

# Komercijalne kvaterne amonijeve soli - potencijalni supstrati Qac efluks pumpi

---

Ćurić, Lucijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:939068>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Lucijana Čurić

**Komercijalne kvaterne amonijeve soli –  
potencijalni supstrati Qac efluks pumpi**

Završni rad

Split, 2022

Ovaj rad, izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Matilde Šprung, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije.

## ZAHVALA

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Matildi Šprung na svom izdvojenom vremenu, volji i strpljenju tijekom cjelokupne izrade ovog završnoga rada.*

*Zahvaljujem se i asistentici Doris Crnčević mag. educ. biol. et chem. na pruženoj pomoći i savjetima mimo svih obveza.*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Stjepanu Orhanoviću na izdvojenom vremenu i prihvaćenom pozivu da bude član komisije.*

*Veliko hvala i izv. prof. dr. sc. Renati Odžak na omogućenim prilikama i podršci tijekom prethodne tri godine studiranja.*

*Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju kroz moje cijelo školovanje te prijateljima i kolegama koji su ga uljepšali i olakšali. ♥*

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

### **KOMERCIJALNE KVATERNE AMONIJEVE SOLI– POTENCIJALNI SUPSTRATI Qac EFLUKS PUMPI**

Lucijana Ćurić

Razvoj rezistentnih sojeva bakterija predstavlja globalnu opasnost. Stoga istraživanja novih antimikrobnih spojeva često obuhvaćaju ispitivanje potencijala razvoja rezistencije kao i rezistentnih mehanizama. Kvaterne amonijeve soli (engl. *quaternary ammonium compounds*, QACs) antimikrobni su reagensi širokog spektra djelovanja. Istraživanja su pokazala da je razvoj rezistencije prema QACs najčešće posredovan efluks pumpama Qac. U ovom završnom radu ispitan je antimikrobni potencijal komercijalnih QACs, cetilpiridinijevog klorida i benzalkonijevog bromida, kao i njihov potencijal razvoja rezistencije posredovan Qac efluks pumpama. Ispitivanja su provedena na bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 pri čemu su određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ovih spojeva bez i u prisustvu inhibitora ATP-sintaze, karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da su oba komercijalna QACs spoja supstrati Qac efluks pumpi što potvrđuje objavljene podatke o sve široj incidenciji rezistencije prema ovim spojevima.

**Ključne riječi:** komercijalne kvaterne amonijeve soli, metoda mikrodilucije, efluks pumpe

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 27 stranica, 10 grafičkih prikaza, 7 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** dr. sc. Matilda Šprung, docent

**Neposredni voditelj:** Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

**Ocjenjivači:** dr. sc. Matilda Šprung, docent

dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Rad prihvaćen: 19. rujna 2022.

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Chemistry  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

B. Sc. Thesis

### COMMERCIAL QUATERNARY AMMONIUM SALTS – POTENTIAL SUBSTRATES FOR Qac EFFLUX PUMPS

Lucijana Ćurić

The development of resistant strains of bacteria represents a global danger. Therefore, research into new antimicrobial compounds often includes testing the potential for resistance development as well as resistance mechanisms. Quaternary ammonium compounds (QACs) are antimicrobial reagents with a wide spectrum of action. Research has shown that the development of resistance to QACs is most often mediated by Qac efflux pumps. In this Final Thesis, the antimicrobial potential of commercial QACs, cetylpyridinium chloride and benzalkonium bromide, as well as their potential for developing resistance mediated by the Qac efflux pumps, was examined. Tests were performed on the bacterium *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, where the minimum inhibitory concentrations (MIC) of these compounds were determined without and in the presence of the ATP-synthase inhibitor, carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone. The obtained results point to the conclusion that both commercial QACs compounds are substrates of Qac efflux pumps, which confirms published data on the increasing incidence of resistance to these compounds.

**Keywords:** commercial quaternary ammonium salts, microdilution method, efflux pumps

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 27 pages, 10 figures, 7 tables and, 25 references, original in: Croatian

**Mentor:** Matilda Šprung, Ph.D. Assistant Professor

**Assistant Supervisor:** Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

**Reviewers:** Matilda Šprung, Ph.D. *Assistant Professor*

Stjepan Orhanović, Ph.D. *Associate Professor*

Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Thesis accepted: 19<sup>th</sup> September 2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kvaterne amonijeve soli .....	2
2.1.1. Komercijalne kvaterne amonijeve soli .....	2
2.1.2. Mehanizam antimikrobnog djelovanja .....	3
2.2. Bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.3. Rezistencija bakterija na kvaterne amonijeve soli .....	6
2.4. Inhibitori efluks pumpi .....	7
2.4.1. Karbonil cijanid m-klorofenil hidrazon i mehanizam djelovanja .....	8
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>10</b>
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Pribor i uređaji .....	10
3.1.2. Kemikalije i otopine .....	11
3.1.3. Mikroorganizmi .....	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase .....	12
3.2.2. Metoda mikrodilucije .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>19</b>
4.1. Rezultati.....	19
4.1.1. Broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase .....	19
4.1.2. Metoda mikrodilucije .....	21
4.2. Rasprava .....	22
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>24</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>

# 1. UVOD

U današnje vrijeme se sve više susrećemo s pojmovima antiseptika i dezinficijensa kao i s njihovom upotrebom. Glavna svrha proizvoda je smanjiti broj mikroorganizama na raznim površinama i na taj način postići higijenski prihvatljivije okruženje. Bitan sastojak nekih dezinficijensa čine kvaterne amonijeve soli (QACs) koje, sa svojom specifičnom strukturom, djeluju negativno na rast mikroorganizama pa tako i na bakteriju *Staphylococcus aureus* [1].

Povećanje broja bolesti i pojava globalnih epidemioloških situacija uzrokovanih mikroorganizmima za posljedicu je imalo ubrzanu proizvodnju i masovnu upotrebu antiseptičkih i dezinfekcijskih sredstava. Misleći o vlastitoj zaštiti, bakterije su razvile obrambeni mehanizam s nazivom „efluks pumpe“. Dok za bakterije navedeno predstavlja obranu i nastavak života, ljudskoj populaciji predstavlja opasnost. Pojava rezistentnih bakterija postaje sve veći problem diljem svijeta. Istraživanja su pokazala da mogući odgovor za rješenje ovog problema leži u inhibiciji efluks pumpi ili dizajnu novih antimikrobnih agensa koji imaju snižen potencijal razvoja rezistencije [2].

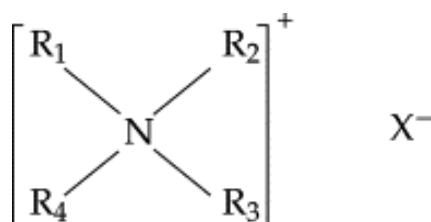
Glavni cilj ovog rada je ispitati antimikrobni potencijal komercijalnih QACs, cetilpiridinijevog klorida i benzalkonijevog bromida, kao i njihov potencijal razvoja rezistencije posredovan Qac efluks pumpama. Ispitivanja su provedena na bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 pri čemu su određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ovih spojeva bez i u prisustvu inhibitora ATP-sintaze, karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kvaterne amonijeve soli

Kvaterne amonijeve soli (QACs) su derivati amonijaka i spadaju u skupinu amina [3]. Građene su od pozitivno nabijenog dušikovog atoma na kojemu su kovalentno vezane četiri funkcionalne skupine i od negativno nabijenog halida kao što je to vidljivo na Slici 1. Slovom R označeni su supstituenti dok je slovom X označen halid (najčešće klorid ili bromid) [4]. Dobivaju se reakcijom tercijarnog amina i alkil-halogenida pri visokim temperaturama [5].



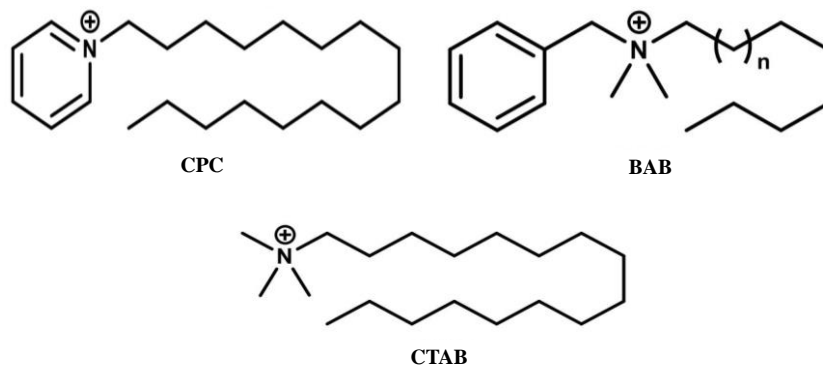
**Slika 1.** Opća strukturna formula kvaterne amonijeve soli [6]

QACs su amfipatske molekule, imaju polarnu „glavu“ kojom privlače vodu i nepolaran „rep“ kojim vodu odbijaju. Zbog navedenog svojstva, one mogu tvoriti micelle te im se često određuje kritična micelarna koncentracija [7]. R grupe različite su prirode, osim što mogu biti alkilni lanci različitih duljina, mogu sadržavati npr. i aromatske skupine. Ovisno o tome, dolazi i do mijenjanja njihove antimikrobne aktivnosti. Dokazano je da su u borbi protiv mikroorganizama najučinkovitiji QACs s alkilnim supstituentima dužine ugljikovodičnog lanca od C12 do C16 [8]. QACs danas imaju široku primjenu u svakodnevnom životu. Koriste se kao kationski surfaktanti u kozmetičkim i higijenskim proizvodima kao što su šamponi, deterdženti i otopine za kontaktne leće. Mogu biti korisni i kao biološki indikatori pri čemu se ugrađuju u komponente stanične membrane bakterija ili DNA molekule. Osim toga, bitno je i antimikrobno djelovanje komercijaliziranih QACs koji su sastojci širokog raspona dezinficijensa i antiseptika čija se primjena i proizvodnja povećava iz godine u godinu [2].

#### 2.1.1. Komercijalne kvaterne amonijeve soli

Već skoro jedno stoljeće kvaterne amonijeve soli (QACs) su vodeći antiseptici u raznim područjima. Prvi rad o QACs i njihovoj baktericidnoj aktivnosti objavljen je 1916. godine. Rad je fokusiran na baktericidnoj aktivnosti benziliranih i aciliranih kvaternih spojeva

koji se primjenjuju kao antiseptici u industriji, kućanstvu, medicini i agrikulturi [2]. Najčešće dostupni komercijalni QACs su cetilpiridinijev klorid (CPC), benzalkonijev bromid (BAB) i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) [4].



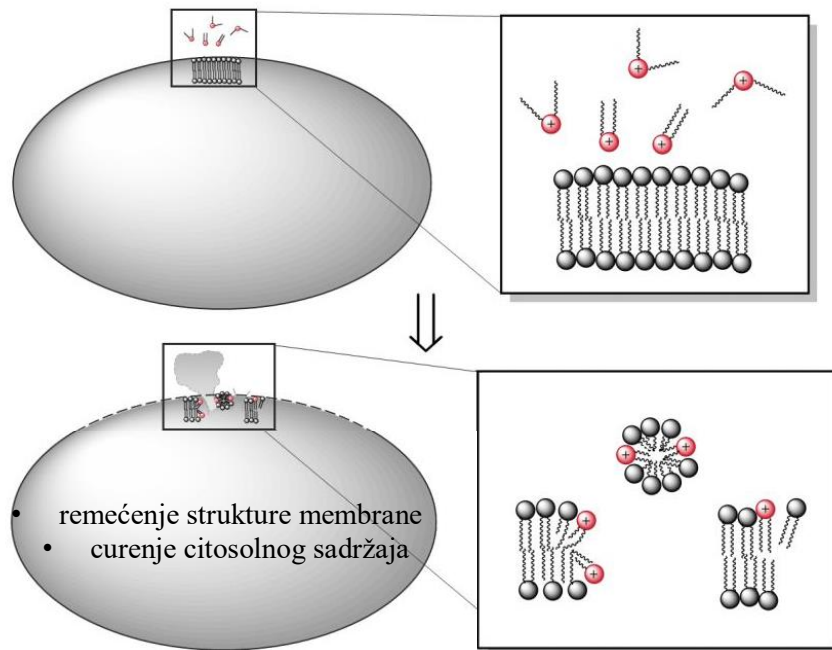
Slika 2. Strukture cetilpiridinijevog klorida (CPC), benzalkonijevog bromida (BAB) i cetiltrimetilamonijevog bromida (CTAB) [2]

Cetilpiridinijev klorid građen je od pozitivno nabijenog piridina na čijem je dušikovom atomu kovalentno vezan ugljikovodični lanac od 16 ugljikovih atoma kao što je prikazano na Slici 2. Osim što se upotrebljava kao dezinficijens, često je sastojak proizvoda oralne higijene [9]. U oftalmološke svrhe upotrebljava se BAB koji je sastojak u otopinama za leće i kapima za oči. Pri većim koncentracijama, također se upotrebljava kao koristan dezinficijens. Građen je od pozitivno nabijenog dušikovitog atoma za kojeg su kovalentno vezane dvije metilne skupine, jedna benzilna skupina i ugljikovodični lanac čiji broj ugljikovih atoma može varirati od 8 do 18 (Slika 2.) [10]. CTAB se koristi kao stabilizator i sredstvo za usmjeravanje strukture pri sintezama anorganskih materijala. Slika 2. prikazuje njegovu strukturu gdje je vidljivo da je građen od tri metilne skupine i ugljikovodičnog lanca od 16 ugljikovih atoma vezanih na dušikov kation [11].

### 2.1.2. Mehanizam antimikrobnog djelovanja

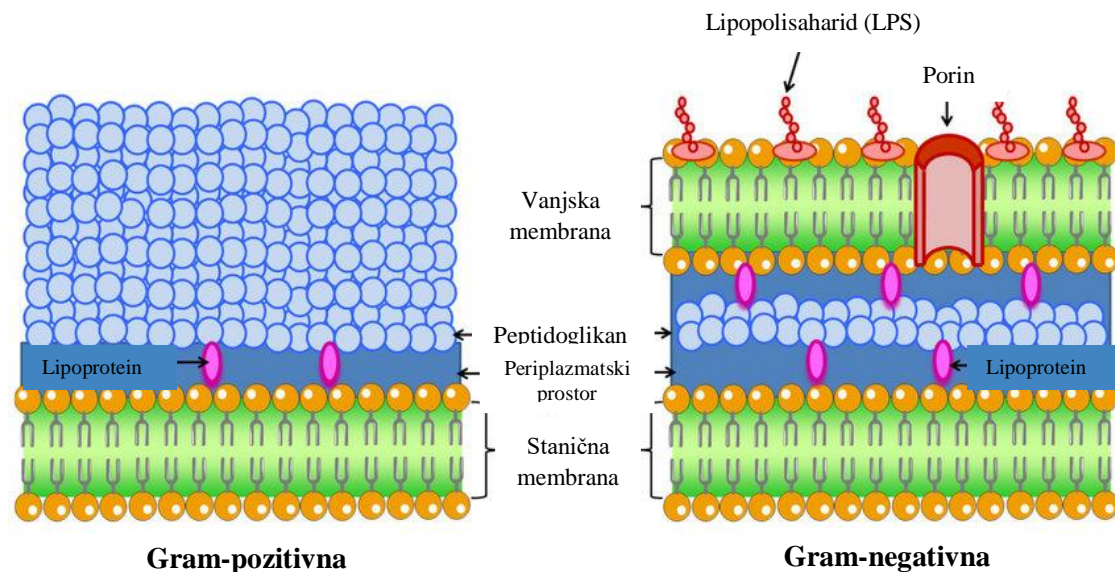
Zahvaljujući svojoj amfipatskoj prirodi, kvaterne amonijeve soli (QACs) imaju sličan mehanizam djelovanja kao deterdženti. Njihovo antimikrobno djelovanje zabilježeno je na pojedinačnim ESKAPE bakterijama kao što su *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, i nekim vrstama roda *Enterobacter* [2]. Osim letalnog djelovanja na bakterije (Gram-pozitivne i Gram-negativne), QACs djeluju i na gljivice, parazite i viruse s lipidnom ovojnicom. Kako bi QACs mogao najbolje djelovati potrebna je optimalna duljina alkilnih lanaca [12].

Mehanizam djelovanja QACs ponajprije se temelji na razaranju stanične membrane nakon čega slijedi curenje citoplazmatskog sadržaja i smrt stanice (Slika 3.). Budući da imaju pozitivno nabijenu polarnu „glavu“, oni stupaju u elektrostatske interakcije s negativno nabijenom staničnom membranom. Takav proces popraćen je prožimanjem hidrofobnog „repa“ u međumembranski prostor (lipidni dio dvosloja). Posljedica navedenog je deformacija membrane pri čemu dolazi do curenja citoplazmatskog sadržaja stanice i njene lize [2], [8].



**Slika 3.** Shematski prikaz predloženog mehanizma djelovanja kvaternih amonijevih soli na bakterijsku membranu [2]

Istraživanja su pokazala da QACs imaju različit učinak antimikrobnog djelovanja ovisno i o tome radili se o Gram-pozitivnoj ili Gram-negativnoj bakteriji. Razlog tomu je građa same bakterijske membrane. Kod Gram-pozitivnih prisutna je samo jedna stanična membrana i deblji peptidoglikanski sloj, dok Gram-negativne bakterije sadrže dvije stanične membrane između kojih se nalazi tanji peptidoglikanski sloj (Slika 4.) [2].



**Slika 4.** Shematski prikaz Gram-pozitivne i Gram-negativne membrane bakterija. Istaknuti su dijelovi lipidni dvosloj te peptidoglikanska ovojnica [13]

Upravo zbog takve građe, Gram-negativnim bakterijama je omogućena bolja zaštita te je manja djelotvornost antiseptika [2].

## 2.2. Bakterija *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* nepokretna je, Gram-pozitivna bakterija koja se nalazi na površini ljudske kože, u nosnom vestibulu i probavnom sustavu kao sastavni dio flore. Naziv roda dobila je po svom kuglastom obliku (koki) i po grozdastim nakupinama koje formira u kolonijama (stafilokoki). *S. aureus* na površini stijenke sadrži protein A koji omogućava vezanje na Fc-fragment imunoglobulina G. Zbog takve prirode imunosti ga sustav ne prepoznaje kao patogena [14]. Iako je *S. aureus* prirodni stanovnik nekih dijelova ljudskoga tijela, može izazvati velik broj infekcija. Vodeći je uzročnik upale pluća i drugih infekcija respiratornog trakta. Osim toga uzrokuje i kardiovaskularne infekcije, bakteremije, infekcije kirurških rana te artritis [15]. Širenje ove bakterije s čovjeka na čovjeka je moguće dodirnim ili kapljičnim putem. Tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća došlo je do velike epidemije meticilin rezistentnog *S. aureus* (MRSA). Takav soj bakterije sadrži gen koji ga čini rezistentnim na meticilin i na druge beta-laktamske antibiotike. Infekcije s rezistentnim bakterijama kao krajnji ishod mogu prouzročiti smrt ugrožene osobe te se za neke infekcije kao oblik liječenja upotrebljavaju antibiotici poput eritromicina, azitromicina i klindamicina [14], [16].

### 2.3. Rezistencija bakterija na kvaterne amonijeve soli

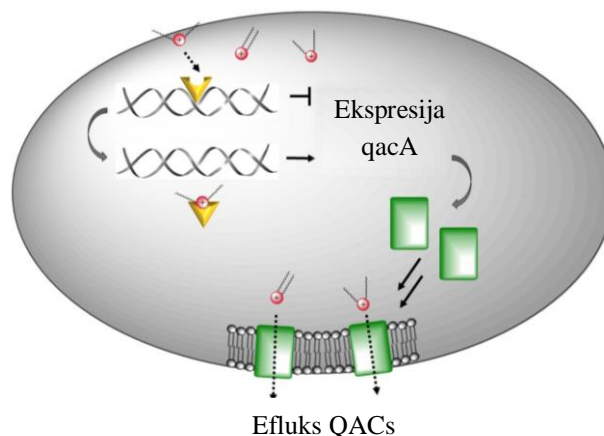
Mehanizam djelovanja kvaternih amonijevih soli (QACs) na bakterije provodi se na razini stanične membrane koja je temelj njihovog preživljavanja te se razvoj rezistencije smatrao gotovo nemogućim. Široka upotreba komercijalnih antimikrobnih QACs uzrokovala je njihovo rapidno nakupljanje u kanalizaciji, jedinicama za biološko pročišćavanje otpadnih voda i u površinskim vodama. Visoka stabilnost i niska reaktivnost ovih spojeva učinila je njihovu akumulaciju u okolišu neizbježnom [2]. Kao rezultat, mikroorganizmi ostaju u okolišu s prisutnim QACs u koncentracijama ispod vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), a takva okruženja postaju selektivna i pogodna za preživljavanje klonova s nižom osjetljivošću što u konačnici dovodi do evolucije i selekcije bakterija otpornih na QACs [12].

Bakterijska rezistencija može biti prirodno svojstvo stanice, kromosomski kontrolirano, pa govorimo o intrinzičnoj (urođenoj) rezistenciji kao što je sinteza određenih enzima koji uzrokuju razgradnju antiseptika. Tako Gram-negativne bakterije imaju tendenciju bolje otpornosti nego Gram-pozitivne kao što su bakterije roda *Staphylococcus*. Razlog tomu je različita građa bakterijskih stanica, budući da Gram-negativne bakterije imaju dvije stanične membrane. Osim urođene rezistencije, postoji i stečena. Naime, bakterijske stanice imaju sposobnost mutacija, pojedine sadrže plazmid koji predstavljaju samoreplicirajuću i ekstrakromosomsku DNA koja najčešće nosi gene rezistencije, a neke sadrže transpozone, odnosno male sekvence DNA koje se mogu premješati unutar genoma. Sve prethodno navedene sposobnosti bakterijskih stanica uzrokuju moguću pojavu rezistencije [1]. Bakterijske stanice izložene razrijeđenim koncentracijama QACs započinju s modifikacijama sastava stanične membrane ili povećanom ekspresijom sinteze efluks pumpi koje izbacuju QACs van stanice [12]. Važno je naglasiti da tolerancija bakterijskih stanica upućuje na reverzibilan proces koji omogućava preživljavanje stanice u povećanim koncentracijama antiseptika te se takvo svojstvo gubi uklanjanjem antiseptika. Suprotno tomu je pojam prave rezistencije koja omogućuje bakterijskoj stanici trajnu otpornost na široki raspon različitih koncentracija QACs. Zbog navedenih okolnosti, još uvijek nije poznato je li riječ o pravoj rezistenciji ili je u pitanju samo fenotipska tolerancija [2].

Efluks pumpe su transmembranski proteini koji stvaraju kanale u svrhu izbacivanja toksičnih spojeva van stanice kao što su QACs. Iste efluks pumpe identificirane su i u vrsti *Staphylococcus aureus*. Vrste roda *Staphylococcus* sadrže gene *qac* koji kodiraju efluks

pumpe te je poznato šest različitih Qac efluks pumpi kodiranih plazmidom. Najbolje proučena efluks pumpa je QacA. Kodirajući gen za QacA sekvenciran je iz *S. aureus* s plazmida pSK1. QacA sadrži 14 transmembranskih spiralnih zavojnica i 514 aminokiselina, iako je u međuvremenu otkriveno da neki *qacA* geni započinju od alternativnih start kodona, stvarajući kraći lanac od 504 ili 486 aminokiselina [17]. Osim toga, ključni kiseliniski ostatak asparaginske kiseline služi za prepoznavanje i izbacivanje mono- i bis-QACs putem pokretačke sile protona [2].

Za ekspresiju *qacA* gena potreban je transkripcijski regulator kojeg kodira gen *qacR*. Nastali protein, QacR, djeluje kao represor jer se veže na uzvodnu (intergensku, IR1) regiju gena *qacR* te blokira daljnju transkripciju. Ulaskom QACs u stanicu, QacR ih veže te disocira s IR1. Disocijacijom QacR, oslobođen je dio DNA molekule potreban za transkripciju *qacA* gena. Na taj način omogućena je transkripcija *qacA* gena, proizvodnja QacA efluks pumpi i efluks toksičnih QACs (Slika 5.). Dokazano je da QACs induciraju ekspresiju *qacA* čime je omogućeno preživljavanje bakterijske stanice [2], [17].



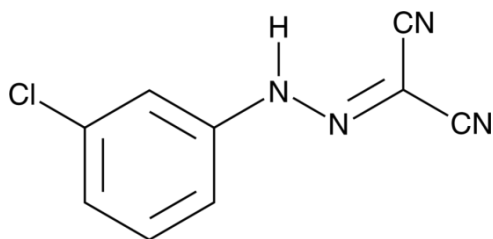
**Slika 5.** Mehanizam bakterijske rezistencije prema kvaternim amonijevim solima [2]

#### 2.4. Inhibitori efluks pumpi

Razvoj bakterijske rezistencije predstavlja sve veći izazov u liječenju raznoraznih bolesti diljem svijeta. Glavni razlog tomu je upravo hiperekspresija efluks pumpi koje smanjuju unutarstaničnu koncentraciju toksičnih spojeva. U konačnici, postavlja se pitanje kako sniziti aktivaciju efluks pumpi kako bi određeni spoj, u ovom slučaju komercijalna kvaterna amonijeva sol (QACs), postala dugoročno efikasna [18]? Moguća rješenja su inhibicija efluks pumpi ili sinteza antimikrobnih spojeva koji će biti njihovi lošiji supstrati.

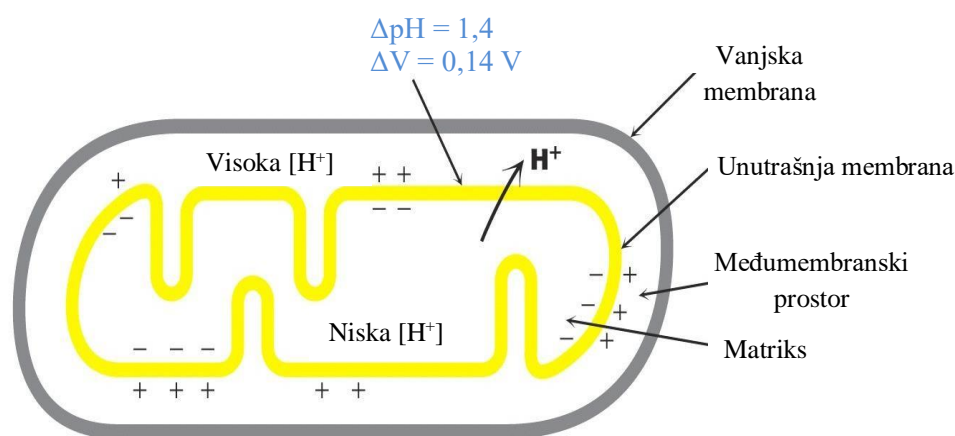
### 2.4.1. Karbonil cijanid m-klorofenil hidrazon i mehanizam djelovanja

Karbonil cijanid m-klorofenil hidrazon (CCCP) jedan je od inhibitora ATP-sintaze koji djeluje kao protonofor, odnosno kao translokator protona. Slaba je kiselina te manipulira proizvodnjom ATP-a [19]. Na Slici 6. prikazana je njegova građa.



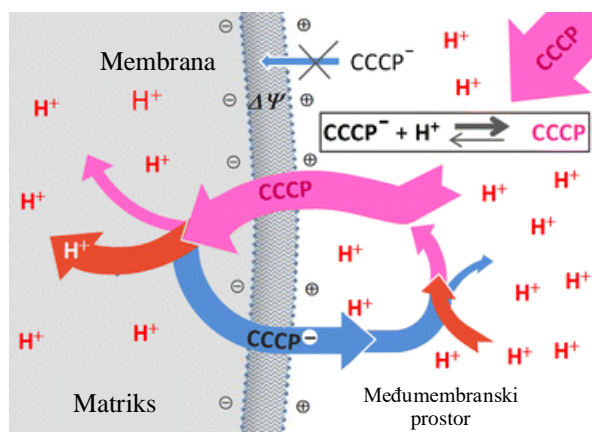
**Slika 6.** Kemijska struktura karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona [20]

Efluks pumpe koriste ATP kao izvor energije kako bi mogle eliminirati toksične spojeve u citosolu bakterijske stanice. Način kojim bi se mogla umanjiti efikasnost efluksa uočava se u smanjenju proizvodnje ATP-a. Tu odgovornost preuzima CCCP koji blokira proizvodnju ATP-a mijenjanjem membranskog potencijala. Naime, proizvodnja ATP-a se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija i povezana je s procesom oksidacijske fosforilacije. Na samom kraju oksidacijske fosforilacije dolazi do izbacivanja protona iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor. Zbog toga dolazi do stvaranja protonskog gradijenta i pozitivnog membranskog potencijala na vanjskoj strani unutarnje membrane, odnosno negativnog membranskog potencijala na unutrašnjoj strani unutarnje membrane (Slika 7.). Spomenuti uvjeti omogućavaju sintezu ATP-a pomoću ATP-sintetaze vraćanjem protona u matriks mitohondrija zajedno s proizvedenim ATP-om [21].



**Slika 7.** Shematski prikaz mitohondrijskih membrana te razdiobe protonskog i elektrokemijskog gradijenta [21]

CCCP ulazi u međumembranski prostor mitohondrija kroz vanjsku membranu. Zbog fizioloških uvjeta u međumembranskom prostoru (niska vrijednost pH), stupanj disocijacije CCCP-a neće biti velik te će kao neutralna molekula pomoću transportnih proteina prijeći iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija. Budući da je u matriksu vrijednost pH viša, CCCP disocira na  $\text{CCCP}^-$  i  $\text{H}^+$  što za posljedicu ima povišenje koncentracije protona u matriksu i rast pozitivnog membranskog potencijala na unutrašnjoj strani membrane. Negativno nabijeni CCCP zatim se ponovno vraća u međumembranski prostor, veže se s obilno prisutnim protonima te se postupak ponavlja (Slika 8.). Ovakav mehanizam djelovanja CCCP-a uzrokuje smanjenu proizvodnju ATP-a jer glavne pokretačke sile, gradijent protona i membranski potencijal, opadaju [22].



**Slika 8.** Shematski prikaz mehanizma djelovanja karbonil cijanid m-klorofenilhidrazona [23]

Smanjena proizvodnja ATP-a direktno utječe i na efikasnost efluks pumpi. Osim efluks pumpi, bakterijska stanica ATP troši i na osnovne metaboličke procese koje omogućuju njeno preživljavanje. Ukoliko se ona tretira s prevelikom koncentracijom CCCP-a, posljedica će biti njena smrt.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Pribor i uređaji

Potrošni materijal:

- Gumene rukavice
- Tubice (Falcon):
  - ✓ 2 mL
  - ✓ 15 mL
  - ✓ 20 mL
- Plastični stalci
- Staklene boce
- Nastavci za pipete (Thermo scientific)
- Jednokratne kivete za spektrofotometriju
- Staklene epruvete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Jednokratne mikrobiološke ušice („eze“)
- Parafilm folija
- Mikrotitarske pločice

Laboratorijski pribor:

- Automatske mikropipete (Eppendorf) :
  - ✓ 2-20  $\mu\text{L}$
  - ✓ 10-100  $\mu\text{L}$
  - ✓ 200-2000  $\mu\text{L}$
  - ✓ 100-1000  $\mu\text{L}$
- Automatska multikanalna mikropipeta (Thermo scientific)
- Plamenik (Fuego basic)
- Tehnička vaga
- Analitička vaga

Uređaji:

- Laminar (Miniflo)
- Inkubator (Gallenkamp)
- Inkubator s orbitalnom tresilicom (Gallenkamp)
- McFarland mjerač optičke gustoće - denzitometar (Biosan)
- UV/VIS spektrofotometar, Lambda Bio 40 (Perkin Elmer)
- Autoklav (Nuve)
- Centrifuga vortex (Biosan)

### 3.1.2. Kemikalije i otopine

Kemikalije:

- Mueller-Hinton medij (Biolife)
- Agar (Sigma-Aldrich)
- 28 mM CPC (Sigma-Aldrich)
- 26 mM BAB (Sigma-Aldrich)
- 21 mM cefotaksim (Sigma-Aldrich)
- 33 mM CCCP (Sigma-Aldrich)
- 96% etanol (Gram-mol)

Priprema otopina:

#### 1) Tekući Mueller-Hinton medij (MHB)

Za pripremu 500 mL tekućeg MHB otopljeno je 11,00 g Mueller-Hinton bujona u 500 mL destilirane vode. Pripremljena otopina autoklavirana je na 121°C i 103 421 Pa.

#### 2) Kruti Mueller-Hinton medij (MHB)

Za pripremu 300 mL čvrstog MHB otopljeno je 6,60 g Mueller-Hinton bujona i 4,50 g agara u 300 mL destilirane vode. Pripremljena otopina autoklavirana je na 121°C i 103 421 Pa.

#### 3) Tekući MHB s 20 µM CCCP

Za pripremu 50 mL tekućeg MHB s 20 µM CCCP pipetirano je 30,30 µL 33 mM CCCP u 49,97 mL MHB.

4) 400  $\mu$ M CPC

Za pripremu 1 mL 400  $\mu$ M CPC pipetirano je 14  $\mu$ L 28 mM CPC u 986  $\mu$ L MHB.

5) 100  $\mu$ M CPC

Za pripremu 1 mL 100  $\mu$ M CPC pipetirano je 3,6  $\mu$ L 28 mM CPC u 996,4  $\mu$ L MHB.

6) 400  $\mu$ M BAB

Za pripremu 1 mL 400  $\mu$ M BAB pipetirano je 15  $\mu$ L 26 mM BAB u 985  $\mu$ L MHB.

7) 100  $\mu$ M BAB

Za pripremu 1 mL 100  $\mu$ M BAB pipetirano je 3,8  $\mu$ L 26 mM BAB u 996,2  $\mu$ L MHB.

8) 500  $\mu$ M cefotaksim

Za pripremu 1 mL 500  $\mu$ M cefotaksima pipetirano je 24  $\mu$ L 21 mM cefotaksima u 976  $\mu$ L MHB.

9) 200  $\mu$ M CCCP

Za pripremu 1 mL 200  $\mu$ M CCCP pipetirano je 6  $\mu$ L 33 mM CCCP u 994  $\mu$ L 96% etanolu.

### 3.1.3. Mikroorganizmi

Korištena je bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. Navedena bakterija sadrži gene koji kodiraju Qac efluks pumpe [17]. Budući da je promatran potencijal razvoja rezistencije posredovan Qac efluks pumpama, *S. aureus* ATCC 33591 predstavlja prikladan predmet istraživanja.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase

Izrada baždarnog pravca preduvjet je pravilnog provođenja metode mikrodilucije čiji rezultati ovise o točno određenom broju bakterijskih stanica. Postoji nekoliko metoda i uređaja koji se koriste za određivanje broja bakterijskih stanica, međutim, u našem

laboratoriju jedina raspoloživa metoda je spektrofotometrijsko određivanje gustoće bakterijske biomase. Kako bi se procijenio broj bakterijskih stanica, potrebno je dovesti u vezu optičku gustoću bakterijske biomase s brojem bakterijskih stanica ili brojem jedinica koje formiraju koloniju (engl. *colony forming units*).

### 1. DAN – Priprema metabolički aktivnog soja

Uzorak glicerol štoka dugoročno pohranjenih stanica *Staphylococcus aureus* uzet je jednokratnom ezom i razmazan na čvrstoj Mueller-Hinton hranjivoj podlozi (MHB). Kulture bakterija na Petrijevim pločama inkubirane su 24 h na 37°C. Petrijeve ploče s bakterijama čuvaju se na 4°C.

### 2. DAN – Postavljanje prekončne kulture

3 mL tekućeg MHB inokulirano je bakterijskom kolonijom koja se s jednokratnom ezom prenese s Petrijeve ploče. Tubica se ostavi preko noći u inkubatoru s orbitalnom tresilicom na 220 rpm i 37°C.

### 3. DAN

#### 1) Razrjeđivanje prekončne kulture

Prekončna kultura bakterijskih stanica, razrijedi se 10 puta na način da se u tubicu od 20 mL prenese 18 mL MHB i 2 mL prekončne kulture. Kultura se potom ostavi 30 min u inkubatoru s orbitalnom tresilicom na 220 rpm i 37°C.

#### 2) Serijsko razrjeđenje po bazi 10

Pripremljeno je 11 tubica s po 9 mL MHB. 1 mL prethodno pripremljene bakterijske kulture doda se u prvu tubicu. Nova bakterijska kultura je vorteksirana kako bi bakterijske stanice bile jednako suspendirane u mediju jer se nastavlja postupak serijskog razrjeđenja gdje se uzima 1 mL bakterijske kulture iz prve tubice i prenosi u drugu koja se također vorteksira. Postupak se ponavlja sve do zadnje tubice. Ovim postupkom dobivena su razrjeđenja po bazi 10, odnosno svaka iduća tubica je 10 puta razrijeđenija od prethodne.

#### 3) Nasijavanje bakterijskih kultura

Za nasijavanje bakterija korištene su pripremljene razrijeđene bakterijske kulture po bazi 10. Za svako razrjeđenje nasijane su po tri ploče s 50 µL bakterijske kulture. Pripremljene ploče ostavljene su preko noći u inkubatoru na 37°C kako bi se idući dan prebrojale narasle kolonije.

#### 4) Serijsko razrjeđenje po bazi 2

Pripremljeno je 7 tubica s po 5 mL MHB. Ponovljen je isti postupak razrjeđenja kao i u razrjeđivanju po bazi 10 s iznimkom što se umjesto 1 mL bakterijske kulture prenosi 5 mL. Na taj način je svaka iduća tubica za pola razrijeđenija od prethodne.

#### 5) Mjerenje OD<sub>600</sub> i McF vrijednosti

Za svako razrjeđenje po bazi 2 mjerena je vrijednost OD<sub>600</sub> (engl. *optical density*, optička gustoća bakterija) i McF (specifična skala mjerenja koncentracije bakterija po mL).

Mjerenje OD<sub>600</sub> izvodilo se na spektrofotometru baždarenom s čistim MHB. Pripremljeno je 8 kiveta s 1 mL bakterijskih kultura s različitim razrjeđenjem. Jedna je služila za mjerenje vrijednosti početne kulture, a preostalih 7 za razrjeđenja po bazi 2. Sva mjerenja su zapisana za potrebe izrade baždarnog pravca.

Mjerenje u McF izvodilo se na denzitometru s odgovarajućim jedinicama. Pripremljeno je 8 staklenih epruveta s 3 mL različito razrijeđenih bakterijskih kultura. Ponovno, jedna je služila za mjerenje vrijednosti početne kulture, a preostalih 7 za razrjeđenja po bazi 2.

#### 4. DAN – Brojanje kolonija

Brojanje bakterijskih kolonija omogućuje izradu baždarnog pravca računanjem CFU/mL (engl. *colony forming units*) po sljedećoj formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen nasijane bakterijske kulture}}$$

Za svako razrjeđenje izračunata je srednja vrijednost broja kolonija na tri ploče. Ploče s velikim brojem kolonija koje je bilo nemoguće prebrojati, označene su kao TMTC (engl. *too many to count*).

Baždarni pravac na apscisi nosi oznaku OD<sub>600</sub>, odnosno McF, i odgovarajuće mjerene vrijednosti, a na ordinati nosi oznaku CFU/mL.

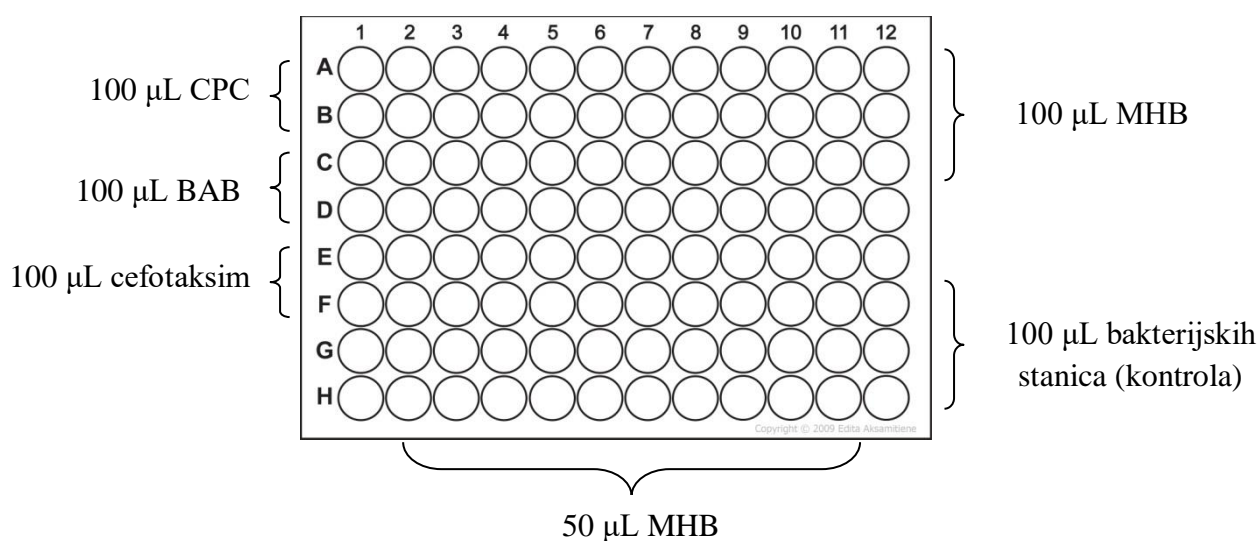
### 3.2.2. Metoda mikrodilucije

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antimikrobnih spojeva određuju se klasičnom metodom mikrodilucije. Temelj metode je serijsko razrjeđenje ispitivane tvari u prisustvu jednakog broja bakterijskih stanica. Na taj način, omogućeno je praćenje rasta bakterija u nizu različitih koncentracija ispitivane tvari te određivanje MIK vrijednosti na temelju izostanka zamućenja kojeg predstavljaju bakterijske stanice [24]. U svrhu izrade ovog rada korišteni spojevi za određivanje MIK vrijednosti su, prije spomenuti, cetilpiridinijev klorid (CPC), benzalkonijev bromid (BAB) i karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP).

#### 3.2.2.1 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije uz prisustvo komercijalnih kvaternih amonijevih soli

Pripremi se bakterijska kultura u logaritamskoj fazi rasta kojoj se pomoću baždarnog pravca odredi točan broj CFU/mL. Bakterijska kultura razrijedi se do koncentracije  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL.

Mikrotitarska pločica priređena je na način koji opisuje prikaz:



Cefotaksim u postupku mikrodilucije služi kao kontrola pravilnog provođenja postupka. Osim navedenog, čisti MHB i bakterijske stanice u 12-om stupcu također služe kao kontrola (MHB nakon prekoćne inkubacije mora ostati nezamućen što znači da nema kontaminacije medija, a uzorak bakterijskih stanica mora se zamutiti).

Multikanalnom mikropipetom u prvi stupac mikrotitarske pločice pipetirano je 100 µL spojeva koji su potom serijski razrijeđeni u MHB uz konstantno resuspendiranje. Time je

dobiven širok spektar različitih koncentracija pri kojima je određen MIK. Odgovarajuća koncentracija spojeva u svakom stupcu prikazana je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Koncentracije cetilpiridinijeva klorida (CPC), benzalkonijeva bromida (BAB) i cefotaksima (Cftx.) u nizu mikrotitarske pločice

**Koncentracije spojeva ( $\mu\text{M}$ )**

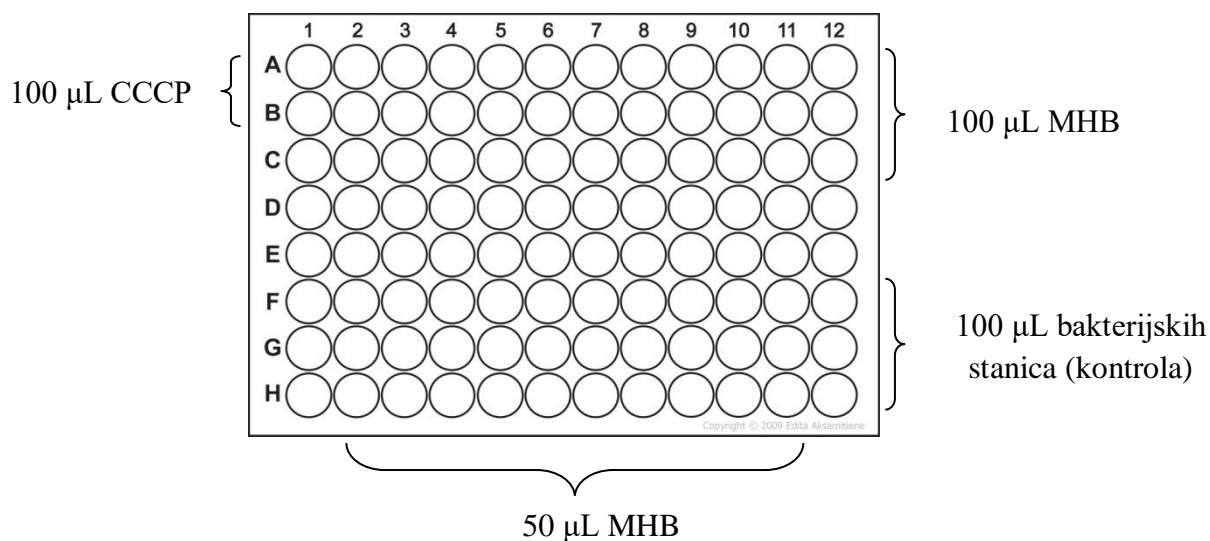
	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>5</sub></b>	<b>C<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>7</sub></b>	<b>C<sub>8</sub></b>	<b>C<sub>9</sub></b>	<b>C<sub>10</sub></b>	<b>C<sub>11</sub></b>
<b>CPC</b>	200	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,7	0,4	0,2
<b>BAB</b>	200	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,7	0,4	0,2
<b>Cftx.</b>	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0,2

Početna bakterijska kultura mora biti razrijeđena do mjere gdje CFU/mL iznosi  $5 \cdot 10^5$ . Početnoj kulturi izmjeren je  $OD_{600}$  na spektrofotometru baždarnog pri 600 nm čistim MHB. Iz jednadžbe baždarnog pravca i izmjerene  $OD_{600}$  izračunat je CFU/mL početne bakterijske kulture. Dovodeći u omjer vrijednosti poznatog i potrebnog ( $5 \cdot 10^5$ ) CFU/mL te poznatog i potrebnog volumena bakterijskih stanica, dobiva se potrebni volumen koji je otpipetiran u poznat volumen MHB. Multikanalnom mikropipetom pipetirano je 50  $\mu\text{L}$  novopripremljene bakterijske kulture u svaki stupac mikrotitarske pločice počevši od 11. stupca (najmanja koncentracija spojeva). Svako ponovno pipetiranje bakterija se provodi uz obavezno resuspendiranje. U posljednje 3 jažice 12. stupca mikrotitarske pločice pipetirano je po 100  $\mu\text{L}$  bakterijskih stanica. Pripremljena pločica ostavljena je preko noći na inkubaciji pri  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona

Pripremi se bakterijska kultura u logaritamskoj fazi rasta kojoj se pomoću baždarnog pravca odredi točan broj CFU/mL. Bakterijska kultura razrijedi se do koncentracije  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL.

Mikrotitarska pločica priređena je na način koji opisuje prikaz:



Postupak daljnje mikrodilucije i priprema bakterijske kulture proveden je jednako kao u prethodnom slučaju. Određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP) omogućen je i uvid pri kojoj koncentraciji CCCP djeluje toksično na bakterije. Kako bi rezultati bili što vjerodostojniji samom antimikrobnom djelovanju komercijalnim kvaternim amonijevim solima (QACs), u idućim postupcima korištena je manja koncentracija CCCP-a nego što to predviđa MIK. Tablica 2. prikazuje koncentracije CCCP-a u nizu mikrotitarske pločice.

**Tablica 2.** Koncentracije karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP) u nizu mikrotitarske pločice

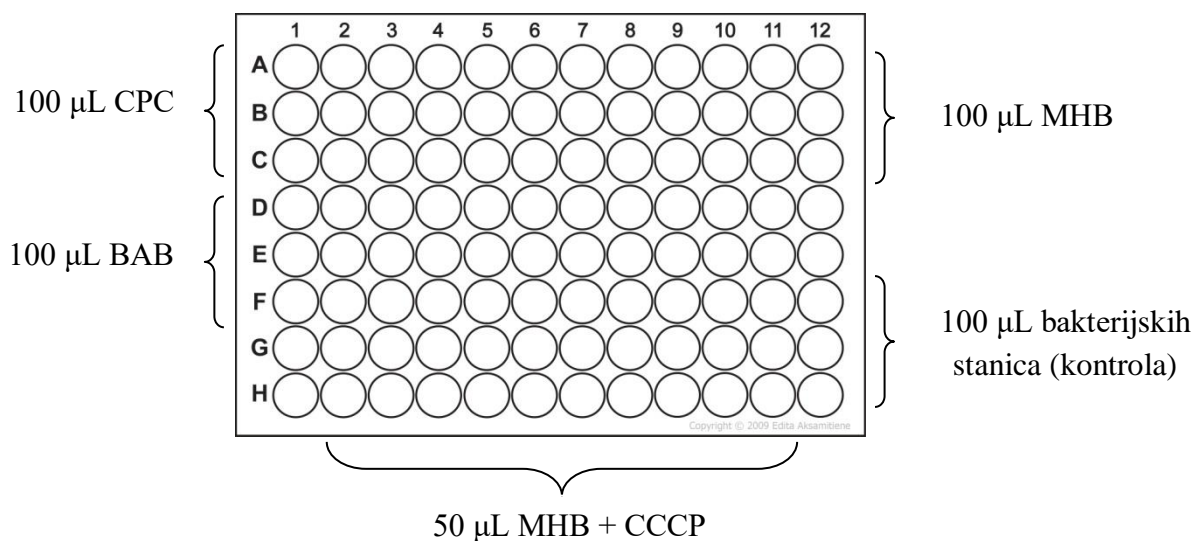
Koncentracije spojeva ( $\mu\text{M}$ )											
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>
<b>CCCP</b>	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1

### 3.2.2.3 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije uz prisustvo komercijalnih kvaternih amonijevih soli i karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona

Pripremi se bakterijska kultura u logaritamskoj fazi rasta kojoj se pomoću baždarnog pravca odredi točan broj CFU/mL. Bakterijska kultura razrijedi se do koncentracije  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL.



Mikrotitarska pločica priređena je na način koji opisuje prikaz:



Postupak daljnje mikrodilucije i priprema bakterijske kulture izvođen je jednako kao u prethodnim. Glavna razlika od ostalih mikrodilucija je medij s otopljenim karbonil cijanid m-klorofenil hidrazonom (CCCP). Koncentracije ispitanih spojeva u nizu mikrotitarske pločice prikazane su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Koncentracije cetilpiridinijeva klorida (CPC) i benzalkonijeva bromida (BAB) u nizu mikrotitarske pločice

**Koncentracije spojeva (µM)**

	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>
<b>CPC</b>	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05
<b>BAB</b>	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase

Izrada grafa koji prikazuje broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase bio je prvi korak kako bi u daljnjim metodama mikrodilucije mogli raditi uvijek s istim brojem bakterijskih stanica u svrhu rezultata koji se mogu uspoređivati. Tablica 4. prikazuje informacije za pojedina razrjeđenja. Kratica TMTC (engl. *too many to count*) označava prevelik broj kolonija na Petrijevim zdjelicama te one nisu brojane. Stoga, broj bakterijskih kolonija za razrjeđenja od  $10^{-1}$  do  $10^{-4}$  nisu brojana nego označena s TMTC. Za razrjeđenja od  $10^{-5}$  do  $10^{-7}$  prikazan je broj kolonija za sve 3 nasijane ploče, njihova srednja vrijednost i izračunat CFU/mL po sljedećoj formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen nasijane bakterijske kulture}}$$

**Tablica 4.** Prikaz izbrojanih kolonija na pločama, srednje vrijednosti broja kolonija i vrijednosti izračunatog CFU/mL

Razrjeđenje $10^{-4}$				
PLOČA 1	PLOČA 2	PLOČA 3	Srednja vrijednost	CFU/mL
Broj kolonija	Broj kolonija	Broj kolonija		
TMTC	TMTC	TMTC	TMTC	TMTC

Razrjeđenje $10^{-5}$				
PLOČA 1	PLOČA 2	PLOČA 3	Srednja vrijednost	CFU/mL
Broj kolonija	Broj kolonija	Broj kolonija		
273	242	218	244,3333333	4,89E+08

Razrjeđenje $10^{-6}$				
PLOČA 1	PLOČA 2	PLOČA 3	Srednja vrijednost	CFU/mL
Broj kolonija	Broj kolonija	Broj kolonija		
35	32	18	28,33333333	5,67E+08

Razrjeđenje $10^{-7}$				
PLOČA 1	PLOČA 2	PLOČA 3	Srednja vrijednost	CFU/mL
Broj kolonija	Broj kolonija	Broj kolonija		
2	2	1	1,666666667	3,33E+08

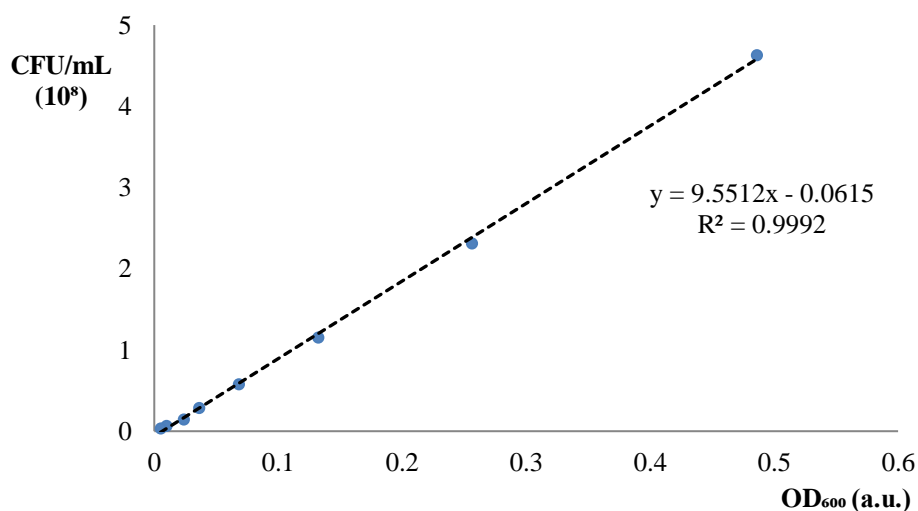
Razrjeđenje $10^{-8}$				
PLOČA 1	PLOČA 2	PLOČA 3	Srednja vrijednost	CFU/mL
Broj kolonija	Broj kolonija	Broj kolonija		
NEMA VIDLJIVOG RASTA				

Za izradu baždarnog dijagrama bilo je potrebno dobiti reprezentativnu vrijednost CFU/mL početne bakterijske kulture, O/N (engl. *over night*), razrijeđene 10 puta. Zbog toga je uzeta u obzir srednja vrijednost prethodno dobivenih CFU/mL. Za svako iduće razrjeđenje po bazi dva, dobivena vrijednost CFU/mL umanjena je dva puta što je prikazano na Tablici 5. Osim računski dobivenih CFU/mL u Tablici 5. prikazane su i mjerene vrijednosti OD<sub>600</sub>.

**Tablica 5.** Prikazane vrijednosti OD<sub>600</sub> i CFU/mL za izradu baždarnog dijagrama

razrjeđenje	OD <sub>600</sub>	CFU/mL (10 <sup>8</sup> )
O/N 10X razr.	0,486	4,6289
1/2	0,256	2,3144
1/4	0,132	1,1572
1/8	0,068	0,5786
1/16	0,036	0,2893
1/32	0,024	0,1447
1/64	0,01	0,0723
1/128	0,005	0,0362

Na temelju Tablice 5. izrađen je dijagram prikazan na Slici 9. Dijagram prikazuje ovisnost broja bakterijskih stanica (CFU/mL) o optičkoj gustoći bakterijske biomase (OD<sub>600</sub>). Pomoću dijagrama i jednadžbe pravca može se saznati CFU/mL za bilo koju pripremljenu bakterijsku kulturu *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 te u eksperiment krenuti s istim brojem bakterija.



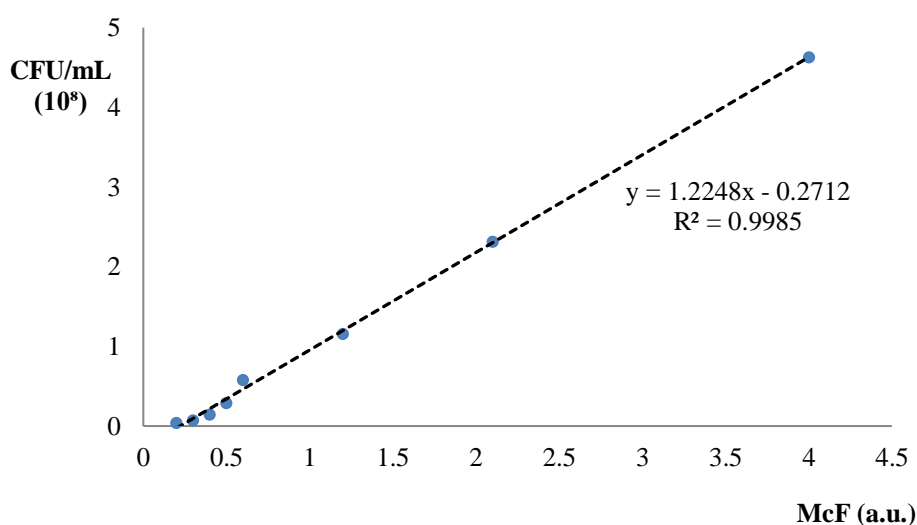
**Slika 9.** Grafički prikaz broja bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase (OD<sub>600</sub>)

Mjerenja optičke gustoće provedena su i na denzitometru (McF). Tablica 6. prikazuje mjerene vrijednosti McF i CFU/mL za svako razrjeđenje.

**Tablica 6.** Prikazane vrijednosti McF i CFU/mL za izradu baždarnog dijagrama

razrjeđenje	McF	CFU/mL (10 <sup>8</sup> )
O/N 10X razr.	4	4,6289
1/2	2,1	2,3144
1/4	1,2	1,1572
1/8	0,6	0,5786
1/16	0,5	0,2893
1/32	0,4	0,1447
1/64	0,3	0,0723
1/128	0,2	0,0362

Na temelju navedenih podataka izrađen je baždarni dijagram koji prikazuje broj bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase (McF), (Slika 10.)



**Slika 10.** Grafički prikaz broja bakterijskih stanica (CFU/mL) u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijske biomase (McF)

#### 4.1.2. Metoda mikrodilucije

Metoda mikrodilucije služila je za ispitivanje antimikrobnog potencijala komercijalnih kvaternih amonijevih soli (QACs), cetilpiridinijevog klorida (CPC) i benzalkonijevog bromida (BAB), kao i njihov potencijal razvoja rezistencije posredovan Qac efluks pumpama. Ispitivanja su provedena na bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 pri čemu su određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ovih spojeva bez i u prisustvu inhibitora

ATP-sintaze, karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP) te su odgovarajući rezultati prikazani u Tablici 7. Budući da CCCP smanjuje koncentraciju H<sup>+</sup> iona u međumembranskom području mitohondrija, što uzrokuje smanjenu sintezu ATP-a pa time i aktivnost efluks pumpi, ispitana je i njegova MIK vrijednost koja iznosi 50 μM. Kako bi rezultati bili vjerodostojni samom djelovanju QACs, u eksperimentu je korištena manja koncentracija od MIK-a u iznosu od 10 μM. U Tablici 7. uočljiva je smanjena MIK vrijednost u prisustvu CCCP-a. Za CPC umanjeno je 16 puta, a za BAB 31 puta.

**Tablica 7.** Prikaz rezultata minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) komercijalnih kvaternih amonijevih soli bez i u prisustvu karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP)

	MIK bez CCCP (μM)	MIK s CCCP-om (μM)
<b>CPC</b>	6,3	0,4
<b>BAB</b>	25	0,8

#### 4.2. Rasprava

Razvoj rezistentnih sojeva bakterija na kvaterne amonijeve soli (QACs) postaje sve veći problem. Stoga se proučavaju moguća rješenja poput inhibicije efluks pumpi ili sinteze antimikrobnih spojeva koji će biti njihovi lošiji supstrati [2]. Inhibicija efluks pumpi temelji se na smanjenju koncentracije H<sup>+</sup> iona što uzrokuje manju količinu raspoloživog ATP-a pa ga bakterija koristi za preživljavanje, a ne za efluks [22]. Zbog navedenog, u ovom završnom radu ispitane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) komercijalnih QACs bez i u prisustvu inhibitora karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP) na bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Dosadašnji rezultati radova pokazuju da komercijalni QACs djeluju toksično na bakterijske stanice uzrokujući njenu smrt [2]. U ovom radu ispitane su komercijalne kvaterne amonijeve soli cetilpiridinijev klorid (CPC) i benzalkonijev bromid (BAB). Minimalne inhibitorne koncentracije CPC-a (MIK 6,3 μM) i BAB-a (MIK 25 μM) u skladu su s već objavljenim podacima u literaturi 9 [1], [9]. Dobiveni rezultati ukazuju da CPC ima veći antimikrobni potencijal nego li BAB budući da je njegov MIK manji. Rezultati antimikrobnih ispitivanja, provedeni u prisustvu CCCP-a, ukazuju da se MIK vrijednost smanjuje za 16, odnosno 31 put što ukazuje kako je CPC lošiji supstrat za Qac efluks pumpe od BAB-a. Navedeni rezultati također su u skladu s literaturom [25]. Ovim istraživanjem potvrđeno je djelovanje CCCP-a i ponuđeno eventualno rješenje u borbi protiv razvoja rezistentnih bakterija uzrokovano Qac efluks pumpama.

Budući smjer u području istraživanja kvaternih amonijevih spojeva svakako će obuhvatiti ispitivanja o spojevima koji imaju sličan efekt kao i CCCP, u kojoj mjeri bi se rezultati razlikovali s Gram-negativnim bakterijama i o tome koje QACs je najbolje upotrebljavati. Potrebno je sintetizirati nove alternative komercijalnih QACs koji su ujedno lošiji supstrati efluks pumpi. Odgovor možda leži u aminokiselinama koje grade efluks pumpu. Već je poznato da efluks pumpa QacA sadrži ključni kiselinski ostatak asparaginske kiseline koji služi za efikasno prepoznavanje i izbacivanje mono- i bis-QACs uz utrošak ATP-a. Međutim, istraživanja su pokazala da efluks pumpa QacB umjesto asparaginske kiseline sadrži alanin – nenabijenu aminokiselinu. Stoga, QacB mnogo specifičnije prepoznaje mono-QACs nego li bis-QACs [2]. Daljnja istraživanja efluks pumpi, kao i potencijala razvoja rezistencije prema različitim supstratima, zasigurno je smjer budućih istraživanja u području kvaternih amonijevih soli.

## 5. ZAKLJUČAK

Pomoću rezultata ovog završnog rada može se zaključiti da su korištene komercijalne kvaterne soli (QACs), cetilpiridinijev klorid (CPC) i benzalkonijev bromid (BAB), uistinu supstrati Qac efluks pumpi.

Metodom mikrodilucije utvrđena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) CPC-a i BAB-a uz i bez prisustva karbonil cijanid m-klorofenil hidrazona (CCCP) na bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. Pretpostavka da će MIK biti manji u prisustvu CCCP-a je potvrđena. Uzimajući u obzir da se MIK za CPC umanjio 16 puta, a za BAB 31 put, može se zaključiti da je antimikrobni potencijal dvaju komercijalnih QACs veći pri odsustvu CCCP-a. Sukladno tome, potvrđeno je i djelovanje CCCP-a koji snižava koncentraciju H<sup>+</sup> iona u međumembranskom području mitohondrija, što uzrokuje smanjenu sintezu ATP-a pa time i aktivnost efluks pumpi.

Potvrđena je i pretpostavka da Qac efluks pumpe uzrokuju razvoj rezistencije bakterije *S. aureus* ATCC 33591 što predstavlja sve veći razlog za zabrinutost. Metoda korištena u ovom radu uz pomoć CCCP-a ukazuje na potencijalno rješenje navedenog problema.

## 6. LITERATURA

- [1] G. McDonnell, A. D. Russell, L. Operations, and S. Louis, "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance," 1999. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/cmr>
- [2] M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole, and W. M. Wuest, "Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance," *ACS Infectious Diseases*, vol. 1, no. 7. American Chemical Society, pp. 288–303, Jan. 08, 2016. doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00047.
- [3] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, and E. M. Kosower, *Introduction to organic chemistry*, Fourth edition. New Jersey, 1998.
- [4] "Citotoksičnost i antioksidacijska aktivnost kvaternih amonijevih spojeva piridinijeva-4-aldoksima." [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:268179>
- [5] J. Juraj, "Sinteza kvaternih amonijevih soli piperidina s potencijalnim antibaktericidnim djelovanjem Faletar, Mihovil." [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:629782>
- [6] J. Fisher, "Cleaning procedures in the factory | Types of Disinfectant," *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp. 1382–1385, Jan. 2003, doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00249-2.
- [7] L. Bazina, "Kvaterni amonijevi spojevi – antimikrobni potencijal i bakterijska rezistencija."
- [8] C. P. Gerba, "Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 2. American Society for Microbiology, pp. 464–469, 2015. doi: 10.1128/AEM.02633-14.
- [9] X. Mao *et al.*, "Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance," 2020. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aac>
- [10] F. L. Short *et al.*, "Benzalkonium chloride antagonises aminoglycoside antibiotics and promotes evolution of resistance," *EBioMedicine*, vol. 73, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103653.



- [11] N. A. Asyiqin Anas, Y. W. Fen, N. A. Yusof, N. A. S. Omar, N. S. Md Ramdzan, and W. M. E. M. Mohd Daniyal, “Investigating the properties of cetyltrimethylammonium bromide/hydroxylated graphene quantum dots thin film for potential optical detection of heavy metal ions,” *Materials*, vol. 13, no. 11, Jun. 2020, doi: 10.3390/ma13112591.
- [12] Y. Jiao, L. na Niu, S. Ma, J. Li, F. R. Tay, and J. hua Chen, “Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance,” *Progress in Polymer Science*, vol. 71. Elsevier Ltd, pp. 53–90, Aug. 01, 2017. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001.
- [13] “Differences between Gram-negative and Gram-positive bacteria. | Download Scientific Diagram.” [https://www.researchgate.net/figure/Differences-between-Gram-negative-and-Gram-positive-bacteria\\_fig2\\_357901900](https://www.researchgate.net/figure/Differences-between-Gram-negative-and-Gram-positive-bacteria_fig2_357901900) (accessed Sep. 10, 2022).
- [14] A. Giroto, “Kinetika rasta bakterije staphylococcus aureus u proteinskim dodacima prehrani na bazi sirutke.” [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:350525>
- [15] G. Y. C. Cheung, J. S. Bae, and M. Otto, “Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus,” *Virulence*, vol. 12, no. 1. Bellwether Publishing, Ltd., pp. 547–569, 2021. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- [16] D. Nathwani, P. G. Davey, and C. A. Marwick, “MRSA: treating people with infection,” 2009. [Online]. Available: [www.clinicalevidence.com](http://www.clinicalevidence.com)
- [17] T. Wassenaar, D. Ussery, L. Nielsen, and H. Ingmer, “ Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in Staphylococcus species ,” *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, vol. 5, no. 1, pp. 44–61, Mar. 2015, doi: 10.1556/eujmi-d-14-00038.
- [18] H. Y. Mahmood, S. Jamshidi, M. Sutton J., and K. M. Rahman, “Current Medicinal Chemistry The International Journal for Timely In-depth Reviews in Medicinal Chemistry,” 2016.
- [19] J. O. Sekyere and D. G. Amoako, “Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae,” *Front Microbiol*, vol. 8, no. FEB, Feb. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00228.

- [20] “CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, NSC 88124, CAS Number: 555-60-2) | Cayman Chemical.” <https://www.caymanchem.com/product/25458/cccp> (accessed Sep. 10, 2022).
- [21] doc dr sc Viljemka Bučević Popović, “Oksidacijska fosforilacija.”, interna predavanja
- [22] J. Plášek, D. Babuka, and M. Hoefler, “H<sup>+</sup> translocation by weak acid uncouplers is independent of H<sup>+</sup> electrochemical gradient,” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2017 49:5, vol. 49, no. 5, pp. 391–397, Sep. 2017, doi: 10.1007/S10863-017-9724-X.
- [23] “Mechanism of uncouplers’ action. a CCCP-mediated proton influx into... | Download Scientific Diagram.” [https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-uncouplers-action-a-CCCP-mediated-proton-influx-into-yeast-cytosol-or\\_fig3\\_319677035](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-uncouplers-action-a-CCCP-mediated-proton-influx-into-yeast-cytosol-or_fig3_319677035) (accessed Sep. 10, 2022).
- [24] D. Sadiku, “Antibakterijsko djelovanje ekstrakta i meda obične planike (arbutus unedo l.) na uropatogenebakterije.” [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:146446>
- [25] R. M Abd El-Baky, T. Sandle, J. John, G. E.-D. AA Abuo-Rahma, and H. F Hetta, “A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant Staphylococcus aureus,” 2019.