FOTOKATALITIČKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA NA BAKTERIJE KOJE SE PRENOSE HRANOM

Lovrović, Maša

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:468000

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Maša Lovrović

FOTOKATALITIČKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA NA BAKTERIJE KOJE SE PRENOSE HRANOM

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Maša Lovrović

FOTOKATALITIČKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA NA BAKTERIJE KOJE SE PRENOSE HRANOM

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

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

Diplomski rad obranjen je dana 25.09.2019. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Željko Linšak, dipl.sanit.ing.

2. doc.dr.sc. Dijana Tomić Linšak, dipl.sanit.ing.

3. izv.prof.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.sanit.ing.

Rad ima 44 stranica, 28 slika, 10 tablica, 29 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvale mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na savjetima, razumijevanju, razgovorima i povjerenju. Hvala obitelji i prijateljima koji su ovaj put prošli sa mnom. Hvala timu divnih ljudi, sadašnjih i prošlih, što sam s vama imala priliku stvarati Sanitas.

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).

SAŽETAK

Hranom prenosive bolesti jedne su od najučestalijih bolesti u svijetu. Uzrokuju ih razni mikroorganizmi koji se prenose hranom i vodom za piće. U ovom istraživanju promatran je antibakterijski učinak fotoaktiviranog cinkovog oksida na šest patogena koji se prenose hranom od kojih su 3 predstavnici gram-pozitivnih, a 3 predstavnici gram – negativnih bakterija. Spektrofotometrijski utvrđene koncentracije bakterijskih suspenzija od 10^6 CFU/mL izlagane su UV svjetlosti valne duljine 366 nm 3 i 5 minuta u prisustvu cinkovog oksida nanesenog na polimerni nosač, a učinkovitost cinkovog oksida uspoređena je s učinkovitosti samog nosača i UV svjetlosti. Bakterijska suspenzija nasađena je na Mueller Hinton agar tehnikom nakapavanja 2 sata i 24 sata kasnije. Eksperiment je ponovljen kako bi se utvrdio učinak na bakterijsku adheziju na polimerne nosače. Nosači su sonificirani u ultrazvučnoj kupelji i dobivena suspenzija je nasađena na agar. Nakon inkubacije od 24 sata, brojene su kolonije. Rezultati pokazuju da fotoaktivirani cinkov oksid ima statistički značajno bolje djelovanje na gram – negativne bakterije. Najotpornija bakterija je *Staphylococcus aureus*, a najosjetljivija je *Escherichia coli*. Usporedba učinka polimernih nosača s cinkovim oksidom sa i bez fotoaktivacije UV svjetlom potvrđuje da je učinak statistički značajan nakon 3 i 5 minuta u preživljavanju i broju adheriranih bakterija. Nakon 24 sata fotokatalitički učinak nije statistički značajan što se može pripisati odgođenim učincima UV – a i oksidacijskog stresa.

Ključne riječi: patogeni, hrana, cinkov oksid, fotokataliza

SUMMARY

Foodborne diseases are one of the most common illnesses in the world. They are caused by various microorganisms distributed by food or potable water. In this research, antibacterial effect of photoactivated zinc oxide was observed on six foodborne pathogens, three Gram negative, and three Gram positive. Spectrophotometrically determined bacterial suspension of 10^6 CFU/mL was exposed to UV light at wavelength 366 nm for 3 and 5 minutes with zinc oxide applied to polymer carrier, and the effectiveness of zinc oxide was compared to the carrier and UV light on their own. Bacterial suspension was plated on Mueller Hinton agar using drop plate technique 2 and 24 hours after exposure. The experiment was repeated to determine the effect on bacterial adhesion to the polymer. Polymer carriers were sonicated in an ultrasound bath and the acquired suspension was plated. After 24 hours of incubation, colonies were counted for results. Results show that photoactivated zinc oxide has a statistically significant effect on Gram negative bacteria. The most resistant bacterium was *Staphylococcus aureus*, and the most susceptible bacterium was *Escherichia coli*. Comparison of effect between polymer carriers with zinc oxide with and without UV light photoactivation confirms that the effects of photoactivation are statistically significant after both 3 and 5 minutes in bacterial survival and adherence to carriers. After 24 hours there was no significant effect which could be due to postponed effects of UV radiation and oxidative stress.

Key words: pathogens, food, zinc oxide, photocatalysis

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1. Patogeni koji se prenose hranom 1

1.1.1. *Staphylococcus aureus* 1

1.1.2. *Enterococcus faecalis* 3

1.1.3. *Listeria monocytogenes* 4

1.1.4. *Yersinia enterocolitica* 7

1.1.5. *Salmonella* Typhimurium 9

1.1.6. *Escherichia coli* 10

1.2. Fotokataliza 12

1.3. Cinkov oksid kao fotokatalitički antibakterijski agens 13

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 15

3. MATERIJALI I METODE 16

3.1. Pribor i uređaji 16

3.2. Bakterijski soj 16

3.3. Medij i hranjiva podloga 17

3.3.1. Ringerova otopina 17

3.3.2. Mueller Hinton agar 17

3.5. Bakterijski inokulum 18

3.6. Polimerni diskovi obloženi tankim slojem cinkovog oksida 18

3.7. Ultraljubičasta (UV) svjetlost 19

3.8. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida 19

3.9. Adhezija na polimerne diskove 21

3.10. Obrada podataka 21

4. REZULTATI 22

4.1. Učinak cinkovog oksida 22

4.2. Učinak cinkovog oksida nakon 24 sata 27

4.3. Adhezija bakterija koje se prenose hranom na polimerne diskove 31

4.4. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida 35

5. RASPRAVA 37

6. ZAKLJUČCI 40

7. LITERATURA 41

ŽIVOTOPIS 44

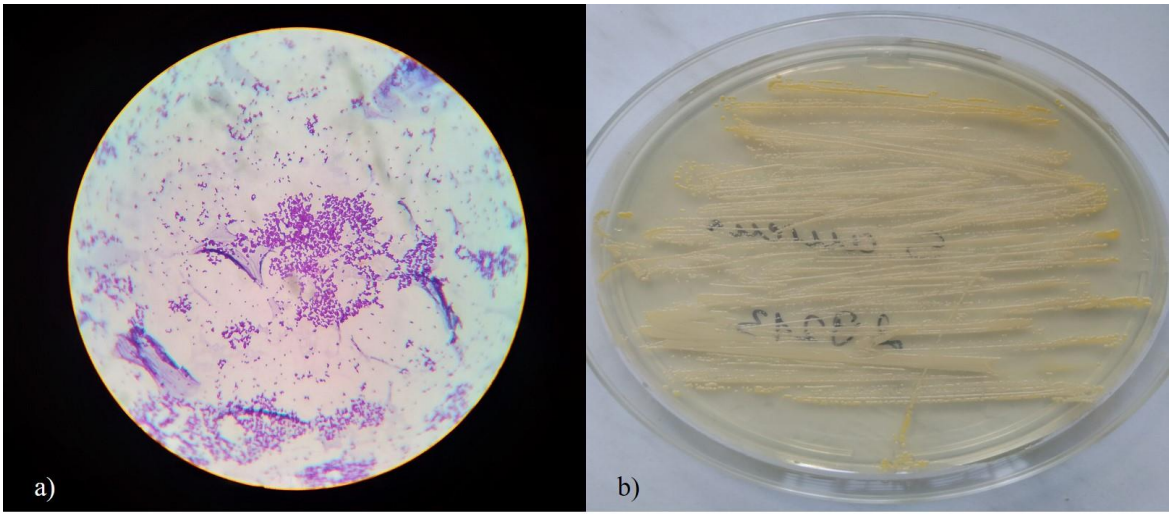
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Hrana je jedan od najvažnijih puteva prijenosa bolesti u svijetu zbog kontaminacije mikroorganizmima. Sve učestalija pojava patogena koji se prenose hranom čine mikrobiološku sigurnost i kvalitetu hrane značajnim javnozdravstvenim problemom. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da 600 milijuna ljudi godišnje oboli zbog patogena koji se prenose hranom, a mortalitet se procjenjuje na 400 tisuća ljudi [1]. Najčešći uzročnici bolesti su virusi i bakterije, kao što su norovirusi, *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. Ovim istraživanjem obuhvaćene su bakterije koje su predstavnici gram – pozitivnih i gram – negativnih patogena koji se prenose hranom.

1.1. Patogeni koji se prenose hranom

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram-pozitivni kok koji formira skupine slične grozdovima promjera 0,5 do 1,5 μm [2]. Nepokretna je bakterija i ne stvara spore. Lako raste na većini hranjivih podloga u aerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima. Kolonije *S. aureus* na hranjivoj podlozi su sitne, okrugle, konveksne, s jasnim rubovima i žute boje (Slika 1.) [3].



Slika 1. *Staphylococcus aureus*: a) bojenje po Gramu, b) kolonije na Mueller Hinton agaru

S. aureus je oportunistički patogen koji može uzrokovati široki spektar infekcija, od kožnih do potencijalno letalnih invazivnih bolesti. Smatra se posebno značajnim zbog kombinacije toksina, invazivnosti i rezistencije na antibiotike te je jedan od najučestalijih uzročnika bolničkih i izvanbolnički stečenih infekcija [4].

S. aureus ne formira spore, ali može kontaminirati hranu prilikom pripreme ili obrade hrane te ima sposobnost stvaranja biofilma. Može rasti u velikom rasponu temperatura (7°C – 48,5°C), niskom pH (4,2) i visokim koncentracijama soli (do 15% NaCl). Zahvaljujući navedenim svojstvima, *S. aureus* može rasti u raznoj hrani te dugo preživjeti na raznim površinama ili koži ruku. Komenzal je ljudske kože i sluznice, a najčešće se nalazi u predvorju nosne šupljine (*vestibulum nasi*) te se tim putem može širiti između pacijenata i zdravog bolničkog osoblja i uzrokovati bolničke infekcije i superinfekcije [5].

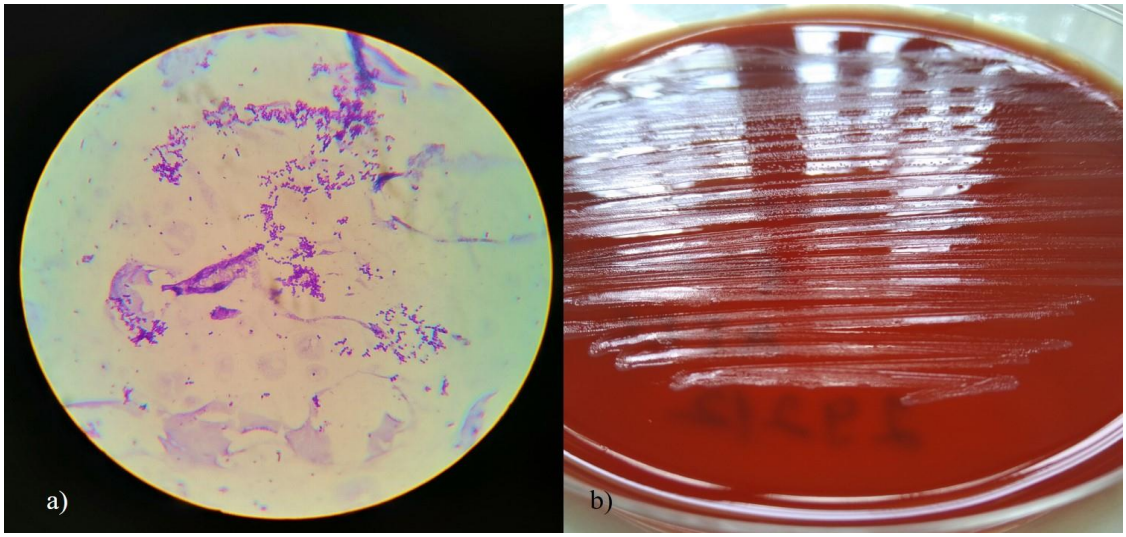
Tipična klinička slika stafilokokne alimentarne intoksikacije javlja se brzo nakon ingestije kontaminirane hrane (3 – 5 h). Simptomi uključuju hipersalivaciju, mučninu, povraćanje i abdominalne grčeve sa ili bez dijareje. Iako je bolest samolimitirajuća i prolazi 24 do 48 sati nakon nastupa prvih simptoma, kod djece i starijih može biti vrlo teška. Definitivni dijagnostički kriterij je pronalazak stafilokoknog enterotoksina u hrani ili minimalno 10^5 *S. aureus* u ostacima sumnjive hrane [6].

S. aureus proizvodi široki spektar toksina, no alimentarnu intoksikaciju uzrokuju stafilokokni enterotoksini koji spadaju u pirogene superantigene. Takvi toksini uzrokuju imunosupresiju i nespecifičnu proliferaciju T – limfocita. Superantigena aktivnost stafilokoknih enterotoksina potiče transcitozu koju omogućava ulazak toksina u krvotok i interakciju sa stanicama imunološkog sustava. Smatra se da je okidač aktivnosti stafilokoknih enterotoksina fokalni upalni odgovor probavnog sustava ili degranulacija mastocita probavnog sustava. Stafilokokni toksini su iznimno termostabilni te otporni na okolišne faktore poput

smrzavanja ili sušenja. Također su otporni na proteolitičke enzime i niski pH što im omogućava potpunu funkcionalnost u gastrointestinalnom traktu nakon ingestije. Pretpostavlja se da je povraćanje uzrokovano utjecajem toksina na *nervus vagus* u probavnom sustavu što stimulira emetički centar u mozgu [4].

1.1.2. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis je gram – pozitivni, na katalazu negativni kok koji se pojavljuje pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima (Slika 2.). Fakultativni je anaerob koji dobro raste u rasponu temperatura između 10°C i 45°C. Dobro podnosi visoke koncentracije soli (do 6,5% NaCl) i visok pH (9,6). Raste u prisutnosti žuči i hidrolizira eskulin [3].



Slika 2. *Enterococcus faecalis*: a) bojenje po Gramu, b) kolonije na krvnom agaru

Enterokoki imaju sposobnost rasta i preživljavanja u ekstremnim uvjetima zbog čega se nalaze u raznim ekološkim nišama. Moguće ih je pronaći u tlu, vodi, hrani, na biljkama, životinjama i ljudima. Dio su prirodne crijevne mikrobiote većine sisavaca i ptica, dok kod ljudi čine oko 1% crijevne mikrobiote s koncentracijama koje variraju od 10^5 do 10^7 CFU/g fecesa [7].

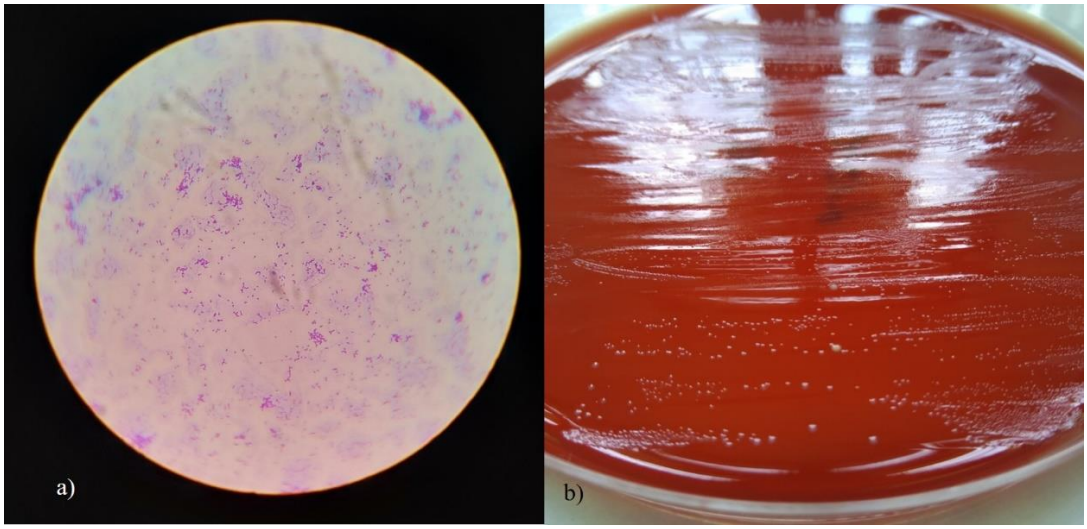
Prisutnost *E. faecalis* u okolišu najčešće je rezultat fekalne kontaminacije. Enterokoki se često koriste kao starter kulture u prehrambenoj industriji, odnosno pri proizvodnji sira. U prerađenim mesnim proizvodima preživljavaju termičku obradu i mogu uzrokovati kvarenje hrane [8].

E. faecalis je mogući, ali nepotvrđeni uzročnik hranom prenosivih bolesti u klasičnom smislu. Prvi je puta povezan s bolesti 1926. godine kada su prijavljene dvije epidemije gastroenteritisa nakon konzumacije sira, a u navedenoj namirnici nije pronađen niti jedan drugi patogen. Također se smatra da može uzrokovati alimentarnu intoksikaciju putem proizvodnje biogenih amina [8].

Enterokoki se povezuju s raznim kliničkim infekcijama. Najčešće uzrokuju infekcije urinarnog trakta, endokarditis i sepsu, infekciju rana i infekcije intraabdominalnog i zdjeličnog mekog tkiva. Bolnička infekcija urinarnog trakta putem instrumenata ili urološke manipulacije najčešća je infekcija uzrokovana *E. faecalis*. Takva se infekcija može zakomplicirati po život opasnom bakterijemijom i endokarditisom [7].

1.1.3. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je kratki, gram – pozitivni, asporogeni bacil. Dobro raste na uobičajenim hranjivim podlogama u aerobnoj ili fakultativno anaerobnoj atmosferi. Na krvnom agaru pokazuje usku zonu β – hemolize (Slika 3.). Dobro raste u temperaturnom rasponu od 1°C do 45°C, pri niskom pH i visokim koncentracijama soli. Nepokretna je na 37°C, ali uzgojena na temperaturi manjoj od 30°C, zahvaljujući peritrihijalnim flagelama pokazuje piruetnu pokretljivost. Katalaza je pozitivna, hidrolizira eksulin, fermentira glukozu, trehalozu i salicin [2].



Slika 3. *Listeria monocytogenes:* a) bojenje po Gramu, b) kolonije na krvnom agaru

L. monocytogenes je ubikvitarna bakterija. Hranom se najčešće prenosi putem sirovog mlijeka, nedostatno pasteriziriranog mlijeka, sireva, sladoleda, sirovog povrća, fermentiranih kobasica te svih vrsta sirovog mesa i ribe. Za razliku od većine ostalih bakterija koje uzrokuju bolesti prenosive hranom, *L. monocytogenes* se umnaža i na temperaturi hladnjaka [9].

Kontaminirana hrana najčešći je izvor infekcija u epidemijama i sporadičnim slučajevima zbog čega se smatra da je gastrointestinalni trakt primarni put ulaska mikroorganizma u domaćina. Klinički tijek infekcije započinje već oko 20 sati nakon ingestije kontaminirane hrane u slučaju gastroenteritisa, dok je period inkubacije za invazivni tip bolesti puno duži, između 20 i 30 dana. Infektivna doza nije utvrđena, ali se smatra da je za razvoj bolesti potrebna doza od 10^6, obzirom da je ta doza detektirana u namirnicama koje su izazvale epidemije ili sporadične slučajeve. Također, taj podatak treba tumačiti s oprezom budući da se u dugom periodu inkubacije u slučaju invazivnog oblika bolesti *L. monocytogenes* mogla umnožiti na sumnjivoj hrani te je bolest mogla izazvati puno niža doza. Patogenost *L. monocytogenes* ovisi i o stanju domaćina, odnosno djeca, starije osobe, trudnice i imunokompromitirani su osjetljiviji o čemu također ovisi i ishod bolesti [10].

Listerioza može biti ograničena na gastrointestinalni trakt i očitovati se tipičnim simptomima gastroenteritisa, no *L. monocytogenes* može prijeći intestinalnu barijeru i uzrokovati sustavne infekcije. Mišji modeli pokazali su da *L. monocytogenes* prodire kroz intestinalnu barijeru putem M – stanica Peyerovih ploča te da nije potrebna intraepitelna replikacija mikroorganizama [11]. Površinski proteini *L. monocytogenes* interagiraju s receptorima epitelnih stanica i potiču fagocitozu putem fagolizosoma, gdje niski pH aktivira stvaranje listeriolizina O. Taj enzim omogućava razaranje fagolizosoma i mikroorganizam se utiskuje u staničnu membranu stvarajući filopodije koje apsorbiraju makrofagi i hepatociti. Na taj se način *L. monocytogenes* kreće iz stanice u stanicu bez izlaganja protutijelima [3]. Ako se infekcija ne kontrolira adekvatnim imunološkim odgovorom u jetri, neograničena proliferacija *L. monocytogenes* može rezultirati otpuštanjem bakterije u cirkulaciju i uzrokovati teške sustavne infekcije. Kod trudnica takvo prodiranje listerije može uzrokovati korioamnionitis što vrlo često dovodi do mrtvorođenosti, spontanih abortusa ili teških neurorazvojnih oštećenja. Infekcija središnjeg živčanog sustava primarno se očituje kao meningitis [11].

Iako se *L. monocytogenes* nalazi ubikvitarno u prirodi i kontaminira raznu hranu, klinički slučajevi infekcije nisu vrlo česti [11]. Tablica 1. prikazuje broj potvrđenih slučajeva u Republici Hrvatskoj i u Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine [12].

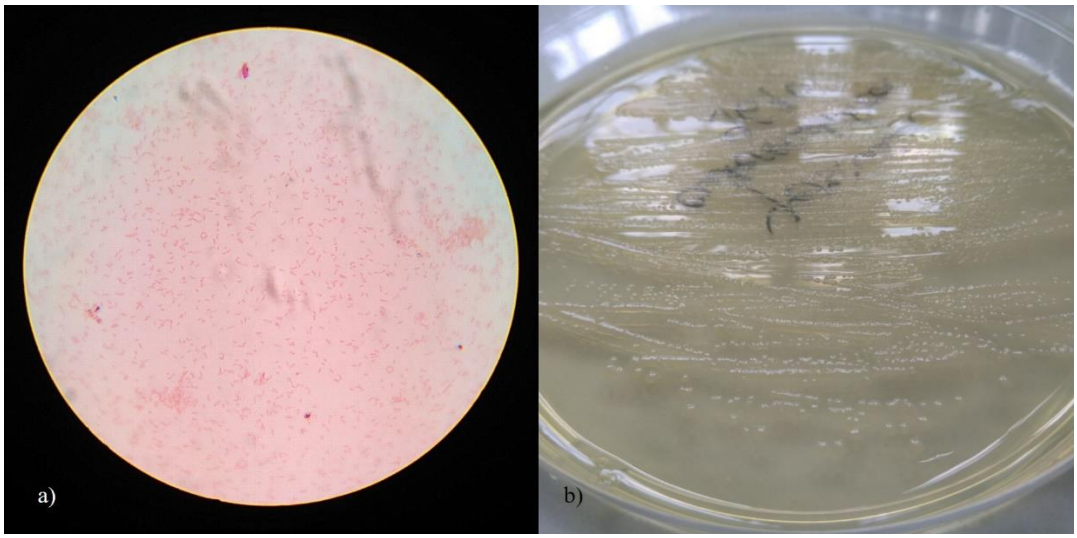
Tablica 1. Broj potvrđenih slučajeva listerioze u Republici Hrvatskoj i Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine

Godina	Republika Hrvatska	Europska Unija
2014.	4	2217
2015.	2	2183
2016.	4	2508
2017.	8	2480

Listerioza se može spriječiti mikrobiološkom kontrolom okruženja u kojem se hrana prerađuje, izborom i pravilnom pripremom namirnica ili antibiotskom profilaksom ukoliko je potrebna. *L. monocytogenes* tvori biofilm i u uvjetima niskih temperatura, ali se kontaminacija može izbjeći pravilnim i detaljnim čišćenjem postrojenja za preradu hrane i primjenom sustava sigurnosti hrane kao što je HACCP [13].

1.1.4. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica je gram-negativni bacil s izraženim bipolarnim bojenjem (Slika 4.). Fakultativni je anaerob, asporogena je, na katalazu i ureazu je pozitivna, a na oksidazu negativna. Pokretna je na 25°C, a nepokretna na 37°C i dobro raste pri 4°C. Na temelju O – antigena, *Y. enterocolitica* se dijeli na oko 50 grupa od kojih su najrasprostranjenije O:3, O:9 i O:8 [2].



Slika 4. *Yersinia enterocolitica:* a) bojenje po Gramu, b) kolonije na Mueller Hinton agaru

Infekcija se predominantno prenosi fekalno – oralnim putem. Konzumacija premalo termički obrađene ili sirove svinjetine najčešći je put infekcije, no u Norveškoj i Novom Zelandu potvrđene su epidemije putem kontaminirane vode za piće [14].

Y. enterocolitica preživljava kiselost želuca proizvodnjom ureaza koje metaboliziraju ureju i proizvode amonijak koji neutralizira žučnu kiselinu. prolazi kroz stijenku crijeva i lokalizira se u limfnom tkivu i mezenterijalnim limfnim čvorovima. Proteini vanjske membrane bakterije zaustavljaju fagocitozu blokiranjem sekrecije medijatora kao što su TNF-α i IL-8. Zbog imunološke reakcije između antigena *Y. enterocolitica* i antigena domaćina, moguć je razvoj reaktivnog artritisa. Česta post-infekcijska sekvela je i *erythema nodosum*. Osim enterokolitisa i reaktivnog artritisa, ovaj patogen može uzrokovati i sepsu, pseudoapendicitis, miokarditis i dermatitis [15].

Enterokolitis se manifestira dijarejom, abdominalnim bolovima, mučninom, povraćanjem i povišenom tjelesnom temperaturom. Dijareja može trajati između 12 i 22 dana. *Y. enterocolitica* se teško razlikuje od ostalih uzročnika akutne dijareje zbog sličnosti simptoma. Lokalizacija abdominalne boli u donjem desnom kvadrantu mogla bi poslužiti kao dijagnostički znak. Nakon akutne infekcije, moguće je kliconoštvo između 17 i 116 dana (medijan 40 dana) [14].

Tablica 2. prikazuje broj potvrđenih slučajeva jersinioze u Republici Hrvatskoj i u Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine [12].

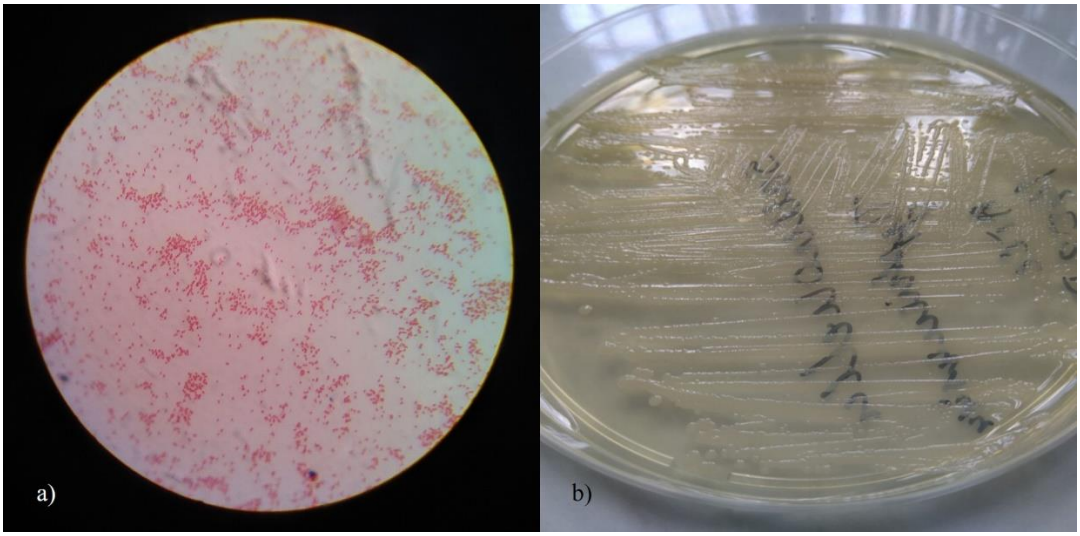
Tablica 2. Broj potvrđenih slučajeva jersinioze u Republici Hrvatskoj i Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine

Godina	Republika Hrvatska	Europska Unija
2014.	20	6435
2015.	16	6928
2016.	22	6888
2017.	29	6823

Preventivne mjere su higijena osoblja i uređaja u prehrambenoj industriji, izbjegavanje konzumacije sirove svinjetine te obrada i dezinfekcija vode [16].

1.1.5. *Salmonella* Typhimurium

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotip Typhimurium je gram – negativna, fakultativno anareobna asporogena štapićasta bakterija (Slika 5.). Pokretna je zahvaljujući peritrihijalnim flagelama. Dobro raste na jednostavnim hranjivim podlogama, ne fermentira laktozu i saharozu, ali proizvodi sumporovodik (H_2S). Otporna je na vanjske uvjete i dugo preživljava izvan domaćina. Osjetljiva je na visoki pH i klorne dezinficijense [3].



Slika 5. *Salmonella* Typhimurium: a) bojenje po Gramu, b) kolonije na Mueller Hinton agaru

Salmonele su prisutne u velikom broju domaćih i divljih životinja. Prehrambeni proizvodi od peradi, svinjetine i govedine (meso, mlijeko, jaja) najčešći su izvor infekcije. Salmonele se često nalaze i kod kućnih ljubimaca kao što su psi, mačke, ptice i reptili [17].

S. Typhimurium je gastrointestinalni patogen koji može penetrirati intestinalnu barijeru i funkcionirati kao unutarstanični patogen u fagocitnim stanicama. Čovjek se najčešće inficira ingestijom kontaminirane hrane ili vode. U tankom crijevu probija crijevnu sluznicu i potiče lizu M – stanica. Razmnožavaju se u makrofagima nakon čega mogu putem limfnog i

krvožilnog sustava diseminirati u cijeli organizam domaćina. Smatra se da je infektivna doza 10^6 do 10^8, no moguća je simptomatska infekcija i s manjim brojem bakterija ukoliko se radi o djeci ili imunokompromitiranima [18].

Salmoneloza se najčešće manifestira kao akutni gastroenteritis. Nakon perioda inkubacije od 6 do 72 sata naglo nastupa mučnina, povraćanje i grčevita abdominalna bol u periumbilikalnom području i donjem desnom kvadrantu nakon čega nastupa vodenasta dijareja koja može sadržavati krv i sluz. Bolest traje 2 do 7 dana, često prolazi i bez antimikrobne terapije. Nakon infekcije često je kliconoštvo u prosječnom trajanju od 5 tjedana [19].

Tablica 3. prikazuje broj potvrđenih slučajeva salmoneloze u Republici Hrvatskoj i u Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine, prema podacima Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) [12].

Tablica 3. Broj potvrđenih slučajeva salmoneloze u Republici Hrvatskoj i Europskoj Uniji u razdoblju od 2014. do 2017. godine [12]

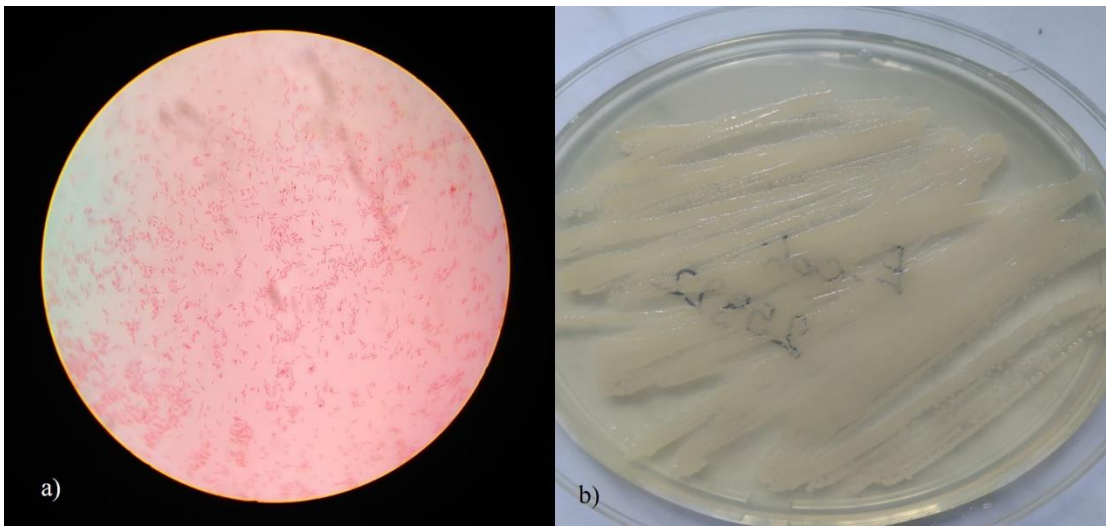
Godina	Republika Hrvatska	Europska Unija
2014.	1494	92012
2015.	1593	94477
2016.	1240	94425
2017.	1242	91593

Prevencija zahtjeva kontrolne mjere u svim fazama hranidbenog lanca, od poljoprivredne proizvodnje do procesa prerade i pripreme hrane [17].

1.1.6. ***Escherichia coli***

Escherichia coli je kratki gram – negativni štapić, fakultativni je anaerob i asporegena je. Pokretna je, stvara indol i fermentira laktozu. Raste na brojnim hranjivim podlogama, a

optimalna temperatura je 37°C (Slika 6.). Može preživjeti neko vrijeme u vodi, zemlji i na različitim predmetima u biološkom materijalu. U hrani se lako i brzo razmnožava. Osjetljiva je na uobičajene dezinficijense [2].



Slika 6. *Escherichia coli*: a) bojenje po Gramu, b) kolonije na Mueller Hinton agaru

Nepatogeni sojevi *E. coli* sastavni su dio crijevne mikrobiote sisavaca, no postoji više patotipova koji uzrokuju razne bolesti. Specifičnosti patotipova i bolesti koje uzrokuju prikazane su u Tablici 4. [2].

Tablica 4. Patotipovi *E. coli*, čimbenici virulencije, mjesto djelovanja i domaćin te bolest koju uzrokuje

Patotip	**Čimbenik virulencije**	**Mjesto djelovanja i domaćin**	**Bolest**
enterotoksična *E. coli* (ETEC)	termolabilni i termostabilni toksin	tanko crijevo; čovjek, svinja, govedo, konj	„proljev putnika“
enteropatogena *E. coli* (EPEC)	specifični pili	tanko crijevo; čovjek, kunić, pas	vodenasti proljev i povraćanje

Enteroagregativna *E. coli* (EAEC)	fimbrije koje potiču adherenciju i agregaciju na epitelu, toksin	tanko crijevo; čovjek	„proljev putnika“, moguć i perzistentan proljev
enteroinvazivna *E. coli* (EIEC)	invazivni antigen	debelo crijevo; čovjek	vodenasti proljev s dizenteričnim sindromom
Enterohemoragična *E. coli* (EHEC, STEC)	pili u snopovima, Shiga-toksin 1 i 2	debelo crijevo; čovjek, govedo, koza	vodenasti proljev s patološkim primjesama, HUS
uropatogena *E. coli* (UPEC)	P- fimbrije, hemolizini	mokraćni sustav; čovjek	infekcije mokraćnog sustava
K1 – pozitivna *E. coli* (MNEC)	kapsula od polisijalične kiseline	moždane ovojnice; čovjek	neonatalni meningitis

U kontroli ekskrecije *E. coli* putem fecesa, domaćim životinjama se u hranu može dodavati probiotički mikroorganizam *Lactobacillus acidophilus* koji učinkovito smanjuje koncentraciju *E. coli* u fecesu goveda čime se smanjuje rizik kontaminacije. U industriji hrane posebno je bitna dobra higijenska praksa i primjena sustava sigurnosti hrane kao što je HACCP [20].

1.2. Fotokataliza

Fotokataliza je akceleracija fotoreakcije uz prisutnost katalizatora. Tu je reakciju moguće opisati u četiri koraka:

1. Apsorpcija svjetlosti kako bi se generirali parovi elektrona
2. Separacija naboja
3. Prijenos elektrona na površinu fotokatalizatora
4. Uporaba naboja na površini za redukciju i oksidaciju [21]

Reakcije zbog fotokatalitičkog efekta započinju djelovanjem svjetlosti (UV) na metalni oksid (MO) adsorbiran na neku površinu. Reakcija je prikazana jednadžbom (1) [22].

$$UV + MO \rightarrow MO\ (h + e^{-}) \qquad (1)$$

Reakcije oksidacije prikazane su sljedećim sustavom jednadžbi (2) [22]:

$$h^{+} + H_2O \rightarrow H^{+} + \bullet OH$$

$$2\ h^{+} + 2\ H_2O \rightarrow 2\ H^{+} + H_2O_2 \qquad (2)$$

$$H_2O_2 \rightarrow 2\ \bullet OH$$

Reakcije oksidacije prikazane su sustavom jednadžbi (3) [22]:

$$e^{-} + O_2 \rightarrow \bullet O_2^{-}$$

$$\bullet O_2^{-} + HO\bullet 2 + H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (3)$$

$$HOOH \rightarrow HO\bullet + \bullet OH$$

U obje reakcije nastaje hidroksil radikal koji je neselektivan i ima visoki redukcijsko – oksidacijski potencijal. U mikrobiološkom smislu, takvo okruženje dovodi do uništavanja strukture i funkcije proteina koje može dovesti do smrti stanice nekog mikroorganizma [23].

1.3. Cinkov oksid kao fotokatalitički antibakterijski agens

Cinkov oksid (ZnO) je anorganska molekula koja se pri sobnoj temperaturi nalazi u obliku bijelih heksagonskih kristala. Lako se otapa u kiselinama i lužinama, a ne otapa se u vodi. ZnO ima visoku optičku apsorpciju u UVA (315 – 400 nm) i UVB (280 – 315 nm) dijelovima spektra što se može iskoristiti u antibakterijske svrhe [24].

Cinkov oksid ima visoku fotokatalitičku efikasnost u usporedbi s ostalim materijalima te bolje odgovara na UV svjetlost što povećava provodljivost i aktivira interakciju između ZnO i bakterija. Fotokonduktivnost perzistira dugo nakon prestanka izlaganja UV svjetlosti zbog

negativnih specija kisika adsorbiranih na površinu. UV zračenje uzrokuje brzu desorpciju slabo vezanog kisika čime se povećava fotokonduktivnost spoja. Cinkov oksid u vodenoj otopini i pod utjecajem UV zračenja može proizvoditi reaktivne specije kisika (ROS) poput vodikovog peroksida ili superoksidnih iona. Generirane aktivne specije mogu penetrirati membranu stanice i uništiti ili inhibirati mikroorganizme [25].

Toksičnost reaktivnih specija kisika (ROS) za bakterije pripisuje se visokoj reaktivnosti i oksidacijskim svojstvima. Fotokatalitička produkcija ROS-a u velikoj mjeri doprinosi antibakterijskim svojstvima metalnih oksida. Toksičnost tih specija uključuje razaranje staničnih komponenti poput lipida, DNA i proteina. Cinkov oksid daje veći broj ROS-a kada je izložen UV svjetlosti. Bez svjetlosti cinkov oksid generira samo superoksidne ione [26].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati antimikrobna svojstva polimernih diskova obloženih tankim slojem cinkovog oksida na patogene koji se prenose hranom. Istraživanja su dio aktivnosti na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Priprema poroznih tankoslojnih materijala za pročišćavanje vode koristeći tehniku depozicije atomskih slojeva (ALD)“ (IP-2016-06-3568) voditeljice izv. prof. dr. sc. Gabriele Ambrožić iz Odjela za fiziku Sveučilišta u Rijeci. Promatran je fotokatalitički učinak cinkovog oksida postignut korištenjem ultraljubičaste svjetlosti pri različitom trajanju izloženosti diskova i u različitim medijima na gram – pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* i *Listeria monocytogenes*) i gram – negativne bakterije (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium i *Escherichia coli*). Promatrana je i adhezija navedenih mikroorganizama na polimerne diskove.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pribor i uređaji

- mikrobiološke ušice („eze“)
- Petrijeve pločice
- mikrotitarske pločice (96 well, ROLL Piove di Sacco, Italija)
- staklene epruvete (15 mL) s čepom
- miješalica
- ultrazvučna kupelj (Bandelin - BactoSonic, Njemačka)
- spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- plastične kivete za spektrofotometriju
- aluminijska folija
- multikanalna pipeta 0,5 - 300 μL (Transferpette S-8, Njemačka)
- automatske mikropipete (Gilson, SAD):
    - P200 (50 - 200 μL)
    - 200- 1000 μL
- nastavci za pipete
- plamenik (Poligas OMM)
- inkubator
- UV lampa (CAMAG UV lamp 4)
- polimerni diskovi obloženi tankim slojem ZnO

3.2. Bakterijski soj

U istraživanju su korišteni sljedeći sojevi bakterija:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923™

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19166™
- *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610™
- *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028™
- *Escherichia coli* ATCC 25922™

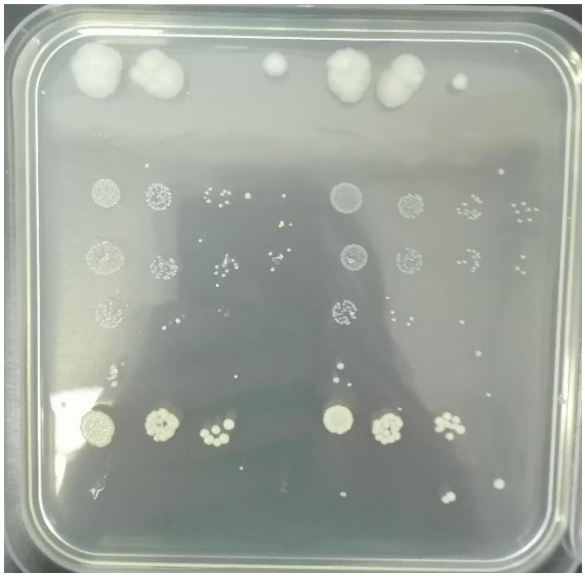
3.3. Medij i hranjiva podloga

3.3.1. Ringerova otopina

Ringerova otopina pripremljena je tako da 1000 mL otopine sadrži 8,60 g natrijevog klorida (NaCl), 0,30 g kalijevog klorida (KCl) i 0,33 g kalcijevog klorid dihidrata ($CaCl_2 \times 2 H_2O$). Tako pripremljena otopina se sterilizira u autoklavu na 121°C tijekom 15 minuta.

3.3.2. Mueller Hinton agar

Sastav podloge je 2,0 g goveđeg ekstrakta, 17,5 g kiselog hidrolizata kazeina, 1,5 g škroba, 17,0 agara po litri pročišćene vode. Sterilizacija podloge provodi se u autoklavu na 121°C tijekom 15 minuta, ohladi na 50°C i sterilno razlije u Petrijeve pločice tako da debljina podloge bude 4 mm. pH vrijednost podloge iznosi 7,3 ± 0.2. Slika 7. prikazuje izgled kolonija bakterija korištenih u ovom istraživanju na Mueller Hinton agaru.



Slika 7. Rast bakterija na Mueller Hinton agaru

3.5. Bakterijski inokulum

U epruvete od 15 mL dodano je oko 3 mL sterilne Ringerove otopine te su sterilnom mikrobiološkom ušicom bakterije s hranjive podloge prenesene u sterilnu Ringerovu otopinu i homogenizirane na miješalici. Broj bakterija određivan je spektrofotometrijskom metodom tako da je kao slijepa proba korištena pripremljena Ringerova otopina, a optička gustoća bakterijske suspenzije namještena je razrjeđivanjem na OD1 (eng. *optical density*) što odgovara koncentraciji bakterija od 10^9 CFU/mL (eng. *colony-forming unit*). Serijskim razrjeđenjima pripremljena je bakterijska suspenzija koncentracije 10^6 CFU/mL koja se dalje koristila u istraživanju.

3.6. Polimerni diskovi obloženi tankim slojem cinkovog oksida

Površinsko modificirani polimerni diskovi pripremljeni su na Odjelu za fiziku Sveučilišta u Rijeci. Diskovi su prekriveni nosačem aluminijevog oksida na kojeg je vezan cinkov oksid kao aktivna komponenta, a promjera su oko 6 mm.

3.7. Ultraljubičasta (UV) svjetlost

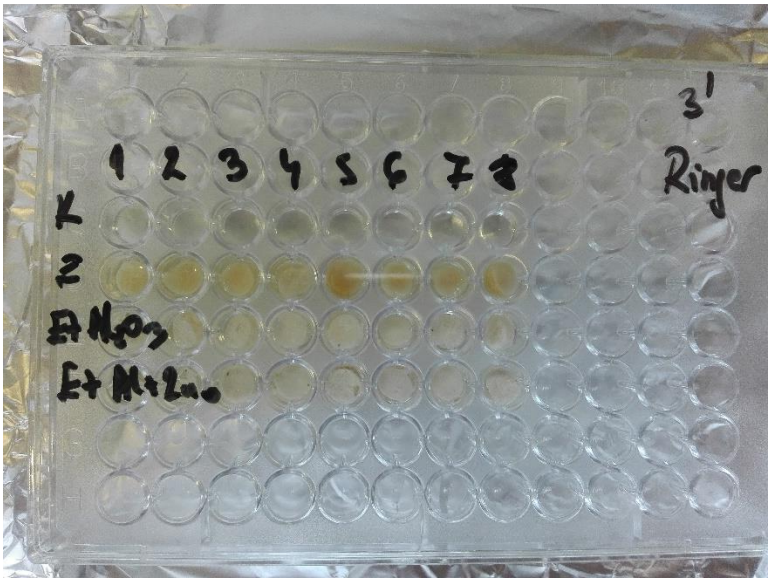
Za fotokatalitičku aktivaciju cinkovog oksida na polimernim diskovima korištena je UV lampa (CAMAG UV lamp 4) snage 8 W na valnoj duljini 366 nm. Lampa (Slika 8.) je bila postavljena na visinu od 5 cm iznad podloge.



Slika 8. UV lampa (CAMAG UV lamp 4) korištena u istraživanju

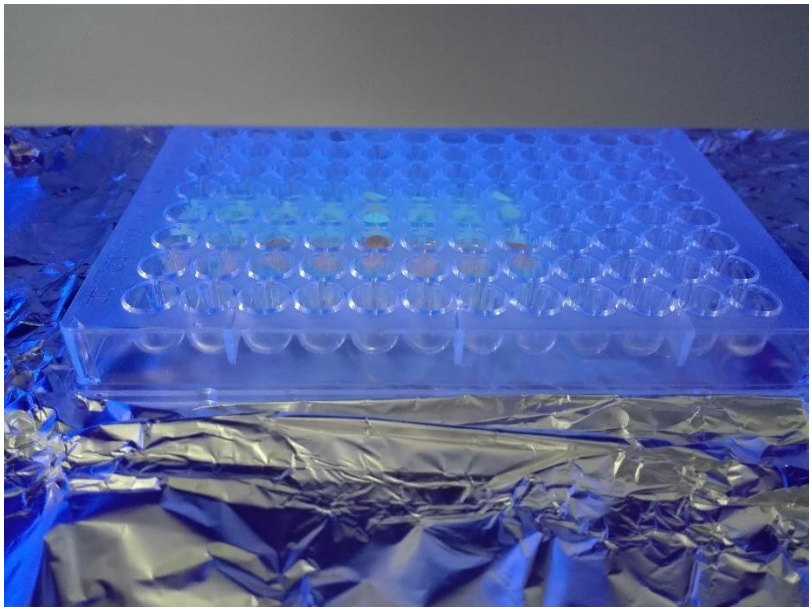
3.8. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida

U jažice mikrotitarske pločice naneseno je po 200 µL svake od već pripremljenih bakterijskih suspenzija (10^6 CFU/mL). Jažice su napunjene u četiri niza tako da u prvom nizu nije bilo polimernih diskova, u drugom su bili samo polimerni diskovi, u trećem polimerni diskovi s nosačem od aluminijevog oksida i u četvrtom nizu diskovi s nosačem i tankim slojem cinkovog oksida (Slika 9.). Pripremljene su dvije pločice s četiri niza.



Slika 9. Mikrotitarska pločica s četiri niza ispunjenih jažica i pripadajućim diskovima

Mikrotitarske pločice zamotane su u aluminijsku foliju kako bi se izbjegao utjecaj prirodno prisutne UV svjetlosti. Nakon 15 minuta, jedna pločica je osvjetljena pod UV lampom 3 minute, a druga 5 minuta. Nakon osvjetljavanja (Slika 10.), pločice su inkubirane 2 sata na 37°C, a nakon inkubacije napravljena su serijska desetorostruka razrjeđenja u Ringerovoj otopini svakog niza te su nasađena na Mueller Hinton agar tehnikom nakapavanja u volumenu od 10 µL. Rezultati su očitavani nakon 24 sata inkubacije. Iste su mikrotitarske pločice s volumenom preostalim nakon nasađivanja na hranjivu podlogu inkubirane 24 sata te je ponovno nakapan volumen od 10 µL kako bi se utvrdio učinak fotoaktiviranog cinkovog oksida nakon 24 sata.



Slika 10. Osvjetljavanje mikrotitarske pločice UV lampom

3.9. Adhezija na polimerne diskove

Mikrotitarske pločice s četiri niza pripadajućih diskova su nakon osvjetljavanja 3 i 5 minuta inkubirane 24 sata na 37°C. Nakon inkubacije, diskovi su ispirani tri puta sterilnom Ringerovom otopinom kako bi se isprale neadherentne bakterije. Nakon ispiranja, mikrotitarske pločice uronjene su u ultrazvučnu kupelj te sonificirane na frekvenciji 40 kHz kako bi se adherirane bakterije odvojile od diskova. Suspenzija odvojenih bakterija u Ringerovoj otopini serijski je desetorostruko razrijeđena, nasađena na Mueller Hinton agar metodom nakapavanja te inkubirana 24 sata nakon čega su očitani rezultati.

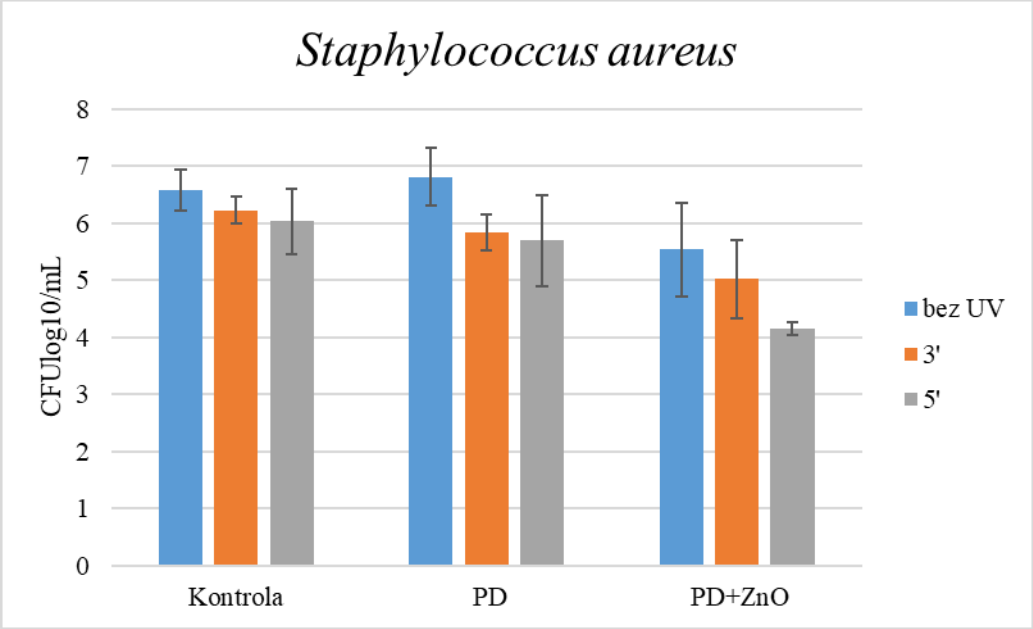
3.10. Obrada podataka

Eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su računalnim programom Excel (Microsoft Office) i Statistica (StatSoft). U izradi grafičkih prikaza korištena je srednja vrijednost podataka i standardna devijacija.

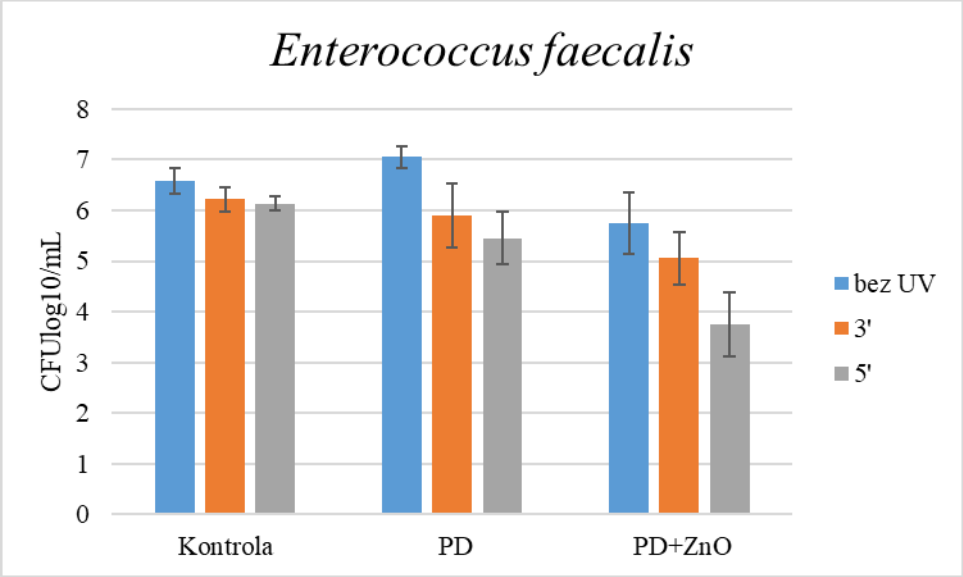
4. REZULTATI

4.1. Učinak cinkovog oksida

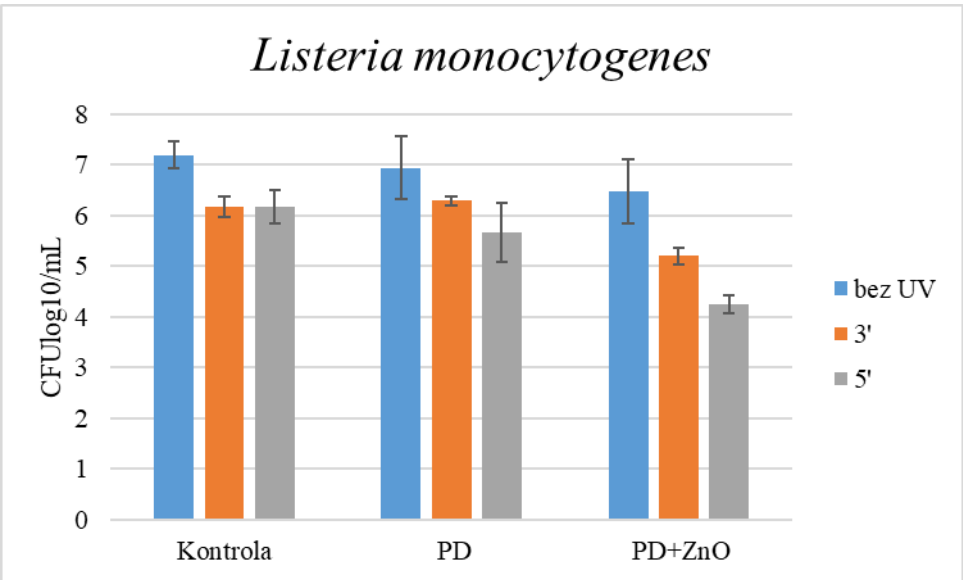
Na Slikama 11. do 16. grafički je prikazan učinak fotoaktiviranog cinkovog oksida nakon 3 i 5 minuta izlaganja UV svjetlosti pri valnoj duljini od 366 nm i bez izlaganja UV svjetlosti u odnosu na učinak polimernog diska koji ne sadrži metalne okside i kontrolne skupine koja nije sadržavala polimerne diskove. Odstupanje je izraženo kao standardna devijacija.



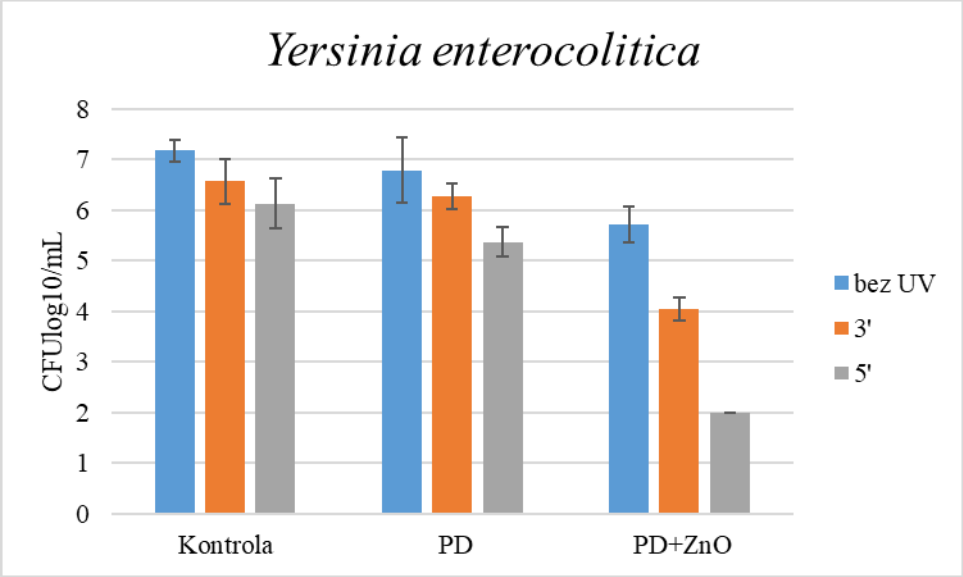
Slika 11. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Staphylococcus aureus* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



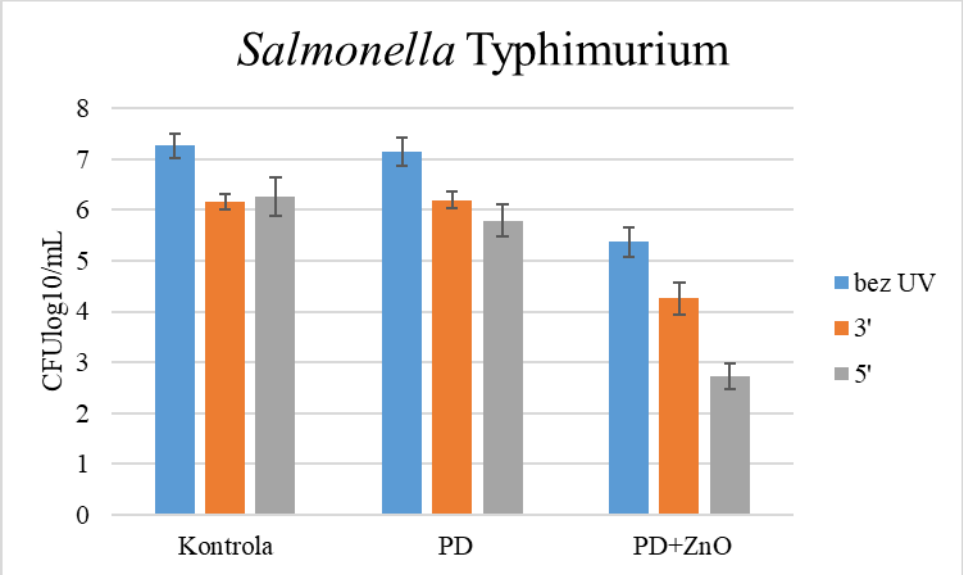
Slika 12. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Enterococcus faecalis* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



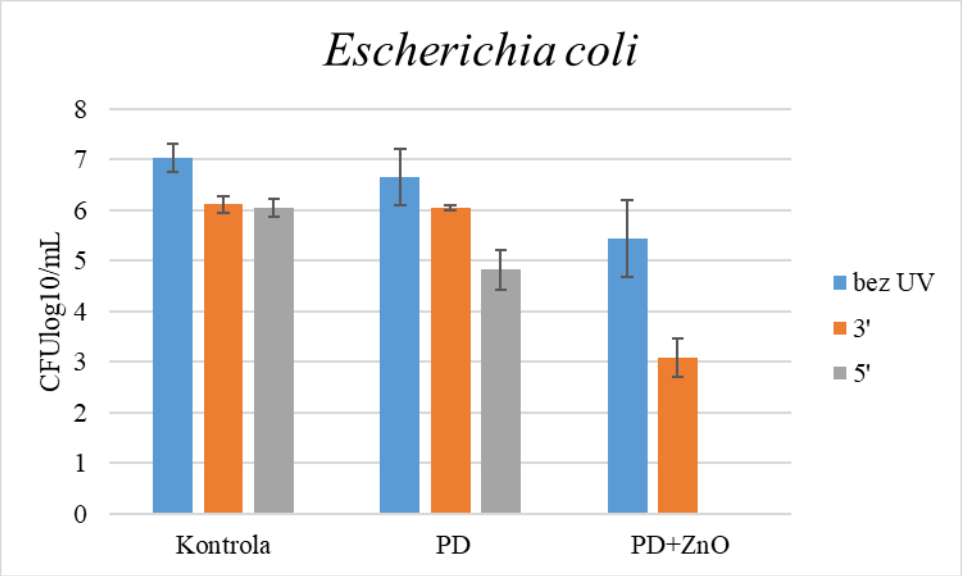
Slika 13. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Listeria monocytogenes* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 14. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Yersinia enterocolitica* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 15. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Salmonella* Typhimurium u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 16. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti na *Escherichia coli* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)

Podaci dobiveni u istraživanju statistički su obrađeni Studentovim t-testom pri čemu je statistički značajnom smatrana p – vrijednost manja od 5% ($p < 0,05$). Uspoređena je skupina u kojoj je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom i skupina u kojoj je korišten polimerni disk bez metalnih oksida. Rezultati statističke analize prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. p – vrijednost dobivena Studentovim t – testom prilikom usporedbe rezultata učinka cinkovog oksida i polimernog diska bez metalnih oksida na odabrane patogene koji se prenose hranom

Bakterijski soj	p - vrijednost
Staphylococcus aureus	p = 0,0865
Enterococcus faecalis	p = 0,1640
Listeria monocytogenes	p = 0,2546
Yersinia enterocolitica	p = 0,1249

Salmonella Typhimurium	p = 0,0593
Escherichia coli	p = 0,1459

* - statistički značajna p – vrijednost

Tablice 6. i 7. prikazuju postotak preživjelih bakterija dobiven brojenjem poraslih kolonija i matematičkim izračunom. Postotak preživljavanja i inhibicije izračunat je nakon 3 minute i nakon 5 minuta osvjetljavanja uzoraka UV svjetlosti. Statističkom analizom uspoređeni su rezultati između skupine gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija pri čemu je p – vrijednost manja od 5% ($p < 0,05$) smatrana statistički značajnom. Statističkom analizom postotka inhibicije nakon 3 minute osvjetljavanja dobivena je vrijednost p = 0,0381 , a nakon 5 minuta osvjetljavanja dobivena je vrijednost p = 0,0242. Obje vrijednosti su statistički značajne.

Tablica 6. Postotak preživljavanja odnosno inhibicije patogena koji se prenose hranom nakon 3 minute tretiranja UV svjetlom uz prisutnost cinkovog oksida

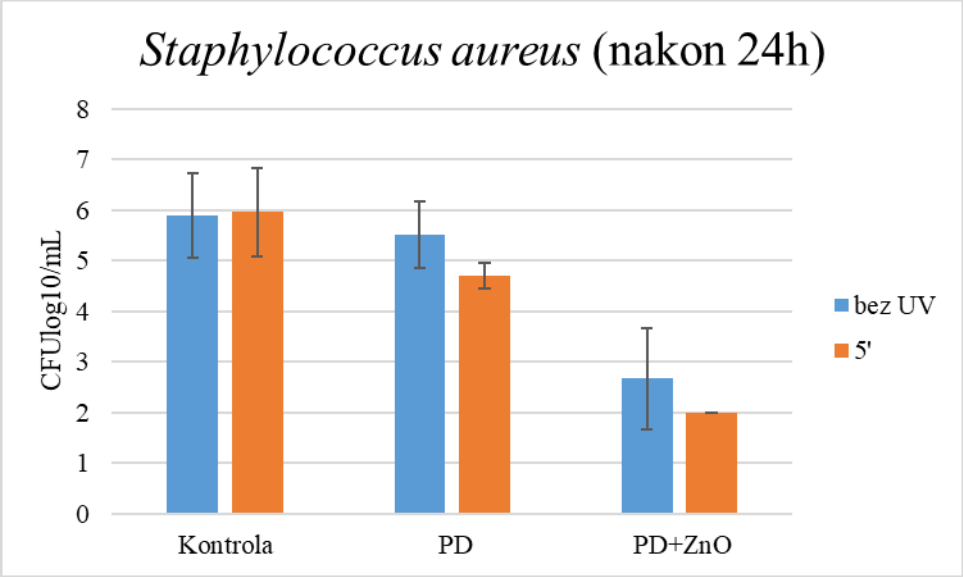
Bakterijski soj	Preživljavanje (%)	Inhibicija (%)
S. aureus	25,78	74,22
E. faecalis	14,03	85,97
L. monocytogenes	8,4	91,6
Y. enterocolitica	0,24	99,76
S. Typhimurium	0,97	99,03
E. coli	0,15	99,85

Tablica 7. Postotak preživljavanja odnosno inhibicije patogena koji se prenose hranom nakon 5 minuta tretiranja UV svjetlom uz prisutnost cinkovog oksida

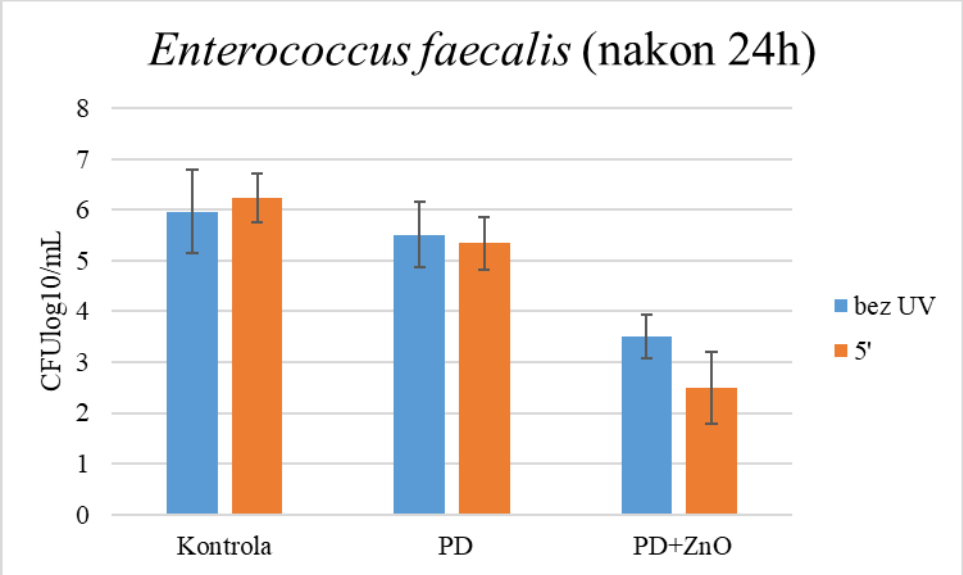
Bakterijski soj	Preživljavanje (%)	Inhibicija (%)
S. aureus	0,74	99,26
E. faecalis	0,53	99,47
L. monocytogenes	1,33	98,67
Y. enterocolitica	0,02	99,98
S. Typhimurium	0,04	99,96
E. coli	0	100

4.2. Učinak cinkovog oksida nakon 24 sata

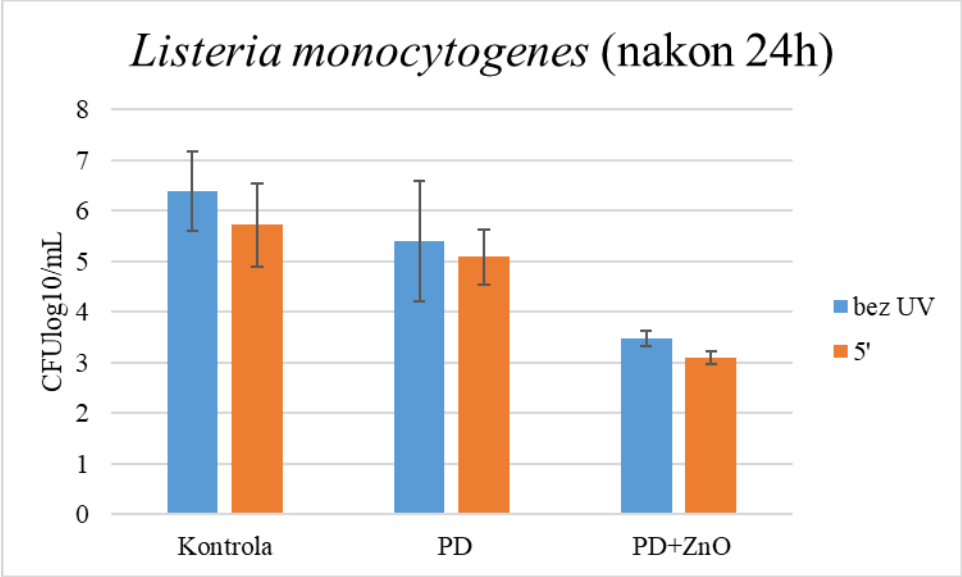
Na Slikama 17. do 22. grafički je prikazan inhibitorni učinak fotoaktiviranog cinkovog oksida nakon 5 minuta izlaganja UV svjetlosti pri valnoj duljini od 366 nm i bez izlaganja UV svjetlosti u odnosu na učinak polimernog diska koji ne sadrži metalne okside i kontrolne skupine koja nije sadržavala polimerne diskove. Bakterije su nasađene na hranjive podloge 24 sata nakon tretiranja. Odstupanje je izraženo kao standardna devijacija.



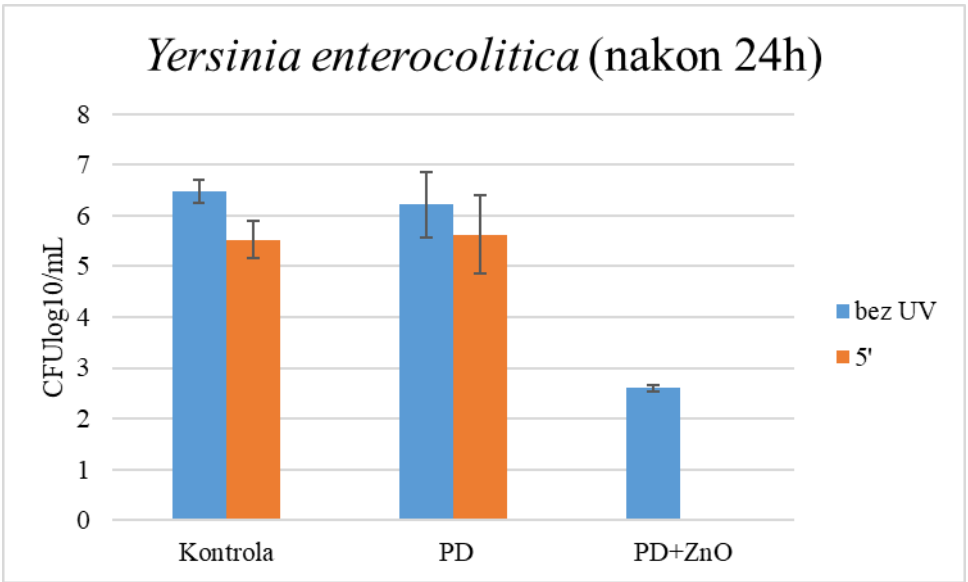
Slika 17. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Staphylococcus aureus* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



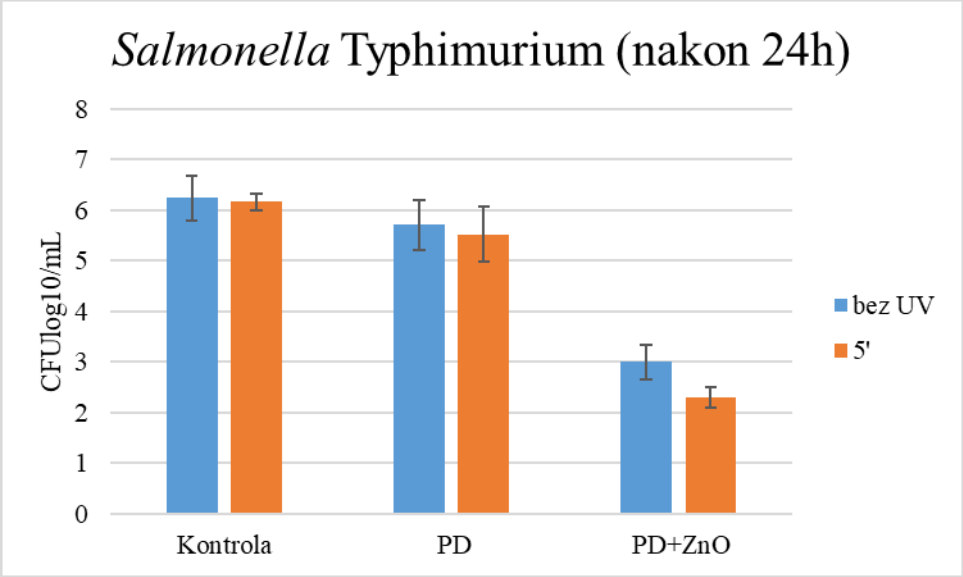
Slika 18. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Enterococcus faecalis* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



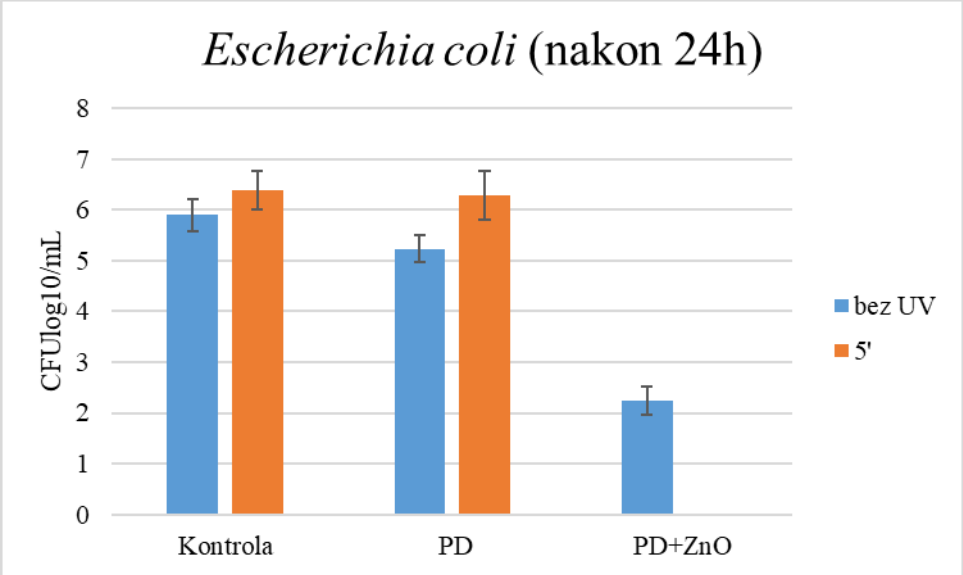
Slika 19. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Listeria monocytogenes* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 20. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Yersinia enterocolitica* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 21. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Salmonella* Typhimurium u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)



Slika 22. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida (PD+ZnO) 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti na *Escherichia coli* u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD)

Podaci dobiveni u istraživanju statistički su obrađeni Studentovim t-testom pri čemu je statistički značajnom smatrana p – vrijednost manja od 5% ($p < 0,05$). Uspoređena je skupina u kojoj je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom i skupina u kojoj je korišten polimerni disk bez metalnih oksida. Rezultati statističke analize prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. p – vrijednost dobivena Studentovim t – testom prilikom usporedbe rezultata učinka cinkovog oksida i polimernog diska bez metalnih oksida na odabrane patogene koji se prenose hranom 24 sata nakon tretiranja s UV svjetlosti

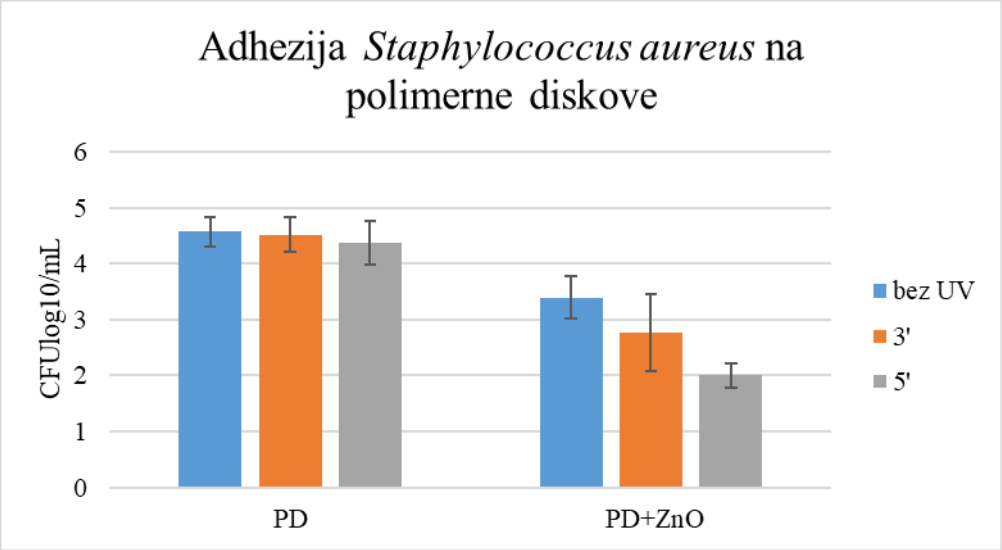
Bakterijski soj	p - vrijednost
Staphylococcus aureus	p = 0,0339*
Enterococcus faecalis	p = 0,0414*
Listeria monocytogenes	p = 0,0153*
Yersinia enterocolitica	p = 0,0741
Salmonella Typhimurium	p = 0,0146*
Escherichia coli	p = 0,0640

* - statistički značajna p – vrijednost

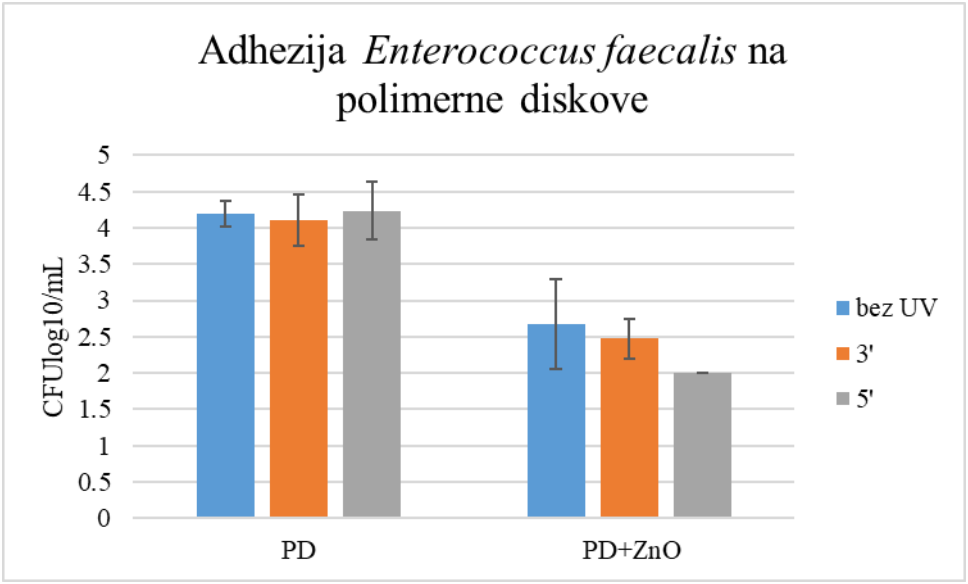
Iako je pronađena statistički značajna razlika u učinku cinkovog oksida u pojedinačnoj analizi, nije pronađena statistički značajna razlika između broja gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija nakon 24 sata ($p = 0,0754$).

4.3. Adhezija bakterija koje se prenose hranom na polimerne diskove

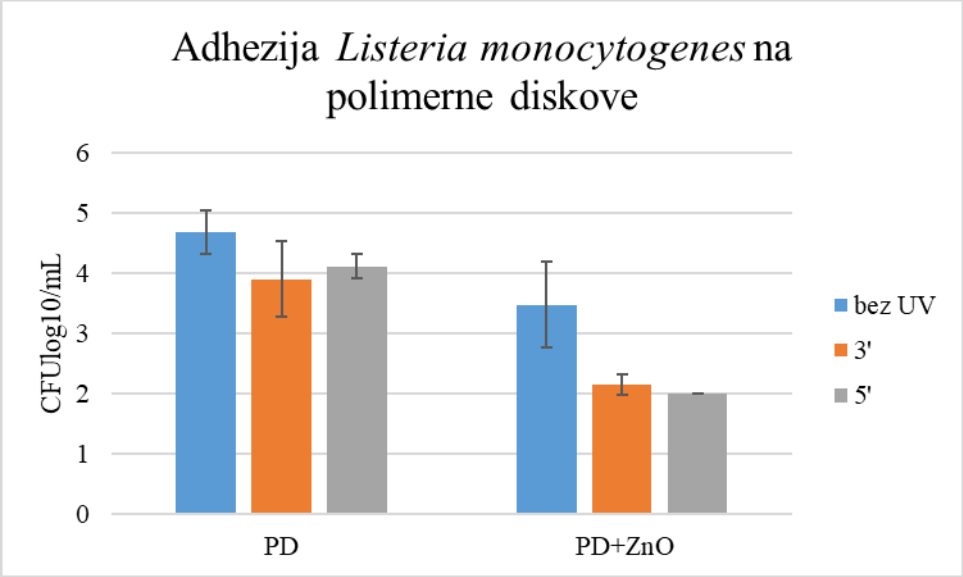
Slikama 23. do 28. grafički je prikazana adhezija odabranih bakterija na polimerne diskove sa i bez cinkovog oksida. Diskovi su tretirani UV svjetlom 3 i 5 minuta, a jedna skupina diskova nije tretirana UV svjetlom. Odstupanje je izraženo kao standardna devijacija.



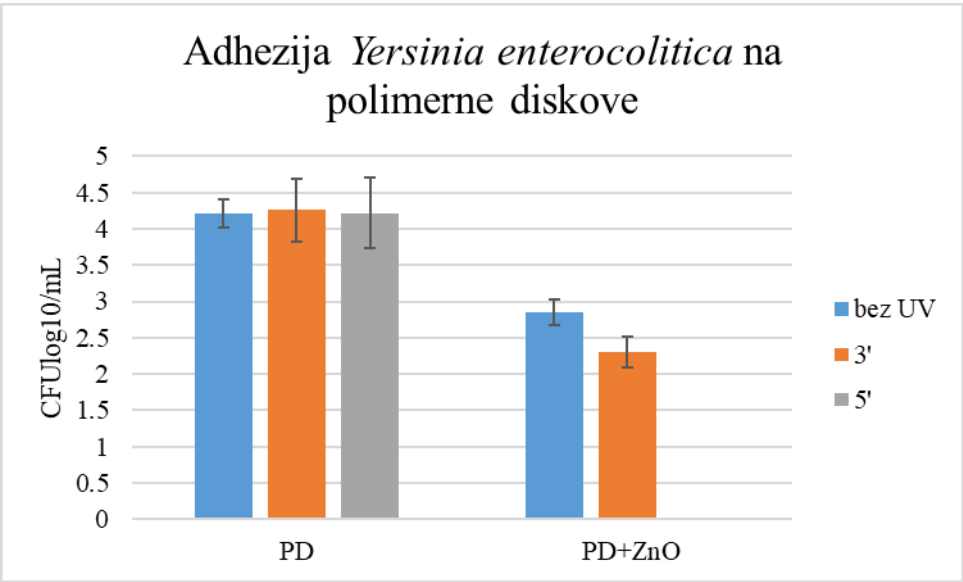
Slika 23. Adhezija *Staphylococcus aureus* na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti



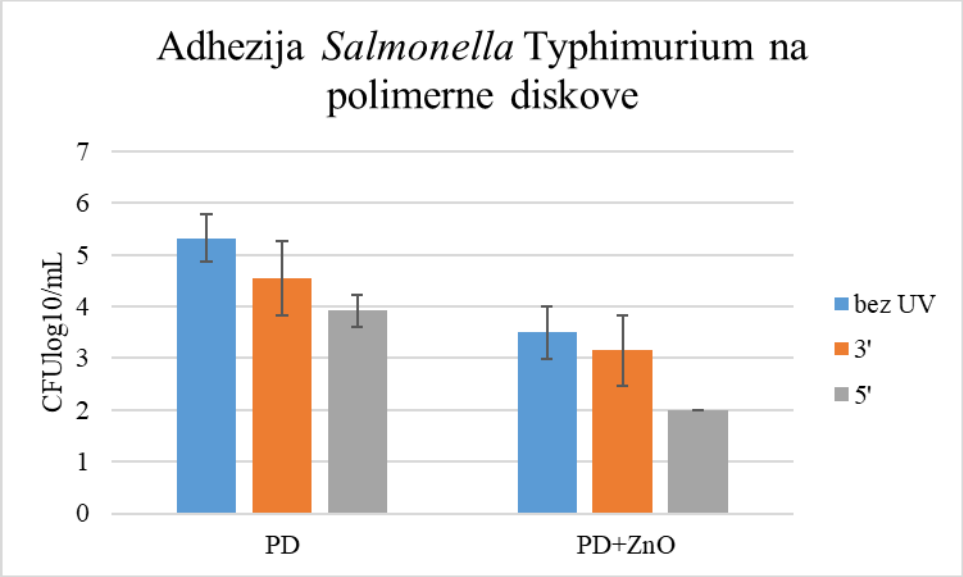
Slika 24. Adhezija *Enterococcus faecalis* na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti



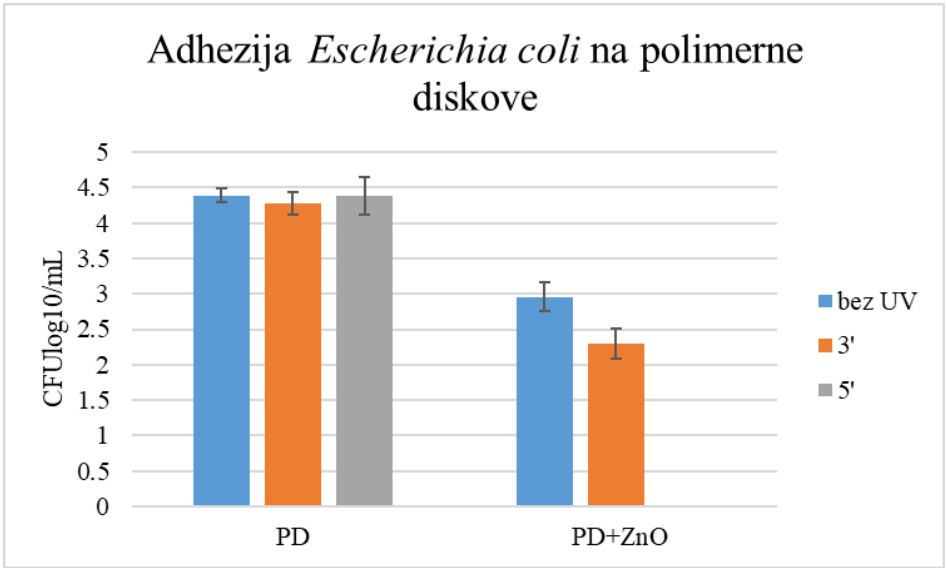
Slika 25. Adhezija *Listeria monocytogenes* na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti



Slika 26. Adhezija *Yersinia enterocolitica* na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti



Slika 27. Adhezija *Salmonella* Typhimurium na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti



Slika 28. Adhezija *Escherichia coli* na polimerni disk s tankim slojem cinkovog oksida (PD+ZnO) u usporedbi sa skupinom u kojoj je korišten disk bez metalnih oksida (PD) pri različitoj duljini izlaganja UV svjetlosti

Podaci dobiveni u istraživanju statistički su obrađeni Studentovim t-testom pri čemu je statistički značajnom smatrana p – vrijednost manja od 5% ($p < 0,05$). Uspoređena je skupina u kojoj je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom i skupina u kojoj je korišten polimerni disk bez metalnih oksida. Rezultati statističke analize prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. p – vrijednost dobivena Studentovim t – testom prilikom usporedbe rezultata adhezije na polimerni disk koji sadrži tanki sloj cinkovog oksida i polimerni disk bez metalnih oksida

Bakterijski soj	p - vrijednost
Staphylococcus aureus	p = 0,0122*
Enterococcus faecalis	p = 0,0009*
Listeria monocytogenes	p = 0,0322*
Yersinia enterocolitica	p = 0,0451*
Salmonella Typhimurium	p = 0,0477*
Escherichia coli	p = 0,0443*

* - statistički značajna p – vrijednost

Iako je pronađena statistički značajna razlika u broju adheriranih bakterija u svakoj pojedinačnoj analizi, nije pronađena statistički značajna razlika između broja adheriranih gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija nakon (p = 0,3743).

4.4. Fotokatalitički učinak cinkovog oksida

Podaci dobiveni u istraživanju statistički su obrađeni Studentovim t-testom pri čemu je statistički značajnom smatrana p – vrijednost manja od 5% ($p < 0,05$). Uspoređena je skupina u kojoj je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom tretiran UV svjetlom i skupina u kojoj je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom no bez tretmana UV svjetlom kako bi se utvrdio fotokatalitički učinak cinkovog oksida. Rezultati statističke analize prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Prikaz mjerenja provedenih u istraživanju i pripadajuće p – vrijednosti dobivene statističkom obradom podataka i usporedbom skupina uzoraka sa i bez fotoaktivacije cinkovog oksida

Mjerenje	p – vrijednost
3 minute UV	0,0066*
5 minuta UV	0,0018*
nakon 24 sata (5' UV)	0,0541
adhezija na disk nakon 3 minute UV	0,0152*
adhezija na disk nakon 5 minuta UV	0,0023*

* - statistički značajna p – vrijednost

5. RASPRAVA

Cinkov oksid je anorganski antibakterijski agens koji dobro apsorbira UV svjetlost i ima funkciju fotokatalizatora, odnosno pojačana su mu svojstva zahvaljujući ionima koji nastaju uz UV svjetlost. Istraživanje Kairiyte i suradnika pokazalo je da je cinkov oksid moguće fotoaktivirati čak i pri 400 nm što graniči s vidljivim dijelom spektra [27], a u ovom se istraživanju koristilo UV zračenje valne duljine 366 nm. Direktan učinak UV zračenja valne duljine 366 nm (UV-A dio spektra) na bakterijsku stanicu je minimalan, obzirom da se germicidnim UV zračenjem smatra UV-C dio spektra, odnosno optimum je zračenje valne duljine 253,7 nm. Cinkov oksid djeluje putem generiranja reaktivnih kisikovih specija koje bakteriju dovode u stanje oksidativnog stresa, a nastanak iona potaknut je apsorpcijom UV svjetlosti [28].

Kada je bakterijska suspenzija u kojoj su se nalazili diskovi sa i bez tankog sloja cinkovog oksida tretirana UV svjetlosti 3 i 5 minuta, zabilježen je pad broja bakterija, no pri usporedbi između diskova sa i bez cinkovog oksida, taj pad nije statistički značajan. Usporedbom vrijednosti dobivenih korištenjem diskova s cinkovim oksidom bez UV svjetlosti i fotoaktiviranih diskova s cinkovim oksidom, fotoaktivirani cinkov oksid djeluje statistički značajno bolje pri 3 i pri 5 minuta. Rezultati također pokazuju da cinkov oksid djeluje bolje na gram – negativne bakterije nakon 3 i 5 minuta tretiranja UV svjetlosti. U oba eksperimenta najosjetljivija bakterija je *Escherichia coli*. Nakon 3 minute, najotpornija je *Staphylococcus aureus* zbog zaštite od UV svjetlosti koju joj pruža žuti pigment. Nakon 5 minuta, najotpornija bakterija je *Listeria monocytogenes*, no razlika u inhibiciji je 0,59% od *Staphylococcus aureus*.

Rezultati dobiveni nasađivanjem bakterija 24 sata nakon tretiranja UV svjetlosti pokazuju statistički značajno bolje djelovanje diskova s cinkovim oksidom u usporedbi s diskom bez cinkovog oksida. I u ovom dijelu eksperimenta zabilježena je razlika između diskova sa i bez cinkovog oksida te je ta razlika statistički značajna, no ona je moguća zbog

odgođenog djelovanja UV svjetlosti na bakterijsku stanicu. Statistički značajne razlike između gram – pozitivnih i gram - negativnih bakterija nije bilo.

Applerot i suradnici u istraživanju su nakon 3 sata kontakta između cinkovog oksida i bakterijskih suspenzija *E. coli* i *S. aureus* dobili slične rezultate. Inhibicija *E. coli* bila je približno 100%, a inhibicija *S. aureus* približna 67%, no u njihovom slučaju cinkov oksid nije bio fotoaktiviran. Rezultati upućuju na to da je antibakterijski učinak posljedica osjetljivosti neke bakterije na ROS [28]. Tako u ovom slučaju bakterija *S. aureus* sadrži velike količine pigmenta karotenoida što ju čini otpornijom na oksidativni stres. Fotokatalitičkom učinku cinkovog oksida svjedoči i istraživanje Thonsuriwong i suradnika koji su mjerenjem degradacije metilenskog modrila nanesenog na cinkov oksid promatrali njegov fotokatalitički učinak, a zatim su tom učinku izložili bakteriju *E. coli* 30 minuta pri čemu se početni broj kolonija smanjio za 10^4 CFU/mL [29].

Bakterijska adhezija prvi je korak kolonizacije i formiranja biofilma. Taj je proces nepoželjan u prehrambenoj industriji i medicini zbog čega je promatran inhibitorni učinak cinkovog oksida na adheziju bakterijskih stanica na polimerne diskove. Kada bakterije adheriraju na polimerni disk s cinkovim oksidom, u direktnom su kontaktu s površinom što ih čini izloženijima reaktivnim specijama kisika koje nastaju. Rezultati su pokazali da kod svih bakterija korištenih u istraživanju cinkov oksid smanjuje broj adheriranih statistički značajno više od samog polimernog diska, no nije bilo statistički značajne razlike između gram – pozitivne i gram – negativne skupine. Eksperiment je proveden pri različitom trajanju izloženosti UV svjetlosti, odnosno pri izloženosti od 3 i 5 minuta. U oba je slučaja fotoaktivirani cinkov oksid djelovao statistički značajno bolje od cinkovog oksida koji nije bio izložen UV svjetlosti.

Potencijalna primjena polimernih diskova s cinkovim oksidom je u prehrambenoj industriji, posebice u ambalaži za sirove proizvode životinjskog porijekla.

6. ZAKLJUČCI

- Nema statistički značajne razlike u inhibitornom učinku cinkovog oksida nakon 3 i 5 minuta fotoaktivacije UV svjetlom u usporedbi s učinkom diska bez metalnih oksida, ali cinkov oksid ima statistički značajno bolje djelovanje na gram – negativne bakterije.
- Gram – pozitivne bakterije su statistički značajno otpornije na djelovanje fotoaktiviranog cinkovog oksida, a najotpornija bakterija je *Staphylococcus aureus*. Najosjetljivija bakterija je *Escherichia coli*.
- Rezultati pokazuju da je 24 sata nakon izlaganja UV svjetlosti inhibitorni učinak cinkovog oksida statistički značajno bolji kod većine bakterija, no moguće je da je takav rezultat dobiven zbog odgođenog djelovanja UV svjetlosti i reaktivnih specija kisika koje nastaju tijekom procesa osvjetljavanja cinkovog oksida.
- Adhezija je statistički značajno manja kod svih bakterija kada je korišten polimerni disk s cinkovim oksidom u usporedbi s onim bez cinkovog oksida, no nema statistički značajne razlike između gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija.
- Usporedba učinka polimernih diskova s cinkovim oksidom sa i bez fotoaktivacije UV svjetlom potvrđuje da je učinak statistički značajan nakon 3 i 5 minuta u preživljavanju i broju adheriranih bakterija. Nakon 24 sata fotokatalitički učinak nije statistički značajan što se može pripisati odgođenim učincima UV – a i oksidacijskog stresa.
- Dokazani fotokatalitički učinak cinkovog oksida potvrđuje da je valna duljina UV svjetlosti od 366 nm dovoljna za fotoaktivaciju ovog spoja kao antibakterijskog agensa.

7. LITERATURA

1. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Dostupno na https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350 Zadnji pristup: 21.08.2019.
2. Kalenić S i suradnici. *Medicinska mikrobiologija.* Zagreb: Medicinska naklada, 2013
3. Brooks GF i suradnici. *Jawetz, Melnick, Adelberg Medicinska mikrobiologija*. 1. hrvatsko izdanje. Split: Placebo, 2015.
4. Naber CK. Staphylococcus aureus Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. Clinical Infectious Diseases 2009;48(Suppl 4):231-237.
5. Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. Staphylococcus aureus Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front. Microbiol. 2008;9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02419
6. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. BioMed Research International. 2014. https://doi.org/10.1155/2014/827965.
7. Agudelo Higuita NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. *U*: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y (ur.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
8. Oprea SF, Zervos MJ. Enterococcus and its Association with Foodborne Illness. *U*: Simjee S. (ur.) *Foodborne Diseases. Infectious Disease*. Totowa: Humana Press, 2007
9. HAH priručnik „Biološke opasnosti u hrani“. Dostupno na https://www.hah.hr/pdf/Prirucnik_bioloske_opasnosti.pdf. Zadnji pristup: 21.08.2019.
10. Radoshevich L, Cossart P. Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2018;16(1):32
11. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 584–640.
12. ECDC Surveillance atlas. Dostupno na https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases. Zadnji pristup: 21.08.2019.
13. Tabit FT. Contamination, Prevention and Control of Listeria monocytogenes in Food Processing and Food Service Environments. 2018. Dostupno na https://www.intechopen.com/books/listeria-monocytogenes/contamination-

prevention-and-control-of-listeria-monocytogenes-in-food-processing-and-food-service-e. Zadnji pristup: 21.08.2019.

14. Aziz M, Waheed A. Yersinia enterocolitica. 2019. Dostupno na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/. Zadnji pristup: 21.08.2019.
15. Grassl GA, Bohn E, Müller Y, Bühler OT, Autenrieth IB. Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion, International Journal of Medical Microbiology. 2003;293(1):41-54.
16. Medeiros L, Lejeune J, Williams M. Yersinia enterocolitica: A rare but important food safety concern for young children and immune-compromised individuals. Dostupno na https://ohioline.osu.edu/factsheet/HYG-5574-11. Zadnji pristup: 21.08.2019.
17. WHO. Salmonella (non-typhoidal). Dostupno na https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal). Zadnji pristup: 21.08.2019.
18. Gart EV, Suchodolski JS, Welsh TH, Alaniz RC, Randel RD, Lawhon SD. Salmonella Typhimurium and Multidirectional Communication in the Gut. Front Microbiol. 2016; 7: 1827.
19. Chiu CH, Su LH. Salmonella, Non-Typhoidal Species (S. Choleraesuis, S. Enteritidis, S. Hadar, S. Typhimurium). Dostupno na http://www.antimicrobe.org/b258.asp. Zadnji pristup: 21.08.2019.
20. FAO. Preventing Escherichia coli in food. Dostupno na http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli.pdf. Zadnji pristup: 21.08.2019.
21. Zhu S, Wang D. Photocatalysis: Basic Principles, Diverse Forms of Implementations and Emerging Scientific Opportunities. Adv. Energy Mater. 2017;7; 1700841
22. Linsebigler AL, Yates J. Photocatalysis on TiO2 Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. Chem. Rev.1995;95(3):735-758.
23. Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. Nat Rev Microbiol. 2017;15(7):385-396.
24. PubChem, Zinc Oxide Dostupno na https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ZINC-oxide. Zadnji pristup: 21.08.2019.
25. Li X, Xing Y, Jiang Y, Ding Y, Li W. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. International Journal of Food Science & Technology. 2009;44:2161-2168.

26. Amna S, Shahrom M, Azman S, Noor Haida MK, Ling Chuo, Siti Khadijah MB, Habsah H, Dasmawati M. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nanomicro Lett. 2015;7(3): 219–242.
27. Kairyte K, Kadys A, Luksiene Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. J Photochem Photobiol B. 2013: 5;128:78-84.
28. Applerot G, Perkas N, Amirian G, Girshevitz O, Gedanken, A. Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. Applied Surface Science. 209:256(3), S3–S8.
29. Thongsuriwong K, Amornpitoksuk P, Suwanboon, S. Structure, morphology, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO thin films prepared by sol–gel dip-coating method. Advanced Powder Technology. 2013:24(1);275–280.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Maša Lovrović

Datum i mjesto rođenja: 05.05.1993., Pula, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

- 2008. – 2012. Srednja škola Mate Balote, Poreč, jezična gimnazija
- 2012. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 2017. – 2019. Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Ostale aktivnosti:

- 2014. – 2019. Demonstrator na Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 2014. Članica organizacijskog odbora Znanstvenog piknika 2014
- 2015. – 2016. Koordinatorica resursa Studentskog kongresa neuroznanosti – NeuRi
- 2017. – 2019. Dopredsjednica organizacijskog odbora Studentskog kongresa neuroznanosti – NeuRi
- 2018. – 2019. Predsjednica organizacijskog odbora Studetskog kongresa zaštite zdravlja – Sanitas
- 2018. – 2019. Članica organizacijskog odbora kongresa „Prehrana i klinička dijetoterapija“
- Aktivna sudjelovanja na raznim studentskim kongresima i radionicama