

Određivanje antibakterijskih svojstava tekstilnih materijala

Leljak, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:007736>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anja Leljak

Određivanje antibakterijskih svojstava tekstilnih materijala

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za bakteriologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Tomislava Ivankovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Od srca zahvaljujem svom mentoru, doc.dr.sc. Tomislavu Ivankoviću na ukazanom povjerenju, izdvojenom vremenu, susretljivosti, strpljivosti, pomoći i savjetima tijekom provedbe i pisanja ovog diplomskog rada. Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, pomoći, razumijevanju i vjeri u mene tijekom studija. Bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje antibakterijskih svojstava tekstilnih materijala

Anja Leljak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Procjena antimikrobne aktivnosti tekstilnih materijala se provodi standardiziranim metodama koje donose različite organizacije za standardizaciju jedna od kojih je i ISO – Internacionalna organizacija za standardizaciju. Ciljevi ovog istraživanja su bili uvođenje i optimizacija ISO 20743:2013 i ISO 20645:2004 standarda za određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala u Laboratorij za bakteriologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te određivanje antibakterijske aktivnosti materijala načinjenih na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u sklopu projekta „Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i odjeće“ Hrvatske zaklade za znanost. Istraženi materijali su pamuk, sirova i obojena viskoza, tencel, mikromodal, modal, materijal X, materijal sa srebrom Aquacel Ag i antibakterijski uložak za cipele. Aquacel Ag, materijal X i uložak su pokazali antibakterijska svojstva na vrstama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* u sve tri korištene metode, a modal i mikromodal u dvije metode. Obojena i sirova viskoza su imale antibakterijska svojstva u jednoj od metoda za svaku bakteriju, a pamuk samo na vrsti *E. coli* u jednoj metodi. Tencel nije pokazao značajnija antibakterijska svojstva. Da bi se dobio točan rezultat, potrebno je paralelno koristiti nekoliko metoda i ispitati bar dvije vrste bakterija, jer se na temelju samo jedne vrste i jedne metode može pogrešno zaključiti o antibakterijskim svojstvima materijala.

(52 stranice, 30 slika, 5 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: tekstil, antibakterijska učinkovitost, standardizirani testovi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Voditelj: Dr.sc. Tomislav Ivanković, doc.

Ocjenitelji: Dr.sc. Tomislav Ivanković, doc., dr.sc. Biljana Balen, izv. prof., dr. sc. Renata Šošćarić, doc.

Rad prihvaćen: 30.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Determination of antibacterial properties of textile materials

Anja Leļjak

RooseveltoV Trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

An assessment of the antimicrobial activity of textile materials is carried out by standardized methods that are provided by different organizations, such as ISO - International Organization for Standardization. The aim of this study was to introduce and optimize ISO 20743: 2013 and ISO 20645:2004 standards for the determination of antibacterial activity of textile materials in the Bacteriological Laboratory at the Department of Microbiology of the Faculty of Science and to determine the antibacterial activity of materials made at the Faculty of Textile Technology as part of the project "Textiles and footwear comfort and antimicrobial properties". The investigated materials were cotton, crude and dyed viscose, tencel, micromodal, modal, material X, silver-containing material Aquacel Ag and antibacterial insoles for shoes. Aquacel Ag, material X and antibacterial insoles showed antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in all three methods, and modal and micromodal in the two applied methods. Dyed and crude viscose had antibacterial properties in one of the methods for each bacterium, and cotton only against *E. coli* in one method. Tencel showed no significant antibacterial properties. In order to obtain precise and relevant result, it is necessary to use several methods and at least two bacteria species, because only one species and one method can misconstrue the antibacterial properties of a material.

(52 pages, 30 figures, 5 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: textile, antibacterial efficacy, standardized tests, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Supervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof., Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof., Dr. Renata Šoštarić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 30.11.2017.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Tekstilni materijali	1
1.2.	Tekstilni materijali i mikroorganizmi.....	1
1.3.	Medicinski tekstil i mikroorganizmi	2
1.4.	Zahtjevi za postizanje antimikrobnog djelovanja tekstila	3
1.5.	Načini antimikrobnog djelovanja	4
1.6.	Metode za postizanje antimikrobnog djelovanja.....	5
1.7.	Najčešće korištena antimikrobna sredstva.....	6
1.7.1.	Triklosan.....	6
1.7.2.	Kvarterni amonijevi spojevi	7
1.7.3.	Poliheksametilen bigvanid (PHMB).....	7
1.7.4.	Hitozan	7
1.7.5.	Metali i njihovi spojevi.....	8
1.7.6.	Prirodni bioaktivni spojevi	9
1.8.	Procjena antimikrobne učinkovitosti tekstilnih materijala	9
1.8.1.	ISO - Internacionalna organizacija za standardizaciju	9
1.8.2.	Metode za procjenu antimikrobne učinkovitosti	10
1.8.3.	ISO 20743:2013 i ISO 20645:2004 standardi za određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala	12
1.9.	Novi istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost: "Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i obuće"	13
1.10.	Tekstilni materijali korišteni u ovom istraživanju.....	13
1.10.1.	Prirodna celulozna vlakna - pamuk	13
1.10.2.	Regenerirana celulozna vlakna - viskoza, modal, mikromodal i tencel	14
1.10.3.	Materijal sa srebrom Aquacel Ag.....	14
1.10.4.	Antibakterijski uložak za cipele s aktivnim ugljenom.....	15
2.	CILJ	16
3.	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1.	Materijali	17
3.1.1.	Bakterijski sojevi.....	17
3.1.2.	Tekstilni materijali.....	17
3.1.3.	Uređaji i pribor	17
3.1.4.	Kemikalije i kulturni mediji	18

3.2.	Metode.....	19
3.2.1.	Priprema materijala za eksperiment	19
3.2.2.	Priprema uzoraka materijala.....	20
3.2.3.	Priprema bakterijske kulture na ploči.....	20
3.2.4.	Bojanje bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Escherichia coli</i> po Gramu.....	20
3.2.5.	Priprema bakterijske suspenzije i podešavanje njene koncentracije	21
3.2.6.	Priprema bakterijskih suspenzija u hranjivom bujonu.....	23
3.2.7.	ISO 20645 Test difuzije u agaru.....	23
3.2.8.	ISO 20743:2013 Transfer metoda	25
3.2.9.	ISO 20743:2013 Apsorpcijska metoda.....	26
4.	REZULTATI.....	28
4.1.	Bojanje po Gramu	28
4.2.	Podešavanje koncentracije bakterijske suspenzije	28
4.3.	ISO 20645 Test difuzije u agaru.....	29
4.4.	ISO 20743:2013 Apsorpcijska metoda.....	37
4.5.	ISO 20743:2013 Transfer metoda	39
5.	RASPRAVA.....	41
6.	ZAKLJUČAK	46
7.	LITERATURA.....	47
8.	ŽIVOTOPIS	51

1. UVOD

1.1. Tekstilni materijali

Materijali proizvedeni od vlakana i niti klasificirani su kao tekstilni materijali. Prema podrijetlu, vlakna su podijeljena na prirodna i kemijska. Prirodna vlakna mogu biti biljnog (pamuk, lan), životinjskog (vuna, svila) ili mineralnog (azbest) podrijetla, a kemijska mogu biti umjetna ili sintetička ovisno o tome da li se dobivaju kemijskom preradom prirodnih sirovina, najčešće pamuka (viskoza, acetat) ili iz sintetičkih polimera (npr. poliester, akril, PVC vlakna) (Pekhtasheva i sur., 2012). Tekstilni materijali su sveprisutni. Primarno se koriste za odijevanje, ali i u kućanstvu i u medicinskim i higijenskim, poljoprivrednim, automobilskim, zrakoplovnim i pomorskim primjenama (Perera i sur., 2013).

1.2. Tekstilni materijali i mikroorganizmi

Tekstili su u stalnom kontaktu s mikroorganizmima iz okoline i ljudske kože. U vrućoj i vlažnoj klimi najčešći problemi nastaju s mikroorganizmima iz okoline, a u umjerenim klimama s bakterijama s ljudske kože (Teufel i Redl, 2006). Mikroorganizmi se mogu brzo umnažati kada su zadovoljeni osnovni zahtjevi kao što su vlaga, nutrijenti i temperatura (Gao i Cranston, 2008). Tekstili mogu biti odličan supstrat za rast mikroorganizama jer su izrađeni od organskih materijala koji pružaju dobru osnovu za pričvršćivanje biofilma, nude veliko površinsko područje i apsorbiraju ljudski znoj koji osigurava hranjive tvari potrebne za rast mikroorganizama (Teufel i Redl, 2006). Prirodna vlakna sadrže proteine (keratin), celulozu i dr. koji mogu djelovati kao nutrijenti i izvori energije (Gao i Cranston, 2008). Mikroorganizmi svojim enzimima utječu na otpuštanje šećera iz celuloze što koriste kao izvor ugljika potreban za rast. Dodatno, aditivi za vlakna kao što su lubrikanti i antistatska sredstva, zajedno s drugim kontaminantima poput prašine mogu biti dodatan izvor nutrijenata za mikroorganizme (Rogina-Car i sur., 2016). Ljudska koža sadrži kompleksnu mješavinu mikroorganizama s oko 100-1000 mikroba / cm². Na tim razinama mikroorganizmi ne predstavljaju zdravstveni problem, nego su njihova prisutnost i balans ključni za zdravlje. Ali,

kada se osiguraju idealni uvjeti rasta, brzo se razmnožavaju i mogu uzrokovati ozbiljne probleme kako na tekstilu tako i na njegovom nosiocu. To uključuje proizvodnju neugodnih mirisa, pogoršanje mehaničkih svojstava, gubitak mase, promjenu boje tekstila, truljenje tekstila i zdravstvene probleme od jednostavne nelagode do fizičke iritacije, alergijske osjetljivosti, toksičnih reakcija, infekcija i bolesti (Teufel i Redl, 2006). Oštećenje tekstilnih materijala mikroorganizmima ovisi o njihovoj stopi nošenja, vrsti i podrijetlu, organskom sastavu, uvjetima temperature i vlažnosti, stupnju aeracije (Pekhtasheva i sur., 2012). Prirodna vlakna su sklonija utjecaju mikroba od sintetskih zbog porozne hidrofilne strukture, koja zadržava vodu, kisik i nutrijente, čime osiguravaju savršen okoliš za bakterijski rast. Kemijska vlakna, posebno ona sintetička, su biološki otpornija zbog više razine hidrofobnosti (Rogina-Car i sur., 2016). Međutim, zbog hidrofobne prirode kojom blokiraju evaporaciju znoja, stvaraju vlažno okruženje na koži i potiču širenje mikroorganizama na njoj (Perera i sur., 2013). Povećana temperatura i povećana vlažnost (obično pod povećanom proizvodnjom znoja) te ograničena razmjena zraka su uvjeti koji dodatno potiču oštećenje materijala. Na stopu oštećenja mikroorganizmima utječe i sama struktura tkanina. Tanje tkanine s nižom površinskom gustoćom i višom poroznošću najpodložnije su oštećenju jer ta svojstva osiguravaju veliko kontaktno područje i omogućuju lako prodiranje mikroorganizama duboko u tkaninu. Mikroorganizmi mogu utjecati na dva načina, direktno tako da koriste materijal kao izvor nutrijenata (asimilacija) ili indirektno tako da oštećuju materijal svojim metabolizmom (degradacija) (Pekhtasheva i sur., 2012).

1.3. Medicinski tekstil i mikroorganizmi

Najveći problem mikroorganizmi predstavljaju za medicinski tekstil koji se primarno odnosi na tekstil koji se koristi u bolnicama i higijenskim i zdravstvenim sektorima, ali i u hotelima i drugim sredinama gdje se zahtijeva održanje higijene (Budimir i sur., 2011). Među mnogim putevima izloženosti infektivnim sredstvima u kliničkom okruženju, značajna je uloga neživog okoliša koji uključuje tekstil. Tekstil može djelovati kao potencijalni izvor zaraze zbog toga što se mikroorganizmi mogu prenijeti sa zaraženog pacijenta, zdravstvenog radnika ili nekog okolišnog izvora na tekstil, zadržavati se unutar njega i onda prenijeti na osjetljivu osobu. Pokazalo se da odjeća koju nose zdravstveni radnici sadrži potencijalno patogene bakterije. Iako i mikroflora radnika može biti izvor prijenosa, najčešće se radi o prijenosu

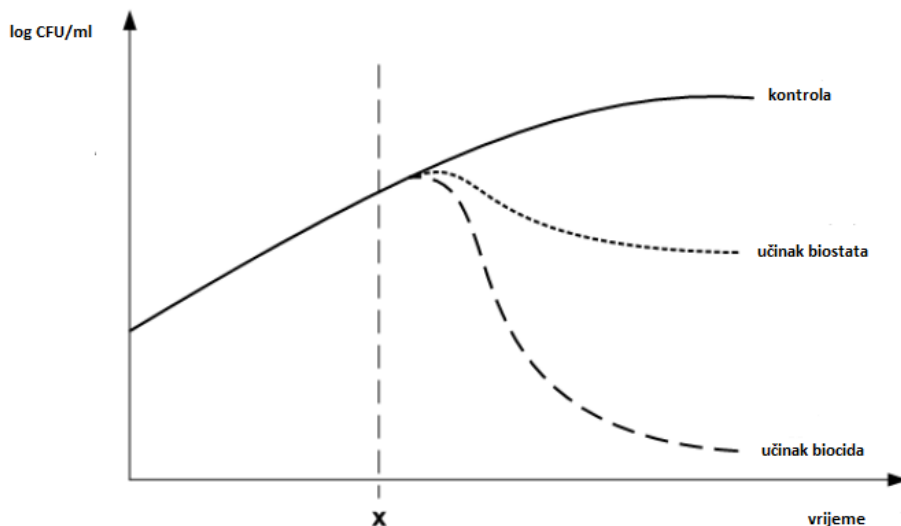
mikroorganizama s zaraženog pacijenta putem odjeće zdravstvenih radnika na druge pacijente. Zavjese za privatnost, posteljina, ručnici i zastori također mogu zadržavati štetne bakterije. Zavjese su često kontaminirane potencijalnim bolničkim patogenima kao što su vankomicin-rezistentni enterokoki (VRE), meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Clostridium difficile*. Budući da se prije, tijekom i nakon skrbi o pacijentu dotaknu zavjese, kontaminirane zavjese mogu biti izvor prijenosa infektivnih sredstava (McQueen i Ehnes, 2017). Wiener-Well i sur. su istraživali bakterijsku kontaminaciju medicinskih odora te su pokazali da je više od 60% uzetih uzoraka pozitivno na potencijalno opasne bakterije. Pokazano je da čak 40% područja kirurškog prostora koja se često ne čiste, poput zavjesa, sadrži patogene bakterije (Rogina-Car i sur., 2016.)

1.4. Zahtjevi za postizanje antimikrobnog djelovanja tekstila

Zbog rastuće svijesti o štetnim učincima mikroorganizama, postoji sve veća potreba za antibakterijskim materijalima u mnogim područjima primjene kao što su medicinski uređaji, zdravstvena zaštita, higijenska primjena, sustavi pročišćavanja voda, bolnice, oprema za zubarsku kirurgiju, tekstil, pakiranje i skladištenje hrane (Shahidi i Wiener, 2012). Svrha postizanja antimikrobne aktivnosti je zaštita materijala od mikrobnog napada, sprječavanje širenja i prijenosa patogenih mikroorganizama, sprječavanje razvoja neugodnih mirisa i stvaranje materijala koji će postići preventivni i/ili ljekoviti učinak (Ristić i sur., 2011). Idealan antimikrobno obrađen tekstil trebao bi biti učinkovit protiv širokog spektra bakterijskih i gljivičnih vrsta, ali istodobno pokazivati nisku toksičnost prema potrošačima i okolišu. Antimikrobna obrada bi trebala biti trajna za pranje te ne bi trebala negativno utjecati na kvalitetu ili izgled tekstila. Konačno, trebala bi biti isplativa i kompatibilna s tekstilnim kemijskim procesima kao što je bojanje. Sve više se spominje i da ne bi smjela ubiti postojeću floru nepatogenih bakterija na koži nositelja koje su važne za zdravlje kože. Srećom, antimikrobna sredstva mogu samo smanjiti gustoću flore koja živi na koži, ali ih ne u potpunosti ukloniti (Gao i Cranston, 2008).

1.5. Načini antimikrobnog djelovanja

Antimikrobna sredstva se mogu klasificirati na temelju svoje kemije, mehanizma antimikrobnog djelovanja, efikasnosti i otpornosti na pranje. Tako možemo govoriti o biocidima i biostaticima, vezanim ili ispirajućim antimikrobnim sredstvima, sredstvima koja se kontrolirano oslobađaju ili koja stvaraju barijeru, prirodnim i sintetskim sredstvima i sredstvima slabe ili dobre otpornosti na pranje. Biocidi uzrokuju smrt mikroorganizama, a biostatici dovode do inhibicije mikrobnog rasta (Slika 1.). Većina komercijalno dostupnih antimikrobnih sredstava su biocidi, npr. srebro, triklosan i kvarterni amonijevi spojevi. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja mogu biti različiti, npr. antimikrobna sredstva mogu sprječavati staničnu reprodukciju, oštećivati stanični zid ili mijenjati permeabilnost stanice, denaturirati proteine, blokirati enzime, inhibirati sintezu lipida. Vezana antimikrobna sredstva su kemijski vezana za površinu vlakana gdje formiraju barijeru protiv mikroorganizama i inhibiraju širenje onih mikroorganizama koji dolaze u kontakt s površinom vlakana, ali ne i one u okolini (Ristić i sur., 2011). Zbog svoje veze s vlaknima, mogu biti odstranjena ili deaktivirana i izgubiti dugu trajnost (Shahidi i Wiener, 2012). Drugi tip su sredstva s mehanizmom kontroliranog oslobađanja, ona se polako otpuštaju na površinu vlakana i/ ili s površine (Ristić i sur., 2011). Mogu biti jako učinkovita protiv mikroba na površini vlakna ili okružujućem okolišu. Međutim, konačno njihov spremnik se može potrošiti i završna obrada tako više neće biti učinkovita. Osim toga, u okolišu mogu interferirati s drugim poželjnim mikrobima (Shahidi i Wiener, 2012).



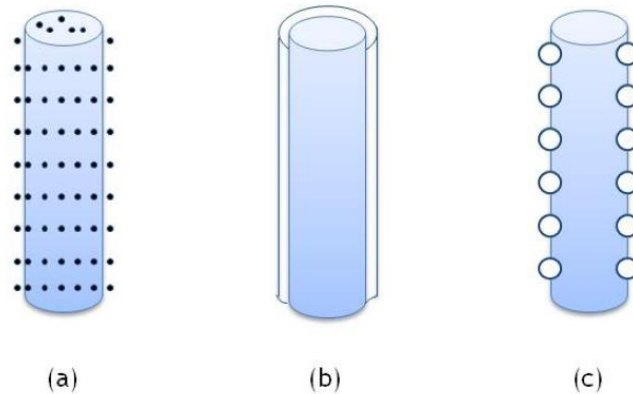
Slika 1. Biocidalni / biostatički učinak antimikrobnog sredstva na rast bakterija (x označava vrijeme primjene antimikrobnog sredstva)

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Ristić i sur., 2011.)

1.6. Metode za postizanje antimikrobnog djelovanja

Razvijene su različite metode za postizanje antimikrobnog djelovanja na tekstilu, ovisno o korištenom antimikrobnom sredstvu i o vrsti vlakana. Za sintetska vlakna, antimikrobna aktivna sredstva se mogu ugraditi u polimer prije ekstruzije ili miješati u vlakna tijekom njihova stvaranja što pruža najveću trajnost jer se sredstvo fizički ugradi u strukturu vlakana i polako pušta tijekom uporabe (Slika 2.a) (Gao i Cranston, 2008). Za prirodna vlakna mogući su samo naknadni tretmani, kao što su konvencionalne metode iscrpljivanja i sušenja, koji se mogu primijeniti i na sintetska vlakna (Slika 2.b). Dodatno, razvile su se metode poput punjenja, prskanja, premazivanja i završne obrade pjenom te upotreba koloidnih otopina nano veličine, nanočestica, kemijske modifikacije biocida za stvaranje kovalentne veze s vlaknom (Slika 2.c), umrežavanja aktivnog sredstva na vlakno pomoću umreživača i sol-gel procesa (Ristić i sur., 2011). Ovisno o korištenoj metodi i antimikrobnom sredstvu, tekstili rezultiraju pasivnim ili aktivnom antimikrobnim djelovanjem. Pasivna antimikrobna vlakna ne sadrže nikakve antimikrobne dodatke, već se npr. mikrobiološka kolonizacija sprječava površinskom strukturom vlakana. Same bakterijske stanice nisu pogođene, već se sprječava prijanjanje

mikroorganizama na površinu vlakana ili su napadnute neispirućim površinski aktivnim spojevima. Većina tekstila ipak sadrži specifične aktivne antimikrobne tvari koje djeluju na mikroorganizme na staničnoj membrani, tijekom metabolizma ili unutar jezgre. Kao aktivna antimikrobna sredstva koriste se brojni metalni spojevi, kvarterni amonijevi spojevi, bigvanidi, amini, glukoprotamini i prirodni proizvodi kao što je hitozan (Höfer, 2006).



Slika 2. Antimikrobno sredstvo je ugrađeno u vlakno (a), primijenjeno na površinu vlakna (b), kemijski vezano na vlakno (c)

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Ristić i sur., 2011.)

1.7. Najčešće korištena antimikrobna sredstva

1.7.1. Triklosan

Triklosan je derivat fenola koji sadrži halogen. Ubraja se u antiseptike i dezinficijense i koristi u kozmetici i pastama za zube. Širokog je ranga djelovanja protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Shahidi i Wiener, 2012). Inhibira mikrobnog rasta blokiranjem biosinteze masnih kiselina, kao i preko interakcije s aminokiselinskim ostacima enzimski aktivnog mjesta unutar membrane. Ako se pamuk tretira s 6 % otopinom triklosana, dolazi do efikasne redukcije bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, a iako se poslije 50 pranja antimikrobna aktivnost smanjuje, redukcija i dalje ostaje preko 70%. No, zabilježena je

pojava otpornosti na triklosan, te je pokazano kako izlaganje sunčevim zrakama uzrokuje njegov raspad i stvaranje toksičnih polikloriranih dioksina (Ristić i sur., 2011).

1.7.2. Kvarterni amonijevi spojevi

Kvarterni amonijevi spojevi se već dugi niz godina koriste kao antiseptici i dezinficijensi. Antimikrobna aktivnost im ovisi o duljini alkilnog lanca i broju kvarternih amonijevih grupa u molekuli koje nose pozitivno nabijen N atom. Ona je rezultat interakcije između kationske amonijeve grupe kvarternih amonijevih spojeva i negativno nabijene membrane mikroba. Time dolazi do prekida osnovnih funkcija stanične membrane, a posljedično i do prekida aktivnosti proteina. Osim toga, djeluju i na sposobnost umnažanja mikrobne DNA. Zabilježena je pojava otpornosti i na te spojeve (Ristić i sur., 2011).

1.7.3. Poliheksametilen bigvanid (PHMB)

PHMB predstavlja snažno baktericidno sredstvo, širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti, koje se uspješno koristi kao dezinficijens i kao biocid u materijalima za previjanje rana i u sredstvima za ispiranje usta (Gao i Cranston, 2008). Koristi se i za antimikrobnu završnu obradu tekstila, posebno celuloze. Zahvaljujući svojoj kationskoj prirodi, stvara ionske i vodikove veze s celuloznim materijalima gdje pri nižim koncentracijama dominira elektrostatska veza s karboksilnim skupinama celuloze, a pri višim ih zamjenjuju vodikove veze. Antimikrobno djelovanje mu se temelji na interakciji s anionskim fosfolipidima unutar staničnog zida čime dolazi do njegovog oštećenja (Ristić i sur., 2011).

1.7.4. Hitozan

Hitozan je deacetilirani derivat hitina. Općenito je prihvaćeno da primarne amino skupine daju pozitivne naboje koji djeluju u interakciji s negativno nabijenim ostacima na površini mikroba što uzrokuje opsežne promjene na staničnoj površini i u staničnoj permeabilnosti, posljedično dovodeći do propuštanja unutarstaničnih supstanci i smrti stanice (Gao i

Cranston, 2008). Hitozan na površini stanice može formirati i polimernu membranu koja sprječava ulazak hranjivih tvari u stanicu. Moguće je i da hitozan manje molekulske mase ulazi u stanicu, veže se na DNA i inhibira sintezu RNA i proteina (Shadidi i Wiener, 2012). Na antimikrobni kapacitet utječu stupanj deacetilacije, molekulska težina i omjer između protoniranih i neprotoniranih amino grupa (Ristić i sur., 2011). Zbog svojstava kao što su kapacitet vezanja vode, sposobnost vezanja masnoća, bioaktivnost, biorazgradivost, netoksičnost, biokompatibilnost i sposobnost ubrzanja zacjeljivanja rana, pokazao je široku primjenu u medicini, kozmetici, poljoprivredi, biomaterijalima i sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova. Zbog polikationske strukture ima dobra antimikrobna svojstva na razne bakterije i gljivice (Shadidi i Wiener, 2012).

1.7.5. Metali i njihovi spojevi

Mnogi teški metali su toksični za mikrobe u veoma niskim koncentracijama bilo slobodni ili u spojevima. Ubijaju ih vezanjem za unutarstanične proteine i njihovom inaktivacijom. Iako su i neki metali poput cinka, kobalta i bakra privukli pažnju kao učinkovita antimikrobna sredstva, srebro je najčešće korišten metal u tekstilnoj industriji (Gao i Cranston, 2008). U prisustvu vlage stvaraju se metalni ioni koji inhibiraju mikrobnu replikaciju. Također, kataliziraju stvaranje kisikovih radikala koji oksidiraju molekularnu strukturu bakterije. Mogu dovesti i do denaturacije proteina i stanične smrti zbog reakcije s nukleofilnim aminokiselinskim ostacima u proteinima i vezanju za sulfidrilne, amino, imidazolne, fosfatne i karboksilne grupe membranskih ili enzimskih proteina. Srebro može i inhibirati brojne oksidacijske enzime, uzimanje sukcinata pomoću membranskih vezikula i respiratorni lanac *Escherichia coli* (Ristić i sur., 2011). Značajna osobina iona srebra je njegov široki spektar antimikrobnog djelovanja, što je osobito značajno u polimikrobnoj kolonizaciji povezanoj s infekcijama na biomaterijal. Osim toga, bakterije pokazuju nisku sklonost razvoja otpornosti na srebro ugrađeno u biomaterijale kao što su poliuretani i hidroksiapatit. Proizvodi se srebrom su također zanimljivi za liječenje rana. Kada metalno srebro reagira s tekućinama rane, oslobađaju se ioni srebra, koji oštećuju bakterijske molekule RNA i DNA, čime se sprječava replikacija mikroorganizama (Shadidi i Wiener, 2012).

1.7.6. Prirodni bioaktivni spojevi

Prirodnim bioaktivnim spojevima s antimikrobnim svojstvima pridaje se sve veća pažnja kao alternativa sintetičkim antimikrobnim sredstvima jer su sigurni, netoksični i podnošljivi za kožu. Primjer su polisaharidi i njihovi derivati, prirodne boje, ekstrakti iz korijena, stabljike, lišća, cvjetova i sjemena različitih vrsta biljaka s antimikrobnim svojstvima. Od polisaharida se koriste dekstran, hijaluronska kiselina, karboksimetil celuloza, heparin, alginati i dr. Prirodne boje se dobivaju iz biljaka, životinja i minerala te se odabirom specifične boje s antimikrobnim svojstvima istovremeno može postići i bojanja i antimikrobna obrada materijala. Proizvodi biljaka se sastoje od supstanci kao što su fenoli, terpenoidi, esencijalna ulja, alkaloidi, lektoni, polipeptidi i poliacetileni. Osim antimikrobnih pokazuju i antioksidacijska svojstva što je jako bitno za razvoj biomaterijala za medicinsku upotrebu. Glavni nedostatak tih proizvoda je netrajanje jer mnogi od njih ne mogu stvarati veze s tekstilnim materijalima (Ristić i sur., 2011).

1.8. Procjena antimikrobne učinkovitosti tekstilnih materijala

1.8.1. ISO - Internacionalna organizacija za standardizaciju

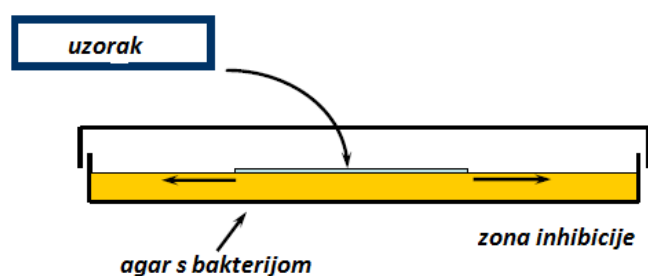
Procjena antimikrobne učinkovitosti materijala se provodi brojnim standardiziranim metodama koje osiguravaju različite organizacije za donošenje standarda kao što su Američko društvo za testiranje i materijale (ASTM) i Američko udruženje tekstilnih kemičara i kolorista (AATCC). Postoje i druge metode koje ne spadaju u djelokrug te dvije organizacije. Jedna od organizacija za donošenje standarda je i ISO – Internacionalna organizacija za standardizaciju (Joiner, 2001). ISO je nezavisna, nevladina međunarodna organizacija s članovima iz 162 nacionalna standardizirana tijela. Okuplja stručnjake iz cijelog svijeta kako bi razvili koncenzusne, tržišno relevantne internacionalne standarde koji osiguravaju zahtjeve, specifikacije, smjernice ili značajke za materijale, proizvode, procese i usluge kako bi se osigurala njihova kvaliteta, sigurnost i učinkovitost. ISO je objavio 21835 internacionalna standarda i srodnih dokumenata koji pokrivaju gotovo svaku industriju, od tehnologije do sigurnosti hrane, agrikulture i zdravstva. ISO standardi utječu na sve, svugdje. Tako se npr. s internacionalnim standardima o kakvoći zraka, vode i tla, emisijama plinova i zračenja te

aspektima zaštite okoliša, štiti zdravlje planeta i ljudi (www.iso.org). Pripremu internacionalnih standarda obavljaju ISO tehnički odbori. U odboru ustanovljenom za neku temu zastupljeno je svako nacionalno standardizirano tijelo zainteresirano za tu temu. Nacrti internacionalnih standarda odobreni od strane tehničkih odbora idu do tih tijela na glasanje te je potrebno odobrenje bar 75% njih da bi došlo do publikacije standarda. Međunarodne organizacije koje su u vezi s ISO - om, također imaju udjela u radu (ISO 20743:2013). Važna organizacija za donošenje standarda je i CEN (Europski odbor za standardizaciju). Da se izbjegne duplikacija standarda između njih, CEN i ISO su se sastali 1991. u Beču gdje su potpisali Sporazum o tehničkoj suradnji (Bečki sporazum). Brojni su standardi nastali upravo kao rezultat djelovanje ove dvije organizacije (Almeida, 2015).

1.8.2. Metode za procjenu antimikrobne učinkovitosti

Testiranje antimikrobne učinkovitosti tekstilnih materijala vrši se s dvije kategorije standardiziranih metoda, kvalitativnih i kvantitativnih. Najčešće korištene metode su AATCC TM147 i ISO 20645 od kvalitativnih i AATCC TM100, JIS L 1902 i ISO 20743 od kvantitativnih. Kvalitativne metode se većinom temelje na testovima difuzije u agaru. One su relativno brze, jednostavne i jeftine, ali subjektivne i neprikladne za sve tipove tekstila i za analize učinkovitosti različitih antimikrobnih sredstava jer ona difuziraju kroz agar različitim brzinama ili uopće ne difuziraju (Ristić i sur., 2011). Najprikladnije su za ispitivanje velikog broja uzoraka da se vidi da li oni uopće imaju antimikrobnu aktivnost prije ispitivanja kvantitativnim testovima (Pinho i sur., 2010). U takvim testovima tekstilni uzorak se stavlja na ploču s agarom koji je inokuliran s ispitivanom bakterijom. Nakon inkubacije (24 - 48 h ovisno o mikroorganizmu koji se koristi), ploča se ispituje za bakterijski rast ispod tkanine i oko rubova tkanine (zona inhibicije - odsutnost bakterijskog rasta odmah oko rubova tkanine) (Slika 3. i 4.). Zona inhibicije se ne može očekivati ako je antimikrobno sredstvo kovalentno vezano za tekstil što sprječava njegovu difuziju u agar. Ako je riječ o difuzibilnom sredstvu, ono difuzira u agar i javlja se zona inhibicije. Premda se ove metode ne mogu koristiti kao kvantitativne, veličina zone inhibicije ipak daje neke znakove jačine antimikrobne aktivnosti ili brzine oslobađanja antimikrobnog sredstva (Ristić i sur., 2011). Iako su napravljene prvenstveno za procjenu antimikrobne aktivnosti tkanina s difuzibilnim antimikrobnim sredstvom, moguće ih je koristiti i za tkanine s nedifuzibilnim sredstvom jer one, premda ne

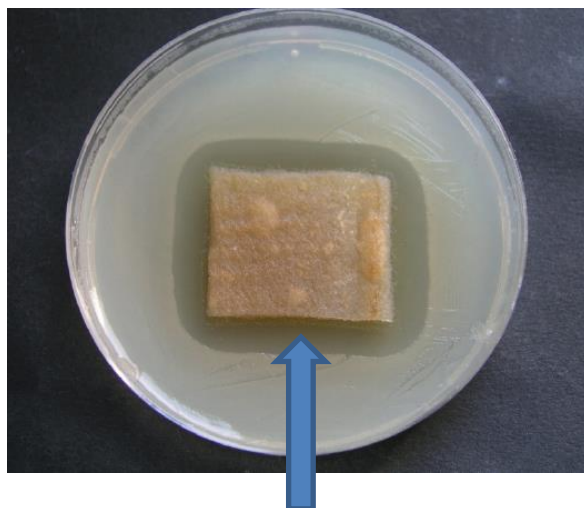
pokazuju zonu inhibicije, mogu imati antimikrobnu aktivnost samo direktnim kontaktom kada nema rasta ispod tkanine. Kvantitativne metode su s druge strane točnije i pouzdanije (Pinho i sur., 2010). Široko su primjenjive, ali zahtijevaju više vremena i materijala (Ristić i sur., 2011). Mogu se koristiti za sve tipove tekstila i antimikrobnih sredstava i mogu se raditi usporedbe između različitih antimikrobnih tretmana na istom tekstilu. Sve se temelje na sličnom principu: uzorak se inokulira s određenim brojem mikroorganizama. Nakon inkubacije, mikroorganizmi koji su preživjeli se ekstrahiraju iz uzorka tako da se tresu na vortexu u poznatoj količini neutralizirajućeg bujona. Konačan broj mikroorganizama se određuje serijskim razrjeđenjima i nasađivanjem na ploče na kojima se broje kolonije i izračunava CFU (eng. *colony forming units*). Antimikrobna aktivnost se predočava kao postotak ili log₁₀ redukcije rasta određene u kontaminiranom uzorku naspram ili početnom inokulumu mikroorganizama ili netretiranoj kontroli bez antimikrobnog sredstva (Ristić i sur., 2011). Standardizirane metode potiču upotrebu i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta jer se one razlikuju u staničnoj stijenci, a posljedično i u osjetljivosti na antimikrobna sredstva (Pinho i sur., 2010). Bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* (Gram pozitivna) i *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativna) preporučuju se u većini metoda, a mnoge studije koriste i bakteriju *Escherichia coli* (Gram negativna) zbog minimalnog zdravstvenog rizika prilikom rukovanja s njom (Gao i Cranston, 2008).



Slika 3. Shema testa difuzije u agaru

(Preuzeto i prilagođeno na temelju

centexbel.eu/files/PDF_files/texchem/20121115_Texchem_biocides.pdf)



Slika 4. Zona inhibicije uzorka tkanine u testu difuzije u agaru

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Ristić i sur., 2011.)

1.8.3. ISO 20743:2013 i ISO 20645:2004 standardi za određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala

EN ISO 20743:2013 i ISO 20645:2004 standarde je pripremio Tehnički Odbor ISO / TC 38 „Tekstili“ u suradnji s Tehničkim Odborom CEN / TC 248 „Tekstili i tekstilni proizvodi“ u skladu sa Sporazumom o tehničkoj suradnji između njih. EN ISO 20743:2013 određuje tri kvantitativne metode za određivanje antibakterijske aktivnosti svih tekstilnih proizvoda uključujući i netkani tekstil. Primjenjiv je za sve tekstilne proizvode bez obzira na tip antibakterijskog sredstva koji se koristi ili metodu njegove primjene (ugrađivanje, naknadni tretman). Ovisno o primjeni i okolišu u kojem će se tekstilni proizvod koristiti kao i o njegovim površinskim svojstvima, korisnik može izabrati najprikladniju od ove tri metode: apsorpcijska metoda (bakterijska suspenzija se inokulira direktno na uzorak), transfer metoda (ispitivana bakterija se stavlja na agar ploču i transferira na uzorak) i metoda printanja (ispitivana bakterija se stavlja na filtar i printa na uzorak). ISO 20645:2004 standard pripisuje kvalitativnu metodu za određivanje učinka antibakterijskog tretmana primijenjenog na tkani, pleteni i ostali ravni tekstil. Koristi se za testiranje antimikrobnog učinka hidrofилnih, za zrak propusnih materijala ili antibakterijskih proizvoda ugrađenih u vlakno, no mogu se testirati i drugi materijali ako se metoda prilagodi tome (www.iso.org).

1.9. Novi istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost: ”Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i obuće“

28. veljače 2017. godine potpisan je ugovor između Hrvatske zaklade za znanost i Tekstilno - Tehnološkog fakulteta o dodjeli sredstava zaklade za istraživački projekt ”Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i obuće“. Projekt traje četiri godine i obrađuje dva područja, tekstilno područje i područje kože/obuće. Podijeljen je u 6 radnih grupa koje čine znanstvenici s Tekstilno–tehnološkog i Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te Technical University of Liberia/Faculty of Textile Engineering. Istražuje različite aspekte struktura i svojstava pređa iz različitih sirovina (viskoza, modal, tencel, pamuk i mješavine), pletiva, čarapa, kože i obuće. Ispitivanje antimikrobnih svojstava tekstila uključuje određivanje antimikrobne učinkovitosti na krutim podlogama i u tekućim medijima na neobrađenim i antimikrobno obrađenim materijalima, obradu s novim antimikrobnim sredstvima na bazi prirodnih biljnih ulja te postupke nanošenja antimikrobnih svojstava na bazi ulja u plazmi.

1.10. Tekstilni materijali korišteni u ovom istraživanju

1.10.1. Prirodna celulozna vlakna - pamuk

Pamuk je jedno od najzastupljenijih i najčešće korištenih prirodnih vlakana na Zemlji (Rana i sur., 2015). Građen je od celuloze, a kako glukozni prsten u celulozi sadrži tri hidroksilne skupine, pamuk ima veliku sposobnost apsorpcije vode do $\frac{1}{4}$ svoje težine zbog čega nastoji pokupiti vlagu s tijela, dajući potrošačima udobnost (Perera i sur., 2013). I druga svojstva pamuka su zaslužna za njegovu ogromnu usvojenost od odijevanja pa sve do tehničkih materijala (visoka specifična površina, porozna struktura, biorazgradivost, propusnost zraka i niža cijena). Unatoč izvrsnim svojstvima, neka svojstva poput inherentnog hidrofilnog svojstva, nemoćne antimikrobne aktivnosti, slabe čvrstoće i slabe osjetljivosti na UV svjetlo, ograničavaju široku primjenu (Rana i sur., 2015). Zbog porozne / hidrofilne strukture, s mogućnošću zadržavanja vode i kisika zajedno s nutrijentima, nudi optimalno obogaćenu kulturu za brzo razmnožavanje mikroorganizama (Ibrahim i sur., 2008).

1.10.2. Regenerirana celulozna vlakna - viskoza, modal, mikromodal i tencel

Viskoza je umjetno vlakno dobiveno kemijskim tretmanom celuloze iz smreke, bora ili jele (Pekhtasheva i sur., 2012). Zbog izvrsne apsorpcije vlage, udobnosti nošenja, svojstava prozračnosti i niske cijene proizvodnje, viskozna vlakna široko su korištena u tekstilnim i odjevnim područjima. Međutim, voda zadržana viskoznim tkaninama osigurava pogodno okruženje za rast mikroorganizama koje nije poželjno u stvarnim primjenama (Zheng i sur., 2014). U usporedbi s prirodnim materijalom od kojeg su dobivena, viskozna vlakna imaju amorfniiju strukturu i zato nižu stabilnost i veći kapacitet vlaženja i bubrenja. Kemijskom strukturom i mikrobiološkom stabilnošću su slična pamučnim. Mikrobiološka stabilnost im je niska, npr. gubitak stabilnosti izazvan mikroorganizmima tla tijekom 12-14 dana je 54-76% i ti parametri su nešto veći od onih za pamuk. Modal i mikromodal su modificirana viskozna vlakna koja su slabo istražena i nisu ispitivana za biostabilnost (Pekhtasheva i sur., 2012). Tencel je liocelno vlakno proizvedeno prije dvadesetak godina kemijskim ispredanjem iz otopine drvene pulpe u N-metilmorfolin-N-oksidu. Izgleda kao pamuk, ali posjeduje veći kristalno / amorfni celulozni omjer i suhu elongaciju, veću otpornost na cikluse pranja i veću homogenost u strukturi i svojstvima. Površina mu je glađa, čime smanjuje iritaciju. Uz to je obnovljiv, ekološki prihvatljiv i može se reciklirati. Porožan je, lako se obrađuje, ima veću površinu bez prašine i površinski mehanizam koji se lako može mijenjati (Lou i sur., 2008). U usporedbi s ostalim umjetnim celuloznim vlaknima, posjeduje veliku čvrstoću, postojanost u suhim i vlažnim stanjima i sklonost uzdužnom kalanju površinskoga sloja, što je zanimljivo modnoj industriji zbog posebnog dodira koji daje. Zbog dobrih svojstava udobnosti koristi se za izradu raznih proizvoda, poput donjeg rublja. Međutim, kada dođe u dodir s ljudskom kožom, može proizvesti neugodan miris (Jang i Lee, 2010). Vlakna tencela imaju sposobnost apsorbirati vodu i vlagu u svoju nanostrukturu, što tencel čini manje sklonim razvoju mikroorganizama, dok npr. pamuk zadržava većinu vode na površini vlakana čime je osjetljiviji na razvoj mikroorganizama (Rogina-Car i sur., 2015).

1.10.3. Materijal sa srebrom Aquacel Ag

Kako su kožne rane otvorene za okoliš i povoljna su okolina za rast bakterija, sve više se preferiraju zavoji koji djeluju kao barijera i potiču zacjeljivanje rana. U njima se koriste

različita antimikrobna sredstva, ali najčešće srebro jer ima široki raspon antimikrobnih aktivnosti, a postoji i minimalan razvoj bakterijske otpornosti na njega (Aramwit i sur., 2010). Na tržištu postoje razni oblici zavoja sa srebrom koji se razlikuju po strukturi i fizičkim svojstvima, obliku i količini srebra i mehanizmu kojim se oslobađa (Barnea i sur., 2009). Aquacel Ag zavoj se pokazao djelotvornim i sigurnim za različite vrste rana. Sastavljen je od natrij karboksimetilceluloznih vlakana koja sadrže 1,2% ionskog srebra. U prisustvu eksudata rane, zavoj apsorbira tekućinu kako bi stvorio gel, vezujući natrij ione i ispuštajući ione srebra (Aramwit i sur., 2010). Gel potiče vlažno okruženje za zacjeljivanje rana te zadržava eksudate. Kad se hidratizira, srebro se premješta s karboksimetilceluloznog nosača čime se postiže kontinuirano oslobađanje, a time i kontinuirana antimikrobna aktivnost. Kako zavoj zarobljava mikroorganizme unutar svojih vlakana, kontrolirano otpuštanje srebra smanjuje biološko opterećenje unutar zavoja, umanjujući rizik od infekcije (Barnea i sur., 2009).

1.10.4. Antibakterijski uložak za cipele s aktivnim ugljenom

Antibakterijski ulošci za cipele marke *Coccine* su napravljeni od kožnog umetka na sloju lateksa debljine 1,8 mm. Sadrže aktivni ugljen koji veže mikroorganizme i poboljšava higijenu obuće. Aktivni ugljen ima izvanredno veliku površinu i volumen pora koji mu daju veliki kapacitet adsorpcije. Aktivnost mu se obično dijeli na adsorpciju, mehaničku filtraciju, ionsku izmjenu i površinsku oksidaciju. Koristi se za obezbojenje tekućina, regeneraciju otapala i uklanjanje bakterijskih endo- i egzotoksina iz vode i zraka. Kada se stavi u sredinu obogaćenu s endotoksinima *Escherichia coli*, uklanja 90-95% toksina. Osim toga, može adsorbirati i bakterije, viruse i druge biokemikalije. Često se koristi u materijalima za previjanje rana jer može smanjiti visoku razinu citokina i kemokina u eksudatu rane. Također, može adsorbirati i neutralizirati smrdljive hlapive masne kiseline koje nastaju kao metabolički nusprodukt anaerobnih bakterija koje zaražavaju ranu. Aktivni ugljen može biti impregniran srebrom, premda za ove uloške ne postoje podaci o tome. Srebro je ugrađeno u matriks ugljena i ne oslobađa se, nego ioni srebra ubijaju bakterije adsorbirane na površinu ugljena i smanjuju bakterijsko opterećenje i rast biofilma (Kerihuel, 2009).

2. CILJ

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- uvođenje i optimizacija ISO standarda ISO 20743:2013 i ISO 20645:2004 za određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala u Laboratorij za bakteriologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu
- određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala načinjenih na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta „Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i odjeće“ Hrvatske zaklade za znanost

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterijski sojevi

Za izradu ovog diplomskog rada koristila sam dva bakterijska soja, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.1.2. Tekstilni materijali

Ispitivala sam antibakterijska svojstva sedam vrsta tekstilnih materijala načinjenih na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (pamuk, obojena viskoza, sirova viskoza, modal, mikromodal, tencel, materijal X) i komercijalno dostupnog materijala koji sadrži srebro (Aquacel Ag) koji je služio kao pozitivna kontrola te sam provjerila stvarnu antibakterijsku aktivnost antibakterijskih uložaka za cipele marke *Coccine* kupljenih u trgovini CCC u Zagrebu. Materijal X predstavlja novi materijal u čijem razvoju sudjeluju znanstvenici s Medicinskog, Agronomskog i Kemijskog fakulteta. Detalji o ovom materijalu se ne smiju iznositi pošto rezultati o njegovom razvoju još nisu objavljeni.

3.1.3. Uredaji i pribor

- Autoklav, sposoban održati temperaturu od 121°C i tlak od 103kPa
- Inkubator, sposoban održati temperaturu od 37±2°C
- Aluminijska folija
- Staklene i plastične Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- Vaga
- Staklene boce i čaše

- Erlenmeyerove tikvice
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Plamenik
- Mikroskop
- Brojač kolonija
- Mikropipete
- Staklena čašica promjera $3,5 \pm 0,1$ cm ispunjena staklenim kuglicama mase oko 100 g
- Sterilne plastične epruvete
- Drygalski štapić
- Vortex
- Bakteriološka užica (eza)

3.1.4. Kemikalije i kulturni mediji

- Kristal violet, lugol i safranin za bojanje po Gramu
- 96% - tni alkohol za flambiranje i 70% - tni za dezinfekciju
- Sterilna fiziološka otopina, odnosno 0,3% - tna NaCl otopina sljedećeg sastava:

Natrijev klorid (NaCl)	3 g
Destilirana voda	1 000 ml

- Hranjivi bujon (eng. *nutrient broth*, NB) sljedećeg sastava:

Goveđi ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Destilirana voda	1 000 ml

- Transfer agar sljedećeg sastava:

Tripton	0,75 g
Kvaščev ekstrakt	0,25 g
Natrij klorid	5,0 g
Agar	20,0 g

Destilirana voda	1 000 ml
------------------	----------

- Agar za brojanje bakterija (eng. *tryptic glucose yeast agar*), u laboratoriju se naziva UBB agar, sljedećeg sastava:

Kvašćev ekstrakt	2,5 g
Kazein tripton	5,0 g
Glukoza	1,0 g
Agar	20,0 g
Destilirana voda	1 000 ml

3.2. Metode

3.2.1. Priprema materijala za eksperiment

Prije početka samog eksperimenta, pripremila sam sav potreban materijal. Za pripremu 1,5 l sterilne fiziološke otopine, dvije staklene boce od 800 ml sam napunila destiliranom vodom i u svakoj otopila 2,4 g NaCl - a. Kako bi dobila 20 - tak transfer agara, u pola litre destilirane vode sam stavila 0,375 g triptonu, 0,125 g kvašćevog ekstrakta, 2,5 g NaCl i 10 g agara. Za pripremu 160 - tak agar ploča za brojanje mikroorganizama (UBB agar), napunila sam dvije staklene boce od 1 litre s destiliranom vodom i u svaku stavila 2,5 g kvašćevog ekstrakta, 5 g kazein triptonu, 1 g glukoze i 20 g agara. Za serijska razrjeđenja bilo je potrebno oko 40 - tak staklenih epruveta napunjenih sa sterilnom fiziološkom otopinom. Da bi to dobila, otopila sam 3 g NaCl - a u litri destilirane vode i po 9 ml te otopine stavila u svaku epruvetu. To je bilo dovoljno otopine za otprilike 96 epruveta. Još sam pripremila i 200 ml hranjivog bujona, stavila sam 0,8 g komercijalno dostupnog NB - a, sastavljenog od goveđeg ekstrakta i peptona, na 100 ml vode. Potom su svi pripremljeni materijali išli na sterilizaciju u autoklav na temperaturu od 121°C i tlak od 103 kPa. Kad je autoklaviranje završilo, izlila sam UBB i transfer agare u petrijeve zdjelice i ostavila da se ohlade i stvrdnu. Kako to nije bilo dovoljno materijala za cijeli eksperiment, dodatno sam pripremila još jednu seriju epruveta, transfer i UBB agara.

3.2.2. Priprema uzoraka materijala

Za ISO 20743 transfer metodu trebalo je pripremiti kružne uzorke materijala promjera 3,8 cm, za ISO 20743 apsorpcijsku metodu uzorke materijala od 0,4 g, a za ISO 20645 metodu difuzije u agaru kružne uzorke materijala promjera 25 ± 5 mm. Za transfer i apsorpcijsku materijali su se trebali sterilizirati. To sam napravila tako da sam svaki uzorak određenog materijala omotala folijom, stavila u staklenu petrijevku, na nju napisala naziv materijala, zalijepila selotejp preko naziva da se ne izbriše, stavila na autoklaviranje i potom sušila u inkubatoru budući da su nakon autoklaviranja uzorci bili mokri.

3.2.3. Priprema bakterijske kulture na ploči

Koristila sam bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 iz banke mikroorganizama na našem fakultetu u kojoj se čuvaju na -80°C . Za početak sam pripremila njihove kulture na UBB pločama. Bakteriološkom uzicom (eza) sam uzela malo bakterija *S. aureus* iz banke mikroorganizama i razmazala po ploči te ju inkubirala 24 h/ 35°C . Nakon porasta bakterijske biomase, ploča se čuvala na $5 - 10^{\circ}\text{C}$ u hladnjaku. Isti postupak sam ponovila za bakteriju *E. coli*. Svakih nekoliko dana sam bakterije precijepila na novu ploču na način da sam ezom uzela malo bakterijske kulture s pripremljene ploče i razmazala ju po novoj UBB ploči.

3.2.4. Bojanje bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* po Gramu

Kako bi utvrdila da se na pripremljenim pločama zaista radi o čistim bakterijskim kulturama, odnosno da bakterije nisu zagađene, radila sam bojenje po Gramu. Uzela sam malo bakterija s bakterijske kulture *S. aureus* na prethodno pripremljenoj ploči i razmazala u kapljici vode na predmetnom stakalcu. Preparat sam fiksirala na plamenu. Na osušeni preparat sam nanijela kristal violet koji sam nakon 1 minute odlila (nisam ispirala vodom). Potom sam prelila Lugolovom otopinom, držala 1 minutu, odlila i isprala s 96% - tnim etanolom do prestanka izlaženja boje. Isprala sam preparat tekućom vodom kako bi prekinula djelovanje alkohola. Potom sam ga prelila safraninom te nakon 1 minute isprala tekućom vodom. Obojeni

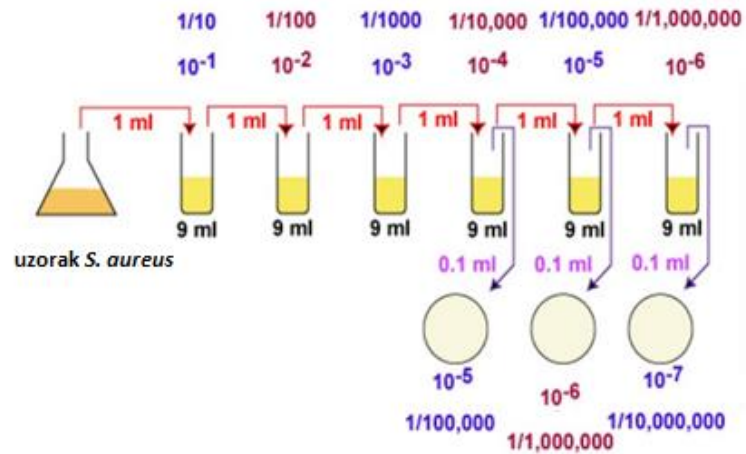
preparat sam osušila između filter papira, na njega dodala kap imerzionog ulja i mikroskopirala upotrebom imerzijskog objektiva. Isti postupak sam ponovila i za bakteriju *E. coli*.

3.2.5. Priprema bakterijske suspenzije i podešavanje njene koncentracije

Početna koncentracija bakterijske suspenzije s kojom sam trebala započeti rad je 10^8 CFU. Kako u laboratoriju nemamo denzitometar pomoću kojeg bi mogli odrediti točnu koncentraciju bakterijske suspenzije mjerenjem optičke gustoće, koncentracija se mogla odrediti samo približno i to tako da sam u sterilnu plastičnu epruveticu stavila 9 ml sterilne fiziološke otopine i 2 eze bakterija pokupljenih s UBB ploče s bakterijom *S. aureus*. Za to se na temelju iskustva pokazalo da je koncentracija od otprilike 10^8 CFU. Kako bi to provjerila, radila sam seriju decimalnih razrjeđenja i određivala CFU (eng. *colony forming units*), broj jedinica koje stvaraju kolonije. To sam radila tako da sam iz epruvete s početnom koncentracijom od 10^8 uzela 1 ml i stavila u epruvetu s 9 ml sterilne fiziološke otopine čime sam početni uzorak razrijedila 10 puta (1:10 ili 10^{-1}), odnosno dobila sam koncentraciju od 10^7 . Nakon homogeniziranja sadržaja epruvete, promijenila sam nastavak pipete i iz te epruvete 1 ml stavila u novu epruvetu s 9 ml sterilne fiziološke otopine da uzorak razrijedim još deset puta, tako sam dobila razrjeđenje 10^{-2} . Isti postupak sam ponavljala dok nisam došla do razrjeđenja od 10^{-6} . Nakon toga sam na UBB ploče stavljala po 0,1 ml iz epruveta s razrjeđenjima 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} . Time sam uzorke dodatno razrijedila pa sam dobila ploče s razrjeđenjima 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} (Slika 5.). Nisam koristila epruvete od 10^{-1} do 10^{-3} jer bi njihove ploče bile nebrojive, tj. naraslo bi previše bakterija. Ploče sam inkubirala 18-24 h na $37 \pm 2^\circ$ C nakon čega sam prebrojila narasle kolonije uz pomoć brojača kolonija (Slika 6.). Brojive ploče su bile one s više od 10, a manje od 300 kolonija. CFU bakterija sam odredila na osnovu broja naraslih kolonija na petrijevim pločama, uzimanjem u obzir volumen uzorka naciyepljen na ploču iz određenog razrjeđenja, prema formuli:

CFU = (broj naraslih kolonija x recipročna vrijednost razrjeđenja uzorka) / volumen inokuluma

Kada sam u jednoj seriji dobila više brojivih ploča (npr. brojive su bile ploče za sva razrjeđenja, 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7}), konačni CFU je bila srednja vrijednost svih brojivih ploča za taj uzorak.



Slika 5. Određivanje CFU pripremom serijskih decimalnih razrjeđenja

(Preuzeto i prilagođeno na temelju www.slideplayer.com)



Slika 6. Brojač bakterijskih kolonija

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Stilinović i Hrenović, 2009.)

3.2.6. Priprema bakterijskih suspenzija u hranjivom bujonu

Prema korištenim standardima, bakterijske suspenzije trebaju biti pripremljene u hranjivom bujonu. Nakon što sam odredila kako dobiti koncentraciju od 10^8 CFU pripremila sam sve potrebne koncentracije suspenzija u hranjivom bujonu (10^6 za transfer metodu i 10^5 za test difuzije u agaru i apsorpcijsku metodu). To sam radila tako da sam u sterilnu plastičnu epruveticu stavila 9 ml hranjivog bujona i u nju dvije eze bakterija pokupljenih s pripremljene UBB ploče sa bakterijom *S. aureus* kako bi dobila koncentraciju od 10^8 CFU. Napravila sam serijska razrjeđenja 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} i tako dobila koncentracije 10^7 , 10^6 i 10^5 koje sam dalje koristila u testovima. Kasnije tijekom eksperimenta sam isti postupak ponovila i za bakteriju *E. coli*.

3.2.7. ISO 20645 Test difuzije u agaru

Nesterilizirani kružni uzorci, promjera 25 ± 5 mm kondicionirali su se 12-24 h u sterilnim petrijevim zdjelicama na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam napravila bakterijsku livadu koristeći Drygalski štapić na ploči s UBB agarom i to tako da sam stavila 0,1 ml prethodno pripremljene suspenzije bakterije *S. aureus* koncentracije od 10^5 CFU na UBB ploču i razmazala Drygalskim štapićem (Slika 7.). Kako bih odredila s kojim je točno volumenom bakterijske suspenzije potrebno raditi, napravila sam i ploču na koju sam stavila 0,2 ml bakterijske suspenzije iste koncentracije. Prvo sam radila s pozitivnom kontrolom, materijalom Aquacel Ag. Po dva uzorka istog materijala sam prislonila na površinu agara i ploču inkubirala 18-24 h na $37 \pm 2^\circ$ C. Nakon inkubacije sam procjenjivala antibakterijsku aktivnost materijala na temelju prisutnosti ili odsutnosti bakterijskog rasta u zoni kontakta između agara i uzorka i na eventualnoj pojavi zone inhibicije oko uzorka. Širinu zone inhibicije sam izračunala prema sljedećoj formuli:

$$H = (D - d) / 2$$

gdje je H zona inhibicije u mm, D je ukupan promjer uzorka i zone inhibicije u mm, a d je promjer samog uzorka u mm. Prvo sam mjerila zonu inhibicije, a zatim sam uzorak maknula i ispitala bakterijski rast ispod njega. Konačan antibakterijski učinak tekstilnih materijala sam odredila na temelju tablice koju pripisuje standard (Tablica 1.). Kada sam vidjela kako nema

pretjerane razlike između ploča s 0,1 i 0,2 ml bakterijskog inokuluma, isti postupak sam ponovila za sve materijale koristeći samo po 0,1 ml bakterijske suspenzije. Kad sam završila s ispitivanjem djelovanja na bakteriju *S. aureus*, isti postupak sam ponovila i za bakteriju *E. coli* za sve materijale osim za materijal X jer na Tekstilno - tehnološkom fakultetu nisu imali više uzoraka tog materijala.

Tablica 1. Procjena antibakterijskog učinka

Zona inhibicije	Rast ispod uzorka	Opis	Procjena
>1 mm	Nema	Zona inhibicije prelazi 1 mm, nema rasta	Dobar učinak
0 – 1 mm	Nema	Zona inhibicije do 1 mm, nema rasta	Dobar učinak
0 mm	Nema	Nema zone inhibicije, nema rasta	Dobar učinak
0 mm	Blagi	Nema zone inhibicije, samo neke ograničene kolonije, rast gotovo potpuno suprimiran	Granična učinkovitost
0 mm	Srednji	Nema zone inhibicije, u usporedbi s kontrolom rast reduciran do pola	Nedovoljan učinak
0 mm	Jaki	Nema zone inhibicije, u usporedbi s kontrolom nema redukcije rasta ili je rast neznatno smanjen	Nedovoljan učinak



Slika 7. Razmazivanje uzorka Drygalskim štapićem na hranjivoj podlozi

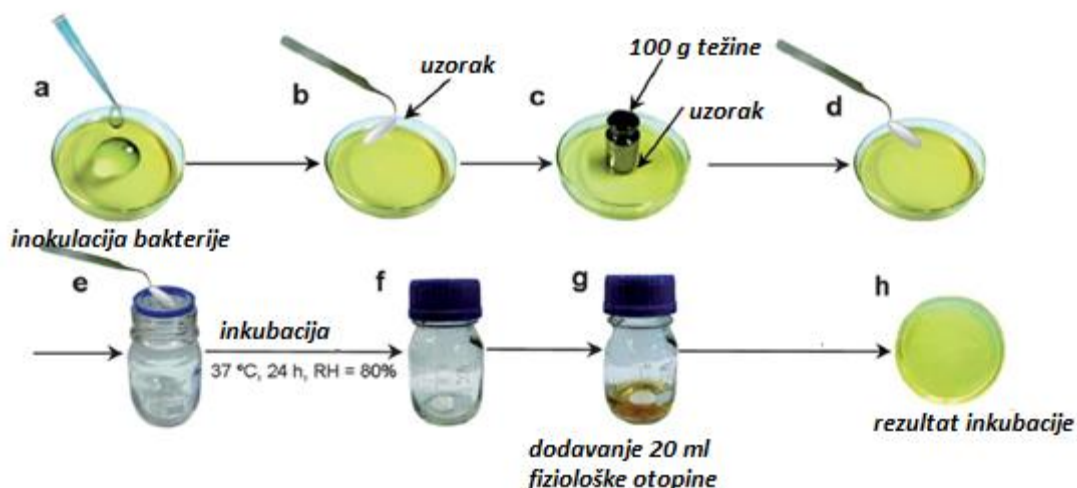
(Preuzeto i prilagođeno na temelju Stilinović i Hrenović, 2009.)

3.2.8. ISO 20743:2013 Transfer metoda

Uzela sam 1 ml bakterijske suspenzije *S. aureus* koncentracije 10^6 CFU, stavila na transfer agar, razmazala po površini Drygalskim štapićem, uklonila višak suspenzije te agar ostavila stajati 5 minuta. Nakon toga sam jedan uzorak određenog materijala stavila na površinu agara i pritisnula staklenom čašicom sa staklenim kuglicama težine oko 100 g i ostavila 60 ± 5 sekundi. Potom sam uzorak stavila u sterilnu plastičnu epruvetu te dodala 20 ml sterilne fiziološke otopine. Tresla sam ju na vortexu i pripremila serijska razrjeđenja na već opisan način kako bi odredila početni CFU. Za prvih par uzoraka sam razrjeđivala do 10^{-6} , a kasnije samo do 10^{-3} jer se nakon inkubacije pokazalo da na pločama od 10^{-4} do 10^{-6} naraste premalo bakterija da bi ploče bile brojive. Nakon pripreme serijskih razrjeđenja, ploče sam inkubirala 24 h na 37 ± 2 °C te sam odredila početni CFU za taj uzorak materijala. Kako su kolonije *S. aureus* nakon 24h inkubacije bile sitne i pretpostavila sam da možda i sve nisu još narasle, za druge materijale sam CFU određivala nakon 48 h inkubacije kada su kolonije bile veće i jasno uočljive. Drugi uzorak istog materijala sam stavila na drugi transfer agar i opet pritisnula po istom postupku te ga zatim stavila u praznu sterilnu petrijevku tako da transferirana površina gleda prema gore i inkubirala 18-24 h na 37 ± 2 °C u vlažnoj atmosferi. Vlažnu atmosferu sam dobila stavljanjem male sterilne posudice s vodom u petrijevku s uzorkom. Nakon inkubacije sam uzorak stavila u sterilnu plastičnu epruvetu u koju sam dodala 20 ml sterilne fiziološke otopine, te sam opet tresla i određivala ovaj put konačni CFU na isti način (Slika 8.). Redukciju bakterijskog rasta sam dobila usporedbom početnog i konačnog broja bakterija prema formuli:

$$R = 100 - (\text{konačan broj bakterija} - \text{početni broj bakterija}) * 100$$

Isto sam ponovila i za bakteriju *E. coli*. Za nju je bilo dovoljno i 24 h inkubacije jer su kolonije bile puno veće nego za bakteriju *S. aureus*.

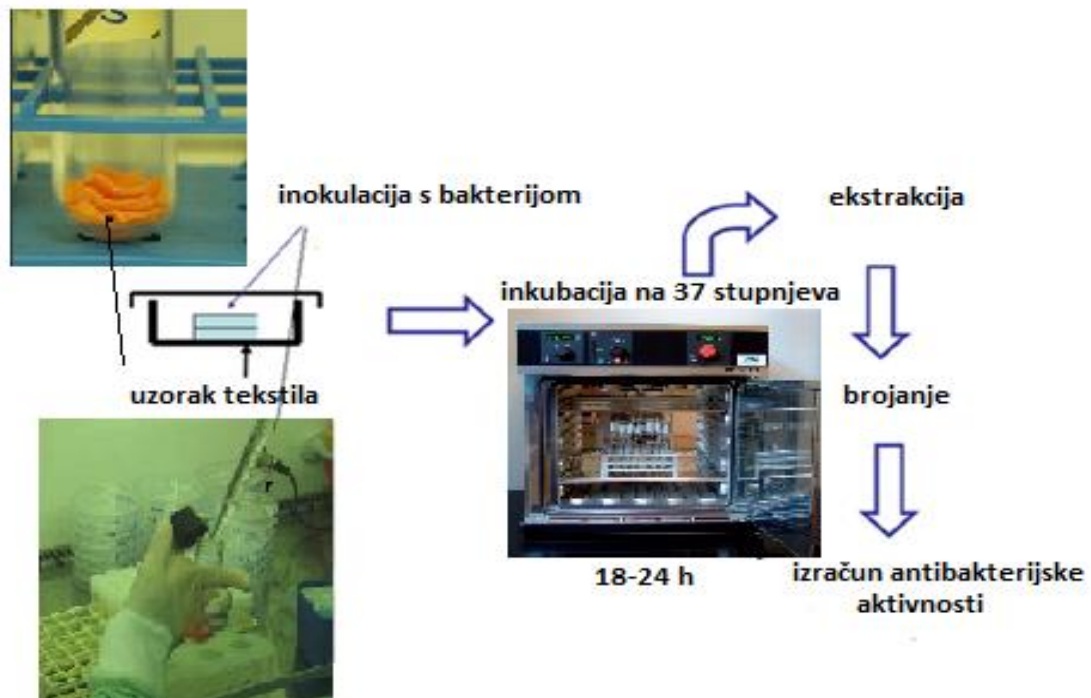


Slika 8. Shematski prikaz ISO 20743:2013 Transfer metode

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Jin, 2012.)

3.2.9. ISO 20743:2013 Apsorpcijska metoda

Koristila sam po dva uzorka istog tekstila. Oba uzorka sam stavila u sterilne plastične epruvete. Na jedan uzorak sam odpipetirala 0,2 ml bakterijske suspenzije *S. aureus* koncentracije 10^5 CFU. Potom sam u epruvetu s uzorkom dodala 20 ml sterilne fiziološke otopine. Epruvetu sam tresla na vortexu 5 puta po 5 sekundi i potom odredila početni CFU. I u ovoj metodi sam razrjeđivala do 10^{-3} . Drugi uzorak istog tekstila sam isto inokulirala s 0,2 ml bakterijske suspenzije 10^5 , ali njega sam odmah stavila na inkubaciju 18-24 h na 37 ± 2 °C. Odmah poslije inkubacije dodala sam 20 ml sterilne fiziološke otopine u epruvetu u kojoj je uzorak, tresla na vortexu i odredila konačan CFU (Slika 9.). Redukciju sam odredila po istom principu kao i u transfer metodi. Isto sam ponovila i za bakteriju *E. coli*. Metoda nije napravljena za uzorak materijala X za bakteriju *S. aureus* jer ga nije bilo dovoljno za ispitivanje svim metodama.



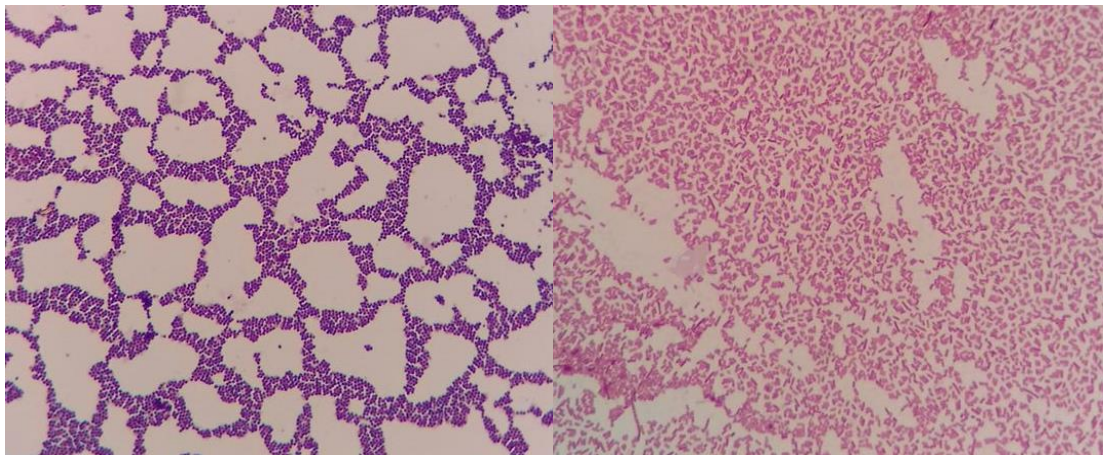
Slika 9. Shematski prikaz ISO 20743:2013 Apsorpcijske metode

(Preuzeto i prilagođeno na temelju
centexbel.eu/files/PDF_files/texchem/20121115_Texchem_biocides.pdf)

4. REZULTATI

4.1. Bojanje po Gramu

Metodom bojenja po Gramu, Gram-pozitivna bakterija *S. aureus* se obojila ljubičasto, a Gram-negativna bakterija *E. coli* ružičasto. Jasno se razlikovao loptasti oblik bakterije *S. aureus* i štapićasti bakterije *E. coli* (Slika 10.). Bakterijska kultura obje bakterije je bila čista, odnosno nije bilo nikakvog zagađenja.



Slika 10. Gram-pozitivno obojena bakterija *S. aureus* (lijevo) i Gram-negativno obojena bakterija *E. coli* (desno) u vidnom polju svjetlosnog mikroskopa

4.2. Podešavanje koncentracije bakterijske suspenzije

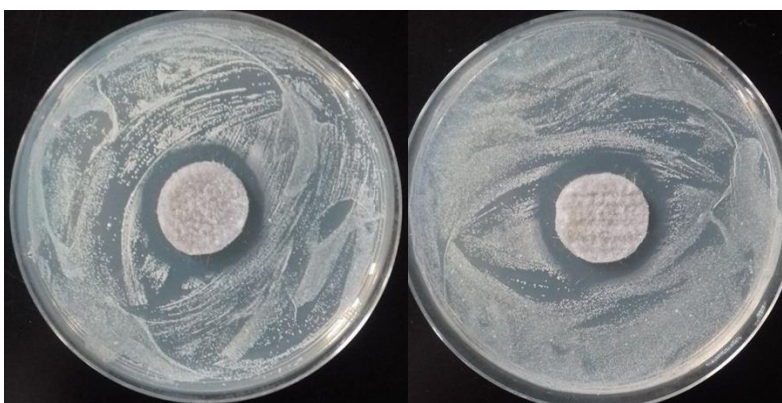
Prema rezultatima dobivenim izračunavanjem CFU, stavljanjem dviju eza bakterija u 9 ml sterilne fiziološke otopine, dobila sam željenu koncentraciju od 10^8 CFU te sam i dalje nastavila raditi prema tom principu.

4.3. ISO 20645 Test difuzije u agaru

Za uzorak materijala Aquacel Ag napravljene su dvije ploče, s 0,1 i 0,2 ml bakterijskog inokuluma i nakon inkubacije među pločama nije bilo neke veće razlike zbog čega sam za ostale uzorke odlučila dodavati po 0,1 ml inokuluma (Slika 11.). Dobra antibakterijska svojstva na testiranu bakteriju *S. aureus* pokazivali su uzorci materijala X, materijala Aquacel Ag i antibakterijskog uloška. Materijal X je testiran dvaput i u oba slučaja su rezultati bili jednaki. Bila je vidljiva blaga zona inhibicije od 1 mm, a rast ispod uzorka je bio gotovo u potpunosti odsutan (Slika 12). Aquacel Ag je pokazivao puno veću zonu inhibicije od 5 mm, a rast ispod uzorka je bio u potpunosti reduciran (Slika 13). Sličan slučaj je bio i s antibakterijskim uloškom kod kojeg je bila jasno vidljiva zona inhibicije od 3 mm, a rasta nije bilo (Slika 14.). Širinu zone inhibicije sam izračunavala prema formuli $H = (D-d) / 2$ gdje je H zona inhibicije u mm, D je ukupan promjer uzorka i zone inhibicije u mm, a d je promjer samog uzorka u mm. Tako je npr. za Aquacel Ag promjer samog uzorka bio je 21 mm, a uzorka i zone inhibicije skupa 31 mm pa je zona inhibicije prema formuli iznosila: $H = (D-d) / 2 = (31-21) / 2 = 5\text{mm}$ (Slika 15.). Granična vrijednost antibakterijske aktivnosti dobivena je za mikromodal, modal i sirovu viskozu kod kojih zona inhibicije nije bila vidljiva, ali je rast ispod uzorka bio slabi (Slika 16., 17., 18.). Ostali uzorci (pamuk, obojena viskoza i tencel) nisu pokazivali antibakterijsku aktivnost (Slika 19., 20., 21.). Uz materijal X, još su neki uzorci testirani dvaput kako bi jasno utvrdila rezultate i u svim slučajevima su rezultati bili istovjetni prvotnom testiranju. Svi rezultati testa difuzije u agaru ispitivanih materijala na bakteriju *S. aureus* prikazani su u Tablici 2.

Antibakterijska svojstva ispitivanih materijala na bakteriju *E. coli* su bila slična. Ponovno su dobra antibakterijska svojstva pokazali uzorci materijala Aquacel Ag i antibakterijskog uloška s jasno uočljivom zonom inhibicije od 3 mm i u potpunosti odsutnim rastom ispod uzorka (Slika 22., 23.). Kako na Tekstilno-tehnološkom fakultetu više nisu imali uzoraka materijala X, nažalost ovaj test nisam bila u mogućnosti izvesti i za njega. Graničnu antibakterijsku aktivnost pokazivali su sirova viskoza, mikromodal, tencel i modal kod kojih je, premda nije bilo zone inhibicije, rast bio samo blagi, odnosno gotovo potpuno suprimiran (Slika 24., 25., 26., 27.). Samo pamuk i obojena viskoza nisu pokazivali nikakvu antibakterijsku aktivnost (Slika 28., 29.). Svi rezultati dobiveni za bakteriju *E. coli* prikazani su u Tablici 3.

Usporedbom antibakterijskog djelovanja materijala na bakterije *S. aureus* i *E. coli*, možemo vidjeti kako su svi materijali, osim tencela, pokazali isti antibakterijski učinak na obje ispitivane bakterije. Tencel nije pokazao nikakav antibakterijski učinak na vrstu *S. aureus*, dok je granični antibakterijski učinak postigao na bakteriji *E. coli*. Ono što još valja zapaziti jest pojava šire zone inhibicije materijala Aquacel Ag u djelovanju na bakteriju *S. aureus* u odnosu na bakteriju *E. coli*. Antibakterijski uložak je pokazao jednako široku zonu inhibicije za obje bakterije, a materijal X nije ispitivan na bakteriju *E. coli* da bi mogla usporediti rezultate.



Slika 11. Uzorci Aquacel Ag s 0,1 ml inokuluma (lijevo) i 0,2 ml inokuluma (desno) za bakteriju *S. aureus*



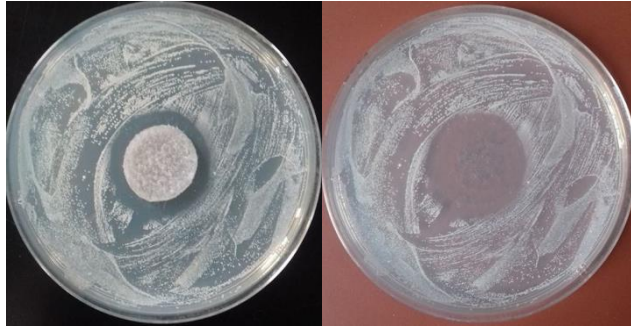
a)

b)

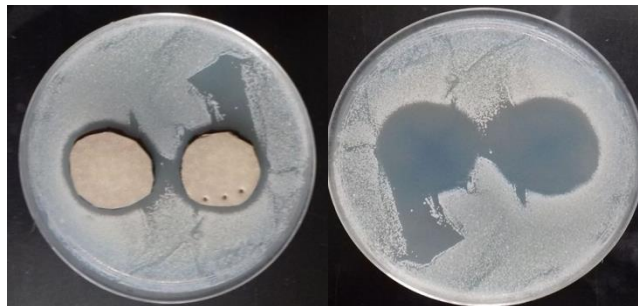
c)

d)

Slika 12. Uzorak materijala X s blagom zonom inhibicije (a, c) i gotovo potpuno odsutnim rastom ispod uzorka (b, d) za bakteriju *S. aureus*



Slika 13. Uzorak materijala Aquacel Ag s zonom inhibicije (lijevo) i odsutnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *S. aureus*



Slika 14. Uzorak antibakterijskog uloška s zonom inhibicije (lijevo) i odsutnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *S. aureus*



Slika 15. Promjer uzorka d-crveno, promjer uzorka i zone inhibicije D-žuto, širina zone inhibicije H-crno



a)

b)

c)

d)

Slika 16. Uzorak mikromodala bez zone inhibicije (a, c) i neznatnim rastom ispod uzorka (b, d) za bakteriju *S. aureus*



a)

b)

c)

d)

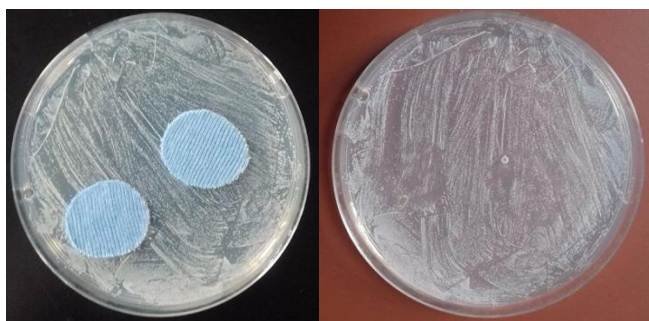
Slika 17. Uzorak modala bez zone inhibicije (a, c) i neznatnim rastom ispod uzorka (b, d) za bakteriju *S. aureus*



Slika 18. Uzorak sirove viskoze bez zone inhibicije (lijevo) i slabim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *S. aureus*



Slika 19. Uzorak pamuka bez zone inhibicije (lijevo) i jakim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *S. aureus*



Slika 20. Uzorak obojene viskoze bez zone inhibicije (lijevo) i jakim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *S. aureus*



a)

b)

c)

d)

Slika 21. Uzorak tencela bez zone inhibicije (a, c) i jakim rastom ispod uzorka (b, d) za bakteriju *S. aureus*



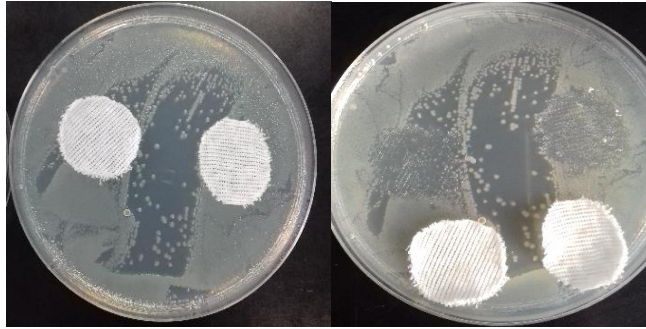
Slika 22. Uzorak materijala Aquacel Ag s zonom inhibicije (lijevo) i odsutnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



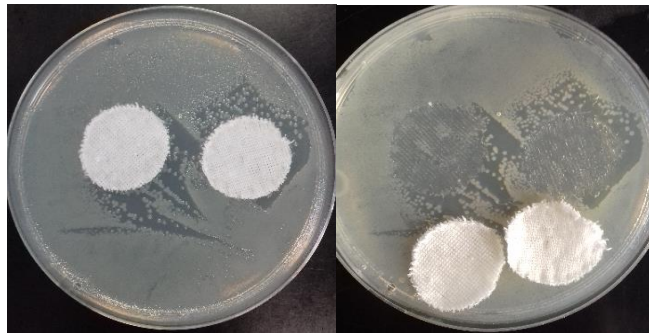
Slika 23. Uzorak antibakterijskog uloška s zonom inhibicije (lijevo) i odsutnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



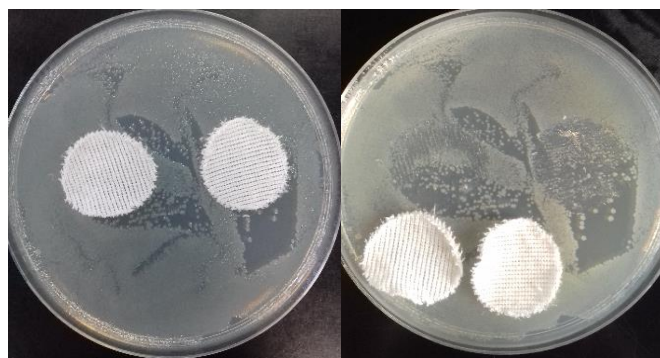
Slika 24. Uzorak sirove viskoze bez zone inhibicije (lijevo) i neznatnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



Slika 25. Uzorak mikromodala bez zone inhibicije (lijevo) i neznatnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



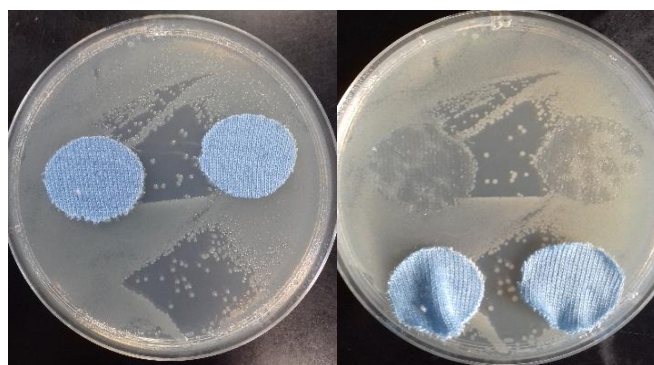
Slika 26. Uzorak tencela bez zone inhibicije (lijevo) i neznatnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



Slika 27. Uzorak modala bez zone inhibicije (lijevo) i neznatnim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



Slika 28. Uzorak pamuka bez zone inhibicije (lijevo) i jakim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*



Slika 29. Uzorak obojene viskoze bez zone inhibicije (lijevo) i jakim rastom ispod uzorka (desno) za bakteriju *E. coli*

Tablica 2. Rezultati testa difuzije u agaru za bakteriju *S. aureus*

Uzorak	Zona inhibicije	Rast ispod uzorka	Antibakterijski učinak
Pamuk	0	Jaki	Nedovoljan učinak
Obojena viskoza	0	Jaki	Nedovoljan učinak
Sirova viskoza	0	Blagi	Granična učinkovitost
Mikromodal	0	Blagi	Granična učinkovitost
Tencel	0	Jaki	Nedovoljan učinak
Modal	0	Blagi	Granična učinkovitost
Materijal X	1 mm	Nema	Dobar učinak
Aquacel Ag	5 mm	Nema	Dobar učinak

Antibakterijski uložak	3 mm	Nema	Dobar učinak
------------------------	------	------	--------------

Tablica 3. Rezultati testa difuzije u agaru za bakteriju *E. coli*

Uzorak	Zona inhibicije	Rast ispod uzorka	Antibakterijski učinak
Pamuk	0	Jaki	Nedovoljan učinak
Obojena viskoza	0	Jaki	Nedovoljan učinak
Sirova viskoza	0	Blagi	Granična učinkovitost
Mikromodal	0	Blagi	Granična učinkovitost
Tencel	0	Blagi	Granična učinkovitost
Modal	0	Blagi	Granična učinkovitost
Aquacel Ag	3 mm	Nema	Dobar učinak
Antibakterijski uložak	3 mm	Nema	Dobar učinak

4.4. ISO 20743:2013 Apsorpcijska metoda

U ispitivanju antibakterijske aktivnosti na bakteriju *S. aureus* značajnu redukciju bakterijskog rasta, a time ujedno i značajnu antibakterijsku aktivnost, su pokazali samo uzorci obojene viskoze i antibakterijskog uložka. Postotak bakterijske redukcije je bio sličan, 92,98 % u slučaju obojene viskoze, odnosno 91,07 % u slučaju antibakterijskog uložka. Ova metoda nije bila primjenjiva za materijal Aquacel Ag jer se vorteksiranjem raspao i nastala smjesa je bila toliko gusta da je bilo nemoguće pipetom povući uzorak (Slika 30.). Također, zbog nedostatka uzoraka ovu metodu nisam mogla isprobati ni na materijalu X. Ostali ispitivani uzorci nisu pokazali redukciju bakterijskog rasta, odnosno antibakterijsku aktivnost, nego se dapače konačan broj bakterija još i povećao najmanje za jedan red veličine (pamuk, sirova viskoza, mikromodal, tencel i modal). U ispitivanju antibakterijske aktivnosti na bakteriju *E. coli* bio je uključen i materijal X. Redukciju rasta pokazali su samo uzorci materijala X i antibakterijskog uložka. Materijal X je doveo do gotovo 100 % - tne redukcije bakterijskog rasta i time pokazao jaku antibakterijsku aktivnost na bakteriju *E. coli*. Antibakterijski uložak je pokazao nešto malo bolju redukciju rasta bakterije *E. coli* (93,54 %) u odnosu na bakteriju *S. aureus* (91,07 %). Kod ostalih materijala redukcije rasta nije bilo, nego se konačan broj bakterija nakon inkubacije povećao najmanje za dva reda veličine. Obojena viskoza koja je

pokazivala visok stupanj redukcije rasta bakterije *S. aureus*, nije imala antibakterijskog učinka na bakteriju *E. coli*. Svi rezultati za obje ispitivane bakterije su prikazani u Tablici 4.



Slika 30. Sadržaj epruvete s materijalom Aquacel Ag nakon vorteksiranja

Tablica 4. Rezultati dobiveni apsorpcijskom metodom za bakterije *S. aureus* i *E. coli*

Uzorak	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	Početni broj bakterija	Konačan broj bakterija	% redukcije	Početni broj bakterija	Konačan broj bakterija	% redukcije
Pamuk	$1,82 \times 10^4$	$>10^5$	/	$5,95 \times 10^3$	$>10^5$	/
Obojena viskoza	$1,61 \times 10^4$	$1,13 \times 10^3$	92,98	$7,75 \times 10^2$	$>10^5$	/
Sirova viskoza	$3,10 \times 10^4$	$>10^5$	/	$1,92 \times 10^3$	$>10^5$	/
Mikromodal	$2,55 \times 10^4$	$>10^5$	/	$2,49 \times 10^3$	$>10^5$	/
Tencel	$1,90 \times 10^4$	$>10^5$	/	$6,90 \times 10^3$	$>10^5$	/
Modal	$1,98 \times 10^4$	$>10^5$	/	$9,20 \times 10^3$	$>10^5$	/
Materijal X	/	/	/	$4,32 \times 10^3$	$3,00 \times 10^1$	99,31
Antibakterijski uložak	$6,05 \times 10^3$	$5,405 \times 10^2$	91,07	$2,84 \times 10^4$	$1,853 \times 10^3$	93,54

4.5. ISO 20743:2013 Transfer metoda

U transfer metodi je antibakterijsku aktivnost pokazivao veći broj uzoraka u usporedbi s apsorpcijskom. Do redukcije rasta bakterije *S. aureus* je došlo u uzorcima sirove viskoze, mikromodala, modala, materijala X i antibakterijskog uloška, a kod ostalih uzoraka (pamuk, obojena viskoza i tencel) se ukupan broj bakterija nakon inkubacije dodatno povećao. Sirova viskoza je pokazivala samo polovičnu redukciju (52,13 %). S druge strane, jaka redukcija je dobivena s uzorcima mikromodala (96,26 %) i antibakterijskog uloška (95,98 %). Modal i materijal X su također doveli do značajne redukcije rasta ove bakterije, preko 80 %. Kada se ispitivala antibakterijska aktivnost na bakteriju *E. coli*, redukciju bakterijskog rasta su pokazivali svi materijali osim sirove viskoze i tencela. Transfer metodu sam ponovila za pamuk i obojenu viskozu kako sam bila iznenađena činjenicom da su pokazivali veoma visok stupanj redukcije budući da za pamuk u prethodnim metodama nisam nijednom dobila redukciju bakterijskog rasta. Opet sam dobila iste rezultate s vrlo visokim stupnjem bakterijske redukcije od 95,63 odnosno 93,98 % što znači da je metoda bila dobro izvođena. Dakle, ti su uzorci antibakterijsko djelovanje pokazali samo na bakteriju *E. coli*, ali ne i na bakteriju *S. aureus*. Uzorci materijala X i antibakterijskog uloška u potpunosti su reducirali sav bakterijski rast i time pokazali bolje djelovanje na bakteriju *E. coli*, nego na bakteriju *S. aureus*. Gotovo 100% - tnu redukciju je pokazivao i modal, također dajući puno bolje rezultate na bakteriju *E. coli*. Jedino je mikromodal dao puno slabiju redukciju rasta bakterije *E. coli* u odnosu na bakteriju *S. aureus* (79,39 %). Sirova viskoza koja je pokazala djelomičnu redukciju rasta bakterije *S. aureus*, u slučaju bakterije *E. coli* nije dovela do nikakve redukcije, nego je ukupan broj bakterija nakon inkubacije narastao za dva reda veličine. Tencel nije reducirao rast nijedne bakterije, nego su obje bakterije dodatno narasle bar za jedan red veličine. Kao ni u apsorpcijskoj metodi, materijal Aquacel Ag nije se mogao ispitati za antibakterijsku aktivnost jer se raspao prilikom vorteksiranja. Svi rezultati dobiveni ovom metodom prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati dobiveni transfer metodom za bakterije *S. aureus* i *E. coli*

Uzorak	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	Početni broj bakterija	Konačan broj bakterija	% redukcije	Početni broj bakterija	Konačan broj bakterija	% redukcije
Pamuk	$2,00 \times 10^4$	$1,65 \times 10^5$	/	$1,66 \times 10^4$	$7,25 \times 10^2$	95,63
Obojena viskoza	$2,11 \times 10^4$	$2,315 \times 10^4$	/	$9,30 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	93,98
Sirova viskoza	$1,53 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	52,13	$1,80 \times 10^3$	$2,94 \times 10^5$	/
Mikromodal	$3,16 \times 10^4$	$1,18 \times 10^3$	96,26	$3,30 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	79,39
Tencel	$1,54 \times 10^4$	$>10^5$	/	$3,30 \times 10^3$	$1,24 \times 10^4$	/
Modal	$1,63 \times 10^4$	$2,75 \times 10^3$	83,13	$7,85 \times 10^3$	$1,65 \times 10^2$	97,90
Materijal X	$1,74 \times 10^3$	$2,05 \times 10^2$	88,22	$2,23 \times 10^3$	0	100
Antibakterijski uložak	$2,00 \times 10^4$	$8,05 \times 10^2$	95,98	$6,81 \times 10^2$	0	100

5. RASPRAVA

Već u startu se početni broj bakterija između različitih materijala razlikovao premda je u sve uzorke dodan isti volumen iste koncentracije određene bakterije. To ukazuje s jedne strane na razliku u sposobnosti bakterija da prijanjaju na površinu različitih materijala. S druge strane, premda sam dodala po dvije eze u 9 ml hranjivog bujona da bih dobila koncentraciju od 10^8 CFU, na taj način nisam mogla pripremiti identičnu koncentraciju za obje bakterije, tako da se početni broj bakterija između materijala za različite bakterije i zbog toga svakako razlikovao. Ipak, na kraju je bitna samo razlika između početnog i konačnog broja bakterija, no da bi dobili još preciznije rezultate, nužno je uvesti mjerenje denzitometrom koji bi odredio točne i početne i konačne koncentracije bakterija i time dao najtočniji podatak o redukciji bakterijskog rasta. Različit konačan broj bakterija nakon inkubacije ukazuje na razlike u antibakterijskim svojstvima među tekstilnim materijalima testiranim u ovom istraživanju.

Kako su tekstilni proizvodi na bazi celuloze zbog svojstava poroznosti, zajedno s hidrofilnom prirodom s mogućnošću zadržavanja vode, kisika i hranjivih tvari, pogodni za rast mikroba, za pamuk i sirovu viskoznu nije se očekivala značajnija antibakterijska aktivnost. Rezultati testa difuzije u agaru su pokazali nedostatan antibakterijski učinak pamuka na bakterije *S. aureus* i *E. coli* što je kompatibilno s literaturom. Perera (2013) je istim testom pokazao da netretirani pamuk ne pokazuje antibakterijsku aktivnost na bakterije *S. aureus* i *E. coli*. Rezultati apsorpcijske i transfer metode ispitivane na bakteriju *S. aureus* su također sugerirali loš antibakterijski učinak pamuka. U ispitivanju bakterije *E. coli*, apsorpcijska metoda nije pokazala antibakterijsku aktivnost pamuka što je također u skladu s literaturom. Budimir (2011) je koristio ISO 20743:2007 apsorpcijsku metodu i broj bakterijskih kolonija *E. coli* i *S. aureus* na netretiranom uzorku pamuka nakon inkubacije je porastao. Ono što je iznenađujuće je rezultat transfer metode koja je pokazala antibakterijski učinak pamuka na bakteriju *E. coli*. Kako slični podaci nisu pronađeni u literaturi, dvaput sam ponavljala ovu metodu i dvaput dobila iste rezultate, što znači da je metoda bila dobro izvođena i da je do redukcije rasta zaista došlo. Xue (2011) je ISO 20743:2007 transfer metodu ispitivao na bakteriju *E. coli* gdje netretirani uzorci pamuka nisu pokazivali redukciju bakterijskog rasta. Tomšić (2008) je koristio tu metodu za bakterije *S. aureus* i *E. coli* i također nije došlo do redukcije bakterija na netretiranim uzorcima pamuka. U literaturi nisam pronašla podatke o tome da se pamuk ispitivao transfer metodom iz 2013. godine.

Test difuzije u agaru za uzorak sirove viskoze pokazivao je graničnu antibakterijsku aktivnost na obje bakterije. Slični podaci nisu pronađeni u literaturi. Zheng (2014) je koristio istu metodu i nije pokazao antimikrobnu aktivnost na bakteriju *S. aureus* za nativna viskozna vlakna. U apsorpcijskoj metodi nije pokazana antibakterijska aktivnost ni na jednu bakteriju, a transfer metoda bila je donekle uspješna samo za bakteriju *S. aureus*. U literaturi nisam pronašla ispitivanje ISO 20743 apsorpcijske i transfer metode na viskozu, već samo druge redukcijske metode i ni u jednoj od njih nije dolazilo do redukcije rasta nijedne od ovih bakterija. Fras (2012) je koristio kvantitativnu ASTM E2149-01 metodu prema kojoj sirova viskoza nije imala antibakterijskih svojstava na bakterije *S. aureus* i *E. coli*. Možemo zaključiti da je sirova viskoza pokazala samo graničnu antibakterijsku aktivnost u testovima difuzije u agaru, a ostali testovi nisu pokazali značajniju redukciju. Moguće je da je ta granična aktivnost zaista prisutna, no s druge strane dosadašnja iskustva s testovima difuzije u agaru su pokazala njihovu priličnu subjektivnost i nedostatak kriterija, tako da je moguće da je procijenjena aktivnost i niža. Rezultati za obojanu viskozu su bili nešto bolji nego za sirovu. Očito je da je bojanje pospješilo antibakterijsku aktivnost viskoze. U ispitivanju aktivnosti na bakteriju *S. aureus* samo je apsorpcijska metoda pokazala značajnu antibakterijsku aktivnost ovog materijala. S druge strane, za bakteriju *E. coli* samo je transfer metoda sugerirala na antibakterijsku aktivnost. Zaključujem da obojana viskoza posjeduje određenu antibakterijsku aktivnost na obje bakterije, ali da to još treba potvrditi drugim metodama jer rezultati između ove tri metode nisu bili konzistentni.

Za uzorke modala i mikromodala dobiveni su slični rezultati. U testu difuzije u agaru su pokazali graničnu antibakterijsku učinkovitost. Transfer metoda je također pokazala značajnu antibakterijsku aktivnost na obje bakterije. Mikromodal je pokazivao zamjetno veću redukciju rasta Gram-pozitivne bakterije *S. aureus*, a modal Gram-negativne bakterije *E. coli*. Jedino gdje do redukcije rasta nije došlo je u apsorpcijskoj metodi. Kako su na antibakterijsku aktivnost ovih materijala ukazala dva od tri korištena testa, određena antibakterijska aktivnost tih materijala svakako postoji. Antibakterijska svojstva modala i mikromodala su slabo istražena pa je u literaturi bilo gotovo nemoguće naći nešto o tome. Zemljić (2012) je koristio kvantitativnu ASTM E2149-01 metodu za vrste *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Candida albicans* i *Candida glabrata*. Sva netretirana regenerirana celulozna vlakna (viskoza, modal i liocel) su pokazala pozitivnu redukciju prema tim mikroorganizmima, no dovoljna redukcija od više od 75% je pokazana samo prema bakteriji *S. agalactiae*. U slučaju drugih

mikroorganizama redukcija je bila manja od 75% tako da ta vlakna nisu zadovoljila uvjete potrebne za antimikrobnu učinkovitost.

Rezultati apsorpcijske i transfer metode su sugerirali da tencel ne posjeduje antibakterijsku aktivnost ni na bakteriju *S. aureus* ni na bakteriju *E. coli*. U testu difuzije u agaru, tencel je pokazao nedovoljnu antibakterijsku učinkovitost na bakteriju *S. aureus*, ali graničnu učinkovitost na bakteriju *E. coli*. Na temelju korištenih metoda može se zaključiti da tencel posjeduje loša antibakterijska svojstva, s izuzetkom granične učinkovitosti na bakteriju *E. coli* dobivene u testu difuzije u agaru, metodi koja se smatra prilično subjektivnom, pa je moguće da je ta aktivnost i nešto manja od procijenjene. Antibakterijska svojstva tencela su vrlo slabo istražena budući da je riječ o relativno novom materijalu. Nisam pronašla podatke da je netko koristio ove metode, međutim u nekim sličnim metodama uglavnom je pokazano isto, s izuzetkom rezultata za test difuzije u agaru na bakteriju *E. coli*. Janjić (2009) je redukcijskom metodom pokazao da netretirani tencel nije posjedovao antimikrobna svojstva na bakterije *E. coli* i *S. aureus*. Praskalo-Milanović (2010) je koristio test difuzije u agaru i nije pokazao antimikrobnu aktivnost netretiranog tencela na bakterije *S. aureus* i *E. coli*.

Antibakterijski ulošci su pokazali dobra antibakterijska svojstva u sve tri ispitivane metode. U testu difuzije u agaru zona inhibicije bila je podjednako široka za obje bakterije. U apsorpcijskoj i transfer metodi, stupanj redukcije bakterijskog rasta je bio jako visok za obje bakterije, nešto viši za bakteriju *E. coli*. Slična istraživanja nisu bila provedena. Zanimljivo je da su ulošci bili učinkovitiji na bakteriju *E. coli*, dok se većinom u literaturi nalaze podaci o boljem antibakterijskom djelovanju materijala na Gram pozitivne bakterije. Niža učinkovitost prema Gram-negativnim vrstama pripisuje se činjenici da one, u usporedbi s Gram-pozitivnim, pokazuju složeniju i gušću strukturu staničnog zida koja je sklonija oduprijeti se antibakterijskom djelovanju (Messaoud i sur., 2013). Međutim, ova pretpostavka ne objašnjava zašto je u ovom radu uložak pokazao bolju aktivnost na Gram-negativnu bakteriju. Bez obzira na to, ono što je sigurno jest da aktivni ugljen sadržan u ulošcima učinkovito veže oba ispitivana mikroorganizma i poboljšava higijenu obuće.

Rezultati testa difuzije u agaru za Aquacel Ag su pokazali jaku antibakterijsku aktivnost na obje bakterije. Zona inhibicije je bila šira u djelovanju na bakteriju *S. aureus* što je u skladu s literaturom. U literaturi nisu pronađena istraživanja koja su koristila ovu metodu, međutim pronađeno je više sličnih testova difuzije u agaru koji su pokazali rezultate u skladu s našima. Aramwit (2010) je korigiranom metodom zone inhibicije pokazao da je Aquacel Ag bio

najdjelotvorniji na bakteriju *Pseudomonasaeruginosa* (zona inhibicije: 22.56 ± 1.77 mm), a zatim na bakterije *S. aureus* (12.97 ± 0.85) i *E. coli* (10.58 ± 0.47), dok su bakterije MRSA (1.84 ± 0.95) i *Bacillus subtilis* (6.69 ± 1.39) bili manje osjetljivi. Wiegand (2014) je koristio test DIN 58940-3 koji je pokazao stvaranje zone inhibicije za bakterije *S. aureus* i *P. aeruginosa* te veći učinak na bakteriju *S. aureus* u usporedbi s Gram-negativnom bakterijom *P. aeruginosa*.

Materijal X je pokazao dobra antibakterijska svojstva u svim korištenim metodama. Za bakteriju *S. aureus* pokazao je dobru antibakterijsku aktivnost u testu difuzije u agaru i u transfer metodi. Za bakteriju *E. coli* nije proveden test difuzije u agaru, ali je zato i u apsorpcijskoj i u transfer metodi došlo do 100% - tne redukcije bakterijskog rasta. Kako nisu provedene sve metode za obje bakterije, ono što se može vidjeti bar iz transfer metode provedene za obje bakterije jest značajno bolje djelovanje na bakteriju *E. coli*. U literaturi nisam naišla na uporabu ovih metoda. Sličnim metodama dobiveni su rezultati u skladu s ovima, s tim da su u literaturi zabilježeni bolji rezultati na bakteriju *S. aureus*.

Među korištenim metodama ispitivanja antibakterijske aktivnosti opažena su neslaganja u slučaju nekih materijala što samo govori o nedosljednosti i pogrešnim rezultatima koji se mogu dobiti s dostupnim metodama. Metode bi se trebale izvoditi pod kontroliranim, standardiziranim uvjetima, kako bi se omogućila ponovljivost rezultata. Međutim, budući da većina metoda ne određuje apsolutni standard za učinkovitost, često se mijenjaju i stoga su nedosljedne među laboratorijima (Ristić i sur., 2011), čime objašnjavam neke razlike između rezultata ovog istraživanja i rezultata drugih istraživanja u kojima su korištene iste metode. Također, budući da za neke materijale nisam mogla pronaći istraživanja koja su koristila iste metode kao i ja, izvijestila sam o rezultatima drugih metoda korištenih za te materijale čime sam htjela dati osnovnu informaciju o njihovoj poznatoj antibakterijskoj učinkovitosti. Međutim, rezultati dobiveni različitim standardima teško se mogu uspoređivati zbog razlika u metodama i ekspresiji rezultata tih standarda, premda se standardi temelje na istom principu.

U ovom istraživanju korištena je jedna kvalitativna, ISO 20645, i dvije kvantitativne, ISO 20743 apsorpcijska i transfer metode za ispitivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala. Kvalitativnom metodom difuzije u agaru dobila sam podatke o inhibiciji rasta mikroorganizama. Ona je bila brza i jednostavna i premda njome nisam dobila kvantitativne rezultate, pokazala se jako korisnom u početnom ispitivanju materijala da se vidi da li oni uopće posjeduju kakvu antibakterijsku aktivnost prije nego što se dobiju kvantitativni rezultati

drugim metodama. Najveći nedostatak joj je što je jako subjektivna jer se rezultati očitavaju samo vizualno, pa se s očitavanjem rezultata mora biti jako pažljiv jer se lako mogu donijeti pogrešni zaključci. Uglavnom se podudarala u rezultatima s bar još jednom od metoda. Kvantitativnom apsorpcijskom i transfer metodom sam dobila podatke o broju bakterija još uvijek živih nakon prikladnog vremena kontakta s materijalom. One su se pokazale preciznijima i pouzdanijima jer su dale kvantitativni rezultat u obliku postotka redukcije bakterijskog rasta, ali mi je za njihovo izvođenje trebalo i više vremena i više pripremljenog materijala i uzoraka. Također, nedostatak tih metoda je i taj da budući da bakterije dolaze u izravni kontakt s materijalom, ne samo da uzorci koji sadrže antimikrobno sredstvo mogu imati učinak, već i uzorci s visokim apsorpcijskim kapacitetima koji imaju sposobnost imobilizacije mikroorganizama (Wiegand i sur., 2014). Transfer metoda se pokazala najuspješnijom od testiranih metoda i vrlo često se podudarala s testom difuzije u agaru. Apsorpcijska metoda je rijetko kad pokazala redukciju bakterijskog rasta. Razliku u rezultatima između tih dviju metoda objašnjavam činjenicom da nisu svi materijali jednako pogodni za ispitivanje svim metodama, nego kao što i u standardu piše, metoda se bira ovisno o primjeni i okolišu u kojem će se materijal koristiti kao i o njegovim površinskim svojstvima. Za neke materijale bila je pogodnija apsorpcijska metoda, za neke transfer, a za neke su bile podjednako pogodne obje metode. U našem istraživanju se više puta pokazalo da izostanak antibakterijskog djelovanja materijala na jednu od ispitivanih bakterija ne znači izostanak djelovanja na drugu i da izostanak djelovanja u jednoj od metoda ne znači da se antibakterijsko djelovanje neće pokazati u drugoj metodi. Kako bi se pouzdano odredila antibakterijska aktivnost materijala, važno je odabrati prikladnu metodu na temelju svojstava materijala jer ona utječe na dobivene rezultate, odnosno na procjenu antimikrobne učinkovitosti. Preporučljivo je paralelno izvoditi nekoliko metoda, a svakako ispitati i bar dvije bakterije, jer se na temelju samo jedne bakterije i jedne metode može pogrešno zaključiti o antibakterijskim svojstvima nekog materijala.

6. ZAKLJUČAK

- ISO standardi ISO 20645:2004 i ISO 20743:2013 uspješno su uvedeni u Laboratorij za bakteriologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i prilagođeni za određivanje antibakterijske aktivnosti tekstilnih materijala.
- Određena je antibakterijska aktivnost tekstilnih materijala načinjenih na Tekstilno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta „Udobnost i antimikrobna svojstva tekstila i odjeće“ Hrvatske zaklade za znanost, te antibakterijskog uložka i materijala Aquacel Ag:
 - materijal X, Aquacel Ag i antibakterijski uložak su pokazali jaka antibakterijska svojstva na bakterije *S. aureus* i *E. coli* u svim korištenim metodama
 - modal i mikromodal su pokazali značajna antibakterijska svojstva na obje bakterije u transfer metodi i metodi difuzije u agaru
 - sirova viskoza je pokazala samo granična antibakterijska svojstva na obje bakterije u metodi difuzije u agaru
 - obojana viskoza je pokazala antibakterijska svojstva na obje bakterije u jednoj od metoda za svaku od njih
 - pamuk nije pokazao antibakterijska svojstva na bakteriju *S. aureus*, a na bakteriju *E. coli* je jaka antibakterijska svojstva postigao u transfer metodi
 - tencel nije pokazao antibakterijska svojstva ni na jednu bakteriju, s izuzetkom graničnih antibakterijskih svojstava na bakteriju *E. coli* u metodi difuzije u agaru
- Kako bi se pouzdano odredila antibakterijska aktivnost materijala, potrebno je paralelno izvoditi nekoliko prikladnih metoda, a svakako i ispitati barem dvije vrste bakterija, jer se na temelju samo jedne vrste i jedne metode može pogrešno zaključiti o antibakterijskim svojstvima nekog materijala.

7. LITERATURA

Almeida, L. (2015): Test methods related to characteristics, performance, and ecological and safety parameters of textiles. U: Muthu, S.S. (ed.) Handbook of sustainable apparel production. CRC Press, str. 351-374.

Aramwit, P., Muangman, P., Namviriyachote, N., Srichana, T. (2010): In vitro evaluation of the antimicrobial effectiveness and moisture binding properties of wound dressings. International journal of molecular sciences **11**: 2864-2874.

Barnea, Y., Weiss, J., Gur, E. (2009): A review of the applications of the hydrofiber dressing with silver (Aquacel Ag®) in wound care. Therapeutics and clinical risk management **6**: 21-27.

Budimir, A., Bischof Vukusic, S., Grgac Flinec, S. (2011): Study of antimicrobial properties of cotton medical textiles treated with citric acid and dried/cured by microwaves. Cellulose **19**: 289-296.

Fras, L., Ristić, T., Tkavc, T. (2012): Adsorption and antibacterial activity of soluble and precipitated chitosan on cellulose viscose fibers. Journal of engineered fibers and fabrics **7**: 50-57.

Gao, Y., Cranston, R. (2008): Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. Textile research journal **78**: 60-72.

Höfer D. (2006): Antimicrobial textiles – evaluation of their effectiveness and safety. U: Hipler, U.C., Elsner, P. (eds.) Biofunctional textiles and the skin. Current problems in dermatology. Basel, Karger, str. 42-50.

Ibrahim, N.A., Gouda, M., Aly, A.A. (2008): Enhancing the antibacterial properties of cotton fabric. Journal of industrial textiles **37**: 203-212.

ISO 20645:2004. Textile Fabrics – Determination of antimicrobial activity - Agar diffusion plate test from International organization for standarization

ISO 20743:2013. Textiles – Determination of antibacterial activity of textile products from International organization for standardization

- Jang, Y.J., Lee, J.S. (2010): Antimicrobial treatment properties of tencel jacquard fabrics treated with ginkgo biloba extract and silicon softener. *Fibers and polymers* **11**: 422-430.
- Janjic, S., Kostic, M., Vucinic, V., Dimitrijevic, S., Popovic, K., Ristic, M., Skundric, P. (2009): Biologically active fibers based on chitosan-coated lyocell fibers. *Carbohydrate polymers* **78**: 240–246.
- Jin, C., Jiang, Y., Niu, T., Huang, J. (2012): Cellulose-based material with amphiphobicity to inhibit bacterial adhesion by surface modification. *Journal of materials chemistry* **22**: 12562–12567.
- Joiner B.G. (2001): Determining antimicrobial efficacy and biocompatibility of treated articles using standard test methods. U: Edwards, J. i sur. (eds.) In *bioactive fibers and polymers*. Washington, American chemical society, str. 201-217.
- Kerihuel, J.C. (2009): Charcoal combined with silver for the treatment of chronic wounds. *Wounds UK* **5**: 87-93.
- Lou, C.W., Lin, C.W. (2008): Properties evaluation of tencel/cotton nonwoven fabric coated with chitosan for wound dressing. *Textile research journal* **78**: 248–253.
- McQueen, R.H., Ehnes, B. (2017): Antimicrobial textiles and infection prevention: clothing and the inanimate environment. U: Bearman, G. i sur. (eds.) *Infection prevention*. Springer international publishing, str. 117-126.
- Messaoud, M., Chadeau, E., Chaudouët, P., Oulahal, N., Langlet, M. (2013): Quaternary ammonium-based composite particles for antibacterial finishing of cotton-based textiles. *Journal of materials science & technology* **30**: 19-29.
- Pekhtasheva, E., Neverov, A., Kubica, S., Zaikov, G. (2012): Biodegradation and biodeterioration of some natural polymers. *Chemistry & chemical Technology* **6**: 263-280.
- Perera, S., Bhushana, B., Bandarac, R., Rajapaksec, G., Rajapaksed, S., Bandara, C. (2013): Morphological, antimicrobial, durability, and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* **436**: 975– 989.

- Pinho, E., Magalhães, L., Henriques, M., Oliveira R. (2010): Antimicrobial activity assessment of textiles : standard methods comparison. *Annals of microbiology* **61**: 493-498.
- Praskalo-Milanovic, J.Z., Kostic, M.M., Dimitrijevic-Brankovic, S.I., Skundric, P.D. (2010): Silver-loaded lyocell fibers modified by TEMPO-mediated oxidation. *Journal of applied polymer science* **117**: 1772–1779.
- Rana, M., Hao, B., Mu, L., Chen, L., Ma, P.C. (2015): Development of multi-functional cotton fabrics with Ag/AgBr-TiO₂ nanocomposite coating. *Composites science and technology* **122**: 104-112.
- Ristić, T., Fras Zemljić, L., Novak, M., Kralj Kunčič, M., Sonjak, S., Gunde Cimerman, N., Strnad, S. (2011): Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. U: Mendez-Vilas, A. (ed.) *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Formatex research center, str. 36-51.
- Rogina-Car, B., Bogovic, S., Katovic, D. (2015): TENCEL with a microbial barrier for medical bras. *Journal of fiber bioengineering and informatics* **8**: 635-643.
- Rogina-Car, B., Budimir, A., Katovic, D. (2016): Microbial barrier properties of healthcare professional uniforms. *Textile research journal* **0**: 1–9.
- Shahidi, S., Wiener, J. (2012): Antibacterial agents in textile industry. U: Bobbarala, V. (ed.) *Antimicrobial agents*. InTech, str. 387-406.
- Stilinović, B, Hrenović, J. (2009): *Praktikum iz bakteriologije*. Kugler d.o.o., Zagreb.
- Teufel, L., Redl, B. (2006): Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganism. *Lenzinger berichte* **85**: 54-60.
- Tomsic, B., Simoncic, B., Orel, B., Cerne, L., Forte Tavcer, P., Zorko, M., Jerman, I., Vilcnik, A., Kovac, J. (2008): Sol–gel coating of cellulose fibres with antimicrobial and repellent properties. *Journal of sol-gel science and technology* **47**: 44–57.
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., Elsner, P., Hipler, U.C. (2014): In vitro assessment of the antimicrobial activity of wound dressings: influence of the test method selected and impact of the pH. *Journal of materials science: Materials in medicine* **26**: 1-13.

Xue, C.H., Chena, J., Yina, W., Jia, S.T., Ma, J.Z. (2011): Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *Applied surface science* **258**: 2468– 2472.

Zemljic, L.F., Sauperl, O., Kreze, T., Strnad, S. (2012): Characterization of regenerated cellulose fibers antimicrobial functionalized by chitosan. *Textile research journal* **83**: 185– 196.

Zheng, J., Song, F., Wang, X.L., Wang, Y.Z. (2014): In-situ synthesis, characterization and antimicrobial activity of viscose fiber loaded with silver nanoparticles. *Cellulose* **21**: 3097–3105.

http://centexbel.eu/files/PDF_files/texchem/20121115_Texchem_biocides.pdf

<http://slideplayer.com>

<https://www.iso.org/home.html>

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Anja Leljak

Datum i mjesto rođenja: 22.08.1993., Zagreb

Adresa prebivališta: Podgaj Petrovski 31, 49234 Petrovsko

Telefon: +385 91 598 8034

E-mail: anja.leljak@hotmail.com

Završeno obrazovanje:

- 2012. – 2015. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij biologije (sveučilišna prvostupnica biologije)
- 2008. – 2012. Opća gimnazija, Krapina
- 2000. – 2008. Osnovna škola Antuna Mihanovića, Petrovsko

Prakse i sudjelovanja:

- 2015. Laboratorijska stručna praksa pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Kovačevića na temu određivanja najpogodnijih uvjeta za razmnožavanje zelene (*Hydra viridissima*) i smeđe hidre (*Hydra oligactis*)
- Sudjelovanje na godišnjem sastanku Hrvatskog mikroskopijskog društva u Rijeci s posterom „Determining the most favorable conditions for breeding of green (*Hydra viridissima*) and brown hydra (*Hydra oligactis*)“ pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Kovačevića

- Sudjelovanje na 11. Znanstveno-stručnom savjetovanju Tekstilna znanost i gospodarstvo na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u siječnju 2018. godine s radom „Usporedba ISO standardnih metoda za određivanje antibakterijskih svojstava materijala“

Radna iskustva:

- Brojni studentski poslovi tijekom studiranja, posebno bih istaknula poslove u Plivi d.o.o. u Kontrolni kvalitete i Sterilnoj proizvodnji, Zagreb, Hrvatska

Znanja i vještine:

- rad na računalu: dobro poznavanje rada na računalu, poznavanje rada u paketu MS Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, pretraživanje Interneta i stručne literature
- strani jezici: engleski (B2), njemački (A2)
- komunikativnost, timski rad, upornost, organizacijske sposobnosti, želja i volja za učenjem
- vozačka dozvola: B – kategorije