije u 2020. i 2021. godini