

# Antifungalno djelovanje novosintetiziranih kvarternih amonijevih soli

---

Ivančan, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:639276>

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

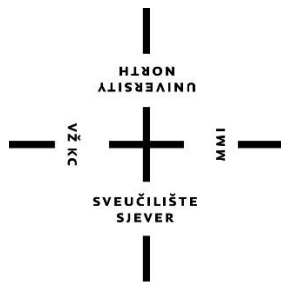
Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





# Sveučilište Sjever

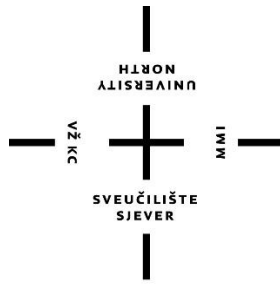
Završni rad br. 77/PREH/2024

## Antifungalno djelovanje novosintetiziranih kvaternih amonijevih soli

Petra Ivančan, 0336056841

Koprivnica, rujan 2024. godine





# Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 77/PREH/2024

## Antifungalno djelovanje novosintetiziranih kvaternih amonijevih soli

### Student

Petra Ivančan, 0336056841

### Mentor

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

### komentor

izv.prof.dr.sc. Marija Jozanović

Koprivnica, rujan 2024. godine

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Prehrambena tehnologija

STUDIJ Preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Petra Ivančan

MATIČNI BROJ 0336056841

DATUM 11.7.2024.

KOLEGIJ Prehrambena mikrobiologija

NASLOV RADA Antifunglano djelovanje novosintetiziranih kvarternih amonijevih soli

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Antifungal activity of newly synthesized quaternary ammonium salts

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv.prof.dr.sc

ČLANOVI POVJERENSTVA

- izv. prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, predsjednik
- prof. dr. sc. Božo Smoljan, član
- izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, mentor
- izv. prof. dr. sc. Marija Jozanović, komentor
- Ivana Dodlek Šarkanj, članica

## Zadatak završnog rada

BROJ 77/PREH/2024

OPIS

Zadatak ovog završnog rada bio je ispitati antifungalno djelovanje novosintetiziranih kvarternih amonijevih soli na plijesni iz rodova *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. i kvasaca iz roda *Candida* spp. Osim toga u radu su opisani antifungalni mikrotestovi te najznačajnije karakteristike za navedene plijesni i kvasce.

ZADATAK URUČEN

11.9.2024

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE  
SJEVER



## **Predgovor**

Prije svega zahvaljujem se mentoru izv.prof.dr.sc. Bojanu Šarkanju na ukazanom iskustvu, znanju, strpljenju te dostupnosti u svakoj fazi rada. Također se želim zahvaliti i ostalim profesorima koji su me pratili i obogaćivali znanjem kroz ovo obrazovanje, kao i svojim kolegama.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima i braći, koji su mi omogućili školovanje te bili moja podrška i snaga kroz cijeli moj život.

## Sažetak

Zbog napretka znanosti, osim antibakterijskih testova od sve veće su važnosti antifungalni testovi. Glavni cilj ovih testova je pronaći MIC vrijednost, koja pokazuje najnižu koncentraciju antifungalnog djelotvornog sredstva (agensa), koja zaustavlja (barem polovicu ili 50% ili manje mikroorganizama, nego u kontroli rasta) vidljivi rast nakon inkubacije. U ovom radu su korišteni antifungalni mikrotestovi za ispitivanje antifungalne aktivnosti novosintetiziranih kvarternih amonijevih soli

Cilj ovog rada bio je ispitati antifungalno djelovanje novosintetiziranih kvaternih amonijevih soli na pojedine vrste iz rodova plijesni *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. i kvasaca iz roda *Candida* spp. Antifungalno djelovanje ispitano je pomoću mikrotesta na mikrotitarskim pločicama. Korišteno je 16 novosintetiziranih kvarternih amonijevih soli od kojih se najučinkovitijim pokazao 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid za kvasce, koji pokazuje izvrstan antifungalni učinak. Kod plijesni su najčešće izvrstan antifungalni učinak imali spojevi od 1 do 5 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-terrtadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium). Kod nekih plijesni i kvasaca određeni spojevi potiču njihov rast. Takvi spojevi mogu se koristiti i kao dodatak mikrobiološkim podlogama kojima će se poboljšati rast i razvoj specifičnih vrsta mikroorganizama za koje ima poboljšana svojstva rasta.

**Ključne riječi:** kvaterne amonijeve soli, antifungalni mikrotestovi, plijesni, kvasci

## Summary

Due to the progress of science, in addition to antibacterial tests, antifungal tests are increasingly important. The main objective of these tests is to find the MIC value, which indicates the lowest concentration of the antifungal active agent (agent), which stops (at least half or 50% or less of microorganisms than in growth control) visible growth after incubation. In this work, antifungal microassays are used to test the antifungal activity of newly synthesized quaternary ammonium salts

The aim of this work was to test the antifungal activity of newly synthesized quaternary ammonium salts on certain types of mold genera *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. and yeasts from the genus *Candida* spp. The antifungal activity was tested using a microtest on microtiter plates. 16 newly synthesized quaternary ammonium salts were used, the most effective of which was 3-hexadecyl-1-vinyl-1*H*-imidazol-3-ium bromide for yeasts, which shows an excellent antifungal effect. In the case of molds, compounds 1 to 5 (3-octadecyl-1-vinyl-1*H*-imidazol-3-ium bromide, 3-hexadecyl-1-vinyl-1*H*-imidazol-3-ium bromide, 3-icosyl-1-vinyl-1*H*-imidazol-3-ium bromide, 3-tertadecyl-1-vinyl-1*H*-imidazol-3-ium bromide, 1,3-didecyl-2-methyl-1*H*-imidazol-3-ium). In some molds and yeasts, certain compounds stimulate their growth. Such compounds can also be used as an addition to microbiological media, which will improve the growth and development of specific types of microorganisms for which the growth properties are improved.

**Key words:** quaternary ammonium salts, antifungal microtests, molds, yeasts



## Popis korištenih kratica

<b>QAS</b>	Kvaterne amonijeve soli
<b>MIC</b>	Minimalna inhibitorna koncentracija
<b>CLSI</b>	Institut za kliničke i laboratorijske <i>standarde</i> (eng. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> )
<b>EUCAST</b>	Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (eng. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )
<b>RPMI</b>	Medij za kulturu stanica (eng. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>MEC</b>	Minimalna učinkovita koncentracija
<b>CFU</b>	Jedinica za stvaranje kolonije (eng. <i>Colony forming unit</i> )
<b>AFST</b>	Testiranje osjetljivosti na antifungalne lijekove (eng. <i>Antifungal susceptibility testing</i> )
<b>DON</b>	Deoksivalenol
<b>DNA</b>	Deoksiribonukleinska kiselina
<b>SAB</b>	Sabouraud dekstroza agar
<b>aw</b>	Aktivitet vode

# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Teorijski dio .....	2
2.1.	Antifungalni mikrotestovi .....	2
2.2.	Referentne metode za ispitivanje osjetljivosti.....	2
2.2.1.	<i>Mikrorazrjeđivanje bujona za kvasce pomoću standarda CLSI.....</i>	2
2.2.2.	<i>Mikrorazrjeđivanje bujona za kvasce korištenjem EUCAST standarda.....</i>	3
2.2.3.	<i>Mikrorazrjeđivanje bujona za plijesni.....</i>	4
2.2.4.	<i>Agar Screening za otpornost na Aspergillus .....</i>	5
2.3.	Komercijalne metode ispitivanja.....	6
2.3.1.	<i>Sensititre YeastOne test.....</i>	6
2.3.2.	<i>Vitek 2 ploče kvasca .....</i>	6
2.4.	Plijesni .....	7
2.4.1.	<i>Fusarium spp.....</i>	7
2.4.2.	<i>Alternaria spp.....</i>	8
2.4.3.	<i>Aspergillus spp.....</i>	9
2.4.4.	<i>Penicillium spp.....</i>	10
2.5.	Kvasci.....	11
2.5.1.	<i>Candida spp.....</i>	12
3.	Praktičan dio .....	15
3.1.	Laboratorijski pribor .....	15
3.2.	Kemikalije i mikroorganizmi .....	15
3.3.	Uređaji.....	16
3.4.	Metode rada.....	16
3.4.1.	<i>Antifungalna temeljna priprema .....</i>	16
3.4.2.	<i>Priprema razrjeđenja kvaternih amonijevih soli.....</i>	17
3.4.3.	<i>Priprema inokuluma.....</i>	17
3.4.4.	<i>Inokulacija jažica .....</i>	18
3.4.5.	<i>Inkubacija.....</i>	19
3.4.6.	<i>Očitavanje rezultata .....</i>	19
4.	Analiza rezultati .....	21
5.	Zaključak.....	33
6.	Literatura.....	34



## 1. Uvod

Jedna od mnogih stvari koje se mogu uočiti istražujući svijet mikroorganizama je njihova iznimna raznolikost u strukturi, funkciji, staništu i upotrebi. Nastanjuju svaki kutak planeta, neophodni su za život na Zemlji, osnova su raznih industrijskih procesa, ali su odgovorni i za neke smrtonosne bolesti. Upravo iz tih razloga postoje antifungalni testovi preko kojih dobivamo MIC vrijednost, koja se kasnije koristi za terapiju pacijenata, informiranje o epidemiološkim studijama i praćenje stope otpornosti na antifungalne lijekove [1].

Spojevi korišteni u ovom radu su kvaterne amonijeve soli koje u svojoj strukturi sadrže pozitivno nabijen dušikov atom na koji je vezan barem jedan hidrofobni ugljikovodični lanac, a ostalo su specifične skupine, koje su vezane za dušik te mogu sadržavati N-C ili O-C vezu. Mogu se pojaviti kao razgranate ili linearne, zasićene ili nezasićene i aromatske ili alifatske. Često se koriste u dezinfekciji i kao sredstvo za čišćenje. Imaju antimikrobna svojstva i mogu uništavati bakterije, viruse i gljivice [2].

Važnost antimikrobnih spojeva nedavno je istaknuta zbog izbijanja pandemije COVID-19. Kvaterne amonijeve soli (QAS) su antiseptici koji su pokazali široki spektar antimikrobnog djelovanja. Patogene bakterije i gljivice stvaraju krute mikrobne biofilme, uzrokujući obrastanje, prijanjanje na podloge i otpornost na dezinfekcijska sredstva. QAS pokazuju biološku aktivnost protiv filamentoznih gljiva i kvasaca, međutim, ta se aktivnost ne može opisati istim mehanizmom kao ona protiv bakterija. Studije aktivnosti pokazuju da je ključni proces u fenomenu antifungalnog djelovanja promjena distribucije naboja na površini stanice te smanjenje površinske napetosti što djeluje na biofilme. Pretpostavlja se da se negativni naboj zamjenjuje pozitivnim, dok se istovremeno ne remeti stanična membrana, što je fenomen koji olakšava prodiranje QAS molekule kroz staničnu stijenku [3].

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Antifungalni mikrotestovi

Iako se antifungalni mikrotestovi ne koriste toliko često kao antibakterijski testovi, od sve veće su važnosti u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima za testiranje osjetljivosti na antifungalne lijekove. Glavni cilj ovih testova je pronaći MIC vrijednost. Ona prikazuje najnižu koncentraciju antifungalnog djelotvornog sredstva (agensa), koja zaustavlja (barem polovicu ili 50% ili manje, nego u kontroli rasta) vidljivi rast nakon 24 sata ili 48 sata od inkubacije. Ta vrijednost se kasnije može koristiti za terapiju pacijenata, informiranje o epidemiološkim studijama i praćenje stope otpornosti na antifungalne lijekove [1].

### 2.2. Referentne metode za ispitivanje osjetljivosti

Kod razrjeđivanja bujona postoje dva standarda, koje je uspostavio CLSI i koje je uspostavio EUCAST. Kod oba standarda se koristi isti medij, ali sa različitim koncentracijama glukoze te se koriste isti kriteriji za definiranje krajnje točke testa što u konačnici daje slične rezultate [1].

#### 2.2.1. Mikrorazrjeđivanje bujona za kvasce pomoću standarda CLSI

Prije više od 30 godina, točnije 1992. CLSI objavio je prvi standard za ispitivanje osjetljivosti kvasaca (M27). Smjernice za ovaj standard opisane su u dokumentu M27, a potrebne su mikrotitarske pločice s 96 jažica u obliku slova U. Medij koji se koristi je RPMI 1640 (koncentracija glukoze do 0,2 %), puferiran sa MOPS puferom (3-(*N*-morfolino) propansulfonična kiselina) do pH 7,0 [1].

Za pripremu antifungalnog agensa potreban je prašak lijeka. Za izradu otopine koriste se dvije formule:

$$\text{težina (mg)} = \text{volumen (mL)} \cdot \text{koncentracija } (\mu\text{g/mL}) / \text{analiza potencije } (\mu\text{g/mg})$$

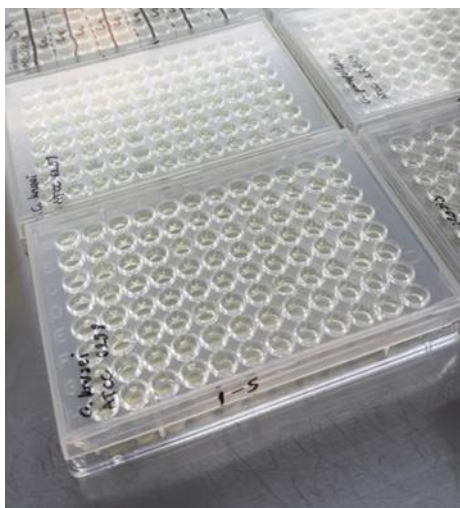
$$\text{volumen (mL)} = \text{težina (mg)} \cdot \text{analiza potencije } (\mu\text{g/mg}) / \text{koncentracija } (\mu\text{g/mL})$$

Priprema inokuluma prema preporukama CLSI-ja zahtijeva potkulturu najmanje dva puta na 35°C s medijem bez antimikrobnih sredstava kao što je krumpirov dekstrozni agar, kako bi se očuvala čistoća i održivost organizma. Odabire se približno 5 kolonija (promjera 1 mm) koje je potrebno suspendirati u sterilnoj fiziološkoj otopini ili vodi, promiješati i podesiti pomoću spektrofotometra

na valnoj duljini od 530 nm. Takva otopina koristi se za izradu radne otopine pripremom razrjeđenja 1:100, a nakon čega slijedi razrjeđenje 1:20, s RPMI 1640 medijem za kulturu. Konačan inokulum bit će  $0,5 \times 10^3$  i  $2,5 \times 10^3$  stanica po mL [1].

Nakon što su pločice s lijekom inokulirane, inkubiraju se bez miješanja na  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  24 sata. Nakon 24 sata očitavaju se rezultati. Jažica za kontrolu rasta se pregledava na prisutnost ili odsutnost rasta. Ploče u kojima nema dovoljno rasta u kontrolnoj jažici za točno očitavanje mogu se ostaviti još 24 sata. Nakon 72 sata sve ploče idu na vizualno očitavanje pod normalnim osvjetljenjem ili pomoću ogledala. Jažice se uspoređuju s kontrolnom jažicom bez ispitivane tvari.

Tako određen MIC (vizualno) može biti donekle subjektivan, zbog čega se preporučuje spektrofotometrijsko očitavanje pri 405 nm ili 450 nm [1].



*Slika 1. Mikrotitarske pločice s 96 jažica [vlastiti izvor]*

### **2.2.2. Mikrorazrjeđivanje bujona za kvasce korištenjem EUCAST standarda**

Za razliku od CLSI-ja, EUCAST preporučuje upotrebu mikrotitarskih ploča s ravnim dnom te se ne smiju koristiti poklopci s niskim isparavanjem jer to može utjecati na koncentraciju kisika. Također ovdje se koriste ploče tretirane tkivom, jer podaci ukazuju na različite vrijednosti MIC kod ploča tretiranih tkivom i ploča koje nisu tretirane tkivom [1].

Preporučuje se kao i kod CLSI korištenje potpuno sintetičkih medija za rast i nalaže upotrebu medija RPMI 1640 (koncentracija od 2 %) s dodatkom glukoze puferiranog na pH 7,0.

Priprema antifungalnog sredstva je ista kao kod CLSI samo uz jednu iznimku. Kod pripreme osnovne otopine EUCAST preporučuje korištenje 200 puta većih koncentracija od najveće koncentracije, dok je kod CLSI priprema osnovne koncentracije veća 10 puta od najveće koncentracije za testiranje [1].

Kod pripreme inokuluma sve organizme treba kultivirati na neselektivnu podlogu kao što je agar s krumpirovom dekstrozom (PDA) na 34 do 37 °C, oko 5 kolonija promjera najmanje 1 mm treba odabrati i suspendirati u sterilnoj destiliranoj vodi i pomoću spektrofotometra namjestiti na valnoj duljini 530 nm. Na kraju se ta otopina koristi za izradu radne otopine pripremom razrjeđenja 1:10 u sterilnoj destiliranoj vodi. Konačna veličina inokuluma je veća od CLSI konačne veličine inokuluma, a bit će između  $1 \times 10^5$  i  $5 \times 10^5$  stanica po mL [1].

Nakon pripreme inokuluma, pločice idu na inkubiranje na  $35 \pm 2$  °C  $24 \pm 2$  sata. Ploče za koje kontrola rasta nije dosegla apsorbanciju od  $\geq 0,2$  na valnoj duljini od 530 nm inkubiraju se dodatnih 12 do 24 sati. Sve ploče se zatim očitaju pomoću čitača ploča za mikrorazrjeđivanje na preporučenoj valnoj duljini od 530 nm (iako se mogu koristiti i druge valne duljine, poput 405 nm ili 450 nm) [1].

### **2.2.3. Mikrorazrjeđivanje bujona za plijesni**

I CLSI i EUCAST imaju standarde mikrorazrjeđivanja bujona za plijesan. Protokol za filamentozne gljive iz CLSI-ja koristi iste ploče koje se koriste za testiranje kvasca. Međutim, inokulum koji se koristi za filamentne gljive je drugačiji. Dok protokol s kvascima koristi  $0,5 \times 10^3$  do  $2,5 \times 10^3$  stanica po mL, protokol za filamentozne gljive koristi  $0,4 \times 10^4$  do  $5 \times 10^4$  konidija po mL za nedermatofite i  $1 \times 10^3$  do  $3 \times 10^3$  konidija za dermatofite. Kada se gustoća konidija mjeri pomoću spektrofotometra, točna apsorbancija ovisit će o vrsti, zbog vrlo različitih veličina konidija filamentoznih gljiva. Dok se većina vrsta kvasca inkubira 24 sata prije očitavanja ploča, filamentozne gljive se inkubiraju 46 do 50 sati, iznimka su *Mucorales*, koje se inkubiraju 24 sata, i dermatofiti, koji se inkubiraju do 96 sata (4 dana) [1].

Iako se ploče za mikrorazrjeđivanje bujona za vrste kvasca i filamentozne gljive očitavaju vizualno pomoću CLSI standarda, sličnosti tu prestaju. I azoli i amfotericin B sprječavaju klijanje konidija plijesni korištenih za inokulaciju i mjere se kao nedostatak rasta. Iz tog razloga, MIC za azole i amfotericin B je prva jažica sa 100 % inhibicijom rasta. Međutim, za ehinokandine, konidije kličaju, ali pri osjetljivim koncentracijama, rast se zaustavlja na vrhu hifa koje se pojavljuju. Rezultat je promjena u načinu rasta, a to se mjeri kao minimalna učinkovita koncentracija (MEC), definirana kao najniža koncentracija koja dovodi do rasta malih, okruglih, kompaktnih oblika hifa u usporedbi s uobičajenim rastom hifa koji se vidi u kontrolnom uzorku. Ova vidljiva promjena u rastu posljedica je činjenice da su ehinokandini fungistatici protiv plijesni, a ne fungicidi [1].

EUCAST mikrodilucija bujona za filamentozne gljive također se razlikuje od EUCAST protokola za kvasce. Kao i CLSI, EUCAST koristi iste ploče za ispitivanje osjetljivosti filamentoznih gljiva i vrsta kvasca. Ali za razliku od CLSI, EUCAST koristi sličnu veličinu inokuluma,  $2 \times 10^5$  do  $5 \times 10^5$  CFU po ml, za plijesni i vrste kvasca. Vrijeme inkubacije ovisi o vrsti, kao i za CLSI metodu, a krajnja točka za azole i amfotericin B očitava se kao potpuna inhibicija rasta, dok se za ehinokandine očitava kao MEC. Dodatna preporuka EUCAST-a je da se ploče očitaju vizualno s crnom trakom papira koja prekriva polovicu jažice. Oštrina papira koja se vidi kroz inokulum pomaže odrediti postoji li vidljiv rast [1].

#### 2.2.4. Agar Screening za otpornost na *Aspergillus*

EUCAST je nedavno razvio standard za određivanje rezistencije na azole u izolatima *Aspergillus* spp. koristeći ploču za probir agara s četiri jažice. Test se sastoji od RPMI 1640 agar ploče s jažicama koje sadrže itraconazol (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), vorikonazol (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i posakonazol (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i jažice bez lijeka. Konidije *Aspergillus* spp. inokuliraju se na ploču, a rast se prati 48 sati. Osjetljivi izolati mogu se prijaviti kao takvi, ali rast u bilo kojoj jažici osim kontrole rasta pokazatelj je da bi mogla biti prisutna rezistencija i potrebno je izvršiti testiranje osjetljivosti bujona na mikrodiluciju [1].



Slika 2. Agar Screening za otpornost na *Aspergillus* spp. [4]

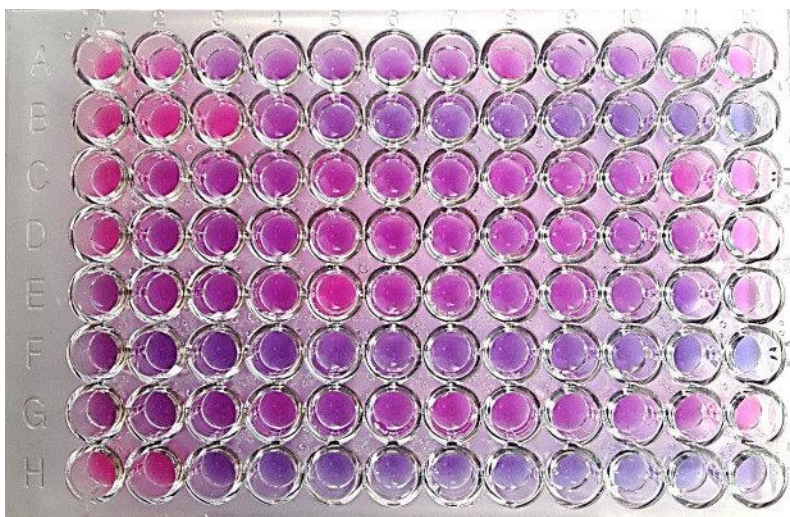


## 2.3. Komercijalne metode ispitivanja

Uz gore opisane referentne metode, postoje komercijalno dostupni proizvodi za ispitivanje osjetljivosti na antifungalne lijekove [1].

### 2.3.1. Sensititre YeastOne test

Sensititre YeastOne kolorimetrijska antifungalna ploča je komercijalno pripremljena ploča za mikrodiluciju bujona. Kao i drugi oblici mikrorazrjeđivanja bujona, YeastOne ploča sastoji se od ploče s 96 jažica koja sadrži serijska razrjeđenja antifungalnog lijeka u definiranom mediju. No, osim toga, jažice sadrže kolorimetrijski indikator rasta resazurin, pa se rast gljivica i određivanje MIC-a temelje na promjeni boje u jažici, a ne na definiranoj količini rasta. Pločice se isporučuju suhe, imaju rok trajanja od približno 24 mjeseca na sobnoj temperaturi i pojedinačno su pakirane, što je idealno za upotrebu u kliničkom laboratoriju u kojem se testiranja rijetko izvode [1].



Slika 3. Sensititre YeastOne test [5]

### 2.3.2. Vitek 2 ploče kvasca

Panel osjetljivosti na kvasce Vitek 2 je automatizirani pristup AFST-u koji koristi spektrofotometrijska očitavanja za određivanje MIC vrijednosti za klinički relevantne vrste *Candida*. Kartice sadrže jažice s osušenim koncentracijama antifungalnih lijekova u mediju. Nakon što se izolat podese na standardiziranu koncentraciju u fiziološkoj otopini, koristi se za rehidraciju jažica s lijekom, a kartica se stavlja u Vitek 2 čitač kartica/inkubator. Rast unutar svake jažice prati se do

36 sati (u prosjeku 12 do 14 sati) pomoću optičkog skenera i generira se izvješće koje sadrži MIC vrijednost zajedno s kategorijom tumačenja za svaki antimikotik na kartici [1].

Automatizacija koju omogućuje ovaj test idealna je za kliničke mikrobiološke laboratorije s velikim opsegom testiranja. Ne zahtijeva specijaliziranu mikologiju i brza je metoda AFST-a koja daje točne rezultate usporedive s onima mikrodilucije bujona [1].

## 2.4. Plijesni

Plijesni zajedno sa kvascima i makroskopskim organizmima spadaju u veliku skupinu gljiva. Aerobni su eukariotski, heterotrofni mikroorganizmi građeni od končastih stanica hifa, a splet hifa čini micelij. Razmnožavati se mogu na spolan i nespolan način. Za spolno razmnožavanje potrebne su dvije hife, koje su nastale iz dvije različite kolonije, te kad dođu jedna do druge spoje se i izmjene nukleinske kiseline te tako dolazi do spolnog razmnožavanja. Dok s druge strane postoji i nesporno razmnožavanje preko spora. Taj proces se odvija na način da dolazi do fragmentacije ili kidanja hifa, koje su djelomično septirane [6].

Često izazivaju bolesti toksikomikoze jer izlučuju mikotoksine, uzrokuju kožne bolesti mikoze te često kvare prehrambene proizvode i izazivaju biorazgradnju. Toksikomikoze su stanja kada dolazi do trovanja organizma ili organskih sustava (koža, dišni sustav, probavni sustav itd.) toksičnim sekundarnim metabolitima, koji se nazivaju mikotoksini. Međutim plijesni mogu parazitirati na domaćinu (npr. na životinji) i to se tada naziva mikoza.

Najzanimljiviji producenti mikotoksina su *Aspergillus* spp. (oblik maslačka), *Fusarium* spp. (oblik polumjeseca), *Penicillium* spp. (oblik prstića), *Alternaria* spp. (oblik šunke), *Claviceps* spp. koja nije mikroskopska gljiva. Ostali predstavnici plijesni su *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Cladosporium* [6].

Osim negativnih uloga plijesni one imaju i pozitivnu ulogu od proizvodnje antibiotika, organskih kiselina (limunska, jabučna, fumarna) do proizvodnje sireva (Roquefort, Gorgonzola, Camembert, Brie) [6].

### 2.4.1. *Fusarium* spp.

Stvara micelij u obliku septiranih polumjeseca sa ružičastim, crvenim ili smeđim krajevima. Rasprostranjene su u tlu te sudjeluju u razgradnji celuloznih biljnih materijala. Uzrokuju trulež voća i povrća, a najčešće ih povezujemo s žitaricama i mahunama, koje napadaju prije žetve. Uzrokuju bolesti kod biljaka uključujući truljenje korijenja i stabljike prije i poslije nicanja. Na

žitaricama se prepoznaje tako što su žitarice crvenkaste boje ili su osušene. Neke vrste *Fusarium* sintetiziraju mikotoksine *zearalenon*, *fumonizine* i *trihotecene* [7].

Plijesan, *Fusarium graminearum*, koja je ispitivana u ovom radu jedna je od najznačajnijih uzročnika bolesti žitarica s kojom se suočavaju proizvođači diljem svijeta. Može proizvesti nekoliko mikotoksina uključujući deoksinivalenol (DON) i zearalenon. Hrana kontaminirana DON-om izaziva imunotoksičnost i povraćanje. Dok zearalenon i nije toliko toksičan, ali s druge strane je ksenoestrogen. *Fusarium* spp. koje proizvode zearalenon vole malo niže temperature, odnosno puno kiše i hladnije vrijeme. Hrana kontaminirana DON-om kod nepreživača može smanjiti stope rasta, dok se zearalenon povezuje s reproduktivnim problemima. Također zaraženi ječam može smanjiti kvalitetu slada i piva [8].



Slika 4. Mikrofotografija spora *Fusarium* spp. pri povećanju od 100 x [9]

#### 2.4.2. *Alternaria* spp.

Ova plijesan je karakteristična po sporama u obliku šunke. Vrste ovog roda uzrokuju smeđe ili crno truljenje plodova rajčice, žitarica, suncokreta, jabuke i smokava, te također i limuna i naranča. Najčešće se javlja kao plijesan s polja na žitaricama, ali se može naći i voću, vinu i pivu [7].

Plijesan *Alternaria alternata*, koja je korištena u ovom radu rasprostranjena je po cijelom svijetu, čije se spore šire na toplom i suhom zraku, tako da je njezin vrhunac ljeto, ali se može naći i u vlažnim, nedovoljno prozračenim kućama. Može uzrokovati alergijsku astmu te je do danas izolirano 16 alergena. Kao što je gore navedeno može zaraziti brojne plodove, sjeme, lišće, stabljike i cvijeće smanjujući poljoprivrednu proizvodnju. Povezuje se s trovanjem hrane zbog proizvodnje mikotoksina koji uključuju alternariol, altenuen, alternaril monometil eter i tenuazonsku kiselinu [10].



Slika 5. Mikrofotografija spora *Alternaria* spp. pri povećanju od 40 x [11]

### 2.4.3. *Aspergillus* spp.

Plijesan čije konidije gledane mikroskopom nalikuju na maslačak. Važan rod u hrani, kako sa stajališta kvarenja, tako i zbog toga što mnoge vrste proizvode mikotoksine. Iako je nekoliko vrsta korišteno za proizvodnju fermentirane hrane (npr. *Aspergillus oryzae* u proizvodnji soja umaka), većina vrsta *Aspergillus* pojavljuju se u hrani kao gljivice koje uzrokuju kvarenje [12].

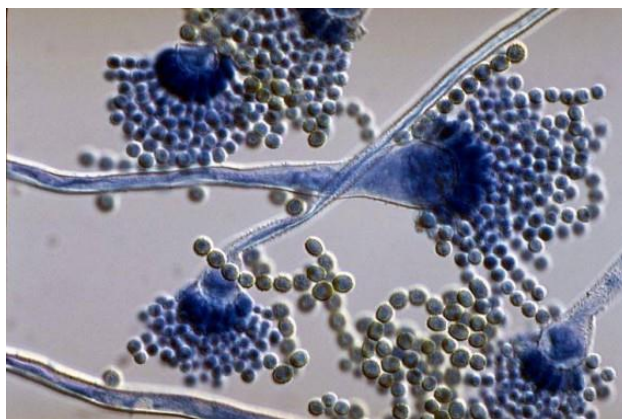
Pojavljuje se u žutoj, crnoj i zelenoj boji u velikom broju namirnica i krmivu. Kod voća se javlja u obliku crnog truljenja breskvi, limuna, naranča i smokvi, a kod mesnih prerađevina javlja se u šunkama, suhomesnatim prerađevinama i slanini. Prisutna je i kod kvarenja ulja kao što je palmino, kikirikijevo i kukuruzno ulje. Kod ljudi mogu uzrokovati infekcije koje su obilježene plućnim bolestima, također mogu uzrokovati i druge bolesti kod imunokompromitiranih osoba. Proizvode aflatoksine i ohratoksin A [12].

U ovom radu su korištene dvije plijesni vrste *Aspergillus*, a to su *Aspergillus flavus* i *Aspergillus ochraceus*.

*Aspergillus flavus* je glavna vrsta koja proizvodi mikotoksine aflatoksine. Za vrijeme suše povećava se prisutnost ove plijesni te može preživjeti u tlu i do nekoliko godina nakon suše. Ova plijesan ovisi o količini vode odnosno padalina. Ovaj patogen uzrokuje propadanje agruma nakon berbe tj. tijekom skladištenja. Također uzrokuje bolesti na usjevima kukuruza, pamuka, kikirikija, kao i orašastih plodova. U vremenskim uvjetima pogodnim za njen rast, *Aspergillus flavus* može uzrokovati trulež klipa kukuruza, također zbog svoje sposobnosti rasta pri niskim količinama vlage ova vrsta je sposobna kolonizirati sjeme žitarica i uljarica [13].

*Aspergillus ochraceus* široko je rasprostranjen, osobito u sušenoj hrani, uključujući sušenu ribu, razne sušene mahunarke, orašaste plodove i sjemenke uljarica, te na grožđu. Rjeđe se javlja kod žitarica (riža, ječam, pšenica, kukuruz). Prisutnost ove vrste u zrnju zelene kave može dovesti do

produkcije ohratoksina A. Prvi put je otkriven 1965. kao mikotoksin iz *Aspergillus ochraceus* i smatra se jakim nefrotoksinom. Na njegovu proizvodnju utječu supstrat na kojem plijesan raste, prisutnost druge kompetitivne mikotoksigene mikroflore, razina vlage i temperatura. Kontaminacije ohratoksinom A prijavljene su u ječmu, raži, pšenici, zobi, zrnu kave i vinu proizvedenom od zaraženog grožđa. Osim što je nefrotoksičan on je i toksin jetre, imunosupresiv teratogen i karcinogen za testise [13].



Slika 6. Mikrofotografija spora *Aspergillus* spp. pri povećanju od 100 x [14]

#### 2.4.4. *Penicillium* spp.

*Penicillium* je dobro poznata i jedna od najčešćih gljiva koja se pojavljuje u različitim staništima, od tla preko vegetacije do zraka, unutarnjih okoliša i raznih prehrambenih proizvoda. Rasprostranjen je diljem svijeta i ima veliki ekonomski utjecaj na ljudski život. Njegova glavna funkcija u prirodi je razgradnja organskih materijala. Također uzrokuje razorne truleži prije i nakon žetve na prehrambenim usjevima. Neke vrste također imaju pozitivne učinke, a prehrambena industrija iskorištava neke vrste za proizvodnju specijalnih sireva, kao što su Camembert ili Roquefort i fermentirane kobasice. Njihova sposobnost razgradnje rezultirala je ispitivanjem vrsta za proizvodnju novih enzima. Njegov najveći utjecaj i pravo na slavu je proizvodnja penicilina, koji je revolucionirao medicinske pristupe liječenju bakterijskih bolesti. [15].

Na namirnicama je ovaj rod prepoznatljiv po plavoj do plavozelenoj boji. Neke vrste uzrokuju zeleno pljesnivo truljenje limuna i plavo pljesnivo truljenje jabuka, krušaka i koštuničavog voća. Također ova gljiva proizvodi i mikotoksine kao što su citrinin, patulin, ohratoksin A itd [6].

U svrhu izrade ovog završnog rada koristila se plijesan *Penicillium expansum*. Ova sveprisutna gljiva, *P. expansum*, rasprostranjena je diljem svijeta te je uobičajena gljiva koja se prenosi zrakom

i sposobna je izazvati alergijsku reakciju kod osjetljivih osoba. *P. expansum* se naziva još i plava plijesan a na mnogim gospodarski važnim voćarskim i povrtnim kulturama uzrokuje meku trulež. Raspon domaćina uključuje jabuke, kruške, breskve, nektarine, marelice, šljive i trešnje, grožđe, jagode, maline, kaki, mango, marakuje, avokado, tikve, mrkvu, luk i rajčicu. Bolest se naziva plava plijesan zbog boje konidija koje proizvodi *P. expansum*. Gubici hrane događaju se u fazama proizvodnje, nakon berbe i prerade u lancu opskrbe hranom. Procjenjuje se da se ekonomski gubici tijekom faze nakon berbe kreću od 10 do 30 % godišnje u svježem voću i povrću. Gubici nakon žetve do 50% prijavljeni su u zemljama u razvoju u kojima nedostaju sanitarni uvjeti i hlađenje [10].

Kontaminacija sa *P. expansum* i patulinom obično se događa nakon berbe i tijekom skladištenja. Patulin se najčešće nalazi u jabukama. Toksin pokazuje mutagena svojstva i snažan je antibiotik za mnoge ljudske bakterije koje uzrokuju bolesti, uključujući *Mycobacterium tuberculosis*. Način djelovanja patulina je da utječe na alkilaciju enzima i inhibira translaciju/transkripciju DNA [10].

Istodobna pojava mikotoksina (primjerice ohratoksina A, kojeg također proizvodi *P. expansum*) može pojačati toksičnost patulina, a netoksični gljivični metaboliti mogu djelovati sinergistički s toksičnima [10].



Slika 7. Mikrofotografija spora *Penicillium* spp. pri povećanju od 100 x [16]

## 2.5. Kvasci

Jednostanične askomicentne gljive koje su tijekom evolucije izgubile sposobnost stvaranja micelija. Stanice kvasca su u obliku kugle, elipsoide ili su pak izdužene. Osnovni oblik je blastospora koja se razmnožava nespolnim putem. Na blastospori se pojavi pup koji na njoj raste

te kada dostigne određenu veličinu se odvaja od osnovne stanice. Kako taj pup raste jezgra iz roditeljske stanice se dijeli i prelazi u pup. Neke tvore lažne micelije ili pseudomicelije na način da se stanice slažu jedna na drugu. Takve stanice se nazivaju pseudohife i primjer takvih kvasaca je *Candida* spp. Osim nespolnog načina mogu se razmnožavati i na spolni način dijeljenjem pomoću askospora [6].

Ako imaju dovoljne količine kisika, dolazi do procesa aerobne respiracije ugljikohidrata, gdje nastaju ugljični dioksid i voda. S druge strane ako nedostaje kisika oni, fermentiraju ugljikohidrate te nastaju ugljični dioksid i etanol. To je osnovno vrenje za proizvodnju piva, vina i kruha, što je pozitivna uloga. Osim toga dobar su izvor proteina, koriste se u proizvodnji vitamina kao što su D<sub>2</sub> i B<sub>3</sub> te su korisni za obradu otpadnih voda. Nasuprot toga imaju i negativne uloge jer stvaraju nepoželjne fermentacije, a najbolji primjer za to je kvarenje pekmeza. Osmofilni kvasci vole visoke koncentracije šećera čak 40-60% i iz tog razloga mogu kontaminirati pekmez. Postoje i patogeni kvasci koji uzrokuju bolesti kandidaze [6].

Predstavnici kvasaca su *Saccharomyces cerevisiae* koji su ovalnog oblika te se razmnožavaju pupanjem i pomoću askospora, drugi predstavnik je štapićasti *Schizosaccharomyces pombe* koji se razmnožava dijeljenjem. Vjerojatno svima najpoznatiji kvasac je *Candida* koja stvara pseudomicelij i ovalnog je oblika. Postoji još i *Torulla kefir*, koja je okruglog oblika i koristit se za proizvodnju kefira [2].

### **2.5.1. *Candida* spp.**

*Candida* je otkrivena 1923. godine od strane Berkhouta. Sam naziv potječe od latinske riječi *Candidus* i znači bijel, upravo zbog toga jer njezine stanice ne sadržavaju karotenoidne pigmente. Spada u veliku porodicu, koju čini oko 200 rodova od kojih je 40 patogeno za ljude. Najpoznatiji rod je *Candida albicans* koju povezujemo s bolestima kod ljudi. Osim tog roda postoji i *Candida glabrata*, *Candida inconspicua* i *Candida krusei* te one također stvaraju infekcije kod ljudi. *Candida* spp. osim što uzrokuje bolesti kod ljudi može kontaminirati primjerice i masulj u proizvodnji vina. Karakteristične za ovaj aseksualni, askomicetni kvasac su stanice s dvostrukom membranom koje ne sadrže ksilozu, ramnozu ili fruktozu. Za život *Candide* optimalni uvjeti su temperatura od 20 do 40 °C, voli visoke koncentracije šećera, pH potreban za rast je između 4,5 i 5,5 te ne podnose visoke količine alkohola. Može se pronaći u velikom broju namirnica, pa tako *Candida famata* kontaminira mesne proizvode, *Candida pelliculosa* i *Candida krusei* kiselu hranu dok *Candida colliculosa* hranu sa niskim aw. Hrana u kojoj se najčešće nastanjuje je svježe mlijeko, mljeveno meso, fermentirana zrna kaka, kefir te pivo i voćni sokovi [17].



Slika 8. Mikrofotografija stanica *Candida* spp. pri povećanju 40 x [18]

U svrhu izrade ovog rada korištene su *Candida albicans*, *Candida krusei* i *Candida parapsilosis*.

*Candida albicans* je prirodno je prisutna u tijelu, posebice u ustima, crijevima i genitalnom području. Međutim kada se naruši ravnoteža mikroorganizama u tijelu može uzrokovati infekcije. Ne nalazi se često u okolišu, već je poznata po tome da napada floru kože i sluznice, no može uzrokovati i bolest vulvovaginitis kod žena i infekciju krvotoka poznatu pod nazivom kandidemija. *Candida albicans* ima sposobnost da raste i kao jednostanični pupajući kvasac i kao filamentozni pseudohifalni ili hifilni oblik. Čimbenici o kojima ovisi njezin oblik su temperatura, pH, hranjive tvari i prisutnost tj. odsutnost krvnog seruma [19].

*Candida krusei*, za razliku od ostalih *Candida* spp. koje su jajolikog oblika, je izdužena odnosno ima oblik riže i razmnožava se stvaranjem pseudohifa. Raste na maksimalnoj temperaturi od 43-45 °C, a ovaj kvasac odlikuje se otpornošću na konzervanse koji sadrže slabe organske kiseline.

Proizvodi velike koncentracije aldehida, fermentira glukozu te asimilira citrate. Može se naći na prirodnim staništima kao što su voće, kanalizacija, silaža, tlo, hrana (uključujući mliječne i mesne proizvode, kisele krastavce). Kod ljudi se može naći, kao kolonizator zdrave ljudske flore no vrlo rijetko. Češće se javlja kod sisavaca i ptica, posebno u probavnom traktu i koži [20].

*Candida parapsilosis* učestalost ovog kvasca je značajno porasla u odnosu na prošlo desetljeće te je u nekim zemljama učestalija nego *Candida albicans*. Stanice imaju ovalni, okrugli ili cilindrični oblik. *Candida parapsilosis* ne stvara prave hife već postoji u obliku kvasca ili pseudohifalnog obliku. U usporedbi s drugim vrstama *Candida* spp., *Candida parapsilosis* ima veliku rasprostranjenost u prirodi. Nije obvezni ljudski patogen, jer je izoliran iz neljudskih izvora kao što su domaće životinje, kukci, tlo i morski okoliš. Jedna je od gljivica koje se najčešće izoliraju iz subungalnog prostora ljudskih ruku. Od posebnog je značaja za kritično bolesnu novorođenčad, uzrokujući više od jedne četvrtine svih invazivnih gljivičnih infekcija u dojenčadi



niske porođajne težine i do jedne trećine neonatalnih infekcija *Candidom* u krvotoku. Često se povezuje kao gljivični organizam koji se povezuje s neonatalnom smrtnošću novorođenčadi [21].

### 3. Praktičan dio

U eksperimentalnom dijelu rada istraživano je antifungalno djelovanje novosintetiziranih spojeva pomoću CLSI standarda, na plijesni iz rodova *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* i *Penicillium* i kvasaca iz roda *Candida*. Antifungalno djelovanje ispitano je pomoću mikrotesta na mikrotitarskim pločicama [22].

#### 3.1. Laboratorijski pribor

U svrhu provođenja eksperimentalnog dijela od laboratorijskog pribora korištene su mikrotitarske pločice sa 96 jažica u obliku slova U, elektronske mikropipete, nastavci za pipete, membranski filteri, Petrijeve zdjelice, plastične kadice, staklena čaša i staklena boca od 50 mL [22].

#### 3.2. Kemikalije i mikroorganizmi

Korištene kemikalije

- Novosintetizirani spojevi (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didodecil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium bromid, 3-decil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 2-metil-1,3-dioktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-dodecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-diikozil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1-oktil-1*H*-benzo[d]imidazol, 3,3'-(heksan-1,6-diil)bis(1-oktil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium dibromid, 1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium bromid)
- Agar medij - Sabouraud dekstroza agar (SAB) ploče
- Testni medij RPMI-1640
- Sterilna fiziološka otopina
- Sterilni 0,9% NaCl
- *Fusarium graminearum*
- *Alternaria alternata*
- *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*
- *Penicillium expansum*

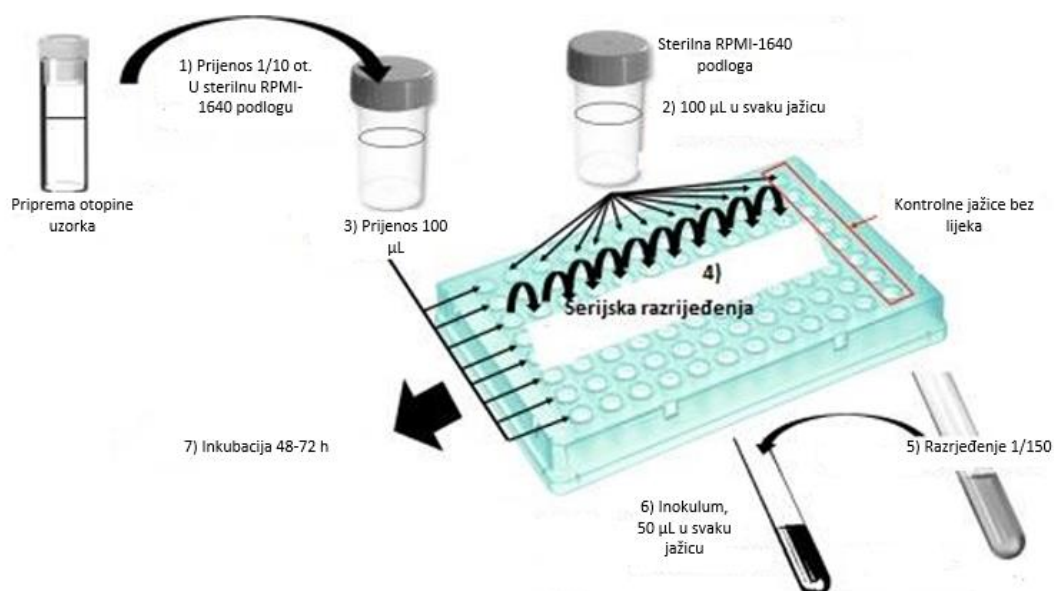
- *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*

### 3.3. Uređaji

- Vortex
- Termostat
- Uređaj za očitavanje (čitač mikrotitarskih ploča)

### 3.4. Metode rada

Ova metoda se sastoji od nekoliko koraka, koji će biti detaljno objašnjeni u nastavku [22].



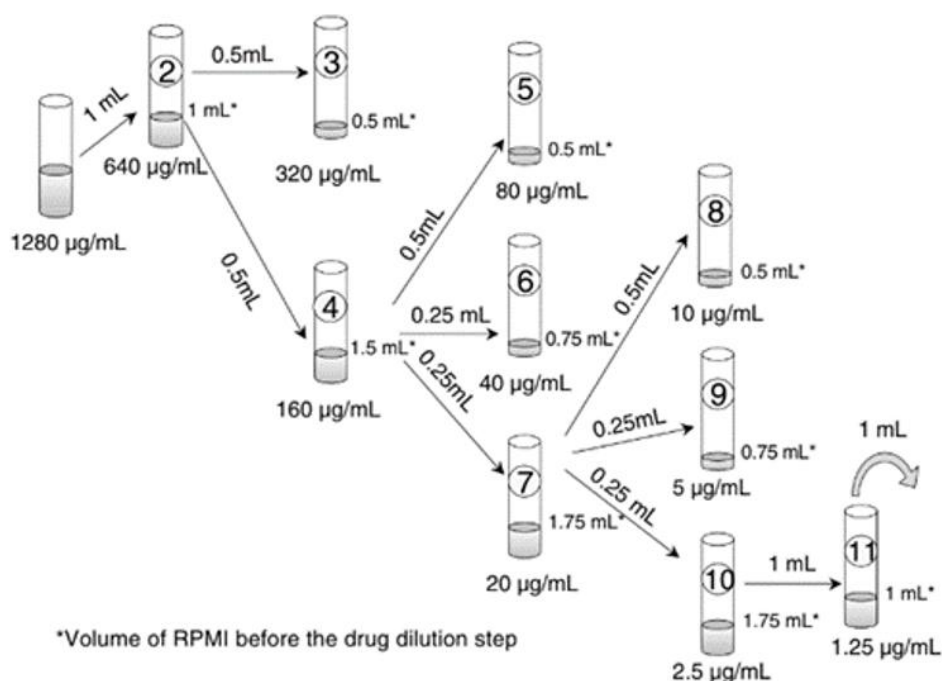
Slika 9. Postupak antifungalnog testiranja [23]

#### 3.4.1. Antifungalna temeljna priprema

Antifungalni spojevi su stigli pripremljeni, odnosno spremni za upotrebu. Radi veće sigurnosti i točnosti rezultata spojevi su sterilizirani pomoću membranskih filtera od 0,22 µm. Ispitan je antifungalni učinak gore navedenih novosintetiziranih spojeva [22].

### 3.4.2. Priprema razrjeđenja kvarternih amonijevih soli

Prilikom pripreme potrebna je mikortitarska ploča sa 96 jažica u obliku slova U. Ona se sastoji od 12 stupaca, potrebno je označiti 10 stupaca, od 2-11 nazivom antifungicida i odgovarajućim koncentracijama. Potom se dodaju odgovarajuće količine sterilnog RPMI u svaki stupac. Postupak je sljedeći, u stupce 2 i 11 potrebno je dodati 1 mL RPMI, u stupac 3,5 i 8 dodaje se 0,5 mL RPMI, u stupac 6 i 9 dodaje se 0,75 mL RPMI, dok u stupac 4 dodaje se 1,5 mL RPMI i u stupac 7 i 10 dodaje se 1,75 mL RPMI. Nakon toga se u stupac 1 dodaje 1 mL osnovne otopine za razrjeđenje protiv gljivica. Prvi stupac označava kontrolu sterilnosti. Zatim slijedi prijenos iz stupca 2, 0,5 mL u stupac 3 i 4, prijenos iz stupca 4, 0,5 mL u stupac 5 i 0,25 mL u stupac 6 i 7, prijenos iz stupca 7, 0,5 mL u stupac 8 i 0,25 mL u stupac 9 i 10, prijenos iz stupca 10, 1 mL u stupac 11 te se na kraju odbacuje 1 mL iz stupca 11 [22].

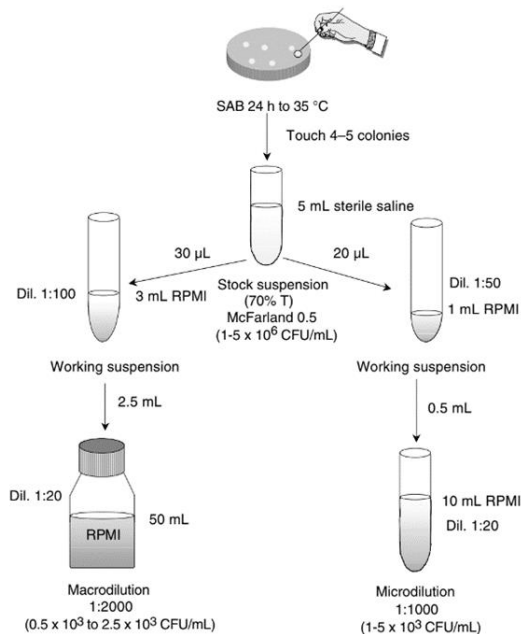


Slika 10. Postupak razrjeđenja [22]

### 3.4.3. Priprema inokuluma

Inokulum se priprema izravnom suspenzijom kolonija. Lagano se dodirne 5 kolonija (barem 1 mm promjera) pomoću mikrobiološke ušice, potom se stanice suspendiraju u 5 mL sterilnog 0,9 % NaCl i promiješaju korištenjem vortexa 15-20 s. Potom je potrebno podesiti zamućenost inokuluma na gustoću 0,5 McFarlandovog standarda na 530 nm valne duljine. Ovaj postupak daje

suspenciju gljivica od  $1-5 \times 10^6$  stanica/mL. Priprema radne suspenzije se provodi razrjeđenjem suspenzije u omjeru 1:100 nakon čega slijedi razrjeđenje 1:20 s RPMI, što rezultira s  $5 \times 10^2$  do  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL [22].



Slika 11. Postupak pripreme inokuluma [22]

### 3.4.4. Inokulacija jažica

Organizacija jažica je vrlo bitna u ovom djelu. Potrebno je uključiti dva stupca jažica, za pozitivnu (kontrola rasta) i negativnu (sterilnost) kontrolu. Započinje se inokulacijom najniže koncentracije lijeka za testiranje te se prelazi na veće koncentracije. Dva stupca jažica sadrže 0,1 mL RPMI (ili otapala) umjesto antifungicida i 0,9 mL razrijeđenog inokuluma (kontrola rasta) ili 0,9 mL RPMI (kontrola sterilnosti). Kontrola rasta osigurava da je inokulum održiv i da aktivno raste i označava 100 % rast izolata. Kontrolna ploča inokuluma potvrđuje da je inokulum ispravno standardiziran. Kontrolne ploče s inokulumom treba pripremiti za svaki soj [22].



Slika 12. Inokulirane jažice [vlastiti izvor]

### 3.4.5. Inkubacija

Na kraju ovog postupka mikrotitarske pločice idu na inkubaciju 48-72 h na 35 °C [22].

### 3.4.6. Očitavanje rezultata

Rezultati se očitavaju pomoću uređaja za očitavanje ploča, nakon 48-72 h, ovisno o vrsti. Pločice se provjeravaju na dvije valne duljine 450 nm i 405 nm. Također ploče se mogu i vizualno procijeniti preko provjere zamućenja između kontrole rasta i sterilne kontrole [22].



Slika 13. Očitavanje rezultata pomoću uređaja [vlastiti izvor]

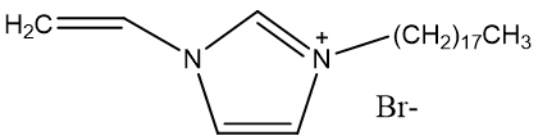
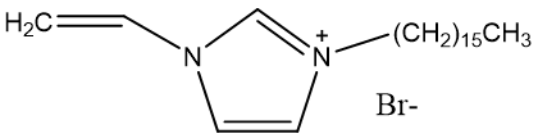
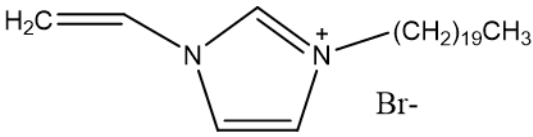
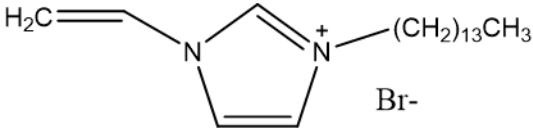


*Slika 14. Očitavanje rezultata golim okom [vlastiti izvor]*

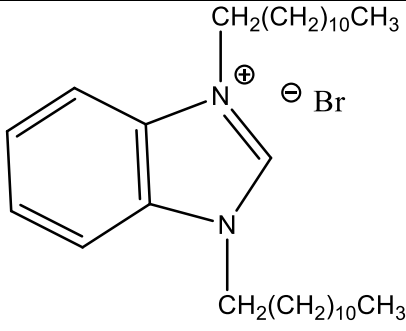
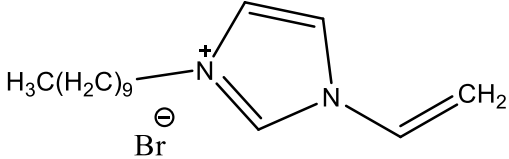
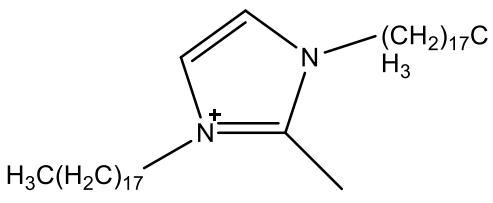
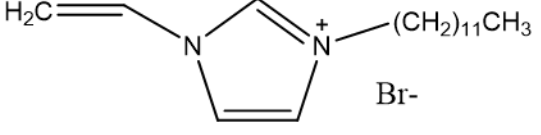
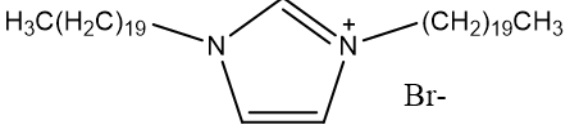
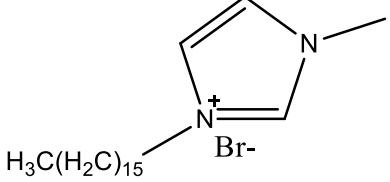
## 4. Analiza rezultati

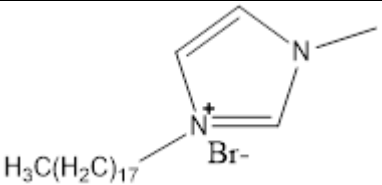
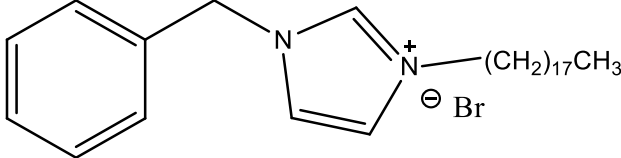
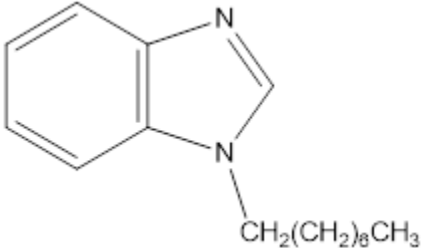
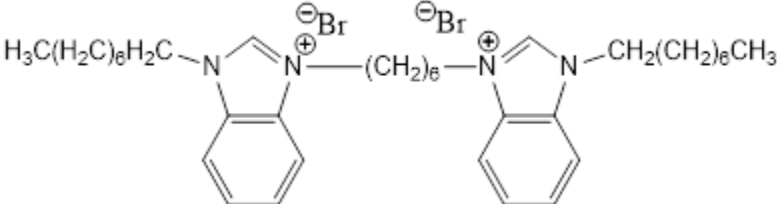
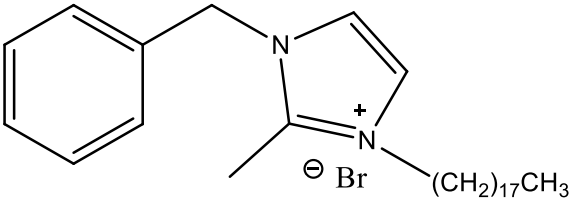
U ovo radu analiziran je antifungalni učinak 16 spojeva. Spojevi su se nalazili pod šiframa te nakon dobivenih rezultata saznajemo imena spojeva. Spojevi su testirani na određene plijesni i kvasce te su nakon inkubacije rezultati očitani na valnoj duljini od 450 i 405 nm. Svaki spoj koji ima negativnu vrijednost pri određenoj koncentraciji je izvrstan fungicid, spoj koji ima vrijednost između 0 i 50 je jako dobar fungicid, dok oni spojevi koji imaju vrijednost između 50 i 100 su slabi fungicidi. S druge strane oni koji imaju vrijednost preko 100 potiču plijesan da raste, odnosno nemaju fungicidno djelovanje. Rezultati su prikazani pomoću tablica [22].

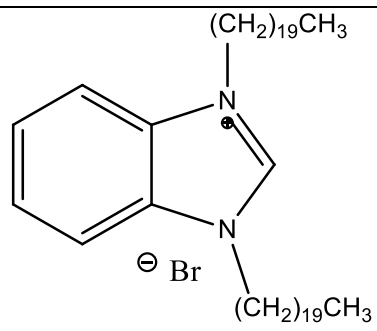
Tablica 1. Imena spojeva

1.	 <p>3-oktadecil-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
2.	 <p>3-heksadecil-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
3.	 <p>3-ikozil-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
4.	 <p>3-tetradecil-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
5.	



	 <p>1,3-didodecyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromid</p>
6.	 <p>3-decyl-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
7.	 <p>2-metil-1,3-dioktadecil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
8.	 <p>3-dodecyl-1-vinil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
9.	 <p>1,3diikozil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
10.	 <p>3-heksadecil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
11.	

	 <p>1-metil-3-oktadecil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
12.	 <p>1-benzil-3-oktadecil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
13.	 <p>1-oktil-1H-benzo[d]imidazol</p>
14.	 <p>3,3'-(heksan-1,6-diil)bis(1-oktil-1H-benzo[d]imidazol-3-ium dibromid</p>
15.	 <p>1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1H-imidazol-3-ium bromid</p>
16.	



1,3-diokozil-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromid

Tablica 2. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan *Fusarium graminearum* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-11%	55%	-11%	26%
2	100%	-12%	56%	71%	19%
3	100%	-11%	22%	41%	4%
4	100%	-12%	4%	-3%	23%
5	100%	-12%	27%	37%	44%
6	100%	-4%	27%	4%	61%
7	100%	-6%	4%	8%	13%
8	100%	10%	13%	-6%	72%
9	100%	14%	63%	112%	29%
10	100%	133%	36%	106%	59%
11	100%	3%	92%	91%	92%
12	100%	70%	84%	72%	75%
13	100%	69%	68%	73%	65%
14	100%	83%	82%	86%	89%
15	100%	65%	79%	94%	95%
16	100%	132%	88%	91%	91%

Spojevi od 1 do 7 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium, 3-decil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) pri najvišoj koncentraciji pokazuju izvrstan antifungalni/fungicidni učinak na ovu plijesan. Spojevi od 1 do 9 pokazuju jako dobar fungicidni učinak i kod nižih koncentracija. Ostali spojevi pokazuju slabi fungicidni učinak, te čak spojevi 10 (3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium) i 16 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) potiču rast ove plijesni.

Tablica 3. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan *Alternaria alternata* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	100%	104%	86%	90%
2	100%	85%	104%	88%	92%
3	100%	94%	96%	85%	81%
4	100%	89%	84%	88%	84%
5	100%	86%	89%	88%	113%
6	100%	66%	74%	81%	75%
7	100%	75%	95%	85%	77%
8	100%	89%	79%	80%	72%
9	100%	74%	71%	77%	65%
10	100%	80%	76%	76%	74%
11	100%	84%	77%	75%	72%
12	100%	69%	70%	72%	69%
13	100%	70%	67%	68%	67%
14	100%	72%	64%	61%	64%
15	100%	64%	71%	66%	67%
16	100%	64%	60%	57%	53%

Dobiveni rezultati pokazuju da većina spojeva ima slabi fungicidni učinak, dok spojevi 1 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) pri različitim koncentracijama potiču rast ove plijesni.

Tablica 4. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan *Aspergillus flavus* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-3%	63%	77%	-1%
2	100%	-6%	-5%	3%	-4%
3	100%	-4%	68%	82%	7%
4	100%	4%	67%	27%	43%
5	100%	-3%	7%	37%	138%
6	100%	60%	44%	2%	71%
7	100%	77%	-6%	58%	-5%
8	100%	-8%	30%	84%	24%
9	100%	26%	105%	28%	29%
10	100%	-7%	77%	58%	108%
11	100%	-11%	70%	86%	15%
12	100%	-12%	58%	-5%	-4%
13	100%	-8%	-8%	-4%	17%
14	100%	58%	26%	49%	2%
15	100%	-39%	60%	50%	3%
16	100%	72%	-2%	-3%	0%

Spojevi od 1 do 5 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) te spoj 8 (3-dodecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i spojevi od 10 do 13 (3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium, 1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium, 1-oktil-1*H*-benzo[d]imidazol) i spoj 15 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) pri najvišoj koncentraciji pokazuju izvrstan fungicidni učinak. Spoj 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium), spoj 9 (1,3-diikozil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i spoj 10 (3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium) potiču rast ove plijesni.

Tablica 5. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan *Aspergillus ochraceus* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-7%	106%	82%	103%
2	100%	-11%	68%	91%	91%
3	100%	-6%	84%	76%	79%
4	100%	-9%	94%	101%	96%
5	100%	-8%	87%	88%	77%
6	100%	100%	114%	83%	96%
7	100%	85%	92%	98%	100%
8	100%	72%	79%	66%	85%
9	100%	86%	70%	89%	62%
10	100%	75%	72%	97%	91%
11	100%	-13%	124%	92%	114%
12	100%	-11%	100%	73%	91%
13	100%	79%	89%	78%	85%
14	100%	62%	96%	81%	84%
15	100%	-49%	66%	78%	57%
16	100%	80%	91%	85%	87%

Spojevi od 1 do 5 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) imaju izvrstan fungicidni učinak pri najvišoj koncentraciji isto kao spoj 11 (1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 12 (1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium) i 15 (1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium). Pri manjim koncentracijama su slabi fungicidi te čak spoj 1, 4, 6 i 11 potiču rast ove plijesni.

Tablica 6. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan *Penicillium expansum* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-5%	77%	32%	58%
2	100%	-8%	68%	87%	80%
3	100%	-6%	97%	67%	65%
4	100%	-7%	80%	99%	65%
5	100%	-8%	89%	92%	93%
6	100%	47%	80%	61%	54%
7	100%	117%	64%	55%	84%
8	100%	6%	102%	84%	113%
9	100%	68%	77%	55%	87%
10	100%	62%	51%	83%	112%
11	100%	-7%	103%	45%	62%
12	100%	-6%	62%	99%	83%
13	100%	89%	48%	82%	80%
14	100%	33%	71%	70%	75%
15	100%	-27%	45%	61%	136%
16	100%	88%	98%	126%	113%

Spojevi od 1 do 5 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid, 1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) su izvrsni fungicidi kod najveće koncentracije, dok su kod manjih koncentracija slabi fungicidi. Isto tako su i spojevi 8 (3-dodecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 11 (1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 12 (1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium) i 15 (1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium). Spojevi 8 (3-dodecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 10 (3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium), 15 (1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium) i 16 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) pri slabijim koncentracijama potiču rast plijesni. Ostali spojevi u srednjim koncentracijama su se pokazali kao slabi antifungalni agensi.



Tablica 7. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac *Candida albicans* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-25%	106%	69%	46%
2	100%	-29%	62%	71%	74%
3	100%	121%	67%	66%	68%
4	100%	44%	74%	70%	68%
5	100%	37%	76%	75%	75%
6	100%	96%	91%	91%	102%
7	100%	86%	94%	90%	97%
8	100%	74%	89%	83%	93%
9	100%	84%	86%	85%	84%
10	100%	84%	84%	82%	92%
11	100%	2%	94%	84%	83%
12	100%	3%	81%	80%	81%
13	100%	77%	76%	77%	76%
14	100%	81%	79%	73%	74%
15	100%	-3%	82%	84%	81%
16	100%	84%	83%	81%	81%

Spojevi 1 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 15 (1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium) imaju izvrstan antifungalni učinak na ovaj kvasac, dok jako dobar imaju spojevi 11 (1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 12 (1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium). Spoj 3 (3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium) se pokazao jako lošim fungicidom u najvišoj koncentraciji, odnosno ne uništava ga već potiče rast ovog kvasca. Ostali spojevi su se pokazali kao slabi antifungalni agensi.

Tablica 8. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac *Candida krusei* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	1%	64%	80%	82%
2	100%	-7%	88%	70%	71%
3	100%	31%	80%	66%	73%
4	100%	-1%	60%	69%	70%
5	100%	-3%	52%	66%	63%
6	100%	22%	84%	84%	90%
7	100%	23%	87%	83%	0%
8	100%	16%	75%	84%	84%
9	100%	78%	84%	78%	79%
10	100%	76%	77%	84%	82%
11	100%	77%	80%	66%	74%
12	100%	75%	77%	76%	78%
13	100%	69%	71%	75%	72%
14	100%	70%	71%	60%	69%
15	100%	55%	72%	82%	77%
16	100%	11%	95%	87%	83%

Spojevi 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 4 (3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) su izvrsni fungicidi, dok spoj 1 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 3 (3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 6 (3-decil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium), 7 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium), 8 (3-dodecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), i 16 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) su jako dobri fungicidi pri najvišim koncentracijama. Ostali spojevi su se pokazali kao slabi fungicidi u slabijim koncentracijama.

Tablica 9. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac *Candida parapsilosis* pri valnoj duljini 450 nm

	0	10	1	0,1	0,01
1	100%	-4%	113%	87%	77%
2	100%	-7%	132%	87%	89%
3	100%	-4%	92%	84%	88%
4	100%	0%	86%	86%	84%
5	100%	-5%	91%	83%	90%
6	100%	99%	95%	87%	95%
7	100%	92%	92%	91%	95%
8	100%	38%	88%	88%	92%
9	100%	92%	92%	87%	85%
10	100%	83%	90%	89%	94%
11	100%	7%	89%	89%	90%
12	100%	11%	87%	85%	91%
13	100%	85%	89%	87%	90%
14	100%	87%	85%	82%	83%
15	100%	8%	79%	86%	85%
16	100%	79%	90%	85%	80%

Spojevi 1 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 3 (3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), i 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) su izvrsni fungicidi u najvišim koncentracijama, dok spojevi 4 (3-terrtadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 11 (1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 12 (1-benzil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium), i 15 (1-benzil-2-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium) su se pokazali jako dobrim antifungalnim agensima. Ostali spojevi su se pokazali kao slabi antifungalni agensi, a spoj 1 (3-oktadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) u koncentraciji od 1 µg/mL pokazali su se kao dobri spojevi za poticanje rasta ovog kvasca.

## 5. Zaključak

Danas su od sve veće važnosti antifungalni testovi, kojima je cilj dobiti MIC vrijednost kako bi se odredila najniža koncentracija antifungalnog djelotvornog sredstva (agensa). Gore prikazane tablice su rezultati dobiveni provedbom antifungalnog mikrotesta. Nakon što su naciyepljene plijesni i kvasci te dodane kvaterne amonijeve soli i nakon inkubacije od 48-72 h slijedilo je očitavanje rezultata.

Iz rezultata smo dobili sljedeće podatke. Kod *Fusarium graminearum* spojevi 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid), 4 (3-tetradecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) i 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) pokazuju jednaki, izvrstan fungicidni učinak u koncentraciji 10 µg/mL, dok spoj 10 (3-heksadecil-1*H*-imidazol-3-ium) kod koncentracije 10 µg/mL potiče rast ove plijesni.

Kod plijesni *Alternaria alternata* niti jedan spoj se nije pokazao kao izvrstan fungicid, većina spojeva ima slabi fungicidni učinak, među kojima je najbolji spoj 16 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) pri koncentraciji 0,01 µg/mL. Spoj 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) pri koncentraciji od 0,01 µg/mL najviše potiče rast ove plijesni.

Kod plijesni *Aspergillus flavus* spoj 15 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) se je pokazao kao izvrstan fungicid kod koncentracije 10 µg/mL, dok spoj 5 (1,3-didecil-2-metil-1*H*-imidazol-3-ium) pri koncentraciji od 0,01 µg/mL najviše potiče rast ove plijesni.

*Aspergillus ochraceus*, plijesan, kod koje se je spoj 15 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium), u najvišoj koncentraciji od 10 µg/mL, pokazao kao izvrstan antifungalni agens, a kao najlošiji pokazao se spoj 11 (1-metil-3-oktadecil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) u koncentraciji 1 µg/mL.

*Penicillium expansum* je plijesan koju najviše uništava spoj 15 (1,3-diikozil-1*H*-benzo[d]imidazol-3-ium) u najvišoj koncentraciji od 10 µg/mL, a isto tako i potiče njezin rast, ali u koncentraciji od 0,01 µg/mL.

Kod *Candida albicans*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* spoj 2 (3-heksadecil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) se pokazao kao izvrstan fungicid u najvišoj koncentraciji od 10 µg/mL. Spoj koji najviše potiče rast *Candida albicans* i *Candida parapsilosis* je spoj 3 (3-ikozil-1-vinil-1*H*-imidazol-3-ium bromid) isto tako u koncentraciji od 10 µg/mL, dok *Candida krusei* ne potiče niti jedan spoj na njezin rast.

## 6. Literatura

- [1] E. L. Berkow, S. R. Lockhart, L. Ostrosky-Zeichner: Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches, *Clinical Microbiology Reviews* , 33:10, 2020.
- [2] M. Faletar: Sinteza kvaternih amonijevih soli piperidina s potencijalnim antibaktericidnim djelovanjem, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2017.
- [3] D. Kwasniewska, Y. L. Chen, D. Wieczorek, Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives, *Phatogens National Library of Medicine*, 10;9(6):459, 2020.
- [4] <https://www.cdc.gov/aspergillosis/php/azole-resistant-aspergillus/index.html>, dostupno 5.6.2024.
- [5] [https://www.researchgate.net/figure/Sensititre-Yeast-One-Panel-with-trailing-effect-in-azole-antifungals\\_fig3\\_288486049](https://www.researchgate.net/figure/Sensititre-Yeast-One-Panel-with-trailing-effect-in-azole-antifungals_fig3_288486049), 5.6.2024.
- [6] S. Duraković, S. Redžepović: Uvod u opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb 2002.
- [7] J. I. Pitt, A. D. Hocking: Fungi and food spoilage. Springer Science + Business Media, New York, 2009.
- [8] T. Kelly Turkington, A. Petran, Tania Yonow and D. J. Kriticos, *Fusarium Graminearum*, HarvestChoice Pest Geography, 1-2, 2014.
- [9] <https://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/>, dostupno 5.6.2024.
- [10] S. Bautista-Baños: Postharvest Decay, Elsevier, SAD, 2014.
- [11] <https://www.microscopemaster.com/alternaria.html>, dostupno 5.6.2024.
- [12] A. D. Hocking: Aspergillus and related teleomorphs, *Food Science, Technology and Nutrition*, 451-487, 2006.
- [13] Clive de W. Blackburn: Food Spoilage Microorganisms, *Food Science, Technology and Nutrition*, 695-712, 2006.
- [14] <https://www.medical-labs.net/aspergillus-flavus-under-microscope-1450/>, dostupno 5.6.2024.
- [15] C. M. Visagie, J. Houbraeken, J. C. Frisvad, S. B. Hong, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi, R. A. Samson: Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Studies in Mycology*, 343-371, 2014.
- [16] <https://www.medical-labs.net/penicillium-394/>, dostupno 5.6.2024.
- [17] M. Martinović: Antifungalni učinak različitih spojeva na odabrane vrste kvasaca roda *Candida*, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- [18] <https://drfungus.org/knowledge-base/candida-albicans/>, dostupno 5.6.2024.

- [19] P. E. Sudbery: Growth of *Candida albicans* hyphae, National Library of Medicine, 16;9(10):737-48, 2011.
- [20] Y. H. Samaranayake and L. P. Samaranayake: *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen, National Library of Medicine 41(5):295-310, 1994.
- [21] D. Trofa, A. Gácsér and J. D. Nosanchuk: *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen, National Library of Medicine, 21(4):606-25, 2008.
- [22] R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, CRC Press SAD, 2007.
- [23] M. Kučica, Određivanje antibakterijske aktivnosti derivata itakonske kiseline, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko biokemijski fakultet, Diplomski rad, 2020.

## Popis slika

Slika 1. Mikrotitarske pločice s 96 jažica.....	3
Slika 2. Agar Screening za otpornost na spp. Izvor: <a href="https://www.cdc.gov/aspergillosis/php/azole-resistant-aspergillus/index.html">https://www.cdc.gov/aspergillosis/php/azole-resistant-aspergillus/index.html</a> .....	5
Slika 3. Sensititre YeastOne test, Izvor: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Sensititre-Yeast-One-Panel-with-trailing-effect-in-azole-antifungals_fig3_288486049">https://www.researchgate.net/figure/Sensititre-Yeast-One-Panel-with-trailing-effect-in-azole-antifungals_fig3_288486049</a> .....	6
Slika 4. Mikrofotografija spora <i>Fusarium</i> spp. pri povećanju 100 x, Izvor <a href="https://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/">https://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/</a> .....	8
Slika 5. Mikrofotografija spora <i>Alternaria</i> spp. pri povećanju 40 x, Izvor <a href="https://www.microscopemaster.com/alternaria.html">https://www.microscopemaster.com/alternaria.html</a> .....	9
Slika 6. Mikrofotografija spora <i>Aspergillus</i> spp. pri povećanju 100 x, Izvor <a href="https://www.medical-labs.net/aspergillus-flavus-under-microscope-1450/">https://www.medical-labs.net/aspergillus-flavus-under-microscope-1450/</a> .....	10
Slika 7. Mikrofotografija spora <i>Penicillium</i> spp. pri povećanju 100 x, Izvor <a href="https://www.medical-labs.net/penicillium-394/">https://www.medical-labs.net/penicillium-394/</a> .....	11
Slika 8. Mikrofotografija stanica <i>Candida</i> spp. pri povećanju 40 x, Izvor <a href="https://drfungus.org/knowledge-base/candida-albicans/">https://drfungus.org/knowledge-base/candida-albicans/</a> .....	13
Slika 9. Postupak antifungalnog testiranja , Izvor: M. Kučica, Određivanje antibakterijske aktivnosti derivata itakonske kiseline, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutskobiokemijski fakultet, Diplomski rad, 2020.....	16
Slika 10. Postupak razrjeđenja, Izvor: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C, Goodwin: Antimikrobia Susceptibility Testing Protocols, SAD, 2007.....	17
Slika 11. Postupak pripreme inokuluma, Izvor: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C, Goodwin: Antimikrobia Susceptibility Testing Protocols, SAD, 2007.....	18
Slika 12. Inokulirane jažice.....	18
Slika 13. Očitavanje rezultata pomoću uređaja.....	19
Slika 14. očitavanje rezultata golim okom.....	19

## Popis tablica

Tablica 1. Imena spojeva.....	20
Tablica 2. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan <i>Fusarium graminearum</i> pri valnoj duljini 450nm.....	21
Tablica 3. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan <i>Alternaria alternata</i> pri valnoj duljini 450nm.....	22
Tablica 4. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan <i>Aspergillus flavus</i> pri valnoj duljini 450 nm.....	23
Tablica 5. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan <i>Aspergillus ochraceus</i> pri valnoj duljini 450 nm.....	25
Tablica 6. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na plijesan <i>Penicillium expansum</i> pri valnoj duljini 450 nm.....	26
Tablica 7. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac <i>Candida albicans</i> pri valnoj duljini 450 nm.....	27
Tablica 8. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac <i>Candida krusei</i> pri valnoj duljini 450nm.....	29
Tablica 9. Rezultati antifungalnog učinka spojeva na kvasac <i>Candida parapsilosis</i> pri valnoj duljini 450nm.....	30



## Turnitin Originality Report

Processed on: 10-Sep-2024 1:35 PM CEST  
ID: 2449990696  
Word Count: 7828  
Submitted: 1

ZAVRŠNI RAD-OK\_BS (3).docx By Petra Ivančan

Similarity Index	Similarity by Source	
0%	Internet Sources:	7%
	Publications:	5%
	Student Papers:	4%

3% match (Internet from 23-Sep-2022) <a href="https://rosdok.uni-rostock.de/file/rosdok_disshab_000002525/rosdok_derivate_0000103320/Sommer_Dissertation_2021.pdf">https://rosdok.uni-rostock.de/file/rosdok_disshab_000002525/rosdok_derivate_0000103320/Sommer_Dissertation_2021.pdf</a>
1% match (Mikkelsen, M., "Synthesis and characterization of zwitterionic carbon dioxide fixing reagents", International Journal of Greenhouse Gas Control, 201005) Mikkelsen, M., "Synthesis and characterization of zwitterionic carbon dioxide fixing reagents", International Journal of Greenhouse Gas Control, 201005
1% match (publications) ULUÇAM, Gühergül. "3-(2-HİDROKSİETİL)-1-(3-AMİNOPROPİL)-1H-İMİDAZOL-3-İUM BROMİD SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ". Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
< 1% match (Internet from 09-Dec-2020) <a href="https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:88/datastream/PDF">https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:88/datastream/PDF</a>
< 1% match (Internet from 04-Oct-2020) <a href="https://repositorij.unios.hr/islandora/object/kemos%3A144/datastream/PDF/view">https://repositorij.unios.hr/islandora/object/kemos%3A144/datastream/PDF/view</a>
< 1% match (Internet from 05-Mar-2023) <a href="https://repositorij.unios.hr/en/islandora/object/ptfos%3A1199/datastream/PDF/view">https://repositorij.unios.hr/en/islandora/object/ptfos%3A1199/datastream/PDF/view</a>
< 1% match (Internet from 04-Dec-2020) <a href="https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:1229/datastream/PDF">https://repositorij.unios.hr/islandora/object/ptfos:1229/datastream/PDF</a>
< 1% match (Internet from 07-Dec-2020) <a href="https://repositorij.unios.hr/islandora/object/mefos:1130/datastream/PDF">https://repositorij.unios.hr/islandora/object/mefos:1130/datastream/PDF</a>
< 1% match (Internet from 22-Sep-2022) <a href="https://core.ac.uk/download/270102088.pdf">https://core.ac.uk/download/270102088.pdf</a>
< 1% match (Internet from 21-Aug-2022) <a href="https://core.ac.uk/download/pdf/197863862.pdf">https://core.ac.uk/download/pdf/197863862.pdf</a>
< 1% match (Internet from 02-Oct-2022) <a href="https://repositorij.medri.uniri.hr/islandora/object/medri:6760/datastream/PDF/view">https://repositorij.medri.uniri.hr/islandora/object/medri:6760/datastream/PDF/view</a>
< 1% match () Gecan, Dajana. "THE INFLUENCE OF DIFFERENT TECHNOLOGICAL PROCESSES IN THE PRODUCTION MUSCAT WINE VINTAGE 2016". Polytechnic in Pozega. Biotechnical department., 2016
< 1% match (Internet from 04-Jan-2022) <a href="https://apps.unizg.hr/ректорова-nagrada/javno/radovi/209/preuzmi">https://apps.unizg.hr/ректорова-nagrada/javno/radovi/209/preuzmi</a>
< 1% match (Ramesh S. Yamgar, Y. Nivid, Satish Nalawade, Mustapha Mandewale, R. G. Atram, Sudhir S. Sawant. "Novel Zinc(II) Complexes of Heterocyclic Ligands as Antimicrobial Agents: Synthesis, Characterisation, and Antimicrobial Studies", Bioinorganic Chemistry and Applications, 2014) Ramesh S. Yamgar, Y. Nivid, Satish Nalawade, Mustapha Mandewale, R. G. Atram, Sudhir S. Sawant. "Novel Zinc(II) Complexes of Heterocyclic Ligands as Antimicrobial Agents: Synthesis, Characterisation, and Antimicrobial Studies", Bioinorganic Chemistry and Applications, 2014
< 1% match () Geittner, Florian. "2-Alkyliden-imidazolidine als „Superbasen“ für stereokontrollierte HX- und Dibrom-Eliminierungen", Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014
< 1% match (student papers from 06-Sep-2024) Submitted to University of Rijeka on 2024-09-06
< 1% match (Internet from 12-Jul-2024) <a href="http://docplayer.cz/154006739-l-36-36-uredni-vestnik-evropske-unie.html">http://docplayer.cz/154006739-l-36-36-uredni-vestnik-evropske-unie.html</a>
< 1% match (Internet from 30-Mar-2023) <a href="https://sielc.com/13-didecyl-2-methylimidazolium-chloride">https://sielc.com/13-didecyl-2-methylimidazolium-chloride</a>
< 1% match (publications) Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, Avery C. Goodwin. "Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols", CRC Press, 2019
< 1% match (student papers from 14-May-2024) Submitted to Birla Institute of Technology and Science Pilani on 2024-05-14
< 1% match (Submitted to Farmaceutsko-biokemijski fakultet / Faculty of Pharmacy and Biochemistry) Submitted to Farmaceutsko-biokemijski fakultet / Faculty of Pharmacy and Biochemistry
< 1% match (Internet from 24-Sep-2023) <a href="https://dabar.srce.hr/islandora/object/pharma%3A1990">https://dabar.srce.hr/islandora/object/pharma%3A1990</a>

< 1% match ()

[Marinković, Emilija, "Imunomodulatorna aktivnost rekombinantne izoforme lektina iz banane u fiziološkim i patološkim uslovima u debelom crevu miševa BALB/c soja", Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 2017](#)

< 1% match (Özlem Doğan, Dolunay Gülmez, Sevtap Arıkan Akdağlı. "Klinik ve Çevresel Örneklerden Elde Edilen Aspergillus fumigatus İzolatlarında Azol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi", Mikrobiyoloji Bülteni, 2020)  
[Özlem Doğan, Dolunay Gülmez, Sevtap Arıkan Akdağlı. "Klinik ve Çevresel Örneklerden Elde Edilen Aspergillus fumigatus İzolatlarında Azol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi", Mikrobiyoloji Bülteni, 2020](#)

< 1% match (Internet from 26-Apr-2023)

[https://theses.hal.science/tel-03523702v1/file/These\\_ABOU\\_DIAB\\_Mira.pdf](https://theses.hal.science/tel-03523702v1/file/These_ABOU_DIAB_Mira.pdf)

< 1% match (Internet from 09-Apr-2023)

[https://archive.org/stream/IJBSTJournalGroup/IJFSNPHT\\_2017\\_9\\_4\\_28-37\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/IJBSTJournalGroup/IJFSNPHT_2017_9_4_28-37_djvu.txt)

< 1% match (Jelena Nakomcic, Djendji Vastag. "The thiazole and triazole derivatives as inhibitors of metal corrosion: Part I", Zastita materijala, 2016)

[Jelena Nakomcic, Djendji Vastag. "The thiazole and triazole derivatives as inhibitors of metal corrosion: Part I", Zastita materijala, 2016](#)

< 1% match (Periklis Karamanis, Jimmy Muldoon, Cormac D. Murphy, Marina Rubini. " Total synthesis of antifungal lipopeptide iturin A analogues and evaluation of their bioactivity against ", Journal of Peptide Science, 2024)

[Periklis Karamanis, Jimmy Muldoon, Cormac D. Murphy, Marina Rubini. " Total synthesis of antifungal lipopeptide iturin A analogues and evaluation of their bioactivity against ", Journal of Peptide Science, 2024](#)

< 1% match ()

[Makra Zsófia. "N-tartalmú heterociklusok szintézise 1,3-dikarbonil részegységet tartalmazó Mannich szubsztrátok diverzitás-orientált transzformációival", 2023](#)

< 1% match (Internet from 20-Nov-2022)

[http://foodtech.uns.ac.rs/uploads/images/docs/Food\\_Kongres\\_NO\\_ISP.pdf](http://foodtech.uns.ac.rs/uploads/images/docs/Food_Kongres_NO_ISP.pdf)

< 1% match (Internet from 22-Apr-2021)

<https://repozitorij.fsb.unizg.hr/islandora/object/fsb:6681/datastream/PDF>

< 1% match (Internet from 09-Jun-2024)

<https://repozitorij.unin.hr/en/islandora/object/unin%3A6066/datastream/PDF/view>

< 1% match (Internet from 28-Jul-2024)

[https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26667527.html?page\\_num=0&rid=0be4acf0-0c45-49e7-8957-0a27b6e16de1](https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26667527.html?page_num=0&rid=0be4acf0-0c45-49e7-8957-0a27b6e16de1)

< 1% match (Internet from 22-Sep-2022)

[https://www.maticasrpska.org.rs/stariSajt/casopisi/prirodne\\_nauke\\_124.pdf](https://www.maticasrpska.org.rs/stariSajt/casopisi/prirodne_nauke_124.pdf)



#### IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski/specijalistički rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, PETRA KALČAN (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog/specijalističkog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom ANTIFUNGALNO DJELOVANJE NOVOSINTETIZIRANIH (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Petra Kalčan  
(vlastoručni potpis)

Sukladno članku 58., 59. i 61. Zakona o visokom obrazovanju i znanstvenoj djelatnosti završne/diplomske/specijalističke radove sveučilišta su dužna objaviti u roku od 30 dana od dana obrane na nacionalnom repozitoriju odnosno repozitoriju visokog učilišta.

Sukladno članku 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.