

# Zelena sinteza nanočestoca srebra iz ekstrakta gljive *Fomes Fomentarius* (L.)

---

**Rebić, Stella**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:865790>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Stella Rebić

Zelena sinteza nanočestica srebra iz ekstrakta gljive *Fomes Fomentarius*  
(L.)

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Stella Rebić

Zelena sinteza nanočestica srebra iz ekstrakta gljive *Fomes Fomentarius*  
(L.)

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Komentorica: izv.prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

### Zelena sinteza nanočestica srebra iz ekstrakta gljive *Fomes Fomentarius* (L.)

Stella Rebić

**Rad je izrađen na:** Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić

#### Sažetak

Zelena sinteza nanočestica srebra zbog svojih načela pridonosi održivom razvoju bez štetnog utjecaja na okoliš. Nanočestice srebra zbog svojih specifičnih antimikrobnih svojstava nalaze sve veću primjenu u medicinske svrhe. Cilj ovoga rada je sintetizirati nanočestice srebra iz vodenog ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* i otopine  $\text{AgNO}_3$ . Morfologija, stanište, upotreba gljive i zelena sinteza nanočestica srebra opisani su u literaturnom pregledu. Karakterizacija nanočestica izvršena je metodama UV-Vis, FT-IR, PXRD i TEM analize. UV-Vis analizom utvrđen je maksimum apsorbancije pri 410 nm. Rezultati FT-IR analize ukazali su na biomolekule koje su sudjelovale u procesu sinteze nanočestica. Prosječna veličina kristalita iznosila je 24 nm. Nanočestice srebra pokazale su dobru sposobnost razgradnje boje metilenskog plavila. Najbolju antibakterijsku aktivnost uzorak nanočestica srebra pokazao je na sojeve bakterija *S. auresus* i *E. coli*, dok najmanju na soj bakterija *P. aeruginosa*.

**Diplomski rad obuhvaća:** 46 stranica, 17 slika, 2 tablica, 46 literaturnih navoda.

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** zelena sinteza, nanočestice, srebro, ekstrakt, *Fomes Fomentarius*

**Rad prihvaćen:** 11.10.2023.

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, mentorica i članica
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, komentorica i članica
4. izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Chemistry**

**Graduate Study of Chemistry**

**Scientific Area: Natural Sciences**

**Scientific Field: Chemistry**

**Green synthesis of silver nanoparticles using *Fomes Fomentarius* (L.) extract**

**Stella Rebić**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Vlatka Gvozdić, PhD. Associate Professor

**Abstract**

Due to its principles, the green synthesis of silver nanoparticles contributes to sustainable development without harmful impact on the environment. Silver nanoparticles are increasingly used for medical purposes due to their specific antimicrobial properties. The aim purpose of this work is to synthesize silver nanoparticles from the aqueous extract of the fungus *Fomes fomentarius* and  $\text{AgNO}_3$  solution. The morphology, habitat, use of the fungus and green synthesis of silver nanoparticles are described in the literature review. Nanoparticles were characterized by UV-Vis, FT-IR, PXRD and TEM analysis methods. UV-Vis analysis determined the maximum absorbance at 410 nm. The results of the FT-IR analysis indicated that the biomolecules had participated in the process of nanoparticle synthesis. The average crystallite size was 24 nm. Silver nanoparticles showed a good ability to degrade the color of methylene blue. The sample of silver nanoparticles showed the best antibacterial activity against bacteria *S. auerus* and *E. coli*, while the least activity against the strain of bacteria *P. aeruginosa*.

**Thesis includes:** 46 pages, 17 figures, 2 tables, 46 references.

**Original in:** Croatian

**Keywords:** green synthesis, nanoparticles, silver, extract, *Fomes fomentarius*

**Thesis accepted:** 11.10.2023.

**Reviewers:**

1. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, president
2. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, mentor and member
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, co-mentor and member
4. izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, member replacement

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

## *Zahvala*

*Želim se zahvaliti svojoj mentorici , izv.prof. dr sc. Vlatki Gvozdić na pomoći i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala izv.prof.dr.sc.Valentini Pavić, izv.prof. dr. sc. Elviri Kovač-Andrić i doc.dr.sc. Aleksandru Sečenju na pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Želim se od srca zahvaliti svojoj majci, teti i mom prijatelju Igoru na svim mogućim oblicima pomoći i podrške.*

*Hvala mojim prijateljicama Moniki i Ivi što su uvijek bile tu za mene!*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Općenito o gljivama.....	2
2.1.1. Sistematika gljiva.....	2
2.2. Karakteristike gljive <i>Fomes fomentarius</i> .....	2
2.2.1. Porijeklo imena gljive .....	3
2.2.2. Morfologija gljive <i>Fomes fomentarius</i> .....	3
2.2.3. Stanište gljive <i>Fomes fomentarius</i> .....	4
2.2.4. Upotreba gljive <i>Fomes fomentarius</i> u tradicionalnoj medicini.....	6
2.2.5. Imuno-stimulirajuća i protuupalna svojstva gljive.....	6
2.2.6. Citotoksična aktivnost.....	7
2.2.6. Antimikrobna aktivnost gljive.....	7
2.2.7. Ostale upotrebe gljive <i>Fomes fomentarius</i> .....	8
2.3. Zelena sinteza .....	8
2.3.1. Zelena sinteza nanočestica srebra .....	8
2.3.2. Zelena sinteza nanočestica srebra posredovana gljivama .....	9
2.3.3. Predloženi mehanizmi djelovanja nanočestica srebra na stanice bakterija	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Cilj .....	11
3.2. Materijali i metode.....	11
3.2.1. Prikupljanje uzoraka.....	11
3.2.2. Ekstrakcija.....	11
3.2.3. Sinteza nanočestica srebra.....	11
3.2.3. Karakterizacija nanočestica.....	12
3.2.4. Sposobnost razgradnje boje metilenskog plavila .....	12
3.2.5. Antibakterijska aktivnost nanočestica srebra .....	12
3.2.6. Obrada podataka.....	13

3.2.7. UV-Vis spektroskopija.....	14
3.2.8. FT-IR spektroskopija.....	16
3.2.8. Rendgenska difrakcija na prahu.....	17
3.2.9. Transmisijska elektronska mikroskopija, TEM.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Rezultati UV-Vis spektroskopije.....	21
4.2. Rezultati FT-IR spektroskopije.....	23
4.3. Rezultati rendgenske difrakcije na prahu.....	25
4.4. TEM analiza.....	27
4.5. Sposobnost razgradnje boje .....	28
4.6. Antibakterijsko djelovanje uzorka nanočestica srebra.....	30
5. Zaključak .....	31
6. LITERATURA .....	32
7. ŽIVOTOPIS .....	37



## 1. UVOD

Zelena kemija predstavlja filozofski pristup koji kroz svoja načela pridonosi održivom razvoju bez štetnog utjecaja na okoliš. U zelenoj sintezi nanočestica srebra koriste se ekstrakti prirodnih materijala kao što su na primjer biljni ekstrakti. Takvi prirodni materijali sadrže biomolekule koje služe kao reducensi iona srebra. Nanočestice srebra imaju sve veću primjenu u medicini, prvenstveno zbog svojih antibakterijskih svojstava. Cilj ovog rada je sinteza nanočestica srebra u vodenom ekstraktu gljive *Fomes fomentarius*. U prvom poglavlju opisana su osnovna svojstva vrste *Fomes fomentarius* što uključuje sistematiku, morfologiju, stanište i upotrebu kako u medicinske tako i u ostale dosad poznate svrhe. Zatim slijedi poglavlje kratkog opisa zelene sinteze i zelene sinteze nanočestica srebra posredovane gljivama. U eksperimentalnom dijelu kratko je opisan postupak sinteze. Na kraju su objašnjeni rezultati, sposobnost razlaganja boje vodene otopine metilnog plavila i antibakterijska aktivnost nanočestica srebra. Za karakterizaciju nanočestica korištene su metode: UV-Vis spektroskopija (*engl. Ultraviolet-visible spectroscopy*, UV-Vis), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (*engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR), rendgenska difrakcija na prahu (*engl. Powder x-ray diffraction*, PXRD) i transmisijska elektronska mikroskopija (*engl. Transmission Electron Microscopy*, TEM)

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Općenito o gljivama

Gljive spadaju u heterotrofne organizme jer nemaju klorofil u plodnom tijelu. Žive na račun drugih živi organizama. Parazitske gljive crpe gotove asimilate ili žive i rastu kao saprofiti na mrtvoj organskoj supstanciji. Gljive mogu živjeti i u simbiozi s drugim biljkama (mikoriza). Od biljaka dobivaju ugljikohidrate, a zauzvrat im omogućavaju bolju apsorpciju mineralnih tvari iz tla [1]. Zbog velike mogućnosti mutacije, broj novih vrsta gljiva u stalnom je porastu [2].

#### 2.1.1. Sistematika gljiva

Zbog velikog broja vrsta gljiva koji se svakoga dana povećava vrlo je važna njihova sistematizacija. Sistematika omogućuje njihovu determinaciju i stalno je podložna promjenama u klasifikacijama gljiva upravo zbog njihove mogućnosti mutiranja i ostalih čudesnih karakteristika. Općenito se gljive mogu podijeliti na četiri filogenetska razreda:

1. *Myxomycetes* (sluznjače) - vrlo slične bičošima, zbog morfologije spora
2. *Phycomycetes* (algašice) - imaju dobro razvijen micelij, uglavnom su paraziti ili saprofiti
3. *Ascomycetes* (mješinarke) - mnoge vrste imaju jako razvijen micelij i spore koje se stvaraju u mješini (ascus)
4. *Basidiomycetes* (stapčarke) - gljive koje su najvišeg razvojnog stupnja

### 2.2. Karakteristike gljive *Fomes fomentarius*

Gljiva *Fomes fomentarius* (L.) (slika 1) čiji su biološki sastojci poslužili u sintezi nanočestica srebra ubraja se u posljednji razred *Basidiomycetes* (stapčarke). Spada u C 3.II. rod, *Fomes Fries* te je jedna od predstavnika roda uz *Fomes marginatus* (Fries) Gill. i *Fomes officinalis* (Vitt.) Bresadola. Gljive ovog razreda imaju vrlo tvrda, drvenasta plodišta. Izgledom podsjećaju na konjska kopita. Plodište raste godinama i na presjeku se mogu jasno vidjeti godovi. Uglavnom rastu na živim ili mrtvim stablima listopadnog drveća [1].



**Slika 1.** *Fomes fomentarius* (L.), pogled odozgo.

### **2.2.1. Porijeklo imena gljive**

*Fomes fomentarius* (L.) ili kresiva guba pripada porodici rupičavki (*Polyporaceae*), klase bazidiomiceta. Prvi znanstveni opis gljive pojavio se u literaturi „Species Plantarum“ Carla Linnaea 1753. godine, gdje je bila opisana pod nazivom *Boletus fomentarius*. Riječ *fomentarius* potječe od latinske riječi "*fomes*", što znači kresivo, dok latinska riječ "*fomentum*" znače oblozi ili zavoji koji griju.

Kresiva guba je poznata još po raznim sinonimima: trud, vlasuljak, kresiva guba i bukov tartuf [3].

### **2.2.2. Morfologija gljive *Fomes fomentarius***

Plodište je široko od 10 do 30 centimetara, a prirasta za podlogu gdje raste godinama. Vrlo je nepravilnog izgleda, polukružno i kvrgavo. Gornja površina plodišta je reljefna i glatka. Boja je najprije crvenkastosmeđa, potom tamnosiva. Rub je debeo i bjelkast [4]. Hife su generativne, vezivne i skeletne. Takva struktura hifa je trimitska [3]. Cjevčice su slojevite, a u sredini poprime smeđu boju. Rupice su okrugle. Trama (tkivo

koje je izgrađeno od isprepletenih hifa) je u početku mekana, zatim žilava i odrveni. Prerez trame pokazuje godine starosti (slika 2). Ima miris karakterističan za gljive, a okus je gorak. Spore su veličine od  $18-24 \times 4,5 - 6,5 \mu\text{m}$ . Eliptično su valjkastog oblika te glatke površine [4]. Micelij se nastanjuje na stablu, a nakon dvije do tri godine se počinju pojavljivati plodovi ili karpofori. Izbijanje plodova događa se u proljeće nakon čega slijedi permanentni rast. Kresiva guba može dostići starost do nekoliko godina. Veličina gljive će varirati u ovisnosti o okolišnim čimbenicima, vrsti substrata i o samoj starosti gljive. Veličina promjera može varirati od 5 do 45 centimetara, debljina od 2 do 25 centimetara i širina od 3 do 45 centimetara. Kora je tvrda, debljine od 1 do 2 milimetara koja prekriva žilavo meso [3].



Slika 2. Tvrda površina trame gljive *Fomes fomentarius*.

### 2.2.3. Stanište gljive *Fomes fomentarius*

Nastanjuje oštećena, oslabljena ili mrtva stabla listopadnog drveća. Najčešće se radi o stablima hrasta, bukve, graba, topole, joha i breze. U planinskim dijelovima obično se nastanjuje na bukvi, a u nizinama i na ostale vrste. U sjevernim krajevima najčešće se nalazi na brezi, a u južnim na bukvi. U početnim fazama razvoja živi kao parazit,

nakon odumiranja drveta preuzima ulogu saprofita gdje razgrađuje i ne celulozni materijal stabla, te ga pretvara u humus. Veže se na stablo vrlo jako te se zbog toga teško i otkida (slika 3). Gljiva *Fomes fomentarius* je zastupljena gotovo širom svijeta. Optimalni interval temperature za rast gljive je od 27 do 30°C [3].



**Slika 3.** Gljiva *Fomes fomentarius* se lako prilagođava i čvrsto veže za supstrat na kojem raste.

**Tablica 1.** Nutritivne vrijednosti suhe gljive *Fomes fomentarius* (L.) [5]

<b>Nutritivne vrijednosti na 100g</b>	
<b>Energetska vrijednost</b>	<b>210.99 ± 1.75 kcal</b>
<b>Bjelančevine</b>	<b>12.96 ± 0.17 g</b>
<b>Ugljikohidrati</b>	<b>2.06 ± 0.33 g</b>
<b>Masti</b>	<b>1.45 ± 0.19 g</b>
<b>Ukupna količina (dijetalnih) vlakana</b>	<b>68.92 ± 0.81 g</b>
<b>β- glukan</b>	<b>20.32 ± 0.29mg</b>
<b>Količina vlage</b>	<b>12.28 ± 0.13 g</b>
<b>Pepeo</b>	<b>2.33 ± 0.06 g</b>

U medicinski važne sastojke gljive mogu se svrstati beta glukan, steroli: ergosterol, isoergosteron i fungisteron, fomentarole A, B, C i D, terpeni: mono-, di- i seskviterpeni [6] (tablica 1). Kumarini su spojevi koji mogu dati vodikov atom i prijeći u fenoksi radikal koji ima više rezonantnih struktura što ga čini dobrim antioksidansom. U gljivi *Fomes fomentarius* identificiran je kumarin dafnetin [5].

#### **2.2.4. Upotreba gljive *Fomes fomentarius* u tradicionalnoj medicini**

Ova se gljiva tradicionalno koristila kao kresivo i za sprječavanje krvarenja. Najstariji podatak o upotrebi gljive *Fomes fomentarius* poznat je otkrićem mumije "Otzi" ili ledenog čovjeka, pronađenog 1991. godine na granici Austrije i Italije. Pretpostavlja se da je gljivu najvjerojatnije koristio kao kresivo. Mogućnosti njene medicinske upotrebe opisao je čak i Hipokrat. U medicinske svrhe upotrebljavala se na području Europe, u Kini, Japanu i Indiji. U spisima je opisana primjena gljive za tretman inficiranih rana, njihovo oblaganje i zaustavljanje krvarenja te kod liječenja hemoroida, u ginekologiji za vanjske upale, bolne menstruacije, za poremećaje mokraćnog mjehura, oboljenja pluća i astmu. Koristila se i za organe probavnog sustava, točnije za bolju probavu, mršavljenje, rak želuca i jednjaka [3].

#### **2.2.5. Imuno-stimulirajuća i protuupalna svojstva gljive**

Beta glukan se pokazao odličnim stimulatorom za jačanje imuniteta. Beta glukan i Fomentariol pokazuju antihiper glikemijsku funkciju tj. pomažu u snižavanju šećera u krvi. Uz beta glukan u gljivi *Fomes fomentarius* prisutni su i mnogi antioksidansi koji blagotvorno djeluju na krvožilni sustav [3].

### 2.2.6. Citotoksična aktivnost

Provedene studije ukazale su na mogućnost upotrebe eksopolisaharida iz gljive *Fomes fomentarius* u liječenju tumora i čira na želucu [7]. Provedena je i studija djelovanja ekstrakta gljive na stanične kulture karcinoma grlića maternice i karcinoma želuca. Istraživanje je provedeno s ekstraktima gljive u cikloheksanu, diklormetanu, metanolu i vodi. Vodeni ekstrakt je pokazao jaku citotoksičnost na stanice karcinoma grlića maternice i stanice karcinoma želuca, dok na zdrave plućne stanice nije imao utjecaja. Metanolni je ekstrakt pokazao također jako citotoksično djelovanje na stanice karcinoma grlića maternice i umjerenu citotoksičnu aktivnost na stanice karcinoma želuca. Kao i vodeni ekstrakt nije imao utjecaj na zdrave plućne stanice. Ekstrakti u diklormetanu i cikloheksanu imali su značajan utjecaj na stanice karcinoma grlića maternice, ali nikakav citotoksični efekt nisu pokazali na stanice karcinoma želuca [5]. Polisaharid-K je sastojak koji može ublažiti simptome kemoterapije kao što su smanjena produkcija leukocita i uništavanje koštane srži. Polisaharid-K je sastojak ove gljive i vezan je za proteine [3].

### 2.2.6. Antimikrobna aktivnost gljive

Gljiva *Fomes fomentarius* je u provedenim istraživanjima pokazala veću antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost od ostalih ispitivanih gljiva. Isto tako jedina je pokazala aktivnost protiv *Herpes simplex* virusa. Sastojak gljive koji pokazuje antivirusni efekt je lignin [8]. Uz njega tu je i patent ChGMC-kompleksa znanstvenika L. F. Gorovoj-a. Hitin-glukan-melanin-kompleks zbog hitinskih vlakana može vezati teške metale i radioaktivne elemente. Kompleks se sastoji od (~70%) hitina, (~20%)  $\beta$ -glukana i (~10%) melanina. Kompleks je bio aktivan protiv gljivice *Candida albicans*, bakterije *Helicobacter pylori* i imao je izraženu antivirusnu aktivnost protiv HIV-a [3,9]. Ključni sastojci koji omogućuju antimikrobnu aktivnost su polifenoli i  $\beta$ -glukan [10]. Za prevenciju i liječenje infekcije bakterijom *H. pylori* važno je u redovnu prehranu uključiti gljive koje su bogate polisaharidima koji imaju značajnu ulogu u borbi protiv bakterijskih infekcija [5].

### **2.2.7. Ostale upotrebe gljive *Fomes fomentarius***

Gljiva *Fomes fomentarius* (L.) ima visok sadržaj proteina i minerala koji sudjeluje u stimulaciji proizvodnje faktora rasta živaca, NGF (*Neurotrophic Growth Factor*). Na taj način se čuva zdravlje kognitivnih funkcija.

Gljiva *Fomes fomentarius* smatra se biosorbentom za pročišćavanje otpadnih voda.

Suha gljiva *Fomes fomentarius* koristi se u pčelarstvu za proizvodnju čistog prirodnog dima. Najbolji izbor su gljive s hrasta ili bukve.

Zbog svojih raznih prirodnih oblika i boja kresiva guba koristi se kao ukras. Zbog svoje tvrdoće koristi se za izradu umjetničkih predmeta, a natopljena u vodi i obrađena tako da se dobije "crveni amadou" koristi se za izradu raznih odjevnih predmeta [3].

## **2.3. Zelena sinteza**

Zelena sinteza je filozofski pristup koji bi trebao pridonijeti održivom razvoju. U kemijskim procesima koriste se reagensi koji nisu štetni i nastaju produkti koji su sigurni za okoliš [11]. Zelena sinteza se sastoji od tri glavna koraka u koje spadaju: odabir prihvatljivog otapala, reducirajući agens koji je ekološki neškodljiv i neškodljive supstance čija je svrha stabilizacija nanočestica [12].

### **2.3.1. Zelena sinteza nanočestica srebra**

Zbog svojih specifičnih kemijskih, fizikalnim i bioloških svojstava nanočestice pobuđuju zanimanje u najvećoj mjeri na području medicine. Međutim, imaju veliku primjenu u nanobioteknološkim istraživanjima zbog svoje katalitičke i antibakterijske aktivnosti [13]. Veliki značaj imaju zbog mogućnosti povećanja površine u odnosu na njihov volumen. Na taj način mijenjaju mehaničke, katalitičke i toplinske osobine materijala [14].

Ekstrakti organizama iz carstava *Monera*, *Protista*, *Fungi* i *Plantae* pokazali su se kao dobri reducens i stabilizatori u sintezi nanočestica [15]. U reducense srebrovih iona



spadaju molekule aminokiselina, vitamina i polisaharida [12]. Indikator nastanka nanočestica srebra je promjena boje otopine iz žućkaste u smeđu, što se naziva SPR-fenomen (eng. *Surface plasmon resonance*) ili rezonancija površinskih plazmona [13].

### **2.3.2. Zelena sinteza nanočestica srebra posredovana gljivama**

Sinteza nanočestica sa staničnom masom ili ekstracelularnim komponentama iz gljiva ima mnogih prednosti. Njihov micelij može podnijeti pritisak, tok, uzburkanost i ostale pojave u bioreaktorima. Lako se uzgajaju i rukovanje je relativno lako. Precipitat s nanočesticama nema nepotrebnih komponenata, pa se može direktno upotrebljavati [16]. Za nastanak nanočestica srebra potrebno je imati ekstrakt s intracelularnim ili ekstracelularnim materijalom koji se zatim pomiješa s otopinom soli metala. Najbolje se pokazala otopina srebrovog nitrata [15]. Reducirajući agensi u ekstraktu mogu biti kombinacija biomolekula: enzima, proteina, vitamina, flavonoida, aminokiselina, alkaloida i ostalih. Biomolekule daju elektron ionu srebra prevodeći ga u atome srebra ( $\text{Ag}^+$  u  $\text{Ag}^0$ ), zatim slijedi aglomeracija nakon koje slijede stvaranje i stabilizacija nanočestica srebra [12][15]. Na morfologiju, veličinu i oblik nanočestica utječu fizikalno-kemijski parametri. Kako bi se dobile nanočestice određenih karakteristika potrebno je uskladiti parametre. Parametri koji određuju njihovu morfologiju su temperatura, koncentracija iona, vrsta ekstrakta, pH, omjeri ekstrakta i vodene otopine  $\text{AgNO}_3$  i temperatura.

O vrsti ekstrakta ovisi koja će se temperatura koja će se koristiti tijekom sinteze. Tako mezofilni mikroorganizmi zbog inaktivacije enzima ne podnose temperature veće od  $40^\circ\text{C}$  [15].

### **2.3.3. Predloženi mehanizmi djelovanja nanočestica srebra na stanice bakterija**

Postoje dva predložena mehanizma djelovanja nanočestica na bakterije. Prvi mehanizam je formiranje kompleksa iona srebra s nukleinskim kiselinama. Ako bakterija ima negativni naboj na staničnoj membrani, pozitivni ioni srebra se nakupljaju na površini bakterije te na posljeticu ulaze u stanicu [17][18]. Pretpostavlja se da dolazi do remećenja osmoregulacije, transporta elektrona i stanične permeabilnosti. Nanočestice srebra manje veličine imaju bolja antibakterijska svojstva

[19]. U drugom mehanizmu nanočestice srebra dolaze u interakciju s makromolekulama (DNA, enzimi) mehanizmom oslobađanja elektrona i tako uzrokuju inhibiciju sinteze proteina i stanične stjenke bakterije [17]. Zbog sve veće primjene i razvoja nanotehnologije dolazi do veće izloženosti nanočesticama. Ključni aspekti toksičnosti su veličina i oblik nanočestica jer utječu na ulazak u organizam. U okoliš mogu dospjeti putem vode i zraka. Stoga se u novije vrijeme sve veća pozornost usmjerava na istraživanja toksičnog utjecaja nanočestica na okoliš i čovjeka [20][21].

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. Cilj**

U ovom radu po prvi puta je provedena sinteza nanočestica srebra iz vodenog ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* uzorkovane na području Istočne Hrvatske. Cilj rada bio je sintetizirati nanočestice srebra zelenom sintezom iz ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* (L.), okarakterizirati ih, a potom ispitati njihovu katalitičku i antimikrobnu aktivnost. Karakterizacija i uspješnost sinteze nanočestica srebra provedena je pomoću UV-VIS, FTIR, PXRD i TEM metode analize, a dodatno je ispitano i njeno svojstvo razgradnje boje otopine metilenskog plavila, kao i antibakterijska aktivnost.

### **3.2. Materijali i metode**

#### **3.2.1. Prikupljanje uzoraka**

Gljiva *Fomes fomentarius* (L.) Fr. uzorkovana je na području Osječko-baranjske županije (Satnica) s bjelogoričnog stabla bukve *Fagus sylvatica* (L.).

#### **3.2.2. Ekstrakcija**

U čašu je dodano 15g uzorka usitnjenog uzorka gljive *Fomes fomentarius* (L.) i 150 ml deionizirane vode. Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. nakon čega je zagrijavana 1 sat na 50°C. Nakon hlađenja otopina je profiltrirana (Whatman No.1) i spremljena u svrhu daljnjeg postupka u hladnjak na 4°C.

#### **3.2.3. Sinteza nanočestica srebra**

Kako bi se istražili optimalni uvjeti sinteze nanočestica srebra rađena su preliminarna mjerenja uz različite koncentracije vodenih otopina AgNO<sub>3</sub> (0.01 mM, 1 mM, 3 mM i 5 mM ), različite pH vrijednosti (5.4, 6, 7, 8, 9, 10), različite temperature (20°C, 40°C, 60°C, 80°C) i različite omjere ekstrakta i vodenih otopina AgNO<sub>3</sub> (1:1, 1:2, 1:5, 1:9).

### **3.2.3. Karakterizacija nanočestica**

Nastale nanočestice okarakterizirane su uporabom UV-VIS, FT-IR, rendgenske difrakcije na prahu, TEM analizom, a dodatno je istražena njihova sposobnost razlaganja boje i antibakterijska aktivnost.

### **3.2.4. Sposobnost razgradnje boje metilenskog plavila**

Izvorna otopina metilenskog plavila priređena je otapanjem 10 mg metilenskog modrila u 1000 ml deionizirane vode. U 100 ml otopine dodano je uz miješanje 2 mg sintetiziranih nanočestica srebra, poslije čega je otopina ostavljena na sunčevom svjetlu od izlaska do zalaska sunca. U svrhu praćenja uspješnosti razgradnje boje, u jednakim je vremenskim intervalima uzorkovano nekoliko mililitara otopine kako bi se snimili UV-Vis spektri. Razgradnja boje praćena je pri 660 nm.

### **3.2.5. Antibakterijska aktivnost nanočestica srebra**

Antibakterijska aktivnost ekstrakata nanočestica srebra ispitivana je na četiri vrste bakterijskih sojeva: Gram-pozitivne *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*; Gram negativne *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Četiri bakterijska soja izolirana su iz različitih kliničkih uzoraka koji su dobiveni od Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osijek, Osječko-baranjske županije, Hrvatska. Antibakterijsko djelovanje ekstrakta provedeno je kao minimum inhibitorne koncentracije (MIC) modificiranom metodom mikrodilucije bujona [22]. Testovi mikrodilucije bujona provedeni su s mikrotitarskim pločicama s 96 polipropilenskim ravnim sterilnim jažicama (Kartell, Italija). Ekstrakti nanočestica su otopljeni u DMSO i jednoj stotini mikrolitara Mueller-Hinton bujona (MHB) (Cultimed) u 96 mikro-jažica. Ekstrakti su serijski razrijeđeni (13 do 0,0063 mg/mL) u bujonu Mueller-Hinton (MHB) (Cultimed). Inokulum je pripremljen iz MHB suspenzije kolonija 24-satne kulture mikroorganizama na ploči MHA (Cultimed). Svaka jažica je inokulirana s  $300 \times 10^3$  bakterija (gustoća bakterijske suspenzije na 0,5 McFarlandove skali, što je  $150 \times 10^6$  CFU/mL). Ciprofloksacin je kotestiran kao pozitivna kontrola, a DMSO je korišten kao negativna kontrola. Kontrolni uzorci (pozitivni i negativni) inkubirani su pod istim uvjetima. Nakon inkubacije na 37 °C tijekom 24 sata u

atmosferskom inkubatoru s 5% CO<sub>2</sub> i 50% vlage. Dodatna inkubacija provedena je s trifeniltetrazolijevim kloridom u vremenu od tri sata na 37 °C. Jažice su ispitane na rast ispitivanih mikroorganizama golim okom. MIC je definiran kao najniža koncentracija spoja pri kojoj nije bilo promjene boje zbog rasta bakterija. Svi testovi su izvedeni u duplikatu.

### **3.2.6. Obrada podataka**

Podatci su obrađeni u program Excel i Statistica Tibco 14.0.0.15

### 3.2.7. UV-Vis spektroskopija

Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja se kreće velikom brzinom kroz prostor. Elektromagnetsko zračenje se može opisati pomoću klasičnog valnoga modela. Osnovni parametri klasičnog valnog modela su frekvencija, valna duljina, amplituda i brzina. Pojave kao što su apsorpcija i emisija energije zračenja mogu se objasniti preko korpuskularne teorije koja govori o prirodi zračenja kao diskretnih čestica nazvanih fotonima. U spektroskopiji apsorpcija je pojava selektivnog smanjenja intenziteta neke frekvencije elektromagnetskog zračenja zbog prisutnosti kemijskih vrsta u propusnoj sredini. Apsorpcija je moguća ako energija fotona ima jednaki iznos kao i razlika u energiji osnovnog i nekoga od viših energetske stanja čestice [23]. Područje primjene u analitičkoj spektroskopiji za vidljivo i ultraljubičasto područje ima raspon od 1000 – 10 nm [24]. U tom području dolazi do apsorpcije energije fotona od strane atoma, iona ili molekula te dolazi do promjene raspodjele elektrona.

Dijelovi instrumenta za UV-VIS spektroskopiju (slika 4) najčešće se dijele na pet osnovnih dijelova: izvora zračenja, sektora valnih duljina koji omogućuje snimanje u određenom valnom području, spremnika za uzorke, detektora zračenja i procesora signala i uređaja za očitavanje signala. Spremnici u koje se nanose uzorci se nazivaju ćelije ili kivete. Upotreba određenih vrsta kivete ovisiti će o spektralnom području u kojemu se vrši ispitivanje. Tako se na primjer kiveta od kvarca upotrebljava za ultraljubičasto i infracrveno područje, dok se plastične kivete upotrebljavaju za vidljivo područje. Najčešća debljina kiveta za ultraljubičasto i vidljivo područje debljine je 1 cm.



**Slika 4.** UV-VIS spektrofotometar.

Apsorpcija ultraljubičastog svjetla je proporcionalna količini uzorka kroz koji prolazi zračenje. Odnos apsorpcije i količine uzorka kvantitativno se opisuje Beer-Lambertovim zakonom:

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (1)$$

Gdje je  $A$  - apsorbancija

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent, konstanta koja je svojstvena za pojedinačni spoj pri valnoj duljini

$c$  - koncentracija uzorka (mol/L)

$l$  - duljina kivete (cm) [25].

### 3.2.8. FT-IR spektroskopija

FT-IR spektroskopija je metoda koja se u posljednjih nekoliko desetljeća koristi za razumijevanje reakcijskih mehanizama, određivanja plinovitih faza i identifikaciju aktivnih mjesta na molekulama [26].

Energije zračenja u infracrvenom području izazivaju molekulske vibracije [25]. Infracrveni spektar sastoji se od većih valnih duljina od 800 nm i preko  $10^5$  nm [27]. Dijeli se na blisko (NIR), srednje (MIR) i daleko (FIR). Uzorak koji je izložen infracrvenom zračenju apsorbira upadno zračenje koje je u rezonanciji s pojedinim molekulskim vibracijama pri čemu dolazi do relativne promjene položaja atoma u molekuli. Izbacivanjem centralnog atoma iz ravnoteže javlja se inducirani dipolni moment [28]. Najčešće su to područja apsorpcije u kojima se javlja deformacija (savijanje) i rastezanje veza u molekuli [25].

Analizator infracrvene apsorpcije s Fourierovim transformacijama mjeri apsorbirano infracrveno zračenje [26] i predstavlja metodu FTIR (eng. *Fourier transform infrared spectroscopy*) [28]. Bilježenjem apsorpcije zračenja u ovisnosti o frekvenciji dobiva se infracrveni spektar. Apsorpcija zračenja se bilježi u smjeru slijeva na desno. Fizikalna veličina koja se upotrebljava je valni broj i izražava se u recipročnim centimetrima ( $\text{cm}^{-1}$ ). U molekuli atomi vibriraju na različite načine i na određenim kvantiziranim energetskim razinama. Infracrveno zračenje s valnim brojevima između  $1200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  odgovara rasteznim vibracijama organskih molekula. Zbog toga se to područje spektra naziva još i područjem funkcionalnih skupina. Područje ispod valnog broja  $1600 \text{ cm}^{-1}$  zove se područje otiska prsta i korisno je za završnu analizu uzorka jer je specifično za svaki spoj. Određeni spoj ima karakterističan oblik koji ocrtavaju zajedno sve vrpce.

IR-spektroskopija je metoda s kojom se mogu snimiti spektri čvrstih, tekućih i plinovitih uzoraka. Uzorci se stavljaju u ćelije koje su izrađene od kristala soli, najčešće natrijevog klorida (NaCl). Rezultati se mogu prikazati na dva načina, u transmisijskom ili apsorpcijskom načinu [25].



FT-IR spektrometar se sastoji od izvora infracrvenog zračenja, interferometra, nosača za uzorak, detektora i računala (slika 5). Interferometar je dio instrumenta kojeg čine kolimator, djelitelj zrake, pomično i stacionarno zrcalo. Postoje razne metode pripreme uzoraka i njihovih nosača. Najčešća od njih je priprema pastile od kalijevog bromida (KBr) i uzorka u omjeru 100:1 [28].

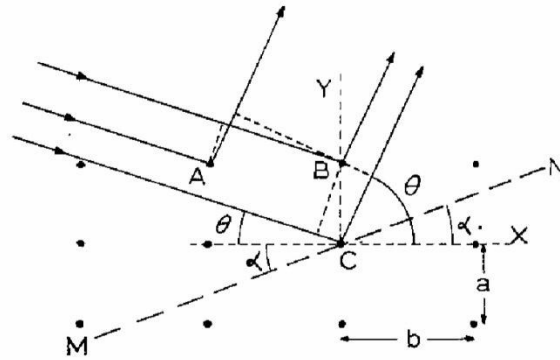


Slika 5. FT-IR spektrometar.

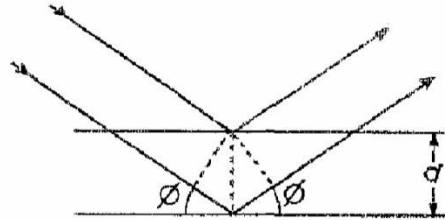
### 3.2.8. Rendgenska difrakcija na prahu

Metoda difrakcije rendgenskih zraka temelji se na Bragg-ovom zakonu. Braggovom jednadžbom (2) moguće je odrediti razmak između ravnina atoma  $d$  u kristalnoj rešetki ukoliko je poznata valna duljina upotrijebljenih rendgenskih zraka i ako je eksperimentalno određen Braggov kut  $\theta$ . Rasute zrake koje su s upadnim zrakama u istoj vertikalnoj ravnini čine Braggov kut s ravninom atoma u kristalnoj rešetci (Slika 6.). Pojava difrakcije rendgenskih zraka je zapravo njihova zrcalna refleksija na atomskim plohama koje predstavlja međusobno djelovanje rendgenskih zraka i elektrona atoma (Slika 7.).

$$n\lambda = 2 d \sin \theta \quad (2) \quad [27]$$



**Slika 6.** Raspršenje X-zraka na kristalnoj rešetci[29].



**Slika 7.** Refleksija X-zraka i Bragg-ov kut[29].

PXRD uređaj za rendgensku difrakciju na prahu je kompaktni napredni instrument koji ima mogućnost mjerenja na različitim temperaturama i posjeduje komoru za vlagu (Slika 8.). Upotreba uređaja je na taj način proširena i na istraživanja utjecaja različitih temperatura i stupnja vlage na različite materijale.

Metoda rendgenske difrakcije na prahu ne zahtjeva prisutnost pojedinačnih (jediničnih) kristala. Difrakcijski uzorak prikazuje intenzitet nasuprot kuta detektora  $2\theta$ . Rezultati se prikazuju difraktogramom, gdje položaj vrha ovisi o valnoj duljini zrake. Difraktometri mogu biti prikazani u dvije konfiguracije, transmisijskoj i konfiguraciji refleksije.

PXRD metoda ima brojne prednosti među kojima su visoka osjetljivosti, pouzdanost, laka priprema uzoraka, jednostavno korištenje, velika brzina, niski troškovi održavanja, laka interpretacija podataka kvantitativnih i kvalitativnih analiza.

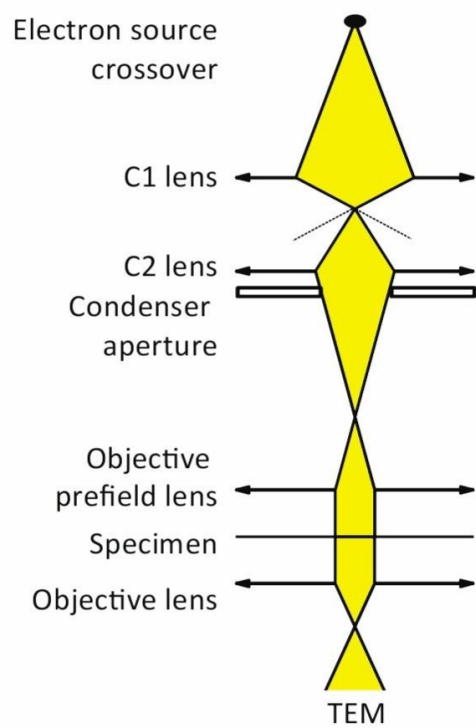


**Slika 8.** Instrument za rendgensku difrakciju na prahu.

Prednost metode je i u tome što nije destruktivna, a nedostatak ove metode je prisutnost zračenja, potreba za referentnim standardom i cijena samog uređaja [30].

### **3.2.9. Transmisijska elektronska mikroskopija, TEM**

Transmisijska elektronska mikroskopija ili TEM je mikroskopska tehnika koja se u kristalografiji koristi za određivanje lokalne veličine kristalita i čestica, te za istraživanja strukture kristala. Temelji se na detekciji elektrona koji su prošli kroz tanki uzorak koji se nalazi na nosaču (Slika 9.). Ovom metodom omogućeno je prikaz čestica u 2D projekciji [31]. TEM se može koristiti za analizu nanočestica kako bi se okarakterizirala njihova struktura, za dokazivanje intracelularne lokalizacije nanočestica i rijetko za određivanje morfologije tkiva ili uzorka stanica [32-38]. Metoda je korisna i često korištena zbog mogućnosti velike rezolucije [39].



**Slika 9.** Shema dijelova uređaja za transmisijsku elektronsku mikroskopiju [40].

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati UV-Vis spektroskopije

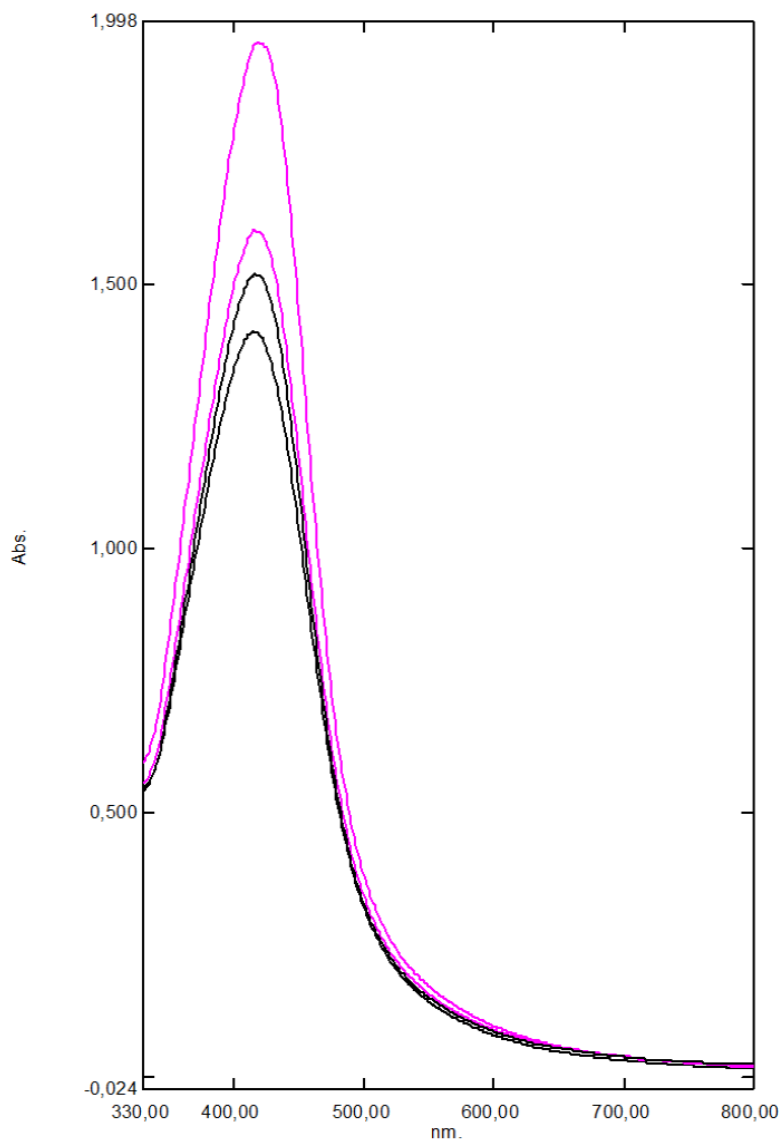
Rezultati preliminarnih mjerenja pokazali su da su najbolji uvjeti sinteze nanočestica srebra iz vodenog ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* i  $\text{AgNO}_3$  bili slijedeći: pH 7, omjer ekstrakta i  $\text{AgNO}_3$  1:9, koncentracija ( $\text{AgNO}_3$ )=3 mM i temperatura od  $80^\circ\text{C}$ . Uz prisutnu promjenu boje iz žute u smeđu (Slike 10 i 11), apsorpcijski maksimum (SPR fenomen) koji se nalazio u rasponu od 410-430 nm poslužio je dodatno kao dokaz njihova nastanka.



**Slika 10.** Otopina ekstrakta prije dodatka  $\text{AgNO}_3$ .



**Slika 11.** Otopina nakon dodatka  $\text{AgNO}_3$  (SPR-fenomen).

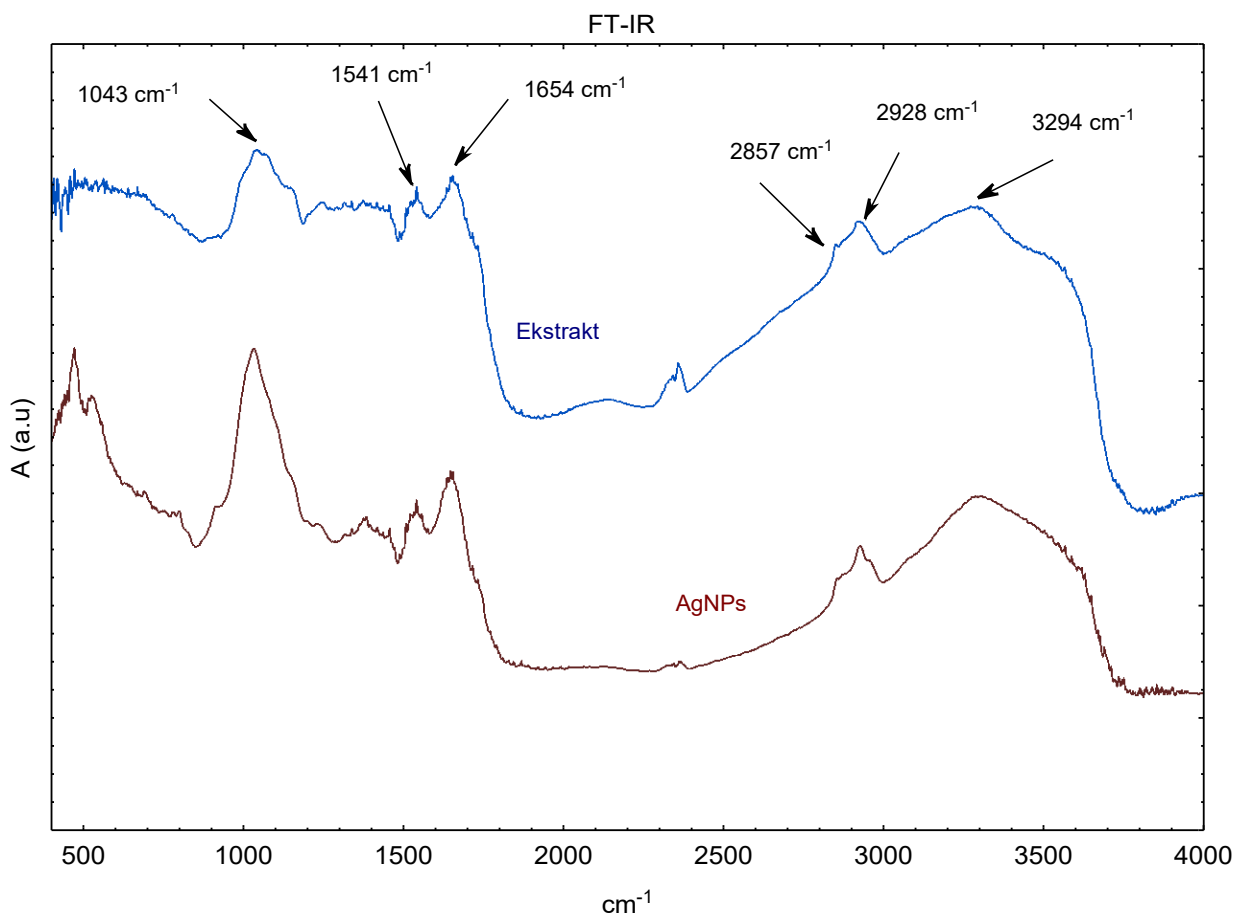


**Slika 12.** Apsorpcijski spektar nanočestica srebra pri  $c=3$  mM, temperatura= $80^{\circ}\text{C}$ , pH 7, omjer 1:9.

Pomaci apsorpcijskih maksimuma ukazuju na promjene u veličini čestica, te je tako plavi pomak (prema kraćim valnim duljinama) pokazatelj smanjenja veličine čestica, a crveni (prema većim valnim duljinama) pokazatelj njihove aglomeracije [19]. Stabilnost sintetiziranih nanočestica srebra okarakterizirana je apsorpcijskim maksimumima koji tijekom tromjesečnog perioda praćenja nisu pokazali veće pomake, a niti promjenu oblika.

## 4.2. Rezultati FT-IR spektroskopije

Metoda IR-spektroskopije s Fourierovim transformacijama (FT-IR) provedena je kako bi se identificirale funkcionalne skupine u ekstraktu i njihovo moguće sudjelovanje u sintezi i stabilizaciji nanočestica srebra [25]. Za snimanje spektara FT-IR metodom pomiješano je 3 mg ekstrakta, a potom i nanočestica srebra s 100 mg KBr.



**Slika 13.** FT-IR spektri prije i nakon sinteze nanočestica (AgNPs).

Na slici 13. prikazan je FT-IR-spektar uzorka gljive *Fomes fomentarius* (plavo) i uzorka nanočestica srebra (crveno). Dokaz jednakog kvalitativnog sastava vidljiv je iz međusobne sličnosti spektara uzorka gljive *Fomes fomentarius*. i nanočestica srebra. Vrpca na 3294 cm<sup>-1</sup> karakteristična je za O-H skupinu, dok one smještene pri 2928 cm<sup>-1</sup> i 2857 cm<sup>-1</sup> odgovaraju simetričnim i asimetričnim vibracijama istezanja C-

H skupina ugljikovodika u proteinima ili enzimima.. Amidna I vrpca smještena je na  $1654\text{ cm}^{-1}$ , a amidna vrpca II pri  $1541\text{ cm}^{-1}$ . Vrpca smještena pri  $1043\text{ cm}^{-1}$  karakteristična je za vibracije istezanja skupine C-N alifatskih amina. Nakon reakcije s  $\text{AgNO}_3$  dolazi do pomaka nekih od vrpca spektra gljive, njihovog nestanka i smanjenja intenziteta. Do pomaka je došlo na slijedećim vrpcama: s  $3294\text{ cm}^{-1}$  na  $3288\text{ cm}^{-1}$ , pri čemu se vrpca smještena pri  $2928\text{ cm}^{-1}$  pomiče na  $2989\text{ cm}^{-1}$ , a ona smještena na  $2857\text{ cm}^{-1}$  nestaje u spektru nanočestica srebra. Pomaci su vidljivi i na vrpca smještenoj pri  $1654\text{ cm}^{-1}$  koja prelazi na  $1647\text{ cm}^{-1}$ , a zabilježen je i pomak maksimuma vrpce s  $1043\text{ cm}^{-1}$  na  $1035\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje da su proteini vjerojatno uključeni u reakciji redukcije  $\text{Ag}^+$  u  $\text{Ag}^0$  [19].



### 4.3. Rezultati rendgenske difrakcije na prahu

Na slici 14. prikazan je difraktogram uzorka sintetiziranih nanočestica.

Scherrer-ovom jednadžbom određena je prosječna veličina kristalita:

$$L = \frac{K \times \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3)$$

Gdje je :

$L$ -veličina kristalita izražena u nm

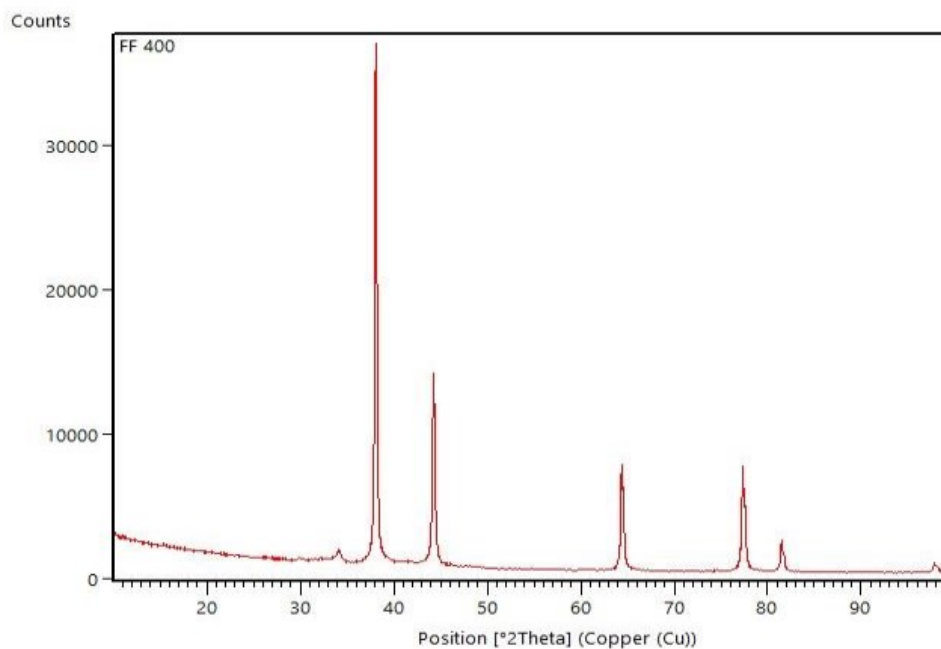
$K$ -faktor oblika

$\lambda$ -valna duljina

$\beta$ -širina na pola visine vrha, vrijednost se očitava iz difraktograma

$\theta$ -kut čija se vrijednost očitava iz difraktograma

$K = 0,9$ , a  $\lambda = 1,5406$  nm



**Slika 14.** Difraktogram sintetiziranog uzorka nanočestica.

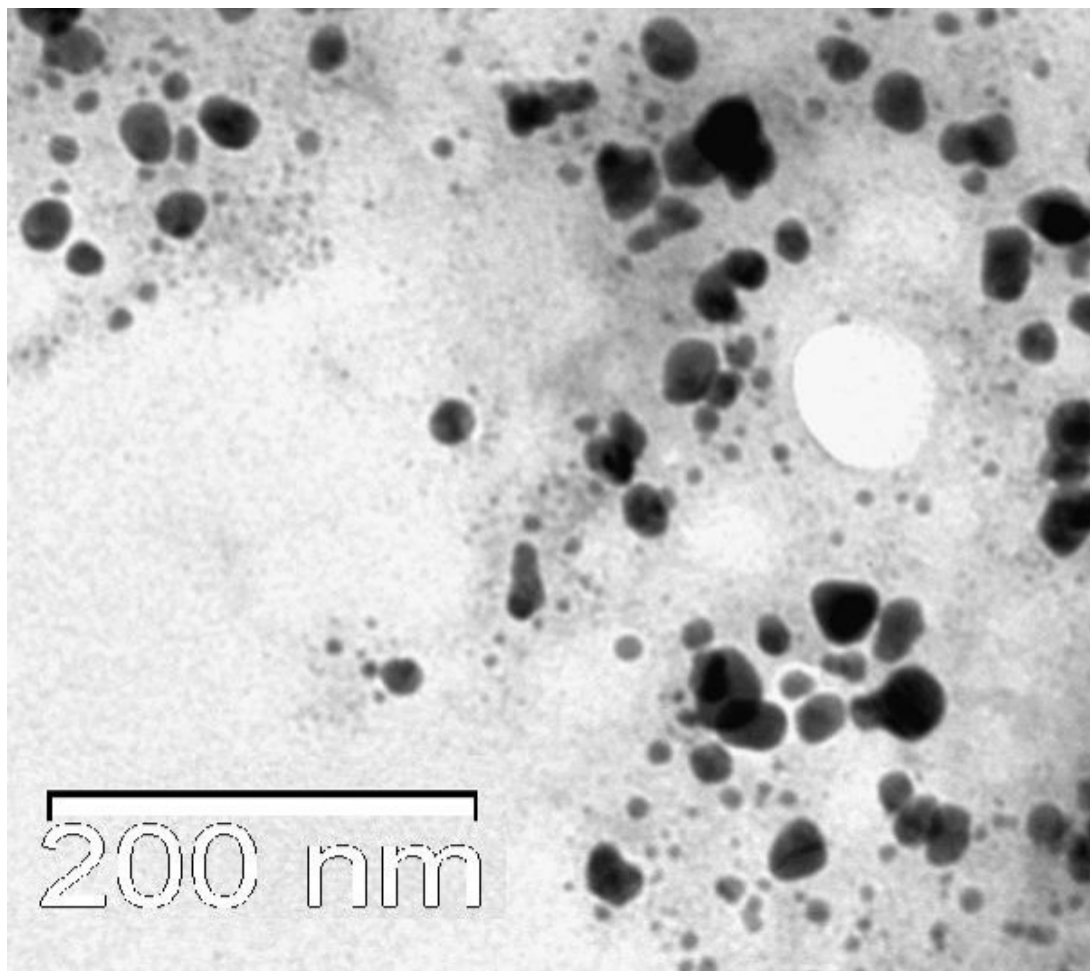
Na difraktogramu (Slika 14.) prikazani su pikovi uočeni pri  $2\theta$  vrijednostima od:  $38^\circ$ ,  $44.6^\circ$ ,  $64.6^\circ$ ,  $78^\circ$  i  $81.5^\circ$  i indeksirani su kao (111), (200), (220), (311) i (222) kristalografske ravnine plošno centrirane kubične strukture (FCC) srebra. Prosječna veličina kristalita izračunala se pomoću Scherrer-ove jednadžbe (3) i iznosila je 24 nm. [41].



**Slika 15.** Uzorak sintetiziranih nanočestica srebra.

#### 4.4. TEM analiza

Bolji uvid u strukturu uzorka pružaju TEM slike produkata sinteze (Slika 16.). Iako su prisutni tragovi aglomeracije, rezultati TEM analize pokazali su relativno dobro slaganje s rezultatom prosječne veličine kristalita dobivenog Sherrerovom formulom.

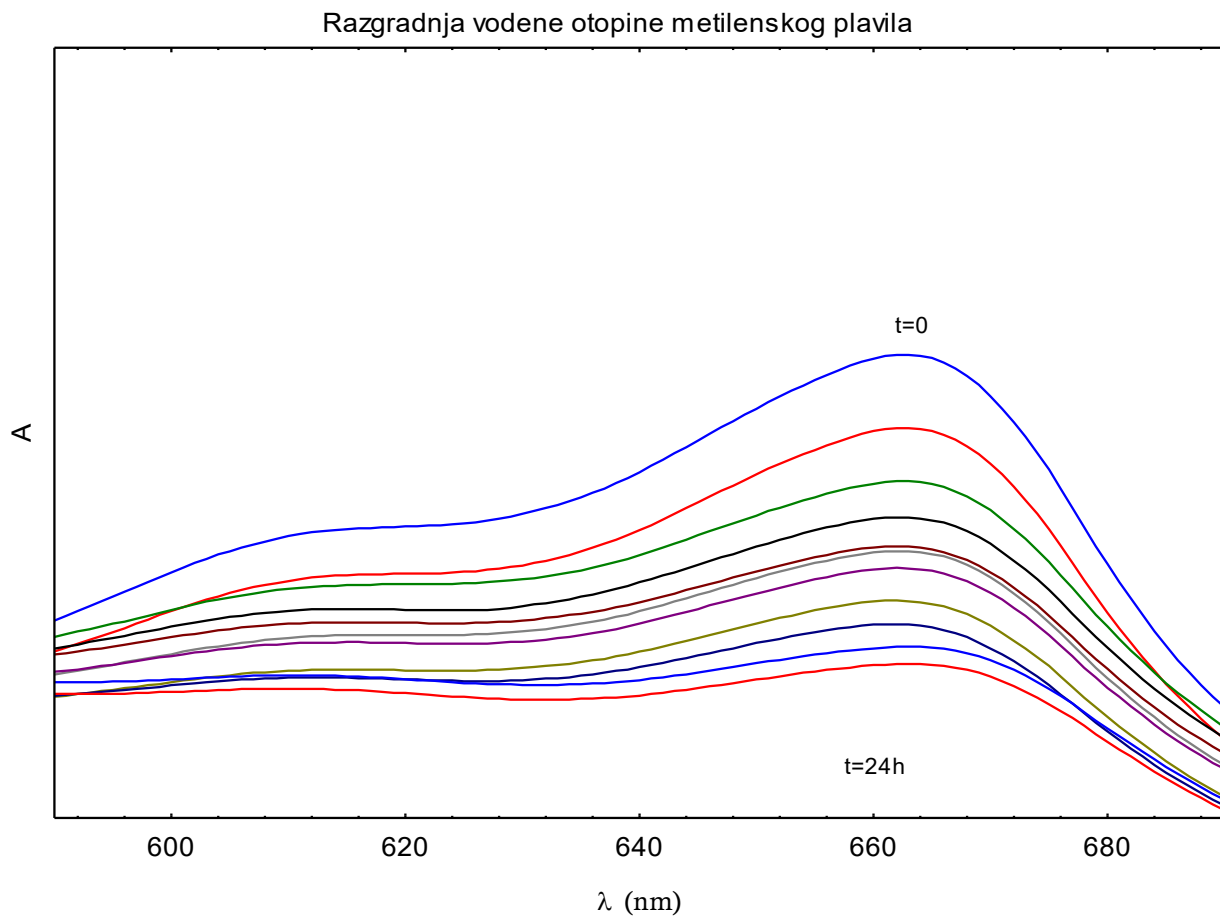


**Slika 16.** TEM slika uzorka nanočestica srebra.

#### **4.5. Sposobnost razgradnje boje**

Obrada otpadnih voda koje sadrže različite pigmente je od velike važnosti budući da je velika većina boja teško biorazgradiva i ekstremno kancerogena. Nedavno su razvijeni tehnološki sustavi za fluktuaciju onečišćenja uključujući i kemijske sustave kao što su kloriranje, ozoniranje, sustavi za adsorpciju i biološki sustavi za biorazgradnju [42][43]. Zelena sinteza nanočestica metala je metoda biosinteze koja se nedavno počela primjenjivati zbog svojih raznih prednosti nad drugim metodama, poput netoksičnosti, ekološki prihvatljivih reaktanata i niskih cijena sirovina. Istraživači koriste biološke sustave za biosintezu nanočestica. Protokol sinteze je jednostavan, a molekule iz biološkog sustava služe kao reducensi ionima metala te tako nastaju atomi koji se dalje aglomeriraju [44][45]. Primjer još jedne zelene sinteze je nastanak nanočestica iz meda koje su se nakon toga koristile u razgradnji metilenskog plavila. Med se pokazao kao vrlo dobar reducirajući i zaštitni agens u sintezi nanočestica, a kao glavne komponente za izvor elektrona su molekule glukoze i fruktoze [46].

Rezultati prikazani na slici 17. pokazuju da je vrlo mala količina sintetiziranih nanočestica (2 mg) dodana u 100 ml vodene otopine metilenskog modrila utjecala na značajnu razgradnju boje već nakon 24 sata.



**Slika 17.** Apsorpcijski spektari metilenskog plavila uz 2 mg/L otopine nanočestica srebra sintetiziranih zelenom sintezom iz gljive *Fomes fomentarius* sniman pri jednakim vremenskim intervalima.

#### 4.6. Antibakterijsko djelovanje uzorka nanočestica srebra

Nanočestice srebra sintetizirane iz vodenog ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* (L.) pokazale su dobro antibakterijsko djelovanje protiv sojeva *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus* (Tablica 2.). Najbolje antibakterijsko djelovanje uočeno je protiv *S. aureus* i *E. coli*. Najmanje antibakterijsko djelovanje opaženo je protiv *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* pokazuje otpornost na razne antibiotike, uključujući aminoglikozide, kinolone i  $\beta$ -laktame. Glavni mehanizmi koji su zaslužni za veliku otpornost *P. aeruginosa* na djelovanje antibiotika mogu se klasificirati u intrinzičnu, stečenu i adaptivnu rezistenciju.

**Tablica 2.** Antibakterijska aktivnost ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* (L.).

<b>MIC (mg mL<sup>-1</sup>)</b>			
<b><i>B. subtilis</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>
<b>0.050</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.100</b>

## 5. Zaključak

U ovome su radu po prvi put nanočestice srebra sintetizirane postupkom zelene sinteze uz pomoć vodenog ekstrakta gljive *Fomes fomentarius* uzorkovane na području istočne Hrvatske. UV-VIS spektroskopijom i promjenom boje otopine nakon dodatka otopine  $\text{AgNO}_3$  dokazan je nastanak nanočestica srebra. Kao najbolji uvjeti sinteze pokazali su se: temperatura od  $80^\circ\text{C}$ , pH 7,  $c(\text{AgNO}_3)=3$  mM, i omjer ekstrakta i vodene otopine  $\text{AgNO}_3=1:9$ . Rezultati dobiveni usporedbom spektara dobivenih FT-IR metodom ukazali su na molekule koje su sudjelovale u sintezi nanočestica srebra. Prosječna veličina kristalita izračunata pomoću Scherrer-ove jednadžbe iznosila je 24 nm. Sintetizirane nanočestice pokazale su dobru sposobnost razgradnje boje vodene otopine metilenskog plavila. Uzorak nanočestica srebra pokazao je najbolju antibakterijsku aktivnost na sojeve bakterija *S. auerusa* i *E. coli*, dok najmanju na soj bakterija *P. aeruginosa*. Vodeni ekstrakt gljive *Fomes fomentarius* pokazao se kao dobar reducirajući i stabilizirajući agens.

## 6. LITERATURA

- [1] R. Božac, Gljive-Morfologija, sistematika i toksikologija, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2021.
- [2] I. Focht, Ključ za gljive, ITP »NAPRIJED«, Zagreb, 1990.
- [3] <https://modroizeleno.com/naucna-medicina/domaca-ljekovita-gljiva-trud-kresiva-guba-fomes-f/> (Pristupljeno 05.listopada 2023. u 16:57 sati)
- [4] M. Josipović, Očaravajući svijet gljiva, Leo-commerce d.o.o., Banja Luka, 2016
- [5] M. Kolundžić, N. Đ. Grozdanić, M. Dodevska, M. Milenković, F. Sisto, A. Miani, G. Farronato, T. Kundaković, Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae, Industrial Crops and Products, 2016, 110-115.
- [6] L. M. Henning, U. Simon, A. Abdullayev, B. Schmidt, C. Pohl, T. N. Guitar, C. Vakifahmetoglu, V. Meyer, M. F. Bekheet, A. Gurlo, American Chemical Society, 2022, 4158-4169.
- [7] W. Chen, Z. Zhao, S.-F. Chen, Y.-Q. Li, Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro, Bioresource Technology, 2008, 3187-3194.
- [8] H. Sakagami, T. Aoki, A. Simpson, S. Tanuma, Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK (review), Tokyo, 1991, 993-999.
- [9] O. F. Senyuk, L. F. Gorovoj, G. V. Beketova, N. O. Savichuk, P. G. Rytik, I. I. Kucherov, A. B. Prilutckaya, A. I. Prilutsky, Anti-Infective Properties of the Melanin-Glucan Complex Obtained from Medicinal Tinder Bracket Mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Aphyllophoromycetidae), International Journal of Medicinal Mushrooms, 2011, 7-18.
- [10] F. Zhu, B. Du, Z. Bian, B. Xu, Glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities, J. Food Compos. Anal., 2015, 165–173.



- [11] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, Green Chemistry – Current and Future Issues, Polish Journal of Environmental Studies, 2005, 389-395.
- [12] K. V. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin, Green synthesis and their antimicrobial activities, Advances in Colloid and Interface Science, 2009, 83-96.
- [13] M. J. Firdhouse, P. Lalitha, Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Application, Journal of Nanotechnology, 2015, 1-18.
- [14] S. Sunkar, C. V. Nachiyar, Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. Asian Pacific, Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 953-959.
- [15] S. K. Srikar, D. D. Giri, D. B. Pal, P. K. Mishra, Green Synthesis of Silver nanoparticles: A Review. Green and Sustainable Chemistry, 2016, 34-56.
- [16] P. Velusamy, G. V. Kumar, V. Jeyanthi, J. Das, R. Pachaiappan, Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application, Official Journal of Korean Society of Toxicology, 2016, 95-102.
- [17] S. Ahmed, M. Ahmad, B. Lal Swami, S. Ikram, 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, Journal of Advanced Research, 2016, 17-28.
- [18] F. Okafor, A. Janen, T. Kukhtareva, V. Edwards, M. Curley, Green Synthesis of Silver nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, 5221-5238.
- [19] H. M. M. Ibrahim, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms, Journal of Radiation Research And Applied Sciences, 2015, 265-275.
- [20] P. C. Ray, H. Yu, P. P. Fu, Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, 2009, 1-35.

- [21] J. Fabrega, S. N. Luoma, C. R. Tyler, T. S. Galloway, J. R. Lead, Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment, *Environment International*, 2010, 517-531.
- [22] M. P. Weinstein, J. B. Patel, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: M07-A11*, 11. edition.; Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute; Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, 2018.
- [23] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 1999.
- [24] C. N. Barwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, Mc.Graw-Hill, London, 1983.
- [25] S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, d.d., Zagreb, 1994.
- [26] M. O. Guerrero-Pérez, G. S. Patience, *Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR*, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2019.
- [27] I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga, d.d., Zagreb, 1995.
- [28] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy*. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.
- [29] L. R. B. Elton, D. F. Jackson, *X-Ray Diffraction and the Bragg Law*, *American Journal of Physics*, 1966, 1036-1038.
- [30] A. Chauhan, P. Chauhan, *Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology*, *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 2014.
- [31] W. Zhou, H. F. Greer, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 941–950.
- [32] A. Nemmar, S. Al-Maskari, B. H. Ali, I. S. Al-Amri, *Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systematically administered diesel exhaust particles in rats*, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2007, 664-669.

- [33] A. Penn, G. Murphy, S. Barker, W. Henk, L. Penn, Combustion-derived ultrafine particles transport organic toxicants to target respiratory cells, *Environmental Health Perspectives*, 2005, 956–963.
- [34] J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J. F. Heilier, M. Delos, M. Arras M, A. Fonseca, J. B. Nagy, D. Lison, Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes, *Toxicology Applied Pharmacology*, 2005, 221–231.
- [35] S. Takenaka, E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, W. Möller, M. Behnke-Semmler, L. Jennen, A. Walch, B. Michalke, P. Schramel, J. Heyder, H. Schulz, Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung, *Inhalation Toxicology*, 2006, 733–740.
- [36] I. Beck-Speier, N. Dayal, E. Karg, K. L. Maier, G. Schumann, H. Schulz, M. Semmler, S. Takenaka, K. Stettmaier, W. Bors, A. Ghio, J. M. Samet, J. Heyder, Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles, *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 1080–1092.
- [37] R. C. Stearns, J. D. Paulauskis, J. J. Godleski, Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001, 108–115.
- [38] K. Pulskamp, S. Diabaté, H. Krug, Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, 2007, 58–74.
- [39] J. Panyam, S. K. Sahoo, S. Prabha, T. Bargar, V. Labhasetvar, Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles, *International Journal of Pharmacy*, 2003, 1-11.
- [40] J. M. Zuo, J. C. Spence, *Advanced Transmission Electron Microscopy*, Springer, New York, 2017.

- [41] A. A. Al-Khedhairy, R. Wahab, Silver Nanoparticles: An Instantaneous Solution for Anticancer Activity against Human Liver (HepG2) and Breast (MCF-7) Cancer Cells, *Metals*, 2022, 148-166.
- [42] P. B. DeJohn, R. A. Hutchins, Treatment of Dye Wastes with Granular Activated Carbon., *Textile Chemist & Colorist*, 1976, 34-38.
- [43] A. T. Moore, A. Vira, S. Fogel, Biodegradation of trans-1,2-dichloroethylene by methane utilizing bacteria in an aquifer simulator, *Environmental Science and Technology Boston*, 1989, 403–406.
- [44] A. M. Fayaz, K. Balaji, P. Kalaichelvan, R. Venkatesan, Fungal based synthesis of silver nanoparticles - an effect of temperature on the size of particles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 123–126.
- [45] Z. Kamel, S. Mahmoud, N. El Namoury, Biosynthesis, characterisation, and antimicrobial activity of silver nanoparticles from actinomycetes, *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical sciences*, 2016, 119-127.
- [46] ] M. I. Al-Zaban, M. A. Mahmoud, M. A. AlHarbi, Catalytic degradation of methylene blue using silver nanoparticles synthesized by honey, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 2007-2013.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Stella Rebić

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij

Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

### **OSOBNI PODACI**

Adresa: Vijenac Ivana Meštrovića 3, 31000 Osijek

Država: Hrvatska

Mobitel: 091/936 0436

E-mail: [stella.stella.rebi@gmail.com](mailto:stella.stella.rebi@gmail.com)

### **ISKUSTVO**

Rad na studentskim poslovima:

Vrijeme: **2018.**

Poslodavac: MASTERPLAN D.O.O.

Radno mjesto: Promotor

Poslodavac: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti  
Posao: Arheološka iskopanja

Poslodavac: CLEAR j.d.o.o.  
Radno mjesto: Spremačica

Poslodavac: TEKSTIL LIO D.O.O.  
Radno mjesto: Rad na blagajni

Vrijeme: **2019.-2021.**  
Poslodavac: Klinički bolnički centar Osijek  
Radno mjesto: Rad u kuhinji Odjela za dijetetiku i prehranu

Vrijeme: **2021.-2022.**  
Poslodavac: PERFETTO j.d.o.o.  
Radno mjesto: Rad u restoranu ROCHER caffe kao kuhar

Vrijeme: **2022.-2023.**  
Poslodavac: Dom za stare i nemoćne osobe Osijek  
Radno mjesto: Rad u kuhinji Odjela za dijetetiku i prehranu

## **OBRAZOVANJE**

**2020.-2023.**          Diplomski studij kemije-istraživački smjer

**2014.-2020.**          Preddiplomski studij kemije

**2009.-2013.**          Prirodoslovna gimnazija Ruđer Bošković

**2001.-2009.**          Osnovna škola Svete Ane

## **AKTIVNOSTI**

**2023.** Sudjelovanje na simpoziju KOPAČKI RIT JUČER, DANAS, SUTRA 2023. s posterskim priopćenjem

Rubil Monika; Rebić Stella; Amić Ana; „Brusnica kao kiselo-bazni indikator”, Osijek, 2023.

**2023.** Volonter u organizaciji Ranger-Čuvari prirode Hrvatska

**2023.** Sudjelovanje na radionicama Detektiv za minerale u OŠ Frana Krste Frankopana

**2018.** Sudjelovanje na međunarodnoj konferenciji GREEN s posterskim priopćenjem

Rebić Stella; Jukić Tea; Kajfeš Karlo; Puntarić Ada; Petrović Ana; Gvozdić Vlatka; Puntarić Dinko; Vidosavljević Domagoj, „Determination of twelve rare earth elements in the hair samples of inhabitants of Eastern Croatia (ICP-MS)”. 1st International Students' GREEN Conference, Osijek, 2018.