

Antimikrobna aktivnost kvaternih fosfonijevih spojeva

Močić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:414772>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Matea Močić

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST
KVATERNIH FOSFONIJEVIH SPOJEVA**

Završni rad

Split, 2024.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Matildi Šprung na pruženoj prilici odrađivanja eksperimentalnog završnog rada. Hvala na izdvojenom vremenu, svim vrijednim savjetima i podijeljenom znanju koje sam imala priliku implementirati u svoj rad

Veliko hvala i asistentici Doris Crnčević mag. educ. biol. et chem. koja mi je olakšala cijeli ovaj proces svojom podrškom, pomoći te nesebičnim dijeljenjem vlastitoga znanja i iskustva.

Hvala izv. prof. dr. sc. Renati Odžak na ustupljenim spojevima bez kojih ovaj rad ne bi bio ostvariv.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST KVATERNIH FOSFONIJEVIH SPOJEVA

Matea Močić

Antimikrobna rezistencija predstavlja globalni problem javno-zdravstvenog sustava. U borbi protiv mikroorganizama dosada su korišteni visoko djelotvorni kvaterni amonijevi spojevi (QACs). Porastom uporabe dezinficijensa i antiseptika niže koncentracije ovih spojeva završile su u otpadnim vodama pri čemu su bakterije u kontaktu s istima počele razvijati rezistenciju. U potrazi za novim antimikrobnim agensima sintetizirani su kvaterni fosfonijevi spojevi (QPCs). Njihova aktivnost pokazala je obećavajuće rezultate, stoga se znanost usmjerava prema sintezi novih inačica ovih spojeva. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost nekomercijalnih kvaternih fosfonijevih spojeva sintetiziranih na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu oznaka: TPP-BnAc, TPP-PhAc, TPP-Bn, TPP-16 i TPP-14. Ispitivanja su provedena na bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 koristeći metodu mikrodilucije. Ispitivanje je pokazalo da TPP-BnAc, TPP-PhAc i TPP-Bn posjeduju vrlo nisku antimikrobnu aktivnost, dok spojevi TPP-16 i TPP-14 imaju zadovoljavajuću antimikrobnu aktivnost, u skladu s dosadašnjom literaturom. Sve navedeno dovodi do zaključka da kvaterni fosfonijevi spojevi predstavljaju dobru polaznu točku za daljnji nastavak istraživanja u potrazi za novim antimikrobnim djelotvornijim spojevima.

Ključne riječi: kvaterni fosfonijevi spojevi, metoda mikrodilucije, MIK

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

Rad sadrži: 26 stranica, 1 grafički prikaz, 10 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Matilda Šprung

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

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Matilda Šprung

izv. prof. dr. sc. Renata Odžak

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

Rad prihvaćen: 13. rujna 2024.

Basic documentation card

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

B. Sc. Thesis

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF QUATERNARY PHOSPHONIUM COMPOUNDS

Matea Močić

Antimicrobial resistance is a significant global public health threat. Quaternary ammonium compounds (QACs) have been widely used as highly effective agents against microorganisms. However, with the growing use of disinfectants and antiseptics, lower concentrations of these compounds have entered wastewater, leading bacteria to develop resistance. In response, researchers have focused on developing new antimicrobial agents, such as quaternary phosphonium compounds (QPCs), which have shown promising results. This thesis investigates the antimicrobial activity of non-commercial quaternary phosphonium compounds synthesized at the Faculty of Science in Split, specifically TPP-BnAc, TPP-PhAc, TPP-Bn, TPP-16, and TPP-14. Using the microdilution method, antimicrobial activity was determined on the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The results revealed that TPP-BnAc, TPP-PhAc, and TPP-Bn exhibit low antimicrobial activity, while TPP-16 and TPP-14 display potent activity consistent with previous findings. These results suggest that quaternary phosphonium compounds offer a promising foundation for further research in the development of more effective antimicrobial agents.

Keywords: quaternary phosphonium compounds, microdilution method, MIC

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

Thesis consists of: 26 pages, 1 figure, 10 tables and 18 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. Associate Professor

Renata Odžak, Ph.D. Associate Professor

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

Thesis accepted: 13th September 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Kvaterni fosfonijevi spojevi.....	2
2.2. Bakterija <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.3. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	4
2.4. Struktura bakterijske membrane.....	5
2.5. Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja.....	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Materijali.....	7
3.1.1. Pribor i uređaji.....	7
3.1.2. Kemikalije i otopine.....	8
3.1.3. Kvaterni fosfonijevi spojevi i njihove strukture.....	10
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura.....	12
3.2.2. Određivanje broja bakterijskih stanica.....	12
3.2.3. Mjerenje broja bakterijskih stanica na brojaču mikrobnih stanica Quantum Tx.....	13
3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	13
3.2.5. Određivanje IC ₅₀ vrijednosti.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Priprema razrijeđene bakterijske biomase.....	17
4.2. Broj bakterijskih stanica po mililitru.....	18
4.3. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK).....	20
4.4. IC ₅₀ vrijednost.....	22
4.5. Rasprava.....	23
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

U borbi protiv raznih mikroorganizama i njima uzrokovanih bolesti čovjek je proizveo dezinficijense i antiseptike koji su i danas inkorporirani u našu svakodnevicu. Posljednjih sto godina u uporabi su dezinficijensi na bazi kvaternih amonijevih spojeva (QACs) kao aktivnih sastojaka. Zbog svoje dostupnosti, jednostavne pripreme i širokog spektra djelovanja pokazali su se idealnim izborom u borbi protiv patogenih vrsta. Za takve dezinficijense vjerovalo se da su otporni na razvoj rezistencije, međutim epidemijom virusa SARS-CoV-2 došlo je do prekomjerne uporabe koja je, zajedno sa dospijećem spojeva u otpadne vode, ipak rezultirala razvojem rezistencije [1].

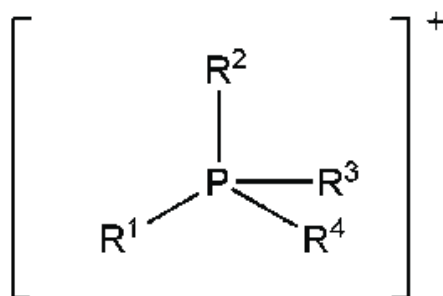
Antimikrobna rezistencija predstavlja veliku prijetnju za čovječanstvo s obzirom na predviđanja koja govore kako će do 2050. godine glavni uzrok smrtnosti upravo biti infekcije uzrokovane rezistentnim sojevima bakterija [2]. S obzirom da se djelovanje kvaternih amonijevih spojeva pokazalo ograničenim, daljnje istraživanje razvilo se u smjeru zamjene dušikovog heteroatoma fosforovim te su sintetizirani kvaterni fosfonijevi spojevi (QPCs). Djelovanje tih spojeva, u usporedbi s komercijalnim QACs, pokazalo je poboljšanu aktivnost [3].

Svrha ovoga rada je ispitati antimikrobno djelovanje nekomercijalnih kvaternih fosfonijevih spojeva (QPCs), ustupljenih ljubaznošću voditeljice Laboratorija za organsku sintezu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, izv. prof. dr. sc. Renate Odžak. Ispitivanja su provedena na po jednom predstavniku Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija pri čemu su korišteni sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 te *Escherichia coli* ATCC 25922. Rezultati antimikrobne aktivnosti prezentirani su u vidu minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ovih spojeva te je određena IC_{50} vrijednost.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kvaterni fosfonijevi spojevi

Kvaterni fosfonijevi spojevi (QPCs) strukturni su analozi kvaternih amonijevih spojeva (QACs). Ti spojevi sadrže tetravalentni, pozitivno nabijeni fosforov atom na koji su vezane četiri funkcionalne skupine (Slika 1.) te negativno nabijeni anion, najčešće atom halogenog elementa [4].

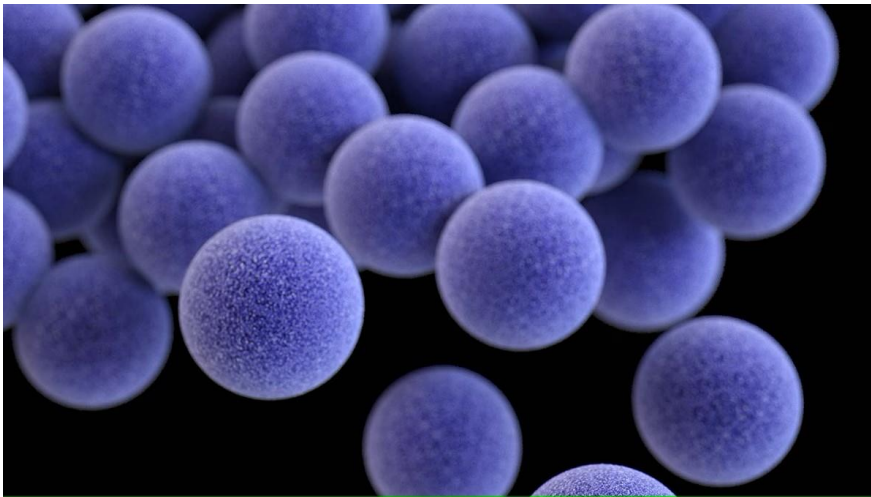


Slika 1. Shematski prikaz kvaternog fosfonijevog kationa [5]

Zbog strukture koja sadrži polarnu 'glavu' i nepolarni 'rep', QPCs su dobri surfaktanti, kao i njima srodni QACs. Svojom apsorpcijom na površinu smanjuju površinsku napetost [6]. Kao surfaktanti koriste se u sapunima, proizvodima za kosu, otopinama za kontaktne leće te u kozmetici. Koriste se i kao biološki indikatori ugradnjom u stanične membrane bakterija i DNA molekula. Njihova najraširenija uporaba leži u proizvodnji dezinficijensa i antiseptika [1]. Upravo takva struktura koja omogućava sve spomenute primjene može se vrlo razlikovati od spoja do spoja. Supstituenti mogu biti različite prirode pa tako mogu varirati od najčešćih alkilnih lanaca različitih duljina, do aromatskih skupina. Dosadašnja istraživanja pokazala su najveću učinkovitost dezinficijensa koji u svojoj strukturi sadrže alkilne lance duljine od C12 do C16 zbog čega je njihova proizvodnja u kontinuiranom porastu [7].

2.2. Bakterija *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, odnosno Zlatni stafilokok, Gram-pozitivna je bakterija koja je široko rasprostranjena u prirodi pa se tako može pronaći u ljudskom i životinjskom organizmu. Prisutna je na površini kože te u nosnoj šupljini gdje čini sastavni dio flore čovjeka. Bakterija je okruglog oblika (koki) po čemu je i dobila ime te raste u grozdastim kolonijskim nakupinama. Veoma je specifična po tome što ju organizam, odnosno imunski sustav, ne prepoznaje kao patogena. Razlog tome je što na površini sadrži protein A koji omogućuje vezanje na imunoglobulin G, točnije na Fc-fragment imunoglobulina G [8]. Činjenica da ju organizam ne prepoznaje kao patogena omogućuje neometan rast ovoj bakteriji pri čemu se razvijaju razne bolesti. Pod okriljem proteina A i njegove zaštite stafilokoka, došlo je i do epidemije meticilin rezistentnog stafilokoka (epidemija MRSA sojem) koji je razvio značajnu antimikrobnu otpornost. *S. aureus* smatra se glavnim uzročnikom stotina tisuća kožnih infekcija i infekcija mekih tkiva [9]. Spomenute infekcije prepoznate su kao glavni uzročnik brojnih morbiditeta te visoke smrtnosti kod ljudi [10]. Kod nekih vrsta infekcija upotrebljavaju se određeni antibiotici, međutim problem razvitka rezistencije ostaje aktualan.



Slika 2. Prikaz okruglog, koki oblika bakterije *Staphylococcus aureus* [11]

2.3. Bakterija *Escherichia coli*

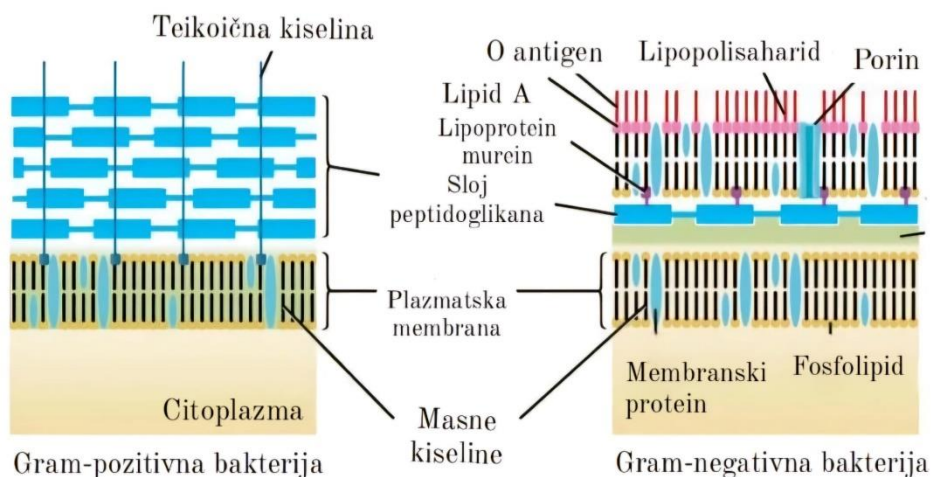
Escherichia coli Gram-negativna je, štapićasta bakterija te jedan od najpoznatijih mikroorganizama uopće. Prirodni je stanovnik ljudskih i životinjskih crijeva, ali unatoč tome određeni sojevi mogu uzrokovati crijevne i mokraćne infekcije s mogućim smrtnim ishodom. Ime je dobila po znanstveniku Theodoru Escherichu koji ju je prvi opisao 1885. godine. Theodor Escherich opisao je kako se ljudski probavni trakt ovom bakterijom kolonizira četrdeset sati nakon rođenja vezanjem za sloj sluzi koja oblaže crijevnu sluznicu [12]. *Escherichia coli*, osim crijevnih bolesti, može uzrokovati i upalu pluća, dizenteriju, bakterijemiju te abdominalne infekcije, primjerice spontani bakterijski peritonitis. Najčešći simptom infekcije bilo kojim sojem *E. coli* je dijareja, koja može dovesti do dehidracije pogotovo u područjima s ograničenim resursima. S obzirom da se *E. coli* nalazi u probavnom traktu te je vrlo rasprostranjena u prirodi gdje se nerijetko može pronaći u tlu, povrću i u vodi, njezina infektivnost ovisi isključivo o virulenciji. U gastrointestinalnom traktu *Escherichia coli* nema virulentnost, međutim kada se nađe van crijevnog trakta njezina sposobnost prodiranja i aktivnog razmnožavanja uvelike poraste. Spomenuta virulencija omogućava *E. coli* da izbjegne obranu domaćina i razvije otpornost na uobičajene antibiotike [13]. Bolesti uzrokovane ovom bakterijom stvaraju mnoge probleme te opterećuju zdravstveni sustav, kako uzrokovanjem infekcija, tako i razvojem rezistencije čime *E. coli* ostaje glavnim predmetom mnogih sadašnjih i budućih istraživanja.



Slika 3. Prikaz štapićastog oblika bakterije *Escherichia coli* s brojnim bičevima [14]

2.4. Struktura bakterijske membrane

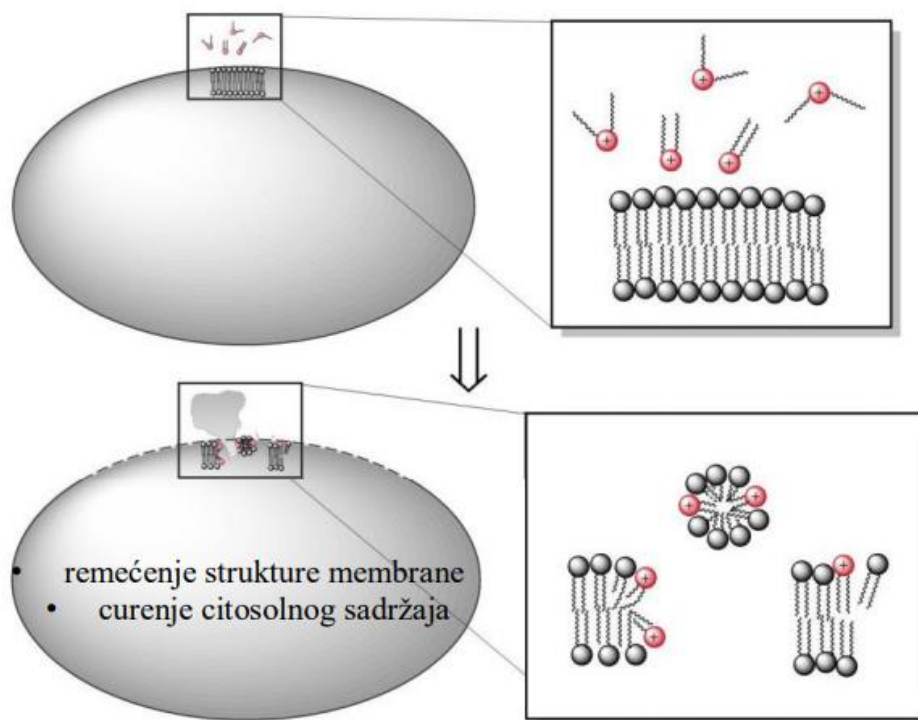
Bakterijska membrana vrlo je važan dio svake bakterije koji ima veliku ulogu u obliku, životu i djelovanju bakterija te se njezina struktura i svojstva razlikuju među Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Na površini bakterijske stanice nalaze se citoplazmatska membrana, periplazmatski prostor, stanična stijenka (koja čini razliku između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija) te kod nekih bakterija i kapsula. Stanična, odnosno citoplazmatska membrana građena je od dvosloja fosfolipida u koji su uronjeni proteini [15]. Inačice fosfolipida određuju svojstva membrane kao što su fluidnost i naboj koji zauzvrat kontroliraju interakcije s proteinima povezanim s membranom [16]. Stanična stijenka pruža bakteriji oblik i strukturu te ju štiti od puknuća, a građena je od peptidoglikana (murein). Upravo stanična stijenka igra ulogu u patogenom djelovanju na stanicu domaćina. Kao što je već spomenuto, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije razlikuju se u građi stanične stijenke. Gram-pozitivne bakterije sadrže velike količine teikoične kiseline u sloju peptidoglikana i na površini te lipoteikoičnu kiselinu usidrenu u lipidnom dvosloju. Kod Gram-negativnih bakterija specifična je prisutnost vanjske membrane kojoj prethode tanki sloj peptidoglikana i sloj lipoproteina. Vanjska membrana ima dva sloja, unutrašnji sloj fosfolipida te vanjski specifični sloj lipopolisaharida (LPS). Na površini vanjske membrane također se nalaze proteini vanjske membrane u koje se ubrajaju porini (Slika 4.) [15].



Slika 4. Shematski prikaz membrane Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [15].

2.5. Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja

Antimikrobna aktivnost QPCs, kao i QACs, ispoljava se na razini bakterijske stanične membrane. Zahvaljujući svojoj amfipatskoj prirodi, ovi spojevi imaju djelovanje slično deterdžentima. Takvo djelovanje uočeno je na skupini takozvanih ESKAPE bakterija u koje se ubrajaju *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i pojedine vrste roda *Enterobacter*. „Napad“ ovih spojeva na bakteriju vrši se elektrostatskom interakcijom pozitivno nabijene „glave“ spoja i negativno nabijene bakterijske stanične membrane. Nakon ostvarenog kontakta slijedi prodiranje bočnih lanaca kvaternih amonijevih i fosfonijevih spojeva u međumembransku regiju. Kao posljedica permeacije, deformacijom membrane, nastupa curenje citoplazmatskog sadržaja te u konačnici bakterijska liza [1]. Opisano djelovanje vrlo je lako ostvarivo na primjeru Gram-pozitivnih bakterija zbog izostanka druge stanične membrane koja je prisutna kod Gram-negativnih bakterija. S obzirom da Gram-negativne bakterije sadrže dodatnu ovojnicu te sloj peptidoglikana između prve i druge stanične membrane, antimikrobno djelovanje QPCs i QACs je otežano te je sukladno tome uočeno smanjeno djelovanje ovih spojeva [1], [15].



Slika 5. Shematski prikaz djelovanja kvaternih fosfonijevih spojeva na bakterijsku staničnu membranu [1].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pribor i uređaji

Potrošni materijal:

- Nitrilne rukavice
- Falcon tubice (15 ml i 50 ml)
- Eppendorf tubice
- Staklene boce
- Plastični stalci
- Nastavci za pipete
- Kivete za spektrofotometriju
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Mikrotitarske pločice
- Parafilm
- Jednokratne mikrobiološke ušice, „eze“

Laboratorijski pribor:

- Automatske mikropipete (Eppendorf)
- Automatska multikanalna mikropipeta (Thermo scientific)
- Plamenik (Fuego basic)
- Analitička vaga (Mettler Toledo)

Uređaji:

- Laminar (Miniflo)
- Inkubator (Gallenkamp)
- Inkubator s orbitalnom tresilicom (New Brunswick Scientific)
- Autoklav (Nuve)
- UV/VIS spektrofotometar Lambda Bio 40 (Perkin Elmer)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Bio-tek, EL808)
- Brojač mikrobnih stanica Quantom Tx (Logos)
- Quantom centrifuga (Logos)

3.1.2. Kemikalije i otopine

Kemikalije:

- Mueller-Hinton medij (Biolife)
- Agar (Sigma-Aldrich)
- Jodonitrotetrazolijev klorid, INT (Sigma-Aldrich)
- Quantom boja za stanice, *Total Cell Staining Dye* (Logos)
- Quantom pojačivač boje za stanice, *Total Cell Staining Enhancer* (Logos)
- Quantom pufer, *Cell Loading Buffer I* (Logos)
- Dimetil sulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich)

Spojevi:

- TPP- BnAc, 10 mg/ml
- TPP- PhAc, 10 mg/ml
- TPP- Bn, 10 mg/ml
- TPP-16, 10 mg/ml
- TPP-14, 10 mg/ml

Mikroorganizmi:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Priprema otopina:

1) Tekući Mueller-Hinton medij (MHB)

Za pripremu 500 mL tekućeg MHB otopljeno je 11,00 g Mueller-Hinton medija u 500 mL destilirane vode nakon čega je otopina autoklavirana pri uvjetima: 103 421 kPa i 121°C.

2) Kruti Mueller-Hinton medij (MHB)

Za pripremu 250 mL krutog MHB otopljeno je 5,50 g MHB te 3,75 g agara u 250 mL destilirane vode. Pripremljena otopina autoklavirana je pri istim uvjetima kao i tekući MHB.

3) Kvaterni fosfonijevi spojevi (QPCs)

Sintetizirani QPCs otopljeni su u 4% DMSO na volumen od 1 mL .

4) 500 μ M QPCs

- TPP- BnAc

Za pripremu 1 mL 500 μ M TPP-BnAc otpipetirano je 24,6 μ L spoja i 975,4 μ L tekućeg MHB.

- TPP-PhAc

Za pripremu 1 mL 500 μ M TPP-PhAc otpipetirano je 24,6 μ L spoja i 975,4 μ L tekućeg MHB.

- TPP-Bn

Za pripremu 1 mL 500 μ M TPP-Bn otpipetirano je 21,7 μ L spoja i 978,3 mL tekućeg MHB.

- TPP-16

Za pripremu 1 mL 500 μ M TPP-16 otpipetirano je 28,4 μ L spoja i 971,6 μ L tekućeg MHB.

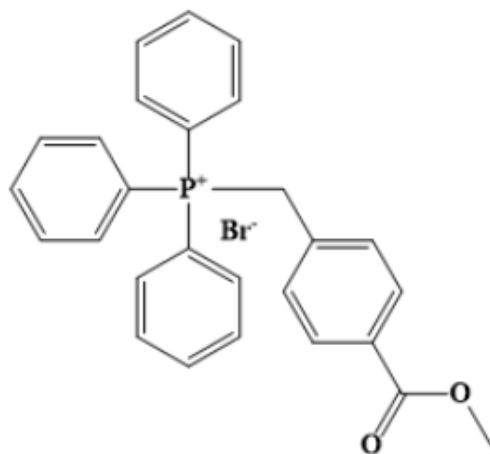
- TPP-14

Za pripremu 1 mL 500 μ M TPP-14 otpipetirano je 27 μ L spoja i 973 μ L tekućeg MHB.

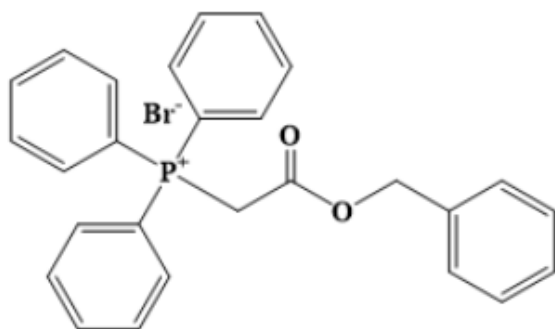
3.1.3. Kvaterni fosfonijevi spojevi i njihove strukture

Svi korišteni spojevi imaju zajedničku trifenilfosfinsku komponentu (TPP), ali se razlikuju u četvrtom supstituentu vezanom na atom fosfora. U nastavku su prikazane strukture spojeva korištenih u ovom radu: (4-(metoksikarbonil)benzil) trifenilfosfonijev bromid (TPP-BnAc), (2-(benziloksil)-2-oksoetil) trifenilfosfonijev bromid (TPP-PhAc), benzil trifenilfosfonijev bromid (TPP-Bn), heksadecil trifenilfosfonijev bromid (TPP-16) i tetradecil trifenilfosfonijev bromid (TPP-14) izrađeni u računalnom programu „ChemDraw 19.0.“.

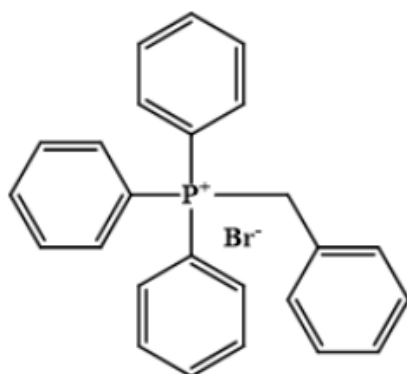
1) TPP-BnAc



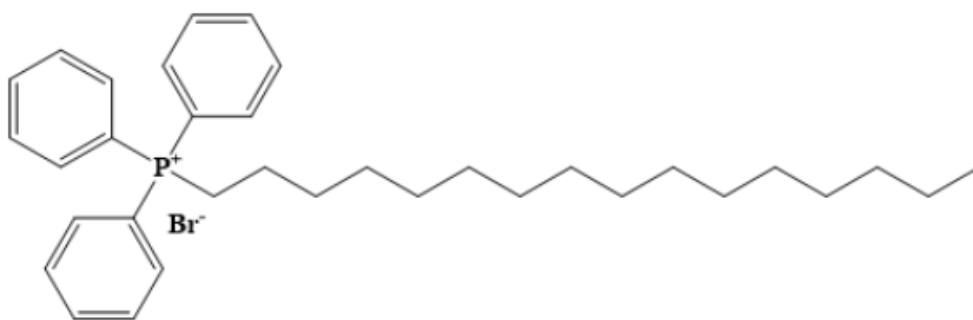
2) TPP-PhAc



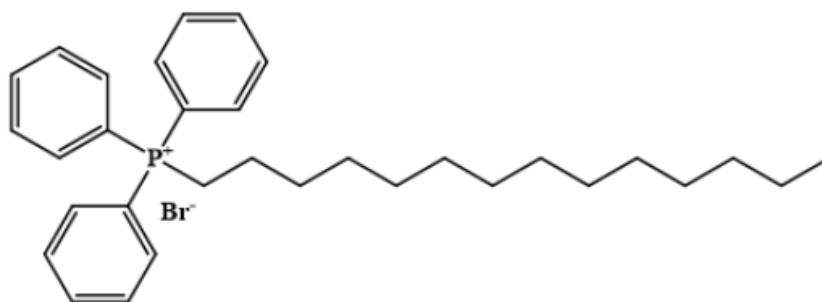
3) TPP-Bn



4) TPP-16



5) TPP-14



3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura

Za pripremu metabolički aktivnog soja bakterija, iz glicerol štoka uzet je uzorak dugoročno pohranjenih stanica *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 te su stanice jednokratnom mikrobiološkom ezom razmazane po čvrstoj Mueller-Hinton hranjivoj podlozi. Pripremljene kulture inkubirane su 24 h na 37 °C te su nadalje čuvane na 4 °C. Nakon što su bakterije narasle, postavljena je prekonoćna kultura tako što je 4 mL MHB inokulirano bakterijskim kolonijama koje su prenesene jednokratnom mikrobiološkom ezom s Petrijeve ploče. Inokulirani medij ostavljen je preko noći u tubici, u inkubatoru s orbitalnom tresilicom na 220 rpm i 37 °C. Kako bi se idući dan bakterije prevele u logaritamsku fazu rasta, prekonoćna kultura razrijeđena je na način da je u tubicu od 50 mL stavljeno 20 mL MHB te 1 mL prekonoćne kulture. Razrijeđena kultura ostavljena je 30 min u inkubatoru s orbitalnom tresilicom na 220 rpm i 37 °C.

3.2.2. Određivanje broja bakterijskih stanica

Određivanje broja bakterijskih stanica provedeno je spektrofotometrijskim određivanjem optičke gustoće (engl. *optical density*, OD) bakterijske biomase mjerenjem apsorbancije pri 600 nm. Spektrofotometar je prije mjerenja baždaren čistim Mueller-Hinton medijem. Kako bi se odredio točan broj, bilo je potrebno prevesti dobivenu OD₆₀₀ vrijednost u vezu s brojem jedinica koje formiraju koloniju (engl. *colony forming unit*, CFU). Izmjerena OD₆₀₀ vrijednost uvrštena je u jednadžbu pravca za svaku bakteriju te je dobivena vrijednost CFU/mL. Jednadžbe pravaca za pohranjene glicerol štokove prethodno su određene na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu te su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Jednadžbe pravaca bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922

BAKTERIJA	JEDNADŽBA PRAVCA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (10 ⁶)	$y = 8,3108x + 0,081$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (10 ⁸)	$y = 8,7039x - 0,4452$

*x= OD₆₀₀, y= CFU/mL

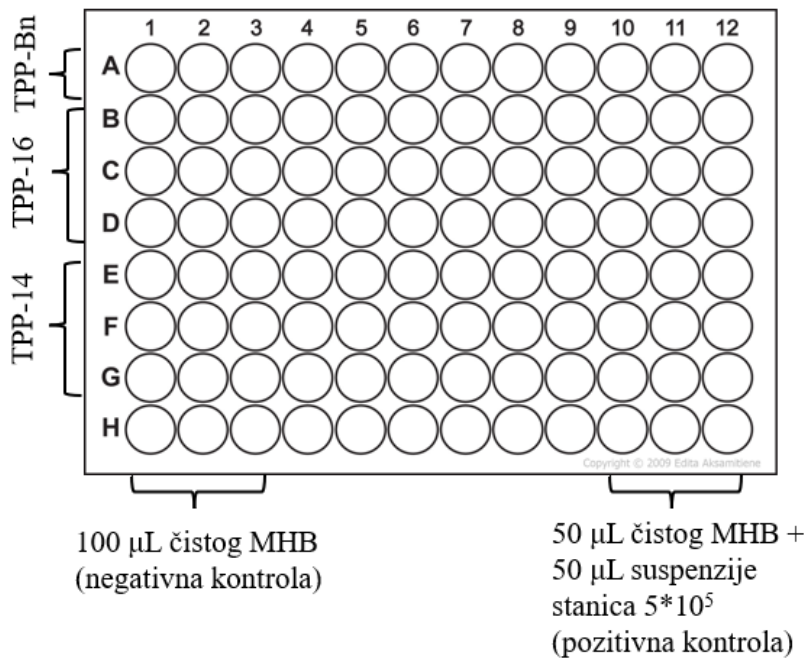
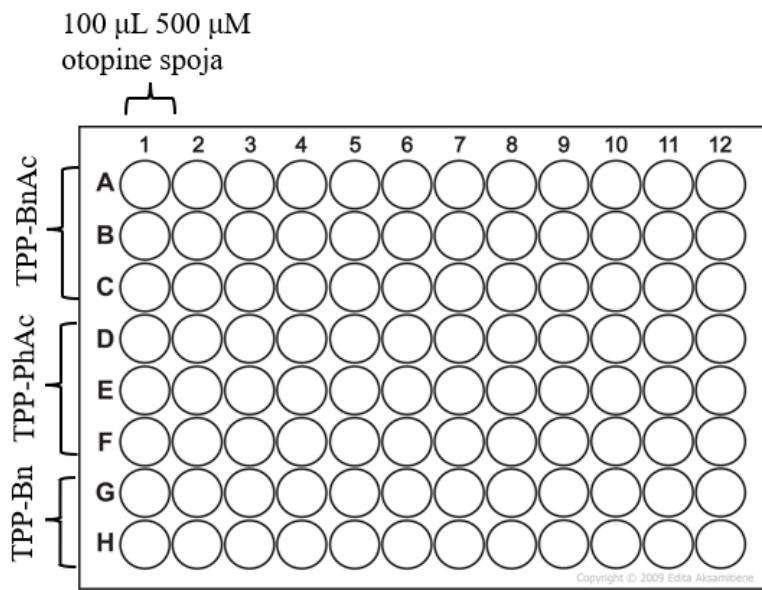
3.2.3. Mjerenje broja bakterijskih stanica na brojaču mikrobnih stanica Quantom Tx

Uzorak za mjerenje pripremljen je pomoću seta za bojenje stanica. Korištena je boja za stanice, pojačivač boje za stanice te pufer od istog proizvođača. Pomiješano je 10 μL uzorka, 1 μL boje te 1 μL pojačivača. Pripremljena otopina inkubirana je na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon što je proteklo vrijeme inkubacije, dodano je 8 μL pufera te je 6 μL otopine naneseo na stakalce. Uzorak je centrifugiran 10 minuta nakon čega je provedeno brojanje stanica. Bojanje se temelji na fluorescentnoj boji koja prodirući kroz membranu oboji nukleinske kiseline u živim i mrtvim stanicama Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Pojačivač boje poboljšava prodiranje boje u stanice ujedno održavajući boju ravnomjerno raspoređenom, a pozadinu jednoličnom za svako vidno polje. Pufer je korišten za ravnomjernu raspodjelu i sedimentaciju bakterijskih stanica.

3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) temelji se na metodi mikrodilucije. Metoda mikrodilucije podrazumijeva serijsko razrjeđenje ispitivanih spojeva u prisutnosti jednakog broja bakterijskih stanica, u ovom slučaju kvaternih fosfonijevih spojeva u prisutnosti *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Tim postupkom omogućeno je praćenje rasta bakterija pri različitim koncentracijama spojeva. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije pripremljena je bakterijska kultura u logaritamskoj fazi te je potom određena vrijednost CFU/mL. Priređena bakterijska kultura razrijeđena je do koncentracije $5 \cdot 10^5$ CFU/mL na način da je željena koncentracija podijeljena sa dobivenom vrijednosti CFU/mL. Time je dobiveno potrebno razrjeđenje. Željeni volumen, u ovom slučaju 20 mL podijeljen je s izračunatim razrjeđenjem te je kao rezultat dobiven volumen bakterijskih stanica koji je otpipetiran u poznati volumen MHB. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) određuje se uočavanjem izostanka zamućenja koje nastaje rastom bakterijskih stanica. Izostanak zamućenja predstavlja prvu koncentraciju ispitivane tvari pri kojoj se nije dogodio rast bakterijskih stanica. Dostignućem dovoljne koncentracije spojeva, rast bakterije je inhibiran, stoga se upravo ta vrijednost označava minimalnom inhibitornom koncentracijom.

Mikrotitarske pločice pripremljene su na način koji opisuje prikaz:



Na shematskom prikazu vidljive su kontrolne jažice. MHB nakon prekonoćne inkubacije mora ostati nezamućen što znači da nema kontaminacije medija (negativna kontrola), a uzorak bakterijskih stanica mora se zamutiti (pozitivna kontrola). Multikanalnom mikropipetom u prvi stupac mikrotitarske pločice pipetirano je 100 μ L spojeva, a u sve ostale stupce pipetirano je po 50 μ L MHB. Provedeno je serijsko razrjeđenje prenošenjem 50 μ L spojeva u jažice s MHB uz konstantno resuspendiranje. Tim postupkom dobiven je široki raspon koncentracija pri kojima je određena MIK. Odgovarajuća koncentracija spojeva u svakom stupcu prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije kvaternih fosfonijevih spojeva u nizu mikrotitarske pločice

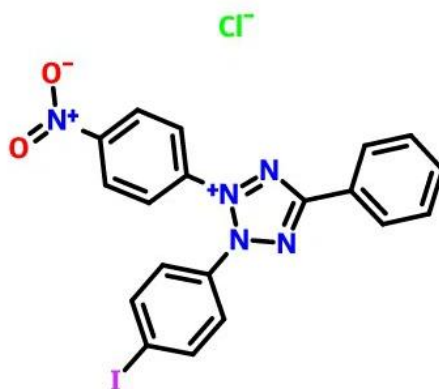
Koncentracije spojeva (μ M)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
QPCs	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24	0,12

Multikanalnom mikropipetom pipetirano je 50 μ L novopripremljene bakterijske kulture u svaku jažicu mikrotitarske pločice. Svakim uzimanjem bakterijskih stanica otopina je resuspendirana. Pripremljena mikrotitarska pločica ostavljena je preko noći u inkubatoru na temperaturi 37 °C.

3.2.5. Određivanje IC₅₀ vrijednosti

Nakon vizualnog pregleda prethodno inkubirane pločice, u jažice je dodan jodonitrotetrazolijev klorid, odnosno reagens INT. INT se dodaje kako bi se detektirao potencijalni rast bakterijskih stanica. Reakcija se temelji na redoks reakciji pri čemu je INT umjetni akceptor elektrona. Njegovom redukcijom u prisustvu metabolički aktivnih stanica nastaje crvena formazanska boja [17].



Slika 6. Strukturni prikaz INT reagensa [18]

Nakon bojenja INT reagensom mikrotitarske pločice stavljene su u čitač mikrotitarskih pločica te je očitana apsorbancija svake zasebne jažice. Rezultati su određeni kroz tri nezavisna eksperimenta na bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 te je svaka pločica obrađena na isti način kako bi se smanjila greška mjerenja. Rezultati su obrađeni u Microsoft Excelu gdje su izračunate srednje vrijednosti svih podataka te postotak živih stanica. Dobiveni podaci uneseni su u računalni program „GraFit 6.0“. Za svaki spoj u reakciji s obje bakterije izrađen je grafički prikaz iz kojeg je određena IC₅₀ vrijednost.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprema razrijeđene bakterijske biomase

Antimikrobna aktivnost novosintetiziranih spojeva, određena je kroz tri nezavisna eksperimenta na tri nezavisne prekonoćne kulture bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922.

Prije nanošenja bakterija na mikrotitarsku pločicu bilo je potrebno pripremiti razrijeđenu bakterijsku biomasu. Iz 20x razrijeđenog uzorka bakterijskih stanica izračunata je vrijednost CFU/mL. Za izračun je bilo potrebno prvo spektrofotometrijski odrediti optičku gustoću bakterijske kulture (OD_{600}) pri valnoj duljini 600 nm. Optička gustoća uvrštena je u jednadžbe pravaca pohranjenih bakterija (Tablica 1.) te je izračunat CFU/mL. Dobivena vrijednost podijeljena je sa željenom koncentracijom te je dobiven faktor razrijeđenja. Brojčane vrijednosti prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Brojčane vrijednosti pripreme konstantne koncentracije bakterijskih stanica

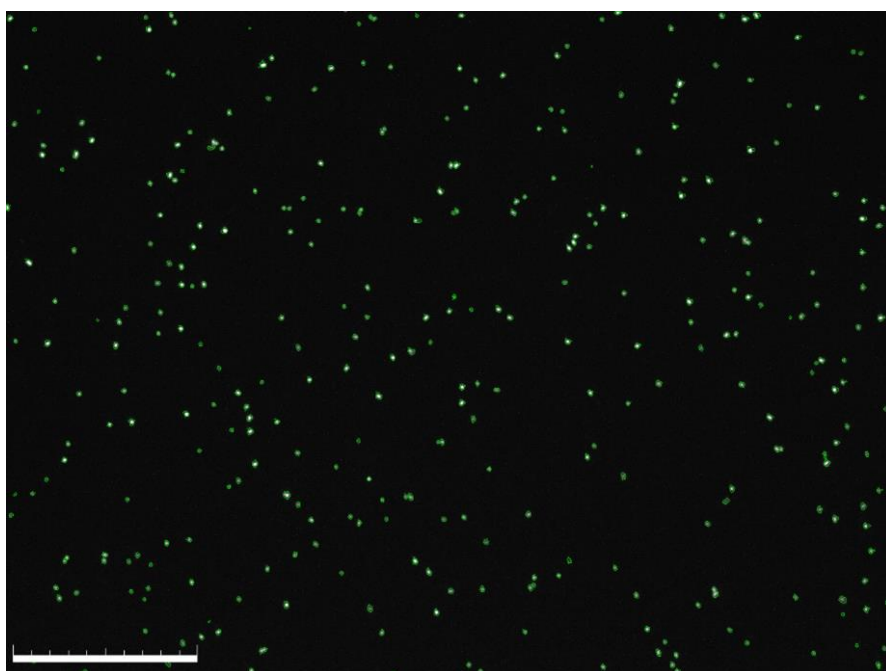
Bakterijski soj	Očitana vrijednost OD_{600}	Formula	CFU/mL	Razrijeđenje
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1. 0,197	$y = 8,3108x + 0,081$	1. $1,718 \cdot 10^6$	1. 3,436x
	2. 0,122		2. $1,095 \cdot 10^6$	2. 2,190x
	3. 0,193		3. $1,685 \cdot 10^6$	3. 3,370x
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1. 0,300	$y = 8,7039x - 0,4452$	1. $2,166 \cdot 10^8$	1. 433,2x
	2. 0,201		2. $1,304 \cdot 10^8$	2. 260,8x
	3. 0,252		3. $1,75 \cdot 10^8$	3. 350x

4.2. Broj bakterijskih stanica po mililitru

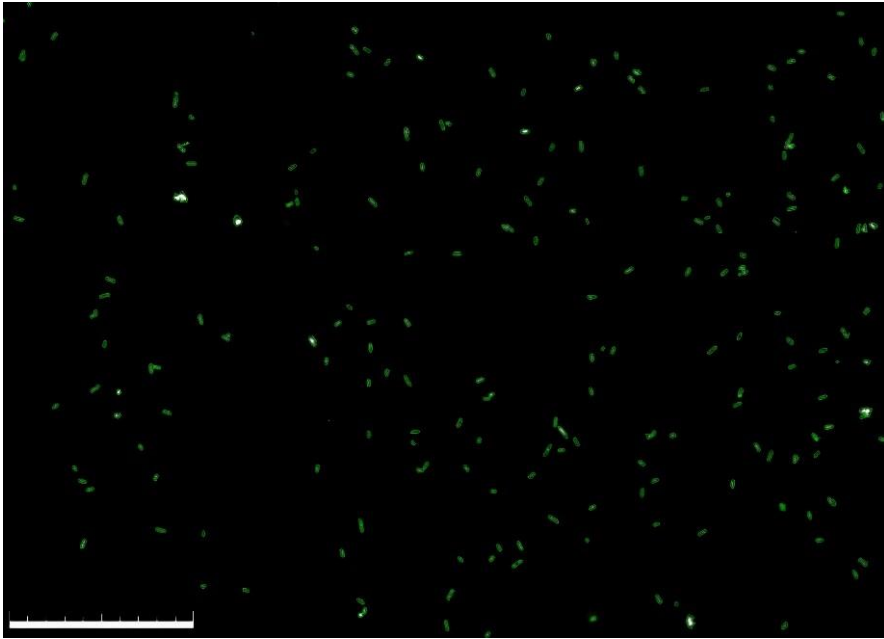
Mjerenje ukupnog broja vijabilnih i nevijabilnih stanica odrađeno je koristeći brojač mikrobnih stanica. Dobiveni su podaci o staničnoj koncentraciji, prosječnoj veličini stanica te broju stanica. Podaci su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Rezultati mjerenja ukupnog broja bakterijskih stanica

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Stanična koncentracija	9.58*10 ⁷ stanica/mL	6.52*10 ⁷ stanica/mL
Prosječna veličina	2.9 μm	4.1 μm
Broj stanica	3340	2273



Slika 7. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, snimljeno na QUANTOM™ brojaču mikrobnih stanica



Slika 8. *Escherichia coli* ATCC 25922, snimljeno na QUANTOM™ brojaču mikrobnih stanica

4.3. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)

Minimalne inhibitorne koncentracije određene su metodom mikrodilucije. Metoda mikrodilucije služila je za ispitivanje antimikrobnog potencijala nekomercijalnih kvaternih fosfonijevih spojeva TPP-BnAc, TPP-PhAc, TPP-Bn, TPP-16 i TPP-14. Ispitivanja su provedena na bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 te *Escherichia coli* ATCC 25922. Nakon prekonoćne inkubacije mikrotitarskih pločica određene su minimalne inhibitorne koncentracije prikazane u sljedećim tablicama:

Tablica 5. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) spoja TPP-BnAc

QPC	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)
TPP-BnAc	125	125	125	>250	>250	>250

Tablica 6. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) spoja TPP-PhAc

QPC	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)
TPP-PhAc	>250	>250	250	>250	>250	>250

Tablica 7. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) spoja TPP-Bn

QPC	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)
TPP-Bn	250	125	125	>250	>250	>250

Tablica 8. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) spoja TPP-16

QPC	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)
TPP-16	3,91	3,91	7,81	7,81	7,81	15,63

Tablica 9. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) spoja TPP-14

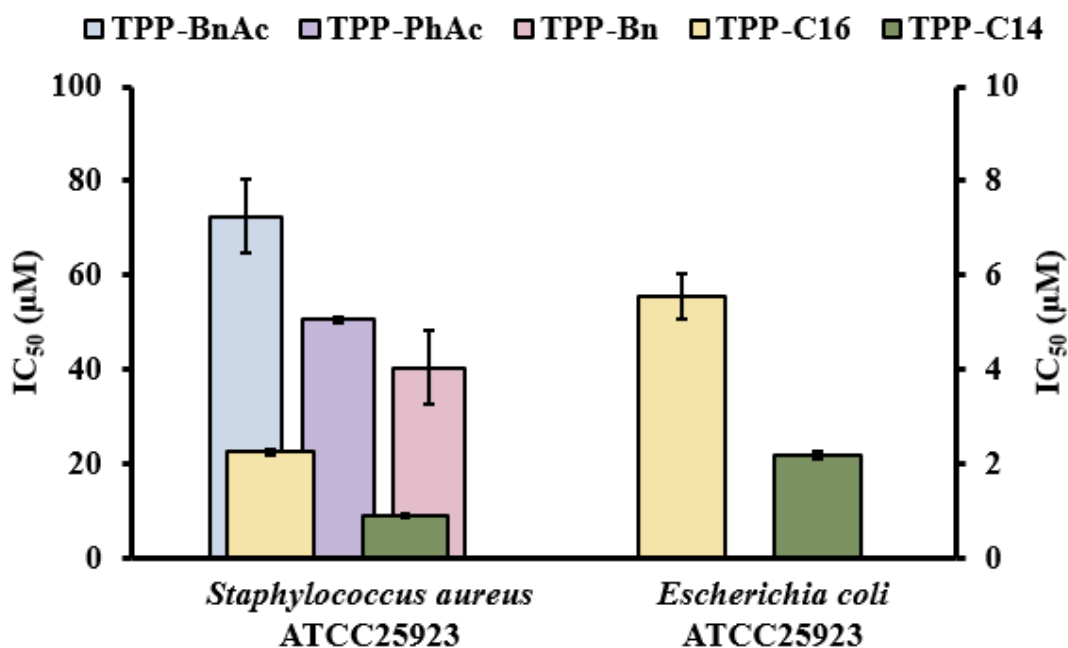
QPC	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)	MIK ₁ (μ M)	MIK ₂ (μ M)	MIK ₃ (μ M)
TPP-14	0,98	1,95	1,95	3,91	3,91	3,91

Tablica 10. Srednje vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija kvaternih fosfonijevih spojeva

	Minimalna inhibitorna koncentracija (μ M)	
	G+	G-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
TPP-BnAc	125	>250
TPP-PhAc	>250	>250
TPP-Bn	166,67	>250
TPP-16	5,21	10,42
TPP-14	1,63	3,91

4.4. IC₅₀ vrijednost

Dodatkom INT reagensa nastalo je crveno-ljubičasto obojenje na mjestima gdje je prisutan bakterijski rast. Nastalo obojenje potvrdilo je prethodno vizualno očitane minimalne inhibitorne koncentracije. U čitaču mikrotitarskih pločica određena je apsorbancija svih redaka mikrotitarske pločice te su dobiveni podaci obrađeni u Microsoft Excelu te u računalnom programu „GraFit 6.0“. U programu su izrađeni dijagrami koji pokazuju polu-maksimalnu inhibitornu koncentraciju. IC₅₀ pokazuje kolika je koncentracija spoja potrebna za inhibiciju rasta bakterija za 50%. Obradom podataka utvrđen je značajan rast i postotak živih stanica *E. coli* pri svim koncentracijama spojeva TPP-BnAc, TPP-PhAc te TPP-Bn. Sukladno tome izrađeni su grafovi samo za spojeve TPP-16 i TPP-14, dok su za bakteriju *S. aureus* izrađeni grafovi za svih pet spojeva, vidljivi na Slici 9.



Slika 9. Grafički prikaz dobivenih IC₅₀ vrijednosti

4.5. Rasprava

Konstantan razvoj rezistentnih sojeva bakterija na često korištene kvaterner amonijeve soli (QACs) predstavlja veliku opasnost svakodnevnom životu na kakav je čovjek navikao. Tom problemu doskočilo se sintezom kvaternih fosfonijevih spojeva (QPCs) koji su u odnosu na QACs pokazali bolje rezultate [3]. Međutim, iako obećavajući, ovi spojevi još nisu idealni antimikrobni agensi, stoga se istraživanje razvija u smjeru sinteze novih i unaprijeđenih kvaternih fosfonijevih spojeva. Zbog svega navedenog, u ovom radu testirana je antimikrobna aktivnost novih inačica QPCs. Korišteni su spojevi TPP-BnAc, TPP-PhAc, TPP-Bn, TPP-16 i TPP-14 te su isti ispitani na bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922.

U dosadašnjoj literaturi opisano je djelovanje spojeva TPP-16 i TPP-14 te su navedeni spojevi pokazali dobru antimikrobnu aktivnost [2] što odgovara i rezultatima dobivenim u ovom završnom radu. Djelovanje spojeva TPP-BnAc, TPP-PhAc i TPP-Bn pokazalo je vrlo visoke vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija kod obje bakterije, što je moguće uzrokovano drugačijim supstituentima u odnosu na ranije spomenute spojeve. TPP-BnAc pokazao je najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju u odnosu na TPP-PhAc i TPP-Bn dok se TPP-PhAc pokazao kao najnedjelotvorniji oblik QPCs. Rezultati dobiveni na Gram-negativnoj bakteriji lošiji su nego rezultati dobiveni na Gram-pozitivnoj bakteriji što je u skladu s očekivanjima.

Za sada antimikrobno djelovanje kvaternih fosfonijevih spojeva ostaje ograničeno, ali pokazuje da se istraživanja kreću u dobrom smjeru. Potrebno je i dalje sintetizirati nove spojeve s antimikrobnim djelovanjem kako bi se došlo do novih spoznaja u okviru strukture i funkcije, a upravo kvaterni fosfonijevi spojevi predstavljaju dobru podlogu za daljnje znanstvene napretke.

5. ZAKLJUČAK

Iz podataka dobivenih u ovom završnom radu može se potvrditi da kvaterni fosfonijevi spojevi (QPCs) uistinu pokazuju antimikrobnu aktivnost s različitim minimalnim inhibitornim koncentracijama.

Metodom mikrodilucije utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije kvaternih fosfonijevih spojeva. Spojevi koji imaju nepolarne alkilne lance pokazali su značajnije djelovanje u odnosu na spojeve s aromatskim supstituentima. Antimikrobna aktivnost je najznačajnije izražena protiv Gram-pozitivnih bakterija, dok je aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija slabija.

Dobiveni rezultati ukazuju da ovi sintetizirani spojevi ne predstavljaju rješenje u borbi protiv bakterija i njima uzrokovanih bolesti. S obzirom da su bakterije vrlo prilagodljive, a njihova prilagodba znači ubrzan rast i razvitak potencijalnih, po život opasnih, bolesti može se zaključiti da se daljnje istraživanje treba usmjeriti prema pronalasku novih spojeva s antimikrobnom aktivnošću. U borbi s bakterijama i njihovim ubrzanim rastom, potencijalne nove inačice kvaternih fosfonijevih spojeva mogle bi pomoći u novim formulacijama antiseptika i dezinficijensa.

6. LITERATURA

- [1] 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.
- [2] O'Neill J *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations; Review on Antimicrobial Resistance*, 2016.
- [3] Kyle J. Sommers et al., „Quaternary Phosphonium Compounds: An Examination of NonNitrogenous Cationic Amphiphiles That Evade Disinfectant Resistance“ *ACS Infect Dis.* 2022 February 11; 8(2): 387–397. doi:10.1021/acsinfecdis.1c00611.
- [4] Robert G. Carden, et al., „Advancements in the Development of Non-Nitrogen-Based Amphiphilic Antiseptics to Overcome Pathogenic Bacterial Resistance“ *ChemMedChem* 10.1002/cmdc.202000612
- [5] Slika preuzeta s online preglednika, dostupno na: https://www.researchgate.net/profile/Marija_Petkovic2/publication/49644174/figure/fig3/AS:667650749374471@1536191751471/Structure-of-quaternary-phosphonium-cation.png
- [6] Filip Bureš, „Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application“, *Topics in Current Chemistry* (2019) 377:14 <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0239-2>
- [7] 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
- [8] Giroto, A. (2021). *KINETIKA RASTA BAKTERIJE STAPHYLOCOCCUS AUREUS U PROTEINSKIM DODACIMA PREHRANI NA BAZI SIRUTKE* (Završni rad). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:350525>
- [9] William R. Schwan, „Staphylococcus aureus Toxins: Armaments for a Significant Pathogen“, *Toxins* 2019, 11, 457; doi:10.3390/toxins11080457
- [10] Shweta Kailasan et al., "Rational Design of Toxoid Vaccine Candidates for Staphylococcus aureus Leukocidin AB (LukAB)", *Toxins* 2019, 11, 339; doi:10.3390/toxins11060339

- [11] Slika preuzeta s online preglednika, dostupno na : <https://www.cdc.gov/staphylococcus-aureus/about/index.html>
- [12] Michael S. Donnenberg ur., „Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis“, drugo izdanje, 2013.
- [13] Matthew Mueller; Christopher R. Tainter., „Escherichia coli Infection“, [Updated 2023 Jul 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- [14] Slika preuzeta s online preglednika, dostupno na : <https://www.cdc.gov/ecoli/about/kinds-of-ecoli.html>
- [15] Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, „Struktura, funkcija i genetika“, interna predavanja
- [16] Henrik Strahl, Jeff Errington, “Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function“, Vol. 71:519-538 (Volume publication date September 2017), Available: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630>
- [17] L. Botz, B. Kocsis, S. Nagy, „BIOASSAYS | Bioautography“, Encyclopedia of Analytical Science, 2013, Pages 253-260
- [18] Slika preuzeta s online preglednika, dostupno na: <https://hr.alfa-chemical.com/uploads/202235855/cas-146-68-9-iodonitrotetrazolium-chloride26401147655.jpg>