

UNIVERZITET U BEOGRADU

Tehnološko-metalurški fakultet

**Jelena K. Milenković**

**SINTEZA I KARAKTERIZACIJA  
ALTERNATIVNIH DEZINFICIJENASA  
NA BAZI ZEOLITA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
Faculty of Technology and Metallurgy

**Jelena K. Milenković**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION  
OF ALTERNATIVE DISINFECTANTS  
BASED ON ZEOLITES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor:

---

Dr Nevenka Rajić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

---

Dr Maja Vukašinović Sekulić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Tibor Sabo, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

---

Dr Jasna Hrenović, redovni profesor  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

---

*Doktorska disertacija urađena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za opštu i neorgansku hemiju kao deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Porozni materijali na bazi oksida u zaštiti životne sredine od genotoksičnih supstanci“ (br. 172-018) i na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Departmanu za biologiju.*

*Najiskreniju zahvalnost dugujem svom mentoru, profesorki Nevenki Rajić, na velikoj posvećenosti, stručnim savetima, podršci i poverenju koje mi je pružila tokom celokupnog istraživačkog rada i tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Takođe, zahvaljujem se profesorici Jasni Hrenović na nesebičnoj pomoći, odličnim idejama i stalnoj motivaciji tokom izrade i tokom pisanja disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i profesoru Đorđu Stojakoviću za kvalitetne savete i usmeravanje tokom izrade ove disertacije.*

*Članovima komisije, profesorki Maji Vukašinović Sekulić i profesoru Tiboru Sabu iskreno se zahvaljujem na svim korisnim savetima i sugestijama.*

*Mojim dragim prijateljima i kolegama dr Sanji Jevtić, dr Mariji Nikolić, dr Milošu Tomiću i master inženjeru zaštite životne sredine Jeleni Pavlović hvala za pozitivnu energiju i besplatne osmehe kojim su mi olakšali izradu ove disertacije.*

*Kolegama sa Katedre za opštu i neorgansku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu hvala na podršci.*

*Takođe, htela bih da se zahvalim kolegi dr Tomislavu Ivankoviću kao i Renati Horvat sa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijateljskoj i stručnoj pomoći.*

*Na kraju, najiskreniju zahvalnost na bezrezervnoj podršci, razumevanju, strpljenju i pomoć u svakom trenutku dugujem svojim roditeljima, Gordani i Kajici, bratu Nemanji i mom suprugu Nemanji.*

*Posebno hvala Despotu za svaki zagrljaj, osmeh i neopisivu snagu!*

## Sinteza i karakterizacija alternativnih dezinficijenasa na bazi zeolita

### REZIME

Cilj ove teze bio je da se ispita dobijanje novih dezinficijenasa na bazi dve vrste zeolita: prirodnog klinoptilolita i zeolita A koji predstavljaju prihvatljive sirovine sa ekološkog i ekonomskog stanovišta. Ovi zeoliti su obogaćeni katjonima Ni, Cu, Zn i Ag u različitim koncentracijama i antibakterijska aktivnost dobijenih proizvoda ispitana je u odnosu na Gram-negativne (*Escherichia coli* i *Acinetobacter baumannii*) i Gram-pozitivne vrste bakterije (*Staphylococcus aureus*).

U cilju određivanja optimalne koncentracije metala u zeolitu kojom zeolit postiže antibakterijsku aktivnost, ispitani su kinetika i mehanizam vezivanja Cu(II) za klinoptilolit kao i jona Ag za klinoptilolit i zeolit A. U ispitivanim slučajevima utvrđeno je da kinetika adsorpcije prati Lagergrenov model pseudo-drugog reda, dok se adsorpcione izoterme mogu prikazati različitim modelima u zavisnosti od vrste katjona metala i vrste zeolita. U svim slučajevima, mehanizam adsorpcije se zasnivao na jonskoj izmeni između jona natrijuma u rešetki zeolita i katjona metala u rastvoru.

Prirodni klinoptilolit i zeolit A obogaćeni jonima Ni, Cu, Zn i Ag ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i multirezistentnim sojevima *A. baumannii*, kao i Gram-pozitivnoj vrsti *S. aureus*. Baktericidnu aktivnost prema *E. coli* ispoljavaju obe vrste zeolita obogaćene katjonima Cu i Ag. Klinoptilolit obogaćen katjonima Ni(II) ne ispoljava antibakterijsku aktivnost kao ni klinoptilolit ni zeolit A kada su obogaćeni katjonima Zn. Takođe, baktericidni efekat ispoljavaju klinoptilolit obogaćen katjonima Ag i Cu(II) prema *A. baumannii*, dok prema *S. aureus* u ispitivanim sistemima nije postignut baktericidni efekat. Kada klinoptilolit sadrži okside Ni, Cu i Zn, klinoptilolit sa česticama bakar-oksida i cink-oksida pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i *S. aureus*, dok klinoptilolit sa česticama nikal-oksida pokazuje zanemarljivu aktivnost prema pomenutim vrstama bakterijama.

Mehanizam baktericidnog delovanja katjona metala ispitan je na primeru katjona srebra prema *A. baumannii* metodama proširene rendgenske apsorpcione spektroskopije za detalje strukture (EXAFS/XANES). Utvrđeno je da se katjoni srebra za bakterijsku biomasu vezuju preko -SH, -OH i -NH grupa pri čemu je dominantno vezivanje srebra

za -OH i -NH grupe. Ovo je ukazalo na činjenicu da je mehanizam baktericidnog dejstva srebra na *A. baumannii* zasnovan prvenstveno na vezivanju srebra za DNK molekul.

Klinoptilolit obogaćen katjonima srebra pokazuje antibakterijsku aktivnost i kada se imobilise u termoplastičnom polimeru poput poli(vinil-hlorida). Kompozit koji sadrži 1 mas.% zeolita smanjuje broj bakterija *A. baumannii* za 4,7 log CFU cm<sup>-2</sup>, dok impregniran D-tirozinom ispoljava baktericidni efekat prema imobilisanim *A. baumannii*.

Dobijeni rezultati ukazuju da se ispitivani zeoliti obogaćeni katjonima Cu, Zn i Ag mogu kao takvi koristiti za pripremu dezinficijensa, ali i za pripremu kompozita na bazi termoplastičnih polimera sa antibakterijskim dejstvom.

**Ključne reči:** zeoliti, antibakterijska aktivnost, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, nikal, bakar, cink, srebro, kinetika adsorpcije.

**Naučna oblast:** Hemijske nauke

## **Synthesis and characterization of alternative disinfectants based on zeolites**

### **ABSTRACT**

The aim of this thesis was to study preparation of novel disinfectants based on two types of zeolite: natural clinoptilolite and synthetic zeolite A which both present environmental as well as cost efficient materials. These zeolites were enriched with cations of Ni, Cu, Zn and Ag in different concentrations, and their antibacterial activity was investigated toward Gram-negative (*Escherichia coli* i *Acinetobacter baumannii*) and Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*).

In order to determine the optimal concentration of studied metals inside zeolite lattice considering antibacterial activity, adsorption kinetics as well as the mechanism of adsorption of Cu(II) into the clinoptilolite as well as of Ag(I) into the clinoptilolite and zeolite A was investigated in detail. It was concluded that the adsorption kinetics follows the Lagergren pseudo-second order kinetics model. The adsorption isotherms can be presented by different models depending on the type of cations and type of zeolites. For all investigated systems, the adsorption mechanism corresponded to an ionic exchange reaction between sodium cations from zeolite lattice and the studied metal cations present in the solution.

Natural clinoptilolite and zeolite A enriched with Ni, Cu, Zn and Ag ions exhibited the antibacterial activity toward *E. coli* and multiresistant *A. baumannii* as well as toward *S. aureus*. The zeolites enriched with except Cu and Ag exhibited bactericidal activity toward *E. coli*. Ni-containing clinoptilolite as well as Zn-containing zeolite A did not show the antibacterial effect toward *E. coli*. Bactericidal effect was achieved for Ag- and Cu-containing clinoptilolite toward *A. baumannii*, while no bactericidal activity toward *S. aureus* was achieved in the investigated systems. When the clinoptilolite was enriched with Ni, Cu and Zn oxide nanoparticles, the clinoptilolite with copper-oxide and zinc-oxide shows significant antibacterial activity toward *E. coli* and *S. aureus*, whereas the clinoptilolite with nickel oxide nanoparticle shows negligible antibacterial activity toward examined bacteria.

Mechanism of the bactericidal activity was examined for silver and *A. baumannii*. The bactericidal activity was studied by X-ray absorption spectroscopy for near edge structure and extended X-ray absorption for fine structure (XANES/EXAFS). It was found that the silver cations are bound *via* –SH, –OH and –NH group of *A. baumannii*, and that the bonding *via* –OH and –NH group are dominant. This indicated that the mechanism of bactericidal activity is based mainly on the silver bonding to DNA chains.

Ag-containing clinoptilolite immobilized into a thermoplastic polymer (polyvinyl-chloride) also exhibits the antibacterial activity toward *A. baumannii*. Composite with 1wt. % of Ag-containing clinoptilolite reduced the number of *A. baumannii* bacteria for 4,7 log CFU whereas impregnation of the composite with D-tyrosine led to the bactericidal activity.

The results obtained in this thesis indicated that the studied zeolites enriched with cations of Cu, Zn and Ag can be used not only for the preparation of disinfectants but also for the preparation of antibacterial composites based on thermoplastic polymers.

**Keywords:** zeolites, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, nickel, copper, zinc, silver, adsorption kinetic.

**Scientific field:** Chemistry sciences



**SADRŽAJ**

UVOD	1
TEORIJSKI DEO	4
1.1. Građa bakterijske ćelije	5
1.1.1. Građa ćelijskog zida	5
1.1.2. Sastav bakterijske ćelije ispod ćelijskog zida	8
1.1.3. Spoljašnja građa bakterijske ćelije	11
1.1.4. Razmnožavanje i rast bakterija	13
1.2. Patogene vrste bakterija	14
Patogene vrste bakterija u vodama	14
<i>Esherichia coli</i>	16
Klinički izolati patogenih bakterija	18
<i>Enterococcus faecium</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
<i>Enterobacter</i> spp.	21
1.3. Postupci dezinfekcije	22
1.4. Mehanizam antibakterijskog delovanja metala	23
1.4.1. Nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)	27
1.4.2. Disfunkcija proteina i gubitak enzimske aktivnosti	29
1.4.3. Oštećenje funkcije membrane	29
1.4.4. Ometanje unosa hranljivih materija	30
1.4.5. Genotoksičnost	31
1.5. Nove vrste dezinficijensa	32
1.5.1. Dezinficijensi na bazi srebra	32
1.5.2. Dezinficijensi na bazi oksida metala	33
Bakar-oksid	33
Titan(IV)-oksid	33
Magnezijum-oksid	33
Cink-oksid	34

Aluminijum-oksid	35
1.5.3. Dezinficijensi na bazi hitozana	35
1.5.4. Dezinficijensi na bazi ugljeničnih nanotuba	36
1.5.5. Dezinficijensi na bazi zeolita i glina	37
Prirodni zeoliti	38
Sintetički zeoliti	39
Gline	40
1.5.5.1. Antibakterijska svojstva zeolita i glina	41
1.6. Novi polimerni materijali sa antimikrobnim svojstvima	44
EKSPERIMENTALNI DEO	46
2.1. Korišćeni sojevi bakterija	47
2.2. Materijali i reagensi	47
2.3. Postupci	48
2.3.1. Modifikacija zeolitskog tufa	48
2.3.2. Ispitivanje kinetike vezivanja Cu(II) i Ag za klinoptilolit (SZ) i zeolit A	49
2.3.3. Dobijanje M-SZ, M-IZ i M-A (M - Ni, Cu, Zn i Ag)	49
2.3.4. Dobijanje SZ sa nanočesticama NiO, CuO i ZnO	49
2.3.5. Priprema kompozita poli(vinil-hlorid)/M-SZ	49
2.3.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	50
2.3.6.1. Antibakterijska aktivnost prema <i>E. coli</i> DSM 498 i <i>S.</i> <i>aureus</i> DSM 799	51
2.3.6.2. Antibakterijska aktivnost prema izolatima <i>E. coli</i>	52
2.3.6.3. Antibakterijska aktivnost prema kliničkim izolatima <i>A. baumannii</i> IC I i IC II	52
2.3.6.4. Antibakterijske aktivnosti kompozita PVC/M-SZ prema kliničkom izolatu <i>A. baumannii</i> ST 145	53
2.4. Metode i postupci	54
2.4.1. Određivanje koncentracije metala u rastvoru	54
2.4.2. Određivanje kapaciteta katjonske izmene zeolita (KKI)	54
2.4.3. Identifikacija bakterijskih izolata	54
2.4.4. Određivanje antibiotske rezistencije bakterijskih sojeva	55

2.4.5. Analiza oslobođenog ćelijskog materijala	55
2.4.6. Statistička obrada rezultata	55
2.5. Karakterizacija uzoraka zeolita	55
2.5.1. Rendgenska difrakcija praha (XRD)	55
2.5.2. Termogravimetrijska analiza (TG/DSC)	56
2.5.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija spregnuta sa X-zračnom energetsko-disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDS)	56
2.5.4. Analiza uzoraka biomase metodom proširene rendgenske spektroskopije za detalje strukture (EXAFS i XANES)	56
2.5.5. Karakterizacija uzoraka kompozita	57
REZULTATI I DISKUSIJA	58
3.1. Karakterizacija uzoraka zeolita	59
3.1.1. Minerološka analiza zeolitskih tufova	59
3.1.2. Termogravimetrijska analiza	60
3.1.3. SEM i EDS-analiza	62
3.1.4. Ispitivanje kinetike i termodinamike adsorpcije katjona metala za klinoptilolit	64
3.1.4.1. Ispitivanje kinetike adsorpcije Cu(II) na SZ	65
3.1.4.2. Ispitivanje termodinamike adsorpcije Cu(II)	71
3.1.4.3. Ispitivanje kinetike adsorpcije Ag-jona za IZ i zeolit A	73
3.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	76
3.2.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti M-SZ (M= Ni, Cu, Zn) prema <i>Escherichia coli</i> DSM 498 i <i>Staphylococcus aureus</i> DSM 799	76
3.2.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti MO-SZ prema <i>E.coli</i> DSM 498 i <i>S. aureus</i> DSM 799	82
3.2.3. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti prema izolatima <i>E. coli</i>	85
3.2.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti prema kliničkom izolatu <i>A. baumannii</i> IC I i IC II	92
3.3. Mehanizam antibakterijskog delovanja	96
3.4. Sinteza novih materijala sa antibakterijskim dejstvom	101

ZAKLJUČAK	109
LITERATURA	113
PRILOG	134
Prilog 1: Kinetika jonske izmene	135
Lagergrenov model pseudo-prvog reda	135
Lagergrenov model pseudo-drugog reda	136
Model međučestične difuzije	136
Prilog 2: Određivanje termodinamičkih parametara	137
Frojndliхова adsorpciona izoterma	137
Lengmirova adsorpciona izoterma	137
Sipsova izoterma (Lengmir-Frojndliхова izoterma)	138
Prilog 3: Bojenje bakterija po Gram-u	139
Prilog 4: Priprema uzoraka za SEM-analizu	141
Prilog 5: Priprema biomase za EXAFS-analizu	142
Biografija autora	143

**SPISAK SLIKA**

<b>Slika 1.1.</b> Građa prokariotske ćelije (web 9).	5
<b>Slika 1.2.</b> Gradivni segment kod peptidoglikana (mureina) (Acharya, 2013).	6
<b>Slika 1.3.</b> Deo peptidoglikana kod <i>S. aureus</i> (Tonkić <i>et al.</i> , 2015).	6
<b>Slika 1.4.</b> Građa ćelijskog zida Gram-pozitivnih (a) i Gram-negativnih (b) bakterija (Brown <i>et al.</i> , 2015).	7
<b>Slika 1.5.</b> Građa citoplazmatične membrane bakterijske ćelije (Tonkić <i>et al.</i> , 2015).	9
<b>Slika 1.6.</b> Skica sistema izlučivanja hidrolitičkih egzoenzima i patogenih proteina kod Gram-negativnih bakterija (Tonkić <i>et al.</i> , 2015).	10
<b>Slika 1.7.</b> Faze formiranja biofilma 1. Reverzibilno vezivanje bakterijskih kolonija za površinu; 2. Ireverzibilno vezivanje i produkcija ekstracelularne polimerne supstance; 3. Razmnožavanje bakterija; 4. Sazrevanje biofilma; 5. Odvajanje delova biofilma (Stoodley <i>et al.</i> , 2002).	12
<b>Slika 1.8.</b> Kriva rasta bakterija (web 8).	13
<b>Slika 1.9.</b> Potencijalni mehanizmi delovanja jona srebra na bakterijsku ćeliju (Rai <i>et al.</i> , 2012).	23
<b>Slika 1.11.</b> Hemijska struktura hitozana (web 10).	35
<b>Slika 1.10.</b> Mehanizam antibakterijske aktivnosti metala: 1. disfunkcija proteina; 2. ometanje unosa hranljivih materija; 3. produkcija ROS i trošenje antioksidanasa; 4. oštećenje funkcije citoplazmatične membrane; 5. genotoksičnost (Lemire <i>et al.</i> , 2013).	27
<b>Slika 1.12.</b> Povezivanje primarnih gradivnih jedinica preko zajedničkih atoma kiseonika u zeolitnoj rešetci. Crvenom bojom prikazani su O-atomi, ljubičastom-Si dok su Al-atomi prikazani plavom bojom.	37
<b>Slika 1.13.</b> a) Šematski prikaz rešetke klinoptilolita koja se sastoji iz osmočlanih i desetočlanih kanala. Kanali su paralelni sa <i>c</i> -osom i normalni sa osmočlanim prstenom koji je dijagonalan sa <i>a</i> -osom. Poliedri predstavljaju atome silicijuma ili aluminijuma dok su atomi kiseonika prikazani malim sferama; b) Kanali i šupljine u rešetki klinoptilolita u kojima se nalaze molekuli vode (veće, tamnije kuglice) i hidratirani katjoni (manje, svetlije kuglice) (Ockwig <i>et al.</i> , 2008).	39
<b>Slika 1.14.</b> Struktura zeolita A (web 4).	39

<b>Slika 1.15.</b> Tetraedarske i oktaedarske gradivne jedinice glina (web 11).	40
<b>Slika 1.16.</b> Čelije bakterije <i>E. coli</i> pod konfokalnim mikroskopom na uzorcima sa Cu-X (mas. %) (a) 0,5% (b) 2,5; (c) 5%. Žive ćelije bakterije su prikazane zelenom a mrtve crvenom bojom. Otpuštanje bakra na uzorcima sa Cu-X (mas. %) (d) - 0,5; (e) - 2,5; (f)- 5 % (Ninan <i>et al.</i> , 2014).	45
<b>Slika 2.1.</b> Šematski prikaz ekperimenta. Koncentracija zeolita u epruvetama iznosila je: 1- 1000 mg dm <sup>-3</sup> ; 2- 500 mg dm <sup>-3</sup> ; 3-250 mg dm <sup>-3</sup> ; 4-125 mg dm <sup>-3</sup> ; 5- 62,5 mg dm <sup>-3</sup> ; 6-31,2 mg dm <sup>-3</sup> ; 7-15,6 mg dm <sup>-3</sup> .	53
<b>Slika 3.1.</b> Difraktogram praha zeolitnog tufa SZ (značenje simbola: * - klinoptilolit; +-feldspat; ^ - kvarc).	59
<b>Slika 3.2.</b> Difraktogram praha zeolitnog tufa IZ (značenje simbola: *- klinoptilolit; ^-kvarc; +-kalcit; I-anortit).	60
<b>Slika 3.3.</b> TG-DTG-krive uzorka SZ (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).	61
<b>Slika 3.4.</b> TG-DTG-krive uzorka IZ (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).	61
<b>Slika 3.5.</b> TG-DTG-krive zeolita A (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).	62
<b>Slika 3.6.</b> SEM fotografije a) uzorak SZ i b) IZ. Tamnije sive površine predstavljaju klinoptilolit, dok svetlije sive površine predstavljaju kvarc.	63
<b>Slika 3.7.</b> Koncentracija Cu(II) na uzorku SZ u zavisnosti od početne koncentracije rastvora i temperature tokom vremena ( $q_t$ - koncentracija Cu(II) u vremenu $t$ , u mg Cu g <sup>-1</sup> ; —●— 100, —■— 200, —▲— 300 i —◆— 400 mg Cu(II) dm <sup>-3</sup> ).	66
<b>Slika 3.8.</b> Primena Lagergrenovog modela pseudo-drugog reda na eksperimentalne podatke za različite početne koncentracije rastvora Cu(II) na temperaturama od 25 do 55 °C.	69
<b>Slika 3.9.</b> Frojndlihove adsorpcione izoterme na različitim temperaturama za sve ispitivane koncentracije: a) 25 °C; b) 35 °C; c) 45 °C; d) 55 °C.	72
<b>Slika 3.10.</b> Kinetika vezivanja Ag <sup>+</sup> za IZ i A (značenje simbola: —●— zeolit A, 300 mg Ag(I) dm <sup>-3</sup> , —■— zeolit A, 600 mg Ag(I) dm <sup>-3</sup> , —▲— IZ, 300 mg Ag(I) dm <sup>-3</sup> i —◆— IZ, 600 mg Ag(I) dm <sup>-3</sup> ).	74

- Slika 3.11.** Primena Lagergrenovog modela pseudo-drugog reda na eksperimentalne podatke za početne koncentracije rastvora Ag(I) 300 i 75 600 mg dm<sup>-3</sup> na temperaturi od 25 °C. 75
- Slika 3.12.** SEM fotografija površine SZ iz kontrolnih sistema: a) *E. coli* i b) *S. aureus*. 81
- Slika 3.13.** Antibakterijska aktivnost uzoraka zeolita u peptonskoj vodi prema *E. coli*: a) DSM 498; b) Izolat I; c) Izolat II. \*(Značenje simbola: ◆ Pozitivna kontrola; ■ Negativna kontrola; ▲ Cu-IZ; ✕ Cu-A; ✖ Zn-IZ; ● Zn-A; 87  
— Ag-IZ; — Ag-A (linije koje pokazuju antibakterijsku aktivnost Ag-IZ i Ag-A paralelne su sa negativnom kontrolom)).
- Slika 3.14.** Antibakterijska aktivnost različitih koncentracija Cu-SZ nakon 1 (plava linija) i 24 h (crvena linija) prema kliničkom izolatu *Acinetobacter baumannii* a) IC I; b) IC klon II. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. 93  
Početni broj ćelija iznosio je  $t_0$  IC I ( $10^6$  CFU cm<sup>-3</sup>)=8,80±0,17;  $t_0$  IC II ( $10^7$  CFU cm<sup>-3</sup>)=1,40±0,17.
- Slika 3.15.** Antibakterijska aktivnost različitih koncentracija Ag-SZ 1 (plava linija) i 24 h (crvena linija) prema kliničkom izolatu *Acinetobacter baumannii* a) 94  
IC I; b) IC klon II. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Početni broj ćelija iznosio je  $t_0$  IC I ( $10^6$  CFU cm<sup>-3</sup>)=8,80±0,17;  $t_0$  IC II ( $10^7$  CFU cm<sup>-3</sup>)=1,40±0,17.
- Slika 3.16.** Tanak sloj ekstracelularne tečnosti (plava boja) bakterijskih izolata 96  
*A. baumannii* a) IC I; b) IC klon II. Ćelije *A. baumannii* obojene su crveno.
- Slika 3.17.** a) SEM fotografija bakterijske biomase i b) koncentracija Ag i C na 97  
površini biomase.
- Slika 3.18.** Prostorni raspored atoma u standardima a) Ag-imidazola; b) Ag- 98  
cisteina; c) Ag-alanina; d) Ag-citrata.
- Slika 3.19.** XANES-spektri biomase *A. baumannii* tretirane srebrom kao i 99  
spektri standarda.
- Slika 3.20.** XANES spektar *A. baumannii* tretiranog srebrom (puna linija) i 100  
najbolje slaganje sa referentnim standardima. Udeo standarda dat je u procentima.

- Slika 3.21.** Antibakterijska aktivnost sintetisanih kompozita prema vrsti bakteriji *A. baumannii* bez (a) i sa impregnacijom D-Tyr (b). Koncentracija zeolita u kompozitu prikazana je brojem u oznakama kompozita. 102  
 $t_0 (\log \text{CFU cm}^{-3}) = 7,79 \pm 0,2$ . Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.
- Slika 3.22.** Kinetika izluživanja srebra iz kompozita PVC-Ag-SZ. Simboli – eksperimentalni podaci, linija - Krosmajers-Pepasov model. 104
- Slika 3.23.** SEM fotografije nakon 24 h kontakta ćelija i kompozita sa 15 mas.% Ag-SZ bez (a) i sa impregnacijom D-Tyr (b). 105
- Slika 3.24.** Zavisnost modula sačuvane ( $G'$ ) i izgubljene energije ( $G''$ ) od frekvencije na 0,1-100  $\text{rad s}^{-1}$  za uzorke PVC, SZ15 i Ag-SZ15 u stanju rastopa na 200 °C. 106
- Slika 3.25.** Zavisnost viskoziteta kompleksa ( $\eta^*$ ) u opsegu od frekvencije na 0,1-100  $\text{rad s}^{-1}$  za uzorke PVC, SZ15 i Ag-SZ15 u stanju rastopa na 200 °C. 107



**SPISAK TABELA**

<b>Tabela 1.1.</b> Pravilnik o mikrobiloškoj ispravnosti vode za piće objavljen u Službenom glasniku pod brojem br. 42/98 i 44/99 (web 6).	15
<b>Tabela 1.2.</b> Udeo veza dobijen matematičkim modelom linearnog fitovanja (LCF metoda) za Ag-tretirane biomase bakterija u poređenju sa referentnim standardima. Udeo aminokiselina dat je u procentima, greška LCF metode iznosila je $\pm 10\%$ (Bovenkamp, 2013a).	25
<b>Tabela 2.1.</b> Sastav hranljivih medijuma.	51
<b>Tabela 3.1.</b> Elementni sastav uzoraka SZ i IZ.	63
<b>Tabela 3.2.</b> Katjonski kapacitet izmene (KKI) zeolitskih tufova SZ i IZ.	64
<b>Tabela 3.3.</b> Vrednosti konstanti $k$ za Lagergrenov model pseudo-drugog reda, korelacioni faktor $R^2$ i ravnotežna koncentracija Cu(II), $q_e$ za različite temperature i početne koncentracije rastvora.	70
<b>Tabela 3.4.</b> Parametri Frojndlihove adsorpcione izoterme.	73
<b>Tabela 3.5.</b> Vrednosti konstanti $k$ za Lagergrenov model pseudo-drugog reda, korelacioni faktor $R^2$ i ravnotežna koncentracija Ag(I), $q_e$ za 25 °C i početne koncentracije 300 i 600 mg Ag dm <sup>-3</sup> .	75
<b>Tabela 3.6.</b> Broj ćelija <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja bakterija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.	78
<b>Tabela 3.7.</b> Broj ćelija <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja ćelija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.	79
<b>Tabela 3.8.</b> Broj ćelija <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja ćelija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.	80
<b>Tabela 3.9.</b> Koncentracije i procenti izluženih katjona metala u efluentu.	82
<b>Tabela 3.10.</b> Smanjenje broja ćelija <i>E. coli</i> ili <i>S. aureus</i> u realnom efluentu i kontrolnim uzorcima, nakon 1 i 24 h.	83

<b>Tabela 3.11.</b> Broj ćelija <i>E. coli</i> u nesterilnom realnom efluentu i kontrolnim uzorcima, tokom 24 h.	84
<b>Tabela 3.12.</b> Koncentracije i procenti izluženih metala sa MO-SZ nakon eksperimenta.	84
<b>Tabela 3.13.</b> Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u mg dm <sup>-3</sup> ispitivanih antibiotika prema izolatima <i>E. coli</i> .	86
<b>Tabela 3.14.</b> Smanjenje broja ćelija <i>E. coli</i> DSM 498 u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.	88
<b>Tabela 3.15.</b> Smanjenje broja bakterija <i>E. coli</i> Izolat I u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.	89
<b>Tabela 3.16.</b> Smanjenje broja bakterija <i>E. coli</i> Izolat II u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.	90
<b>Tabela 3.17.</b> Izlužene količine Cu i Zn sa metal-modifikovanih zeolita.	92
<b>Tabela 3.18.</b> Koncentracije izluženih katjona u suspenzijama za koje su utvrđene vrednosti MBK i MIK. Pored koncentracije katjona, prikazan je i procenat izluživanja.	95
<b>Tabela 3.19.</b> Parametri mehaničko-dinamičke analize za PVC i kompozite.	108

## **UVOD**

Jedan od problema današnjice predstavlja veliki broj različitih vrsta patogenih mikroorganizama koji izazivaju bolesti i infekcije kod ljudi i životinja. Pored savremenih tehnologija i pronalaska lekova i terapija, ozbiljan problem predstavlja širenje otpornosti bakterija na brojne antibakterijske agense. Pojava otpornosti bakterija prema antibioticima je sve više raširena, i to ne samo na jedan antibiotik već na više grupa antibiotika istovremeno, što je posledica nekontrolisane i nepravilne upotrebe lekova. Otpornost bakterija na antibiotike dovodi do neuspešnog lečenja kao i do povećanja njihovih troškova i stope smrtnosti, ali i drugih ozbiljnih problema koji uključuju i globalno širenje infekcije, prenošenje otpornosti među bakterijskim sojevima, i sl.

Sa pojavom otpornosti bakterija na različite grupe antibiotika, bakterijska zagađenja sve su prisutnija u različitim sredinama, kako u vodama i hrani, tako i u bolničkim uslovima. Bolničke infekcije izazvane su različitim vrstama mikroorganizama, pri čemu je Društvo za infektivne bolesti Amerike (engl. Infectious Diseases Society of America-IDSa) posebnu pažnju usmerilo na grupu patogenih vrsta bakterija koja je nazvana „ESKAPE“ (engl. escape-pobeći) (Rice, 2008; Bush i Jacoby, 2010). Vrste bakterija koje spadaju u ovu grupu su: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Bakterija *A. baumannii* je poslednje tri decenije prihvaćena kao oportuni patogen koji vrlo lako postaje patogen kada oslabi organizam domaćina. Infekcije i epidemije izazvane multirezistentnim vrstama bakterija iz roda *Acinetobacter* se sve više registruju u različitim klinikama i bolnicama širom sveta. Tako se često pojavljuju infekcije krvi i zapaljenja pluća koje su povezane sa primenom mehaničke ventilacije i predstavljaju kliničke manifestacije bolničkih infekcija izazvanih ovim vrstama bakterija. Ove infekcije se najčešće registruju u jedinicama intenzivne nege kao i hematološkim i hirurškim jedinicama. Lečenje ovih infekcija je komplikovano i zahtevno, a imajući u vidu da se infekcije obično javljaju kod starijih osoba i osoba sa oslabljenim imunitetom, često za posledicu imaju smrtni ishod. U Srbiji do danas nisu registrovane niti sprovedene studije vezane za infekcije izazvane ovom vrstom bakterije. Pored *A. baumannii* i Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* koja je otporna na antibiotik meticilin iz grupe  $\beta$ -laktamskih antibiotika (engl. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - *S. aureus* MRSA)

decenijama se razmatra kao prototip vrste bakterije koja uzrokuje bolničke infekcije. Pored kliničkih infekcija, mikrobiološko zagađenje voda predstavlja veliki rizik po zdravlje ljudi. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (*engl.* World health organization-WHO) u zemljama u razvoju, oko 80% svih bolesti povezano je sa mikrobiološkim zagađenjem vode, dok je čak 85% bolesti kod dece u Africi izazvano mikroorganizmima iz voda (Cabral, 2010). Najčešćim uzročnikom infekcija smatra se Gram-negativna vrsta bakterije, indikator fekalnog zagađenja *Escherichia coli*.

S obzirom na činjenicu da bakterijske vrste razvijaju sve veću otpornost prema dostupnim antibakterijskim agensima, razvoj novih, nekonvencionalnih antibakterijskih agenasa je sve više predmet interesovanja. U novije vreme se, kao potencijalni antimikrobni agensi istražuju nanoporozni (materijali sa porama prečnika od 0,2 do 100 nm) i nano-materijali. Zbog jedinstvenih fizičko-hemijskih svojstava, sve veći broj materijala se proizvodi u obliku nanočestica, dimenzija do 100 nm. Nanočestice metala su dobri antibakterijski agensi ali je njihova široka primena još uvek predmet rasprava. Tako, nanočestice bakra, cinka, titanijuma, magnezijuma i srebra pokazuju aktivnost prema velikom broju mikroorganizama. Međutim, pored dobrih antibakterijskih osobina neophodno je da se razviju materijali koji ne bi izluživali nanočestice u spoljašnju sredinu, kako ne bi došlo do zagađenja metalima. Kao pogodni, ekonomski i ekološki isplativi materijali koji bi služili kao nosači, poslednjih godina se intenzivno proučavaju prirodni i sintetički zeoliti, nanoporozni alumosilikatni minerali.

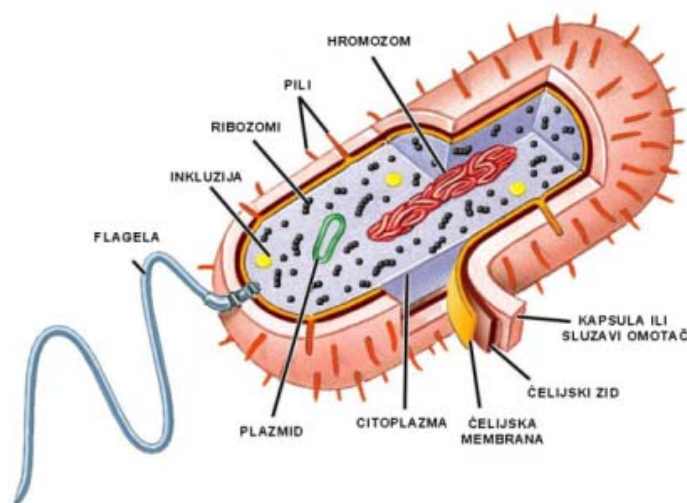
Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. sinteza, karakterizacija i modifikacija prirodnih i sintetičkih zeolita koji bi imali primenu kao alternativni dezinficijensi;
2. određivanje antibakterijske aktivnosti prirodnih i sintetičkih zeolita prema patogenim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija u različitim vodenim medijumima;
3. ispitivanje mogućnosti ugradnje metal-modifikovanih zeolita kao punioca u polimerima koji se upotrebljavaju za pravljenje potrošnog medicinskog materijala;
4. ispitivanje antibakterijske aktivnosti polimernih kompozita;
5. utvrđivanje mehanizma antibakterijskog delovanja modifikovanih prirodnih i sintetičkih zeolita.

**TEORIJSKI DEO**

## 1.1. Građa bakterijske ćelije

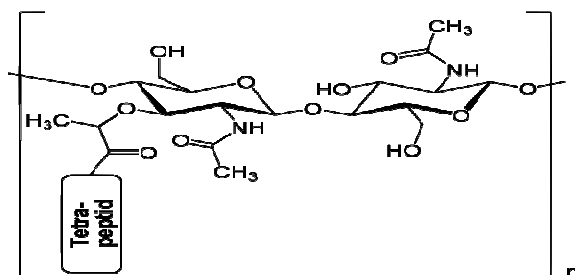
Ćelija bakterije ima prokariotsku građu koju čine funkcionalno i morfološki različiti delovi (slika 1.1.). Uglavnom sve bakterijske ćelije poseduju ćelijski zid, zatim ćelijsku tj. citoplazmatičnu membranu koja obavija citoplazmu. Te strukture štite bakteriju od nepovoljnih uticaja kao što su ekstremna osmolarnost, štetne hemikalije ili antibiotici. Genetički materijal bakterijskih ćelija smešten je u nukleoidu, dok se sinteza proteina obavlja na ribozomima. Pored ovih delova, prokariotske ćelije mogu da sadrže još i inkluzije, endospore, pile, flagele, kapsulu, fimbrije (Tortora *et al.*, 2010).



Slika 1.1. Građa prokariotske ćelije (web 9).

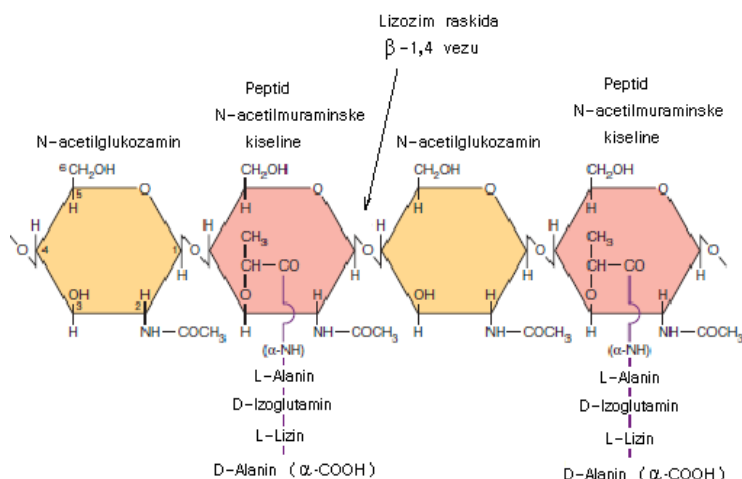
### 1.1.1. Građa ćelijskog zida

Ćelijski zid bakterija je kompleksne, prilagodljive strukture koja je odgovorna za oblik ćelija. Ovaj zid se nalazi oko cele ćelije i štiti ćeliju od uticaja spoljašnje sredine. Bakterijski ćelijski zid je izgrađen od peptidoglikana (mureina) (slika 1.2.) koji se u strukturi nalazi sam ili sa još nekim supstancama kao što su alkoholi, lipidi i polisaharidi.



Slika 1.2. Gradivni segment kod peptidoglikana (mureina) (Acharya, 2013).

Peptidoglikan je složeni polimer koji se sastoji od molekula disaharida koji je izgrađen od dve monosaharidne jedinice: N-acetilglukozamina (NAG) i N-acetilmuraminske kiseline (NAM) (slika 1.3.). Na slici 1.3. je prikazan jedan deo peptidoglikana *S. aureus*. Kao što se sa slike uočava, osnovu polimera čine naizmenično povezane podjedinice NAG i NAM koje su povezane  $\beta 1 \rightarrow 4$  glikozidnim vezama. Delovi muraminske kiseline vezani su za kratke peptide čiji je sastav različit i zavisi od bakterijske vrste. Tako, kod nekih vrsta L-lizin može biti zamenjen sa diaminopimelinskom kiselinom koja je u prirodi prisutna jedino u ćeliji prokariota (Tonkić *et al.*, 2015).



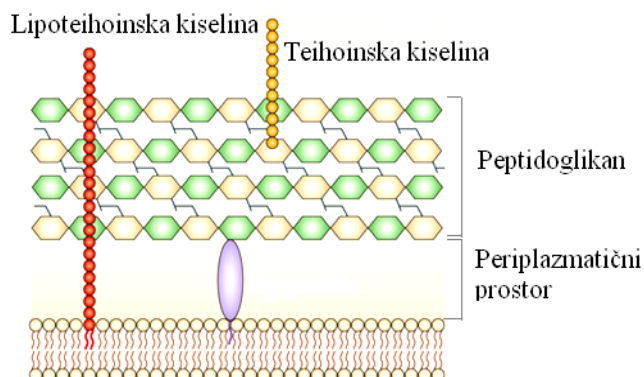
Slika 1.3. Deo peptidoglikana kod *S. aureus* (Tonkić *et al.*, 2015).

Lanci peptidoglikana povezani su međusobno peptidnim mostovima. Kod Gram-pozitivnih bakterija postoji oko 40 slojeva peptidoglikana koji čine oko 50% suve materije ćelije. Kod Gram-negativnih ćelija sloj peptidoglikana je tanji i sastoji se od svega jednog ili dva sloja što čini od 5 do 10 % materijala ćelije. Struktura ćelije daje

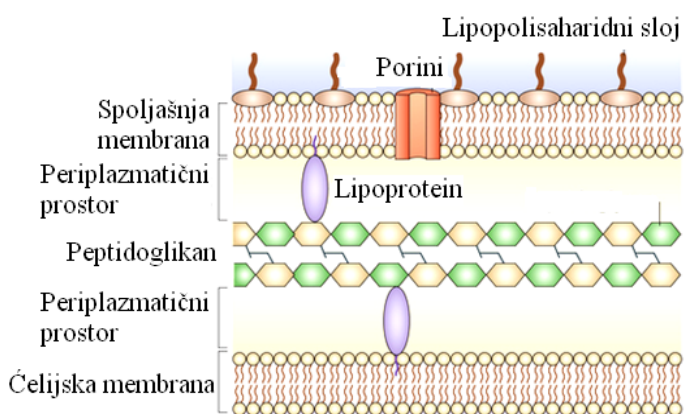


bakterijama oblik koji je karakterističan za pojedinačnu vrstu (Tonkić *et al.*, 2015). Na slici 1.4. je prikazana građa ćelijskog zida Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

a)



b)



**Slika 1.4.** Građa ćelijskog zida Gram-pozitivnih (a) i Gram-negativnih (b) bakterija (Brown *et al.*, 2015).

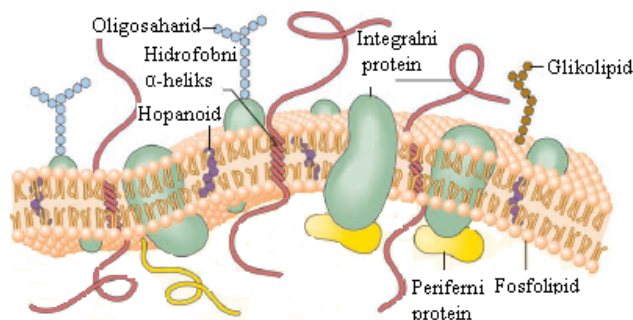
Ćelijski zid Gram-pozitivnih bakterija, pored peptidoglikana čija je debljina oko 30 nm (Shockman i Barrett, 1983), sadrži fosfate i teihoinsku kiselinu, koja je izgrađena od alkohola (glicerola ili ribitola). Teihoinska kiselina je vezana direktno za peptidoglikanski sloj. Zbog negativnog naelektrisanja ćelijskog zida koje potiče od fosfatnih grupa, za teihoinsku kiselinu se mogu vezivati katjoni. Teihoinska kiselina ima ulogu u rastu ćelija, sprečavanju oštećenja zida i zaštiti ćelija od nepovoljnih uticaja spoljašnje sredine (lize ćelija) (Tortora *et al.*, 2010).

Ćelijski zid Gram-negativnih bakterija se sastoji od tankog sloja peptidoglikana u periplazmatičnom prostoru i spoljašnje membrane. Peptidoglikanski sloj je povezan sa lipoproteinskim slojem iz spoljašnje membrane, dok je sam peptidoglikan smešten u periplazmatičnom prostoru. S obzirom da ćelijski zid Gram-negativnih bakterija sadrži samo tanak sloj peptidoglikana, debljine svega 2 do 3 nm, ove bakterije su podložnije mehaničkom lomu (Murray *et al.*, 1965). Spoljašnja membrana Gram-negativnih bakterija sadrži lipopolisaharide, lipoproteine i fosfolipide. Ova membrana ima zaštitnu ulogu jer može da štiti bakterije od određenih antibiotika, deterdženata, teških metala i nekih soli (Rai *et al.*, 2012). Zahvaljujući porinima koji se nalaze u njenoj strukturi, spoljašnja membrana je polupropustljiva i u bakterijsku ćeliju propušta hranljive materije iz spoljašnje sredine. Lipopolisaharidni sloj spoljašnje membrane sastoji se od jedne lipidne (Lipid A) i dve polisaharidne komponente (gradivnog i „O“ polisaharida). Lipid A je vezan za gornji deo spoljne membrane. Ovaj lipidni sloj je odgovoran za infekcije Gram- negativnim bakterijama. Kada Gram-negativna bakterija ugine, lipid se otpušta sa površine i ponaša se kao endotoksin. Gradivni polisaharid je vezan za lipid A i njegova uloga je u stabilnosti ćelijskog zida. „O“ polisaharidna komponenta lipopolisaharidnog sloja se nalazi ispod gradivne polisaharidne komponente i na osnovu ovog sloja se Gram-negativne bakterije mogu podeliti na serotipove (Tortora *et al.*, 2010).

### **1.1.2. Sastav bakterijske ćelije ispod ćelijskog zida**

Unutar ćelijskog zida bakterija smeštene su citoplazmatična membrana, citoplazma, nukleoid, ribozomi i inkluzije. Citoplazmatična membrana predstavlja tanak sloj koji se nalazi odmah ispod periplazmatičnog prostora i ćelijskog zida (slika 1.5.). Ova membrana se kod prokariota sastoji od dva sloja fosfolipida i od više od 200 različitih proteina (Tonkić *et al.*, 2015). Proteini čine čak 70 % suve materije što je znatno više nego kod citoplazmatične membrane sisara. Fosfolipidni dvosloj sastoji se od polarnih, hidrofilnih glava i nepolarnih, hidrofobnih repova koji se spajaju čineći dvoslojnu strukturu u kojoj su repovi okrenuti jedan prema drugom dok su glave usmerene prema ekstracelularnom, odnosno, intracelularnom prostoru. U fosfolipidnom sloju se nalaze proteini čija je uloga u premošćavanju fosfolipidnog sloja za koji je

vezan (integralni proteini) i periferni proteini koji su samo prikačeni za spoljašnji ili unutrašnji sloj fosfolipida (slika 1.5.).

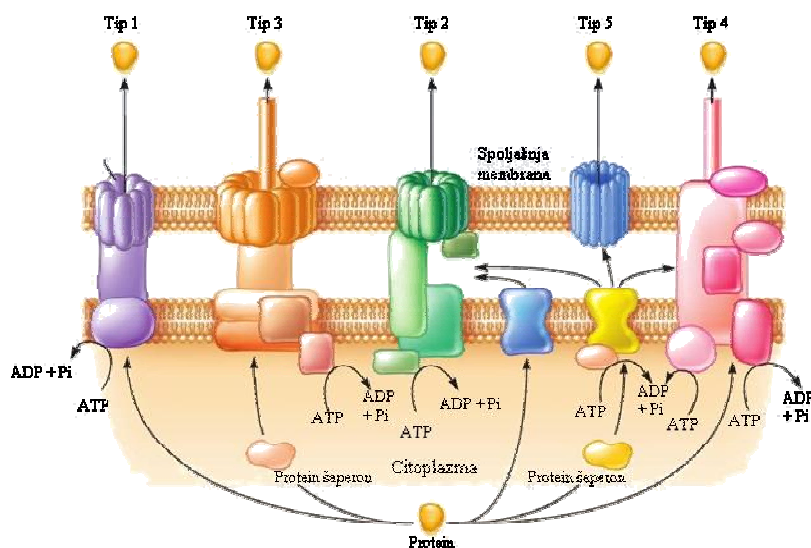


**Slika 1.5.** Građa citoplazmatične membrane bakterijske ćelije (Tonkić *et al.*, 2015).

Uloga citoplazmatične membrane je višestruka: 1) selektivna propustljivost i prenos materija; 2) prenos elektrona i oksidativna fosforilacija kod aerobnih vrsta; 3) izluživanje hidrolitičkih enzima; 4) uloga nosača enzima i prenosa molekula koji imaju ulogu u biosintezi DNK, ćelije i membranskih lipida kao i 5) nosač receptora i drugih proteina hemotaksije. U citoplazmatičnoj membrani su smeštene pumpe koje učestvuju u transportu materija kroz membranu (*engl.* efflux pumps). Citoplazmatična membrana predstavlja nepropusnu hidrofobnu barijeru za većinu hidrofilnih molekula, međutim, mehanizmi prenosa omogućavaju unos hranljivih materija i izbacivanje otpadnih produkata iz ćelije. Tri opšta mehanizma prenosa su: - pasivni koji se odvija po principu difuzije;

- aktivni pri čemu dolazi do koncentrisanja nutrijenata čak više od hiljadu puta;
- grupna translokacija, bitna za metabolizam šećera kod nekih bakterija.

Svi organizmi koji koriste makromolekularne organske polimere kao izvor hranljivih materija izlučuju hidrolitičke enzime koji imaju ulogu u razgradnji polimera na manje molekule koji mogu da prolaze kroz citoplazmatičnu membranu. Gram-pozitivne bakterije izlučuju enzime u spoljašnju sredinu dok Gram-negativne bakterije ove enzime izlučuju u periplazmatični prostor između peptidoglikana i spoljašnje membrane ćelije (Tonkić *et al.*, 2015).



**Slika 1.6.** Skica sistema izlučivanja hidrolitičkih egzoenzima i patogenih proteina kod Gram-negativnih bakterija (Tonkić *et al.*, 2015).

Kod bakterijskih ćelija pronađeno je šest tipova sistema za izlučivanje proteina (slika 1.6.). Tipovi 1 i 4 nalaze se i kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih bakterija, dok su ostali (tipovi 2, 3, 5 i 6) prisutni samo kod Gram-negativnih bakterija. Sistemi izlučivanja kod Gram-pozitivnih bakterija funkcionišu tako da proteini prolaze i kroz unutrašnju i kroz spoljašnju membranu u jednom koraku, dok se kod sistema 2 i 4 ovaj prolaz obavlja odvojeno. Proteini koji se luče sistemima 2 i 5 se sintetišu zajedno sa ribozomima citoplazme.

Ispod citoplazmatične membrane nalazi se citoplazma koju čine voda (oko 80 % zapremine) i enzimi, ugljeni hidrati, masti i neorganske soli. U citoplazmi je smešten i nukleoid u kome se nalazi DNK, kao i ribozomi i „rezervoari“ hranljivih materija (inkluzije). U nukleoidu bakterijskih ćelija smešten je genetički materijal koji se nalazi u obliku jedne kružne molekule dvočlane DNK (bakterijski hromozom). Pored hromozoma, u bakterijskoj ćeliji se kao nosioci nasleđenih informacija nalaze i plazmidi. Plazmidi predstavljaju ekstrahromozomalne delove DNK koji se dele nezavisno od hromozomske DNK (Tortora *et al.*, 2010). Određene Gram-pozitivne bakterije mogu da obrazuju endospore, koje im omogućavaju preživljavanje u nepovoljnim životnim uslovima (visoke temperature, nedostatak vode i izloženost

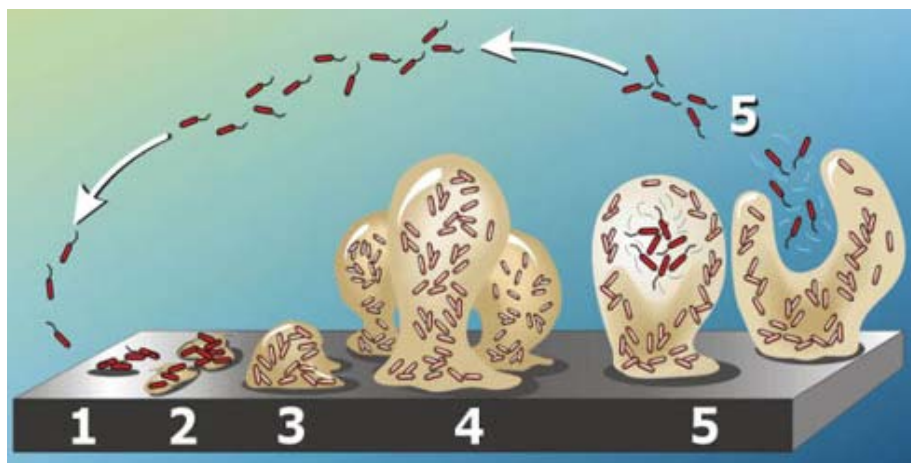
toksičnim jonima i zračenju). Endospore predstavljaju dehidratirane ćelije sa vrlo debelim višeslojnim zidovima. Spore u centralnom delu sadrže DNK, RNK i termostabilne enzime, a njihova enzimsko i metabolička aktivnost svedena je na minimum ili potpuno odsutna.

### 1.1.3. Spoljašnja građa bakterijske ćelije

Na površini bakterijske ćelije mogu se naći bičevi ili flagele za pokretanje, pili ili fimbrije za vezivanje na čvrste površine kao i neki ekstracelularni polimeri kao što su kapsula i sluzavi sloj. Flagele se nalaze na krajevima bakterija ili na celoj ćeliji i služe bakterijama pri kretanju u vodi. Fimbrije su kraće od flagela i raspoređene su na celoj ćeliji. Uključene su u obrazovanje zaštitnog sloja koji je sačinjen od polimerne matrice (biofilma) i imaju ulogu u pričvršćivanju ćelija za spoljne površine (Tortora *et al.*, 2010).

Glikokaliks predstavlja omotač bakterijske ćelije koji čine polisaharidi ili/i polipeptidi i može biti u obliku kapsule (organizovano raspoređeni slojevi glikokaliksa, tačno definisani sloj, pričvršćeni za ćelijski zid) ili tankog, sluzavog filma (neorganizovano raspoređeni slojevi glikokaliksa, slabim silama vezani za ćelijski zid). Kapsula može štiti ćelije bakterija od proždiranja makrofaga naročito kod patogenih vrsta bakterija, jer ima zaštitnu ulogu od uticaja spoljne sredine.

Neke bakterije mogu da produkuju biofilm koji predstavlja skup bakterijskih ćelija povezan u polimernom matriksu, obrazovan na nekoj površini (Costerton, 1978). Po svom sastavu biofilm pretežno sadrži vodu (85-90 %), zatim polisaharide, proteine, fosfolipide, teihoiniku i nukleinske kiseline kao i druge polimere. Od šećera najčešće su prisutni glukoza, galaktoza, manoza, fruktoza, ramnoza i drugi (web 7). Formiranje biofilma je složen proces koji se sastoji od nekoliko faza (slika 1.7.). U prvoj fazi bakterije se uz pomoć fimbrija pričvrste za odgovarajuću podlogu (1) i nakon nekog vremena počinju da formiraju mikrokolonije (2). Zatim, bakterije rastu, razmnožavaju se i međusobno povezuju (3 i 4). Na kraju, dolazi do sazrevanja biofilma i odvajanja bakterija od biofilma i površine (Stoodley *et al.*, 2002).



**Slika 1.7.** Faze formiranja biofilma 1. Reverzibilno vezivanje bakterijskih kolonija za površinu; 2. Ireverzibilno vezivanje i produkcija ekstracelularne polimerne supstance; 3. Razmnožavanje bakterija; 4. Sazrevanje biofilma; 5. Odvajanje delova biofilma (Stoodley *et al.*, 2002).

Ćelije bakterija koje žive u biofilmu zaštićene su od antibiotika i dezinficijensa i pokazuju 10-1000 puta veću otpornost prema antimikrobnim agensima kao što su antibiotici i dezinficijensi (Mah i Toole, 2001). Takođe, ćelije bakterija zaštićene biofilmom pokazuju otpornost i prema teškim metalima kao što su srebro i bakar (Donlan i Costerton, 2002). Produkcija biofilma pojedinih bakterija odgovorna je i za nastanak nekih bolesti kao što su mastitis izazivan vrstom bakterija *S. aureus* (Vaseduvan *et al.*, 2003), upalu pluća, infekcije rana (*S. aureus*, *P. aeruginosa*). Takođe, bakterijski biofilmovi su nađeni na mnogim medicinskim uređajima: endotrahijalnim tubusima, kateterima, medicinskim implantima, kontaktnim sočivima, materijalu za šivenje i drugim potrošnim medicinskim materijalima (Costerton, 2001).

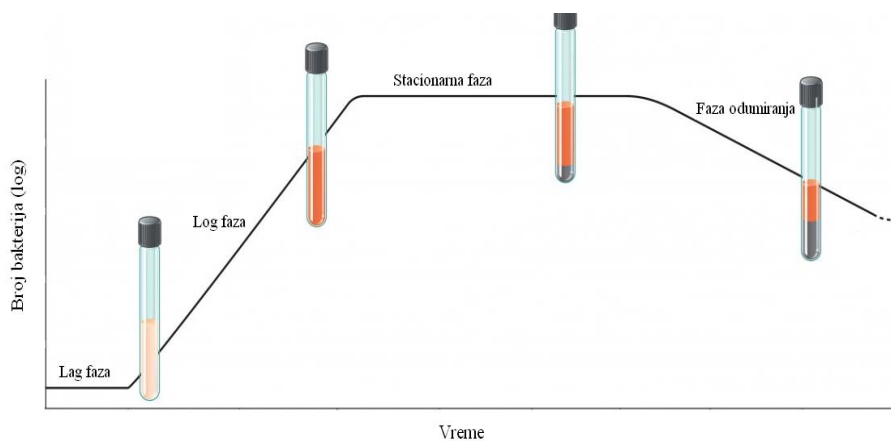
Neke D-aminokiseline pokazuju sposobnost da sprečavaju obrazovanje bakterijskog biofilma tako što ometaju obrazovanje peptidnog mosta kojim se peptidoglikan vezuje za ćelijski zid (Lam *et al.*, 2009; Cava *et al.*, 2011a; Cava *et al.*, 2011b). Tako D-tirozin, D-leucin, D-triptofan i D-metionin inhibiraju nastajanje biofilma *B. subtilis* dok D-fenilalanin ne pokazuje ovaj efekat (Kolodkin-Gal *et al.*, 2011). Međutim, D-tirozin, D-fenilalanin i D-prolin sprečavaju nastanak biofilma kod *S. aureus* (Hochbaum *et al.*, 2011). Najbolji efekat sprečavanja produkcije biofilma kod različitih vrsta bakterija pokazuje D-tirozin (Xu i Lui, 2011; Si *et al.*, 2014).

### 1.1.4. Razmnožavanje i rast bakterija

Bakterije se dele prostom, binarnom deobom. Pre početka deobe ćelije, dolazi do replikacije (dupliranja) DNK materijala. Bakterijska ćelija zatim kontinuirano raste, dolazi do formiranja pregrade i na kraju se ćelija deli na dve identične ćerke ćelije. Neke bakterije mogu razmenjivati genetički materijal. Razmena genetičkog materijala se može obaviti na tri načina:

1. Konjugacijom koja podrazumeva spajanje dve bakterije pilusima preko koga jedan deo DNK jedne bakterije (davalac) prelazi u drugu (primalac). Kako se primalac dalje razmnožava, potomstvo će imati genetički materijal i davaoca i primaoca.
2. Transformacijom gde dolazi do ulaska strane (egzogene) DNK u ćeliju primaoca i „kopiranja“ novoprimitih gena u ćelije primaoca. Donori DNK su najčešće lizirane-mrtve bakterije ili bakteriofagi (Quinn *et al.*, 2002; Watanabe, 1963).
3. Transdukcijom pri kojoj bakteriofagi (specifični bakterijski virusi) prenose DNK materijal iz jedne u drugu ćeliju (Tortora *et al.*, 2010).

Promena broja ćelija bakterija prikazuje se krivom rasta (slika 1.8.). U *lag* fazi bakterije se prilagođavaju na uslove spoljne sredine i u ovoj fazi ne dolazi do razmnožavanja bakterijskih ćelija. Dalje, u *log* fazi dolazi do eksponencijalnog rasta bakterija. Kada faktori okruženja, kao što su dostupnost nutrijenata i temperatura postanu ograničavajući, faza rasta se usporava i broj ćelija u populaciji postaje maksimalan. Razmnožavanje postaje relativno konstantno, što dovodi do *stacionarne* faze. Nedostatak nutrijenata i metaboliti koje ćelija stvara dovode do smrti bakterija (faza *odumiranja*) (Tortora *et al.*, 2010).



Slika 1.8. Kriva rasta bakterija (web 8).

## 1.2. Patogene vrste bakterija

### Patogene bakterije u vodama

Infekcije i bolesti koje se prenose putem vode nazivaju se hidričke infekcije i mogu se prenositi putem konzumacije, kontakta ili u vidu aerosola. Svetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization-WHO) procenjuje da je polovina svetske populacije ugrožena od zaraznih bolesti koje izazivaju patogeni mikroorganizmi i od tih infekcija godišnje strada oko 17 miliona ljudi (web 5). Uz pomoć novih metoda za posmatranje, epidemioloških studija i stalnog usavršavanja dijagnostičkih metoda nove patogene vrste mogu biti detektovane. Tako je 2001. godine identifikovano čak 1415 vrsta mikroorganizama koji izazivaju infekcije (Taylor *et al.*, 2001). Priroda i stepen zagađenja vode bakterijama određuju se biološkim i saprobiološkim ispitivanjima. Mikrobiološko ispitivanje vode se sastoji u određivanju broja koliformnih indikatorskih mikroorganizama i virusa. Zagađene vode sadrže 5000-10000 ćelija patogenih bakterija u 100,0 cm<sup>3</sup> dok voda za piće ne sme da sadrži patogene bakterije (Đukić *et al.*, 2000). U tabeli 1.1. prikazan je Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti vode za piće objavljen u Službenom glasniku pod brojem br. 42/98 i 44/99 (web 6).



**Tabela 1.1.** Pravilnik o mikrobiloškoj ispravnosti vode za piće objavljen u Službenom glasniku pod brojem br. 42/98 i 44/99 (web 6).

Vrsta mikroorganizama	Prečišćena i dezinfikovana voda i flaširana voda na izvoru	Prirodna voda	
		Zatvorena izvorišta	Otvorena izvorišta
Vrste roda <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Vibrio</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kao i drugi patogeni mikroorganizmi, koliformne bakterije i streptokoke fekalnog porekla			
Crevne protozoe, crevni helminti i njihovi razvojni oblici		Ne sme da sadrži	
Vibrioni			
Bakteriofagi			
Alge i drugi organizmi koji mogu da izmene izgled, miris i ukus vode			
Aerobne mezofilne bakterije na agaru posle inkubacije od 48 h na 37 °C u 1 cm <sup>3</sup> vode	do 10	do 100	do 300
Ukupne koliformne bakterije određene kao najverovatniji broj u 100 cm <sup>3</sup> vode	0	do 10	do 100
Ukupne koliformne bakterije određene metodom membranske filtracije u 100 cm <sup>3</sup> vode	0	do 5	do 10
Sulfitoredujuće klostridije u 100 cm <sup>3</sup> vode	0	do 1	do 10

S obzirom da se u vodama može naći veliki broj mikrobiloških vrsta, prilikom ispitivanja kvaliteta vode u realnim uslovima nije moguće identifikovati sve mikroorganizme. Zato su definisane vrste mikroorganizama koje predstavljaju indikatore zagađenja. Da bi određena vrsta bakterija bila indikator zagađenja neophodno je da:

1. ima zajedničku životnu sredinu sa patogenim bakterijama i da se izdvaja u spoljašnju sredinu u velikoj količini;

2. u spoljašnjoj sredini bude ravnomerno raspoređena i otpornija u odnosu na patogene vrste. Neophodno je da duže vreme opstaje u vodi, da se praktično ne razmnožava, bude otporna na dejstvo različitih nepovoljnih agenasa;

3. metode određivanja budu jednostavne, brze i dovoljno pouzdane (Đukić *et al.*, 2000).

Najtipičniji predstavnici ljudske mikroflore su bifidobakterije, enterokoke i crevne štapičaste bakterije, tako da je prihvaćeno da se kao indikatori zagađenja koriste grupe bakterija sa sličnim svojstvima, a ne jedna pojedinačna vrsta ili rod. Najčešće, mikrobiološka analiza vode obuhvata određivanje koliformnih bakterija i *Escherichia coli* (ili fekalnih koliforma). U grupu sanitarnih pokazatelja kvaliteta voda spadaju: patogene bakterije (*Campylobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, *Yersinia*), zatim bakterije koje izazivaju dijareju (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Vibrio*) kao i bakterije koje su uzročnici infekcija (*Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas*). Kao glavni indikator zagađenja voda smatra se koliformna bakterija *Escherichia coli* (Đukić *et al.*, 2000).

***Escherichia coli***. Porodica *Enterobacteriaceae* uključuje rodove kao što su *Escherichia* i *Salmonella* (Garrity *et al.*, 2005). Pored vrste *E. coli* u rodu *Escherichia* nalaze se još i *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* i *E. vulneris*. Vrsta bakterija *E. coli* prvi put je izolovana 1885 (Welch, 2006). *E. coli* je Gram-negativna bakterija, štapičastog oblika. Neki sojevi ove vrste imaju kapsulu koja se sastoji od jednog od 80 serološki i hemijski različitih polisaharida (Jann i Jann, 1992). Većina na površini ima flagele koje ih čine pokretnim. *E. coli* je aerobna i fakultativno anaerobna i za većinu njenih serotipova optimalna temperatura za rast iznosi 37–42 °C (Ingraham i Marr, 1996) dok se optimalnom vrednošću pH za rast smatra pH~ 7. Neki patogeni sojevi *E. coli* mogu da rastu čak i pri vrlo niskim vrednostima pH (oko 2) (Waterman i Small, 1996). Ove vrste bakterija se nalaze u crevnoj mikroflori sisara i njihovo prisustvo je neophodno za pravilno varenje hrane i rad crevne flore. Međutim, patogeni sojevi *E. coli* izazivaju brojna oboljenja (dijareja, povraćanje, mučnina, groznica). Na osnovu toksina koje produkuju i bolesti koje izazivaju do sada je definisano 6 crevnih i 2 prirodne grupe koje se smatraju izazivačima bolesti. Crevne patogene *E. coli* označene su kao ETEC (*engl.* Enterotoxigenic *E. coli*), EPEC (*engl.* Enteropatogenic *E. coli*),

EHEC (*engl.* Enterohemoragic *E. coli*), EAEC (*engl.* Enteroaggregative *E. coli*), DAEC (*engl.* diffusely adherent *E. coli*) i EIEC (*engl.* Enteroinvasive *E. coli*), dok su prirodni izolati podeljeni na one koji su izazivači meningitisa (MAEC) i izazivače bolesti urinarnog trakta (UPEC) (Garrity *et al.*, 2005).

Najčešćim izazivačem dijareje smatra se *E. coli* ETEC koja je prema procenama Svetske zdravstvene organizacije odgovorna za 600 miliona infekcija godišnje, dok za 800 000 ljudi, uglavnom dece mlađe od 5 godina, ova infekcija ima fatalan ishod (WHO, 1999). Smatra se da je za ove infekcije odgovoran enterotoksin LT, koji je po hemijskom sastavu i funkciji sličan toksinu koji produkuje *V. cholerae* (Sixma *et al.*, 1991, Sixma *et al.*, 1993). EPEC i EHEC izazivaju bolesti kod beba stvaranjem takozvanog „Shiga“ toksina, s tim da su EHEC izolovane u kliničkim uslovima. EAEC ne obrazuju LT ni „Shiga“ toksin, već stvaraju agregate bakterijskih ćelija (*engl.* „stacked bricks“-složene cigle) (Nataro *et al.*, 1987). DAEC infekcije nisu dovoljno proučene, ali je poznato da izazivaju bolesti kod dece mlađe od godinu dana (Scaletsky *et al.*, 2002). EIEC najviše podsećaju na vrste roda *Shigella* vrstu jer je ovaj soj ne fermentiše laktozu i nepokretne su, međutim za razliku od vrste roda *Shigella* ne proizvode gas iz glukoze.

*E. coli* je jedna od najotpornijih mikroorganizama u životnoj sredini, i za lečenje infekcija koje su izazvane bakterijama otpornim na veliki broj antibiotika (*engl.* multidrug resistant bacteria) najčešće se koriste antibiotici iz grupe karbapenema. U cilju određivanja profila antibiotske otpornosti, ispitivana je antibakterijska aktivnost 11 različitih antibiotika prema 137 kliničkih izolata *E. coli*. Zaključeno je da najveću otpornost izolati *E. coli* pokazuju na nitrofurantoin, dok su najosetljiviji prema tetraciklinu (Olorunmola *et al.*, 2013). Takođe i izolati iz hrane pokazali su veliku otpornost prema 12 od 19 antibiotika, pri čemu se otpornost pripisuje  $\beta$ -laktamazi (Rasheed *et al.*, 2014). Stečena rezistencija prema antibioticima nastaje jednim od četiri mehanizma i to: promenom ciljanog mesta, enzimskom detoksifikacijom antibiotika, smanjenim nagomilavanjem kao i preskakanjem aktivne faze leka. Prva tri mehanizma dovode se u vezu sa hromozomskim mutacijama ili sa prisustvom plazmida koji imaju gene koji kodiraju otpornost prema nekim antibioticima. Četvrti mehanizam se zasniva na horizontalnom prenosu gena koji kodiraju enzime koji daju otpornost na antibiotike, a nalaze se na plazmidima (Garrity *et al.*, 2005). Ispitivanja mehanizma otpornosti *E.*

*coli* prema većini uobičajenih antibiotika ukazuju na mutacije na molekulu DNK (engl. multiple antibiotic resistance locus-*Mar* locus) (Sáenz *et al.*, 2004).

### **Klinički izolati patogenih bakterija**

Infekcije u bolnicama izazvane su različitim vrstama mikroorganizama, pri čemu je Društvo za infektivne bolesti Amerike (engl. Infectious Diseases Society of America- IDSA) poslednjih godina posebno izdvojilo infekcije izazvane patogenim vrstama bakterija koje je nazvalo „ESKAPE“ (engl. escape-pobeći) (Rice, 2008; Bush i Jacoby, 2010). Vrste bakterija koje spadaju u ovu grupu su: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Tokom godina, ove vrste bakterija su uspele da razviju otpornost na veliki broj antibiotika i dezinfekcionih sredstava i na taj način uslovno rečeno „beže“ od dejstva antibiotika.

*Enterococcus faecium* pripada rodu *Enterococcus* koji se do skoro svrstavao u rod *Streptococcus*. Ova vrsta bakterija pripada Gram-pozitivnim kokama, pri čemu se ćelije uglavnom grupišu u diplokoke. Neki od sojeva ove vrste bakterija od skora se koriste i kao probiotici (Sisson *et al.*, 2014). *E. faecium* je uzročnik 5-10% infekcija koje izazivaju enterokoke, koje su najčešći uzročnici bolničkih infekcija, naročito u jedinicama intenzivne nege. Za vrste roda *Enterococcus* je karakteristična otpornost prema cefalosporinima, penicilinaza-otpornim penicilinima, monobaktamima, vankomicinima i aminoglikozidima (streptomycin ili gentamicin) (Tonkić *et al.*, 2015).

*Staphylococcus aureus*. U rodu *Staphylococcus* nalaze se vrste bakterije koje su loptastog oblika, mogu se naći same (mikrokoke), u paru (diplokoke), tetradama ili grupisane u grozdove. Mlade ćelije bakterija su izrazito Gram-pozitivne dok starenjem mogu da postanu Gram-negativne (Tonkić *et al.*, 2015). Ćelije bakterija ove vrste su nepokretne, ne obrazuju endospore i obično ne poseduju kapsulu. Pod dejstvom penicilina može da dođe do lize ćelije. Uglavnom su fakultativni anaerobi i katalaza pozitivne. Enterotoksini ovog roda su jako otporni na povišenu temperaturu i mogu da izazovu infekcije hranom. Ćelije bakterije ove vrste su sveprisutne u prirodi, mogu se naći u svim staništima, kao i na koži ljudi i životinja. Stafilokoke pokazuju otpornost

prema sušenju i visokim temperaturama (mogu da podnesu temperaturu od 50 °C tokom 30 minuta) kao i prema fiziološkom rastvoru i raznim antibioticima. Definisani su različiti mehanizmi otpornosti stafilokoka prema antibioticima. Tako, jedan od mehanizama podrazumeva stvaranje  $\beta$ -laktamaze koja uslovljava rezistenciju na antibiotike iz grupe penicilina. Otpornost stafilokoka na nafticin (metacilin i oksacilin) je kodirana i regulisana genima koji su smešteni na hromozomima. Intermedijarna otpornost pojedinih sojeva stafilokoka na vankomicin je takođe pronađena, i ovi sojevi su poznati kao VISA (*engl.* Vancomycin Intermediate *S. aureus*). Smatra se da je mehanizam rezistencije prema vankomicinu povezan sa pojačanom sintezom ćelije i promenama u njoj. Sojevi koji su intermedijarno otporni na vankomicin obavezno su osetljivi i na metacilin/naftacilin, dok su ponekad osetljivi i na oksazolidinone i kvinupristin-dalfopristin. Pored intermedijarno otpornih sojeva, postoje i sojevi koji su potpuno otporni na vankomicin (*engl.* Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA). Ovi sojevi poseduju gen za otpornost koji je prvobitno pronađen kod enterokoka. Stafilokoke takođe poseduju i otpornost na tetracikline, eritromicin i aminoglikozide koja je plazmidom posredovana. Neki sojevi stafilokoka mogu posedovati toleranciju prema određenom leku, koja može da uslovi produžetak kliničkog lečenja infekcije. Tolerancija se može pripisati nedostatku aktivacije autolitičkih enzima u ćeliji (Tonkić *et al.*, 2015).

Do 1970. u ovom rodu su se nalazile samo tri vrste bakterija: *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. saprofiticus*, dok danas ovaj rod sačinjava preko 40 različitih serotipova (Tong *et al.*, 2015). Među njima, najvećim izazivačem bolesti smatra se *S. aureus* koja je patogena, izlučuje razne toksine- alfa toksin, enterotoksine, leukocidin, egzotoksine i svojim direktnim ulaskom u organizam može da izazove razne infekcije (Gotz *et al.*, 2006). Posebna grupa ovih stafilokoka je *S. aureus* MRSA koja je proglašena za najveći klinički i epidemiološki problem u bolnicama osamdesetih godina prošlog veka. MRSA je otporna na veliki broj antibiotika poput onih iz grupe penicilina i cefalosporina (Chambers i DeLeo, 2009). Infekcije ovom vrstom bakterija najčešće se javljaju u bolničkim uslovima, kod pacijenata sa oslabljenim imunim sistemom. Procenjuje se da je 2005. godine bilo 94 360 infekcija ovom bakterijom, i da u Americi oko 18 000 ljudi godišnje umre od ovih infekcija. Takođe, procenjeno je da ova bakterija izaziva više

infekcija nego virusi hepatitisa, side i tuberkuloze, dok je broj preminulih od ovih infekcija duplo veći u odnosu na broj preminulih od side (Green *et al.*, 2012).

***Klebsiella pneumoniae*** pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Ova bakterija je Gram-negativna, štapičasta, obično obrazuje kapsulu, fakultativno anaerobna i ima sposobnost da fermentiše laktozu, dok je oksidaza negativna (Garrity *et al.*, 2005). Za razliku od *E. coli*, ova vrsta bakterija je nepokretna i nalazi se u disajnim putevima i fesesu u oko 5 % zdravih ljudi. Može da uzorkuje bakterijska zapaljenja pluća kao i hemoragičnu nekrotizirajuću konsolidaciju pluća. Takođe, izaziva i infekcije mokraćnih puteva. Osetljiva je na dejstvo ampicilina i tetraciklina (Tonkić *et al.*, 2015).

***Acinetobacter baumannii***. Vrste bakterija roda *Acinetobacter* su saprofiti, Gram negativne, aerobne, štapičaste, nefermentativne, nepokretne i katalaza pozitivne. Optimalna temperatura za rast ovih vrsta patogena je u opsegu 35-45 °C i pH 5,5-6,0. Mogu se naći u tlu, vodi, kanalizaciji ili hrani. Prisutne su i u bolnicama gde se mogu klinički izolovati iz pacijenata ili sa bolničkog osoblja. Ove bakterije mogu da produkuju biofilm i otporne su na veliki broj antibiotika (Towner, 2006). Danas se u ovom rodu nalazi 57 vrsta, pri čemu neke od njih nisu patogene (web 1).

*A. baumannii* je poslednjih godina jedna od najotpornijih vrsta bakterija koja se često javlja u jedinicama intenzivne nege, lako se prilagođava uslovima životne sredine i može da izazove bolničke epidemije (Maragakis i Perl, 2008). Čelije bakterije ove vrste su otporne na veliki broj izuzetno delotvornih antibiotika (iz grupe karbapenema i cefalosporina). Mehanizam otpornosti zasniva se pre svega na hidrolizi antibiotika koja se dešava pod dejstvom  $\beta$ -laktamaze, povećanoj aktivnosti pumpe koja se nalazi u citoplazmatskoj membrani (*engl.* efflux pump), manjoj propustljivosti spoljašnje membrane, kao i produkcijom enzima koji inaktiviraju aminoglikozide (Giamarellou *et al.* 2008; Karageorgopoulos i Falagas, 2008). Ova vrsta bakterija ima sposobnost da obrazuje biofilm na pacijentima i na medicinskoj opremi, naročito na aparatima za mehaničku ventilaciju pacijenata (Wang *et al.*, 2013). Preko fimbrija se može vezati za epitelne ćelije čoveka, ili obrazovati biofilm na plastičnim ili staklenim površinama (Lee *et al.*, 2008). Specifični Internacionalni klonovi, od kojih je trenutno 8 poznato i identifikovano, se smatraju uzročnicima epidemija izazvanih ovom vrstom

bakterija (Higgins *et al.*, 2010). Nedavno su izolati *A. baumannii* izdvojeni iz voda reke Save, što predstavlja upozorenje na širenje ove patogene vrste u prirodu (Hrenović *et al.*, 2016; Šeruga Musić *et al.*, 2017).

***Pseudomonas aeruginosa*** je nefermentativna, striktno aerobna, Gram-negativna, štapićasta, pokretna vrsta bakterija koja spada u porodicu *Pseudomonadaceae*. Pojavljuju se pojedinačno, u parovima ili ponekad u kraćim lancima. Veoma je otporna na razne uslove spoljašnje sredine iako ne stvara endospore ni kapsule (Garrity *et al.*, 2005). Ova vrsta bakterija nema mogućnost da koriste ugljene hidrate kao izvore ugljenika, aerobne su i stvaraju specifične pigmente koji olakšavaju njihovu identifikaciju. Široko su rasprostranjene u prirodi, najčešće se mogu naći u zemljištu i vodi, na vlažnim mestima, a čak 10% stanovništva ih ima kao sastavni deo crevne mikroflore (Tonkić *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* je prvenstveno bolnički patogen i ima sposobnost rasta u vlažnom okruženju. Kod lečenja infekcija izazvanih ovom vrstom bakterija preporučuje se kombinacija antibiotika. *P. aeruginosa* je osetljiva na dejstvo penicilina sa proširenim delovanjem (npr. piperacilin) naročito ukoliko je u kombinaciji sa aminoglikozidom (najčešće tobramicinom). Takođe, kao efikasni antibiotici za lečenje infekcija izazvanih *P. aeruginosa* su i aztreonam (karbapenemi kao što su imipenem ili meropenem), fluorokuinoloni i neki cefalosporini (ceftazidim, cefoperazon i cefepim). Multiplorezistentni izolati postali su značajan problem kao uzročnici bolničkih infekcija a nastaju brojnim mehanizmima rezistencije prisutnim u *P. aeruginosa* kao što su sticanje hromozomske  $\beta$ -laktamaze,  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra, mutacijama unutar porinskih kanala i delovanjem efluks pumpi (Tonkić *et al.*, 2015).

***Enterobacter spp.*** pripada porodici *Enterobacteriaceae*, pri čemu tri vrste roda (*E. aerogenes*, *E. cloacae* i *E. sakazaki*) izazivaju većinu infekcija. Vrste roda *Enterobacter* su Gram-negativne, štapićaste bakterije, koje fermentišu laktozu i mogu da imaju kapsulu zbog čega stvaraju sluzave kolonije. Poseduju flagele koje su peritrihijalno raspoređene, dok kapsulu sintetiše samo jedan deo ovih vrsta bakterija. Većina sojeva poseduje  $\beta$ -laktamazu zbog čega su otporni na ampicilin i prvu i drugu generaciju cefalosporina. Kod mutanata se može javiti hiperprodukcija ovog enzima, pri čemu oni mogu biti otporni i na treću generaciju cefalosporina. Sve vrste bakterije iz ovog roda su

fakultativni anaerobi i lako se gaje na jednostavnim hranljivim podlogama (Tonkić *et al.*, 2015).

### 1.3. Postupci dezinfekcije

Biološka zagađenja posledica su prisustva mikroorganizama, prirodnih organskih materija i bioloških toksina, dok su mikrobiološka zagađenja prouzrokovana mikroorganizmima, među kojima su i ljudski patogeni. Broj mikroorganizama (virusa, bakterija i parazita) može se značajno smanjiti postupcima dezinfekcije. Dezinfekcija se može izvoditi na različite načine. Mehanička dezinfekcija vremenski nije zahtevan postupak i podrazumeva uklanjanje bakterija mehaničkim putem, međutim ova dezinfekcija nije naročito delotvorna. Postupak fizičke dezinfekcije se najčešće izvodi pod dejstvom toplote, ultraljubičastog zračenja ili korišćenjem membranskih postupaka kao što su ultrafiltracija ili reverzna osmoza. Ovaj postupak zahteva duže vreme kontakta (Somani i Ingole, 2011). U praksi se najčešće primenjuje hemijska dezinfekcija prilikom koje se koriste dezinfekciona i antiseptička sredstva na bazi hlora ili ozona (Baras *et al.*, 2009). Dejstvo dezinficijenas koji sadrže hlor zasniva se na inaktivaciji enzima koji su esencijalni za život mikroorganizama. Međutim, primena preparata na bazi hlora ima neželjene efekte jer se kao sporedni proizvodi obrazuju kancerogene materije (*engl.* disinfection by-products DBP). Ozonizacija vode, osim što je skup proces, takođe dovodi do stvaranja neželjenih organskih materija (Baras *et al.*, 2009).

Današnja istraživanja usmerena su ka ispitivanju novih, efikasnih, lako dostupnih dezinficijenas koji su ekonomski isplativi i ekološki prihvatljivi. Pojava multirezistentnih bakterija prema komercijalnim dezinfekcionim sredstvima sve je izraženija s obzirom na njihovu sposobnost da se lako prilagođavaju uslovima i promenama u spoljašnjoj sredini. Poslednjih godina se, kao potencijalni dezinficijensi, razmatraju nanomaterijali na bazi TiO<sub>2</sub>, MgO, Ag, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, CuO kao i ugljenične nanocevi, hitozan, različite vrste glina, prirodni i sintetički zeoliti (Hossain *et al.*, 2014; Beyth *et al.*, 2015). U novije vreme nanomaterijali se često primenjuju i imaju veliku prednost u odnosu na dosadašnje antimikrobne agense, s obzirom na njihovu veliku dodirnu površinu u odnosu na dimenzije. Čestice nanodimenzija imaju veliku antibakterijsku aktivnost čak i u malim dozama, pa se mogu koristiti i kao zamena za antibiotike. Do oštećenja citoplazmatične membrane ćelije bakterija dolazi kada se

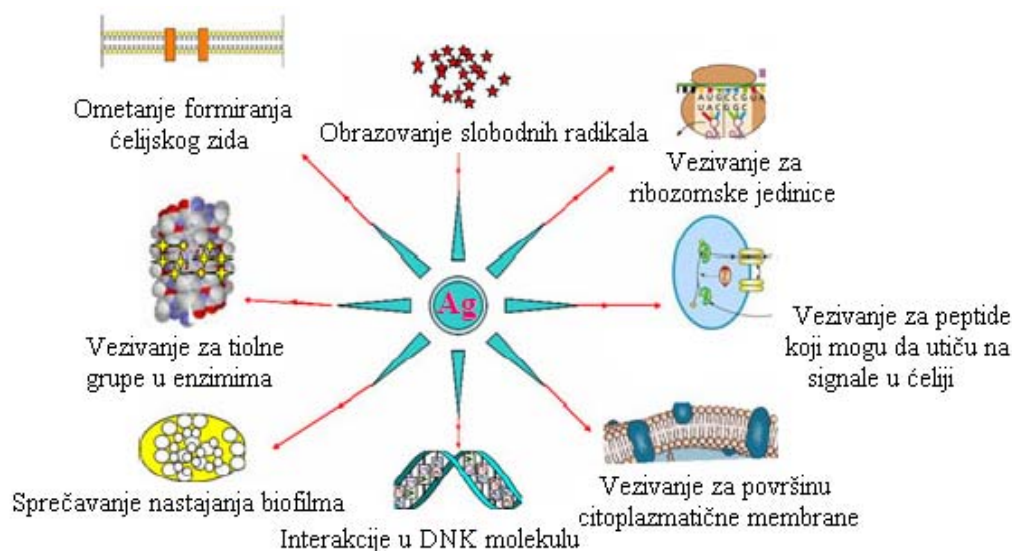


nanočestice elektrostatički vežu za ćelijski zid ili neku od membrana. Usled vezivanja nanočestica za ćeliju bakteriju dolazi do problema sa transportom hranljivih materija i oštećenja procesa disanja što za krajnji ishod ima lizu i smrt ćelije. Mehanizam dejstva nanočestica uglavnom se zasniva na obrazovanju slobodnih radikala (*engl.* reactive oxygen species-ROS) koji zatim ispoljavaju toksično dejstvo na mikroorganizme ili ometaju metaboličke procese u ćeliji (Beyth *et al.*, 2015).

Pre nego što bude prikazan pregled do sada najčešće ispitivanih novih dezinficijensa, u daljem tekstu biće prikazane relevantne činjenice u vezi sa mehanizmom antimikrobnog delovanja nekih metala i njihovih katjona koji su glavne komponente novih dezinficijensa.

#### 1.4. Mehanizam antibakterijskog delovanja metala

Antibakterijski efekat različitih metala, poput srebra, bakra, cinka, žive, kadmijuma, hroma i olova prema različitim vrstama bakterija opisan je u literaturi (Jung *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2010; Raghupathi *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2013). Joni srebra i materijali na bazi srebra pokazuju najizraženiju aktivnost prema bakterijama (Slawson *et al.*, 1992; Zhao i Stevens, 1998) kao i prema 16 bakterijskih vrsta, među kojima je i *E. coli* (Spadaro *et al.*, 1974). Među metalima srebro pokazuje najizraženiju antibakterijsku aktivnost. Do sada poznati mehanizmi delovanja srebra prikazani su na slici 1.9. (Rai *et al.*, 2012).



**Slika 1.9.** Potencijalni mehanizmi delovanja jona srebra na bakterijsku ćeliju (Rai *et al.*, 2012).

U poređenju sa drugim metalima srebro ima izraženiju aktivnost prema mikroorganizmima dok prema ćelijama sisara ispoljava slabiju aktivnost (Zhao i Stevens, 1998), što je bitno ukoliko se preparati srebra primenjuju *in vivo*. Srebro deluje baktericidno prema *E. coli* pri koncentraciji od  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  (Matsumura *et al.*, 2003) što je oko 1000 puta manja vrednost od doze  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  jona potrebne za isti efekat (Navarro *et al.*, 2013). Izražena toksičnost srebra objašnjava se činjenicom da srebro nije esencijalni element, pa i u malim dozama deluje baktericidno (Demirci *et al.*, 2014), kao i time da nanočestice srebra imaju veliku dodirnu površinu, čime se obezbeđuje bolji kontakt sa ćelijama bakterija (Rai *et al.*, 2009).

Metode proširene rendgenske spektroskopije za detalje strukture EXAFS/XANES su nedestruktivne metode i omogućavaju uvid u ne samo naelektrisanje elementa već i u lokalnu strukturu ispitivanog prelaznog elementa. Tokom snimanja dobija se spektar koji predstavlja jedinstven „otisak prsta“ (*engl.* fingerprint analysis) svake veze. Najizraženiji pik na spektru, koji pokazuje zavisnost apsorbance od energije, naziva se „bela linija“ (*engl.* white line). Poređenjem spektra standarda u kojima je poznata priroda veze katjona i spektra uzorka dobija se uvid u prirodu veze. Bovenkamp i saradnici (Bovenkamp *et al.*, 2013b) ispitivali su detaljno uticaj katjona srebra na bakterijsku biomasu *E. coli*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Najpre je snimljeni spektar uzoraka poređen sa spektrima  $\text{AgNO}_3$  i  $\text{AgCl}$ , međutim ovi spektri nisu pokazali dobro slaganje sa matematičkim modelom linearnog fitovanja (linear combination fitting, LCF) čime bi se odredio udeo veze. Na osnovu ovih podataka je zaključeno da se neorganski standardi ne mogu koristiti za ovakva merenja (Bovenkamp, 2013a).

Za dalje potrebe analize, sintetisani su kompleksi srebra sa aminokiselinama i bakterijska biomasa tretirana srebrom je isprana od viška srebra. Poređenjem dobijenih spektara došlo se do zaključka da postoje male razlike u spektrima tretiranih biomasa *E. coli* i *S. aureus*, dok se spektar *L. monocytogenes* poklapa sa spektrom *S. aureus*. „Bela linija“ bakterijskih biomasa pomerena je na veće vrednosti energija u odnosu na  $\text{AgNO}_3$  (za 1 eV). Korišćenjem LCF metode poređeni su spektri uzoraka srebrom tretirane biomase sa spektrima Ag-histidina, Ag- cisteina, Ag-alanina i Ag-D,L-asparaginske kiseline. U Ag-histidinu postoji veza Ag-N, u Ag-cisteinu Ag-S, veza Ag-

O zastupljena u Ag- D,L-asparaginskoj kiselini, dok je veza sa kiseonikom i azotom zastupljena u Ag-alaninu. Rezultati analize dati su u tabeli 1.2.

**Tabela 1.2.** Udeo veza dobijen matematičkim modelom linearnog fitovanja (LCF metoda) za Ag-tretirane biomase bakterija u poređenju sa referentnim standardima. Udeo aminokiselina dat je u procentima, greška LCF metode iznosila je  $\pm 10\%$  (Bovenkamp, 2013a).

Uzorak	Ag-cistein	Ag-histidin	Ag-alanin	Ag-D,L-asparaginska kiselina
Ag- <i>E. coli</i>	24	10	37	29
Ag- <i>S. aureus</i>	10	47	40	3
Ag- <i>L. monocytogenes</i>	14	47	26	13

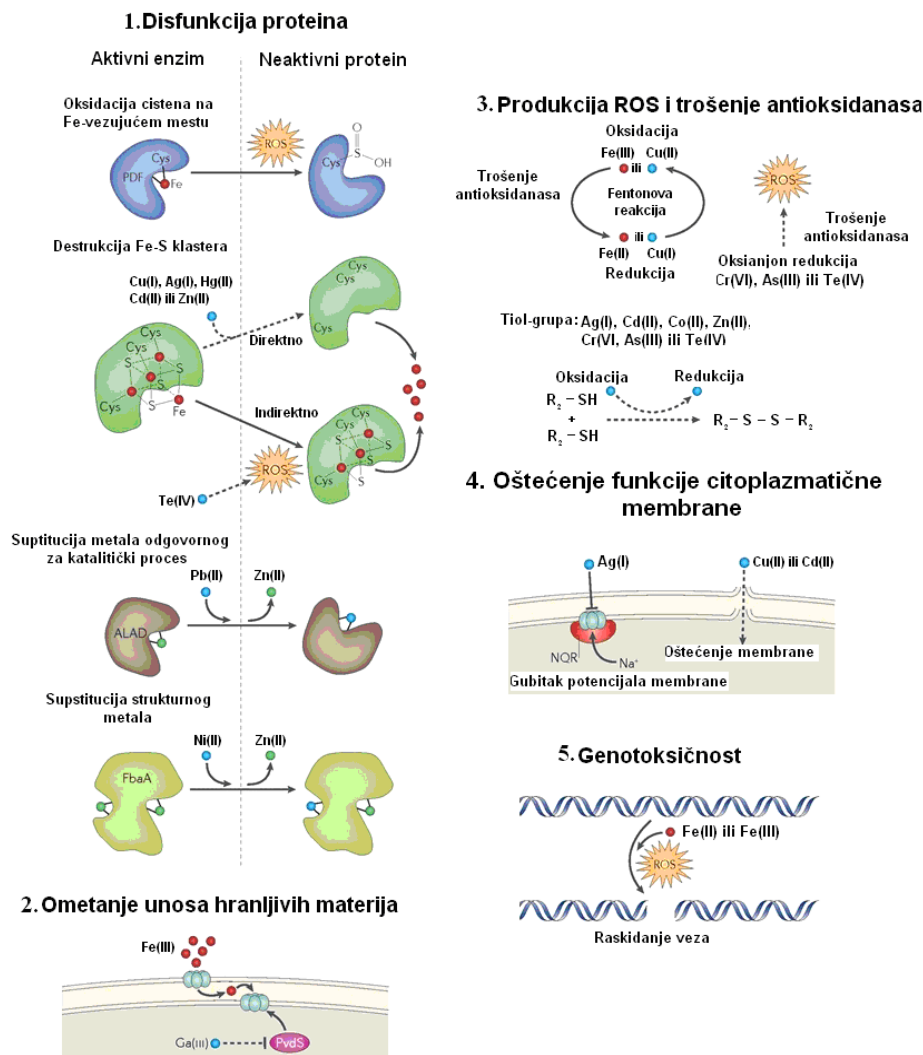
Na osnovu prikazanih vrednosti u tabeli 1.2. uočavaju se jasne razlike u aktivnosti jona srebra prema vrstama bakterija. Tako, na *E. coli* najizraženiji udeo veza srebra je sa azotom i kiseonikom (37 %), nešto je manji procenat veza Ag-O (29 %) i Ag-S (24 %), dok je najmanji udeo veza Ag-N (10 %). Kod Gram-pozitivnih vrsta bakterija, *S. aureus* i *L. monocytogenes*, najveći procenat veza ostvaruje se preko Ag-N (47 %) pri čemu veze Ag-O gotovo da nema (3 i 13 % za *S. aureus* i *L. monocytogenes*, redom). Kod ovih vrsta bakterija i veza Ag-S je zastupljena u malom procentu (10 i 14 % za *S. aureus* i *L. monocytogenes*, redom). Veza srebra sa azotom i kiseonikom je različitog udela (40 i 26 % za *S. aureus* i *L. monocytogenes*, redom).

Na osnovu prikazanih rezultata može se izvesti zaključak da antibakterijska aktivnost srebra prema bakterijama zavisi od strukture ćelijskog zida Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Deblji peptidoglikanski sloj ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija sadrži azotne grupe, pa se može zaključiti da srebro utiče na oštećenje funkcije membrane. S druge strane, kod *E. coli* najzastupljenija je veza sa kiseonikom i azotom što navodi na zaključak da srebro izaziva oštećenje funkcije spoljne membrane i izaziva genotoksičnost vezujući se za DNK molekul (Bovenkamp, 2013a).

Mehanizam delovanja teških metala na bakterijske ćelije nije tačno definisan. Dosadašnja istraživanja ukazuju da metali na mikroorganizme deluju po jednom od navedenih mehanizama (Lemire *et al.*, 2013):

1. Nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)
2. Disfunkcija proteina i gubitak enzimske aktivnosti
3. Oštećenje funkcije citoplazmatične membrane
4. Ometanje unosa hranljivih materija
5. Genotoksičnost.

Na slici 1.10. su šematski prikazani pomenuti mehanizmi delovanja jona teških metala na bakterijsku ćeliju (Lemire *et al.*, 2013) koji će biti opisani u nastavku.



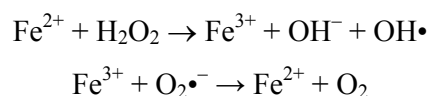
**Slika 1.10.** Mehanizam antibakterijske aktivnosti metala: 1. disfunkcija proteina; 2. ometanje unosa hranljivih materija; 3. produkcija ROS i trošenje antioksidanasa; 4. oštećenje funkcije citoplazmatične membrane; 5. genotoksičnost (Lemire *et al.*, 2013).

### 1.4.1. Nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

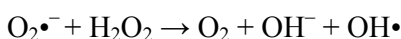
Prema dosadašnjim rezultatima istraživanja, prisustvo teških metala može da dovede do nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta unutar ćelije (*engl.* reactive oxygen species-ROS). Prisustvo toksičnih doza metala kao što su Cr(VI), As(III), Fe(II) ili Cu(II) povećava mogućnost nastajanja ROS unutar bakterijske ćelije (Imley *et al.*, 1988; Touati *et al.*, 1995; Nunoshiba *et al.*, 1999; Macomber *et al.*, 2007; Harrison *et al.*, 2009; Warnes i Keevil, 2011; Warnes *et al.*, 2012). ROS-vrstama se smatraju sledeći

radikali: superoksid-radikal ( $O_2^-$ ), vodonik-peroksid, hidroksil-radikal ( $OH^\bullet$ ), perhidroksil-radikal ( $OOH^\bullet$ ), alkoksil-radikal ( $RO$ ), peroksil-radikal ( $ROO^\bullet$ ). Nastajanje hidroksil-radikala, koji se smatra najreaktivnijom ROS-vrstom, vezano je za Haber-Vajsovu (Haber-Weiss) reakciju u kojoj reaguju  $H_2O_2$  i  $O_2$ , kao i za Fentonovu reakciju koja se odnosi na razgradnju  $H_2O_2$  u prisustvu metala koji se javljaju u više različitih oksidacionih stanja (npr.  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  i  $Cu^+/Cu^{2+}$ ). Joni Cu i Fe uglavnom su vezani za funkcionalne proteine koji imaju ulogu transportera. Kada se poveća koncentracija Cu i Fe dolazi do reakcije sa vodonik peroksidom i nastaje peroksil radikal. Fentonova i Haber-Vajsova (Haber-Weiss) jednačine mogu se prikazati na sledeći način (Lemire *et al.*, 2013):

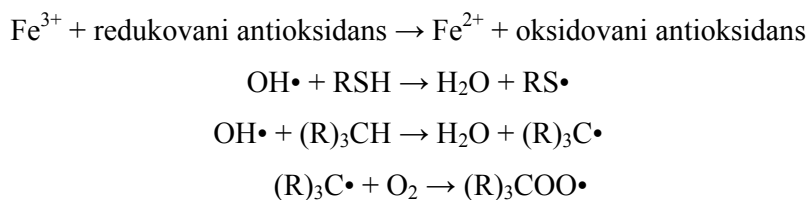
Fentonova reakcija:



Haber-Vajsova (Haber-Weiss) jednačina:



Nastajanje peroksil-radikala:



U fiziološkim uslovima Haber-Vajsova reakcija je spora, ali se u prisustvu metala odvija kao Fentonova reakcija uz nastanak reaktivnog peroksil-radikala koji je toksičan za ćeliju. ROS-vrste dovode do oštećenja DNK i do inhibicije enzima (Matsumura *et al.*, 2003). Pretpostavlja se da postoje tri mehanizma delovanja jona teških metala u kojima nastaju ROS-vrste:

1. katalitička aktivnost jona prelaznih elemenata (Cu, Cr, Co, V, Ni) u Fentonovoj reakciji;
2. ometanje nastajanja kompleksa između atom-donora u zidu ćelije i jona gvožđa;
3. redukcija Fe(III), Cu(II), Cr(VI), As(III) i Te(IV) tiol grupama u uslovima *in vitro* (Lemire *et al.*, 2013).

Srebro, takođe može da dovede do nastajanja slobodnih radikala (slika 1.9.) (Danilczuk *et al.*, 2006). Na osnovu rezultata merenja elektronske spinske rezonance (eng. electron spin resonance-ESP) kao i istraživanja sa antioksidansima potvrđeo je da su Ag-nanočestice odgovorne za nastajanje slobodnih radikala (Kim *et al.*, 2007; Prabhu i Poulouse, 2012) koji dalje mogu da prouzrokuju oštećenje membrane i smrt ćelije. Srebro i vodonik-peroksid zajedničkim delovanjem mogu da dovedu do oštećenja proteina u ćeliji (Feng *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. Disfunkcija proteina i gubitak enzimske aktivnosti

Oksidacija aminokiselina može da dovede do gubitka katalitičke aktivnosti enzima (Stadtman, 1993). S obzirom da ova reakcija može biti katalizovana jonima metala ovo se smatra razlogom njihove toksičnosti prema mikroorganizmima. U toku nekoliko minuta visoke toksične doze Cr(VI) mogu da dovedu do nastajanja slobodnih radikala koji zatim dovode do disfunkcije proteina kod *S. aureus* (Sumner *et al.*, 2005). Fe-S dehidrataze su naročito osetljive na dejstvo metala (Macomber *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2009; Xu i Imlay, 2012). Bakar može da utiče na aktivnost izopropilmalat izomeraze što dovodi do inaktivacije fumaraze A i 6-fosfoglukonat dehidrataze, dva enzima koja zavise od Fe-S klastera (Macomber *et al.*, 2009). Supstitucija metala koji je u sastavu enzima takođe može biti razlog inhibicije enzima. Na primer, Zn se nalazi na aktivnom mestu  $\delta$ -aminolevulinske kiselinske dehidrataze. Ukoliko se cink zameni olovom dolazi do inhibicije enzima i do uginuća (Erskine *et al.*, 1997; Ogunseitán *et al.*, 2000). Srebro takođe može da obrazuje veze sa tiolnim grupama prisutnim u nekim aminokiselinama (cistein) pri čemu dovodi do disfunkcije proteina i gubitka enzimske aktivnosti (Fuhrmann i Rothstein, 1968; Bragg i Rainnie, 1974; Belly i Kydd, 1982; Furr *et al.*, 1994).  $Ag^+$  jon može da zameni gradivni metal u strukturi enzima i da na taj način dovede do disfunkcije (Ghandour *et al.*, 1988).

#### 1.4.3. Oštećenje funkcije membrane

Bakterijska membrana se sastoji od polimera sa elektronegativnim hemijskim grupama za koje mogu da se vežu katjoni metala (Zhang i Rock, 2008). Zbog svojstva da lako vezuju metale, citoplazmatična membrana se smatra mestom na kom teški metali najčešće ispoljavaju toksičnost. Elektronskim mikroskopom ispitivane su

citoplazmatske membrane *E. coli* i *S. aureus* koje su bile izložene dejstvu Ag (Feng *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010) i vrsta bakterije *Erwinia carotovora* koja je bila izložena dejstvu Al (Yaganza *et al.*, 2004). Rezultati ukazuju da se smrt ćelije ne može dovesti u direktnu vezu sa oštećenjem citoplazmatske membrane ili sa potpunim odvajanjem ćelijskog zida. Lipidna peroksidacija je povezana sa toksičnošću Cu(II) i Cd(II) kod bakterija i kvasaca (Grass *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). Na osnovu istraživanja zaključeno je da povećanje koncentracija ovih metala dovodi do nastanka kiselih, reaktivnih tiobarbiturnih kiselina (TBARS). Povezanost jona teških metala sa lipidnom peroksidacijom se uzima sa rezervom jer je lipidna peroksidacija povezana sa citoplazmatskim membranama eukariotskih organizama. Citoplazmatska membrana sadrži polinezasićene masne kiseline, međutim, bakterijska citoplazmatska membrana sadrži uglavnom mononezasićene masne kiseline koje su u *in vitro* uslovima nereaktivne.

Srebro može da se vezuje za ćelijski zid i da dovede do ometanja procesa disanja, a samim tim i do smrti ćelije (Rai *et al.*, 2009). Joni srebra mogu da izazovu pojavu „jama“ nepravilnog oblika na membranama, pri čemu dolazi do otpuštanja proteina iz ćelije, koje dovodi do curenja genetskog materijala, poremećaja metaboličkih funkcija i smrti ćelije (Sondi i Salopek Sondi, 2004; Pal *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Pod dejstvom srebra dolazi i do odvajanja citoplazmatske membrane od ćelijskog zida, pri čemu se otpušta dolazi do otpuštanja ćelijskog materijala (Jung *et al.*, 2008). Vezivanje srebra za ćelijsku membranu može da dovede i do gubitka  $K^+$  jona koji je neophodan za normalan transport kroz citoplazmatsku membranu (Na-K pumpa) (Ghandour *et al.*, 1988; Lok *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2015 ).

#### 1.4.4. Ometanje unosa hranljivih materija

Toksičnost nekih metala dovodi se u vezu i sa sprečavanjem unosa hranljivih materija. Kod kvasca *S. cerevisiae* hromat-jon i sulfat-grupe pokazuju sličan afinitet. S obzirom da hromat-jon ometa akumulaciju sulfata, izlaganje hromatu je u vezi sa kompetitivnom inhibicijom unosa sulfata (Fauchon *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008). Takođe, kod *E. coli* primećeno je da srebro utiče na usvajanje fosfata i oslobađanje manitola, sukcinata, prolina i glutamina iz ćelija *E. coli* (Bragg i Rainnie, 1974;



Schreurs i Rosenberg, 1982; Haefili *et al.*, 1984; Yamanaka *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2009).

#### 1.4.5. Genotoksičnost

Istraživanja ukazuju da oštećenje u DNK molekulu može biti katalizovano gvoždem iz Fentonove reakcije. Mutacije mogu da dovedu do povećanja količine Fenton-aktivnog gvožđa koje izaziva smrt ćelije (Linley *et al.*, 2012). Ova pojava nije uočena kod drugih metala. Toksični efekti Ni(II), Cu(II), Te(IV), Pb(II), Ag(II) i Al(III) nisu dovedeni u vezu sa povećanjem mutacija (Nishioka, 1975; Green *et al.*, 1976; Wong *et al.* 1988; Asakura *et al.*, 2009). Cu(II) može da ima zaštitno dejstvo kod *E. coli* od vodonik-peroksida iako je ovaj metal Fenton-aktivan i dovodi do nastanka hidroksil-radikala u *in vivo* uslovima (Macomber *et al.*, 2007). Isto tako, pored činjenice da je Cr(VI) jedan od jona sa najizraženijim mutagenim svojstvima (Nishioka, 1975; Green *et al.*, 1976; Wong *et al.* 1988), *S. cerevisiae* sa oštećenim DNK molekulom ne pokazuju osetljivost prema Cr(VI) (Sumner *et al.*, 2005). Međutim, iako svi metali pri *in vitro* uslovima izazivaju oštećenje DNK, u uslovima *in vivo* ne dolazi uvek do letalnog ishoda.

Takođe, i joni srebra mogu da izazovu mutacije u DNK molekulu i da dovedu do letalnog ishoda za bakterijske ćelije. Pod dejstvom jona srebra DNK molekul obrazuje aglomerate i gubi mogućnost replikacije (Feng *et al.*, 2000). Srebro se ponaša kao slaba kiselina i u DNK molekulu reaguje sa azotnim bazama pri čemu dolazi do smrti ćelije (Yakabe *et al.*, 1980; Hatchett i Henry, 1996). Takođe, na osnovu analize veza koje srebro obrazuje sa bakterijskom biomasom, zaključeno je da se srebro vezuje za azot kod *S. aureus* i azot i kiseonik kod *E. coli*. Smatra da se veze uspostavljaju sa nukleinskim kiselinama u DNK molekulu, što je dokazano EXAFS/XANES metodom (Bovenkamp *et al.*, 2013b).

## 1.5. Nove vrste dezinficijensa

### 1.5.1. Dezinficijensi na bazi srebra

Joni i jedinjenja srebra ispoljavaju slabu toksičnost prema humanim ćelijama, dok sa druge strane, za kratko vreme ispoljava baktericidni efekat prema velikom broju bakterija. Uticaj jona srebra na *E. coli* i *S. aureus* ispitivan je u hranljivom tečnom medijumu. U slučaju *E. coli* primećene su značajne morfološke promene kao što je velika praznina između citoplazmatske membrane i ćelijskog zida i prisustvo velike količine srebra i sumpora, pri čemu se pretpostavlja da se srebro u bakterijskoj ćeliji vezuje za sumpor. Kod *S. aureus* takođe je citoplazmatska membrana odvojena od ćelijskog zida, dok je u nekim delovima ćelije prisutna velika količina srebra sa fosfatima. Mehanizam delovanja jona srebra pripisuje se činjenici da joni srebra prolaze kroz ćelijski zid i dovode do smrti ćelije (Feng *et al.*, 2000).

Nanočestice srebra ispoljavaju izraženiju antibakterijsku aktivnost od jona srebra zbog veće dodirne površine. Antibakterijska aktivnost zavisi od veličine i oblika nanočestica srebra. Tako su čestice Ag manjih dimenzija (8 nm) i trouglastog oblika efikasnije prema *E. coli* od većih (11-23 nm) i sfernih (Pal *et al.*, 2007). Masa sfernih nanočestica potrebna za inhibiciju rasta bakterijskih ćelija iznosila je 12,5 µg dok je svega 1 µg trouglastih nanočestica potreban za inhibiciju. Nanočestice srebra ispoljavaju baktericidni efekat prema *E. coli* na suvim površinama, dok u tečnom medijumu trenutno inhibiraju rast ovih bakterija, pri čemu je primećeno da i veće koncentracije nisu dovoljne za baktericidni efekat u tečnom medijumu (Salopek i Salopek-Sondi, 2004). *E. coli* je osetljivija na dejstvo nanočestica srebra od *B. subtilis*. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) nanočestica srebra iznosi 0,0622 i 0,0236 µg cm<sup>-3</sup> za *B. subtilis* i *E. coli*, redom (Yoon *et al.*, 2007). Na osnovu SEM analize bakterijskih ćelija izloženih dejstvu Ag nanočestica zaključeno je da Ag reaguje sa gradivnim elementima citoplazmatske membrane i izazivaju oštećenje ćelija ili mogu da izazovu denaturaciju proteina zamenom funkcionalnog elementa sa Ag<sup>+</sup> (Salopek i Salopek-Sondi, 2004).

### 1.5.2. Dezinficijensi na bazi oksida metala

**Bakar-oksidi.** CuO nanočestice generalno imaju manju antibakterijsku aktivnost od nanočestica srebra, međutim to nije uvek pravilo. Tako su *E. coli* i *S. aureus* osetljivije na dejstvo nanočestica srebra, dok je aktivnost CuO nanočestica izraženija prema *B. subtilis* i *B. anthracis* (Ruparelia *et al.*, 2008; Pey *et al.*, 2014). Nanočestice CuO ispoljavaju izraženiju antibakterijsku aktivnost od nanočestica NiO, ZnO i Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> prema *E. coli*, *B. subtilis* i *S. aureus* (Baek i An, 2011). Mehanizam antibakterijskog dejstva ovih nanočestica zasniva se na oštećenju citoplazmatske membrane kao i na nastajanju ROS vrsta (Pelgrift i Friedman, 2013).

**Titan(IV)-oksidi.** Najčešće se primenjuju u vidu nanočestica koje ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema velikom broju bakterija. Antimikrobni efekat prema različitim mikroorganizmima prisutnim u vodi poput protozoa, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* ispoljava se već nakon 8 h kontakta. TiO<sub>2</sub> modifikovan jonima srebra ili bakra ispoljava baktericidni efekat prema *E. coli* kao i prema parazitima *Leishmania tropica* i *Leishmania infantum*. Antibakterijska aktivnost TiO<sub>2</sub> zavisi od niza parametara kao što su koncentracija, vrsta mikroorganizama, pH vrednost i temperatura (Hossain *et al.*, 2014). Mehanizam antibakterijskog delovanja zasniva se na obrazovanju slobodnih radikala kiseonika (*engl.* reactive oxygen species-ROS) poput hidroksil- ( $\cdot\text{OH}$ ) i superoksid-radikala ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) kao i vodonik-peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) koji nastaju prema već prikazanoj Fentonovoj reakciji (Cho *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

**Magnezijum-oksidi.** Nanočestice MgO ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema Gram-negativnim (*E. coli*) i Gram-pozitivnim bakterijama koje obrazuje spore (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*) (Stoimenov *et al.* 2002). Pokazano je da antibakterijska aktivnost MgO prema *Bacillus subtilis* zavisi od veličine čestica ovog oksida. Tako, MgO čije čestice imaju dimenzije oko 70 nm pokazuje efikasnost oko 92 %, dok čestice dimenzija 20 nm pokazuju efikasnost oko 98 % (Huang *et al.*, 2005). Čestice MgO imaju baktericidni efekat prema *E. coli* i *B. megaterium* već nakon 20 minuta kontakta (Stoimenov *et al.*, 2002). Mehanizam antibakterijskog dejstva objašnjava se obrazovanjem superoksid-radikala ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) (Huang *et al.*, 2005). Pokazano je da efikasnost MgO nanočestica zavisi od vremena kontakta, njihove specifične

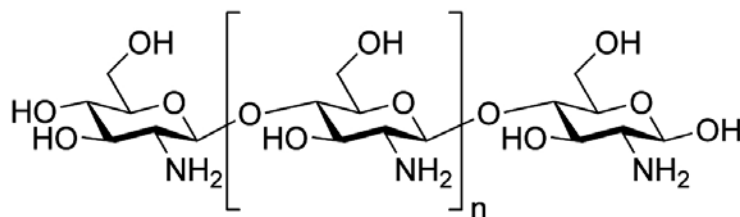
površine i sposobnosti da produkuju kiseonične radikale. Tako, MgO nanočestice manjih dimenzija mogu da produkuju veću količinu superoksida i da ubrzaju uništenje bakterija (Shi *et al.*, 2010).

**Cink-oksidi.** ZnO nanočestice ispoljavaju značajan antibakterijski efekat prema velikom broju bakterija. Na primer, mogu da inhibiraju rast *S. aureus* MRSA i meticilin-osetljivog soja *S. aureus* (*engl.* Methicillin-sensitive *S. aureus*-MSSA) kao i meticilin-otpornog soja *S. epidermidis* (*engl.* Methicillin-resistant *S. epidermidis* – MRSE) (Ansari *et al.*, 2012; Malka *et al.*, 2013). Isto tako, antibakterijska aktivnost ovih čestica zapaža se i prema *K. pneumoniae* (Reddy *et al.*, 2014), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* (Jin *et al.*, 2009), *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* (Kasraei *et al.*, 2014) i *E. coli* (Zhang i Rock, 2008; Jin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Na primer, baktericidni efekat prema *E. coli* zapaža se nakon 24 h, pri čemu je koncentracija nanočestica 2,0 g dm<sup>-3</sup> na pH 7,0 (Zhang i Rock, 2008). Nanočestice ZnO ispoljavaju veću aktivnost prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim vrstama bakterija (Shi *et al.*, 2010). S obzirom da su ove nanočestice bele bolje, blokiraju prolazak UV-svetlosti i imaju sposobnost da sprečavaju produkciju biofilma mogu se upotrebljavati kao prevlake za materijale i staklo, koji se dalje koriste u medicinske ili neke druge svrhe (Dastjerdi i Montazer, 2011; Applerot *et al.*, 2012). Mehanizam delovanja se zasniva na formiranju ROS, koji zatim ispoljavaju antibakterijski efekat prema različitim delovima bakterijske ćelije kao što su citoplazmatična membrana i ćelijski zid ili vezivanjem za DNK molekul pri čemu dolazi do mutacija (Jin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2014). Prema propisima svetske organizacije za lekove i hranu (*engl.* Food and Drug Administration-FDA) Zn se može koristiti i kao dodatak hrani (Blecher *et al.*, 2011). Značajno je da se efikasnost ZnO nanočestica kao antibakterijskog agensa ne umanjuje ni na visokim temperaturama (Hossain *et al.*, 2014) i da je cena ZnO nanočestica relativno niska (Huh i Kwon, 2011). Pokazano je da efikasnost nanočestica ZnO zavisi od veličine čestica, pH vrednosti i temperature (Hossain *et al.*, 2014).

**Aluminijum-oksidi.** Veće koncentracije nanočestica aluminijum-oksida poznate su po svojim antibakterijskim svojstvima. Tako, ove nanočestice u koncentraciji od  $500 \text{ mg dm}^{-3}$  značajno smanjuju broj ćelija vrste bakterija *E. coli*, za razliku od soja *Cupriavidus metallidurans* CH34 na koje ne deluje (Deckers *et al.*, 2009). Mehanizam dejstva ovih nanočestica zasniva se na smanjenju funkcije i nagomilavanju nanočestica unutar ćelije, pri čemu dolazi do obrazovanja „jama“ i reorganizaciji citoplazmatične membrane, što na kraju dovodi do smrti ćelije (Ansari *et al.*, 2014).

### 1.5.3. Dezinficijensi na bazi hitozana

Hitozan (slika 1.11.) je biokompatibilan i biodegradabilan polimer u čijoj biodegradaciji učestvuju brojni enzimi poput lizozima i hititridaze, koji su prisutni u fiziološkim tečnostima (Garcia-Fuentes *et al.*, 2012). Poslednjih godina se ovaj polimer izučava u različite svrhe pre svega, zbog svoje biorazgradljivosti. Tako je hitozan našao primenu kao hemostatik, lokalni analgetik, u industriji hrane, biohemijском inženjerstvu ali i kao antimikrobni agens (Chung *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004; Raafat *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2010).



Slika 1.11. Hemijska struktura hitozana (web 10).

Hitozan poseduje širok spektar antimikrobnog dejstva, pri čemu ima nešto izraženije antifungalno od antibakterijskog dejstva. Antifungalno dejstvo hitozana zasniva se na sprečavanju nastanka spora (Hernandez-Lauzardo *et al.*, 2008). Hitozan ispoljava izraženiju antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama, pri čemu se aktivnost hitozana prema Gram-negativnim bakterijama povećava kada se upotrebljava hitozan sa malom molarnom masom (No *et al.*, 2002). Zapaženo je da se antibakterijska aktivnost hitozana prema Gram-negativnim bakterijama povećava u prisustvu EDTA. Smatra se da je razlog za ovakvu aktivnost formiranje helatnih kompleksa EDTA sa  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  koji se nalaze u spoljašnjoj membrani Gram-negativnih bakterija, u lipopolisaharidnom sloju (Chung *et al.*, 2003)

pri čemu dolazi do povećanja propustljivosti membrane i otežanog rasta ćelija. Takođe, primećeno je da katjoni metala, posebno  $Zn^{2+}$ , mogu da ometaju antibakterijsku aktivnost hitozana jer reaguju sa hitozanom, stvarajući helatne komplekse (Chung *et al.*, 2003). Antibakterijska aktivnost hitozana zavisi od njegove molekulske mase, pH sredine,  $pK_a$ , naelektrisanja površine hitozana, koncentracije hitozana, vremena kontakta, kao i vrste bakterija prema kojoj se ispituje aktivnost (Rabae *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2003; Holappa *et al.*, 2006). Antibakterijski mehanizam dejstva hitozana zasniva se na interakciji hitozana sa negativno naelektrisanim grupama strukturnih molekula lociranih na površini ćelija bakterija, pri čemu dolazi do ometanja unosa supstanci iz spoljašnje sredine u ćeliju (Kong *et al.*, 2010). Takođe, hitozan može delovati na bakterije tako što dovodi do inhibicije sinteze proteina i RNK ili usled heliranja jona metala koji su neophodni za normalan ćelijski rast (Rabae *et al.*, 2003).

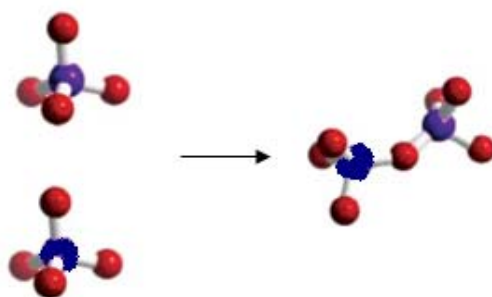
#### 1.5.4. Dezinficijensi na bazi ugljeničnih nanotuba

Ugljenične nanotube poseduju jedinstvena fizička, hemijska i mehanička svojstva kao što su velika čvrstoća i toplotna provodljivost. Zbog ovih osobina, nanotube su našle primenu u različitim industrijskim procesima poput tekstilne industrije, biotehnologija, procesima prečišćavanja voda, u solarnim ćelijama ali i kao antimikrobni agensi (Hossain *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2007). Ugljenične nanotube postoje u dva oblika: jednoslojnom i višeslojnom. Većina jednoslojnih nanotuba ima prečnik blizu jednog nanometra i dužinu nekoliko miliona puta veću dok se višeslojne nanotube sastoje od više uvijenih slojeva grafita. Prema *E. coli* jednoslojne nanotube ispoljavaju veću antibakterijsku aktivnost od višeslojnih zbog manjih dimenzija i izraženijeg oblika cilindra. Jednoslojne nanotube ispoljavaju izražen efekat na viruse koji izazivaju infekcije kod *E. coli* (MS2 bakteriofage) (Brady-Estevez *et al.*, 2008), dok višeslojne manjih dimenzija pokazuju antibakterijski efekat prema *Salmonella typhimurium* (Yang *et al.*, 2010). Antibakterijska aktivnost nanotuba zavisi od njihove građe, vremena kontakta i koncentracije (Kang *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012). Mehanizam dejstva ugljeničnih nanotuba na bakterije se zasniva na oštećenju membrane usled oksidativnog stresa koje ove tube izazivaju, koje kasnije dovodi do smrti ćelije (Kang *et al.*, 2007).

### 1.5.5. Dezinficijensi na bazi zeolita i glina

Prirodni i sintetički zeoliti, kao i gline, predstavljaju lako dostupne i jeftine sirovine, sa poroznom strukturom i velikim adsorpcionim svojstvima prema molekulima i jonima iz spoljašnje sredine. Poslednjih godina ispituju se kao nosači antimikrobnih agenasa. S obzirom da ulogu nosača ostvaruju na osnovu specifičnih strukturnih svojstava, u daljem tekstu će biti ukratko opisana njihova građa.

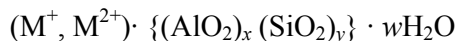
Zeoliti su kristalni mikroporozni aluminosilikati. Struktura zeolita predstavlja trodimenzionalnu mrežu, nastalu povezivanjem tetraedarskih  $(\text{SiO}_4)^{4-}$  i  $(\text{AlO}_4)^{5-}$  gradivnih jedinica preko zajedničkog kiseonikovog atoma (slika 1.12.).



**Slika 1.12.** Povezivanje primarnih gradivnih jedinica preko zajedničkih atoma kiseonika u zeolitnoj rešetci. Crvenom bojom prikazani su O-atomi, ljubičastom-Si dok su Al-atomi prikazani plavom bojom.

Međusobnim povezivanjem tetraedara dobijaju se sekundarne gradivne jedinice (*engl.* secundar building unit, SBU), dok se njihovim daljim povezivanjem dobijaju poliedri. Spajanjem poliedara dobija se konačna zeolitna struktura – pravilna, beskonačna, trodimenzionalna, kristalna rešetka zeolita. Kristalna struktura rešetke zeolita zavisi upravo od sekundarnih gradivnih jedinica nižeg reda, kao i od kombinacija u kojima one učestvuju. Tetraedri mogu biti umreženi na različite načine dajući kao rezultat više od 200 strukturnih tipova prirodnih i sintetičkih zeolita opisanih u Atlasu zeolitnih struktura (Baerlocher *et al.*, 2007). Aluminosilikatna mreža zeolita je negativno naelektrisana. Elektroneutralnost se postiže katjonima alkalnih i zemnoalkalnih metala koji se smeštaju u kanale i šupljine zeolitske rešetke.

Hemijski sastav zeolita može se prikazati opštom formulom (Breck, 1974):



gde je:

*M*- katjon alkalnog ili zemnoalkalnog metala, odnos celih brojeva  $y/x \geq 1$  (s obzirom da nisu moguće veze Al-O-Al prema Löwenstein-ovom pravilu) i *w* - broj molekula vode u svakoj jediničnoj ćeliji.

### Prirodni zeoliti

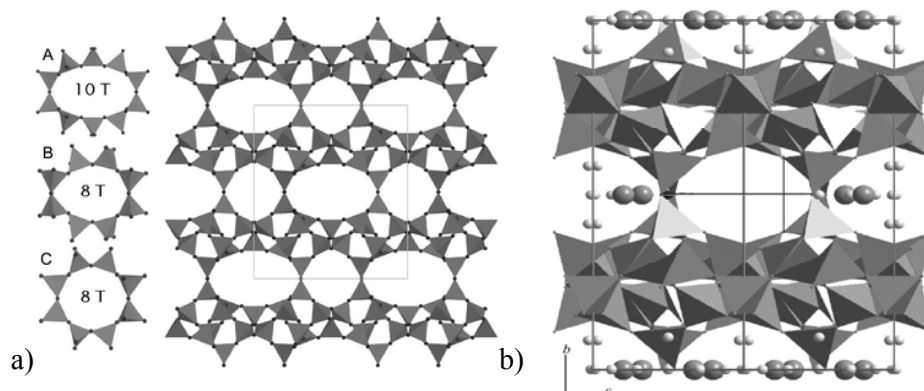
Do danas je okarakterisano i opisano oko 50 prirodnih zeolita, međutim, samo je sedam (mordenit, klinoptilolit, kabazit, erionit, ferierit, filipsit i analcim) prisutno u prirodi u dovoljnoj količini da se mogu eksploatisati (Yang, 2003). Jedan od najrasprostranjenijih prirodnih zeolita je klinoptilolit koji je ispitivan u ovom radu.

Opšta hemijska formula kojom se može prikazati sastav klinoptilolita je (Breck, 1974):



Aluminosilikatna rešetka klinoptilolita sadrži tri vrste kanala. Dve vrste kanala se pružaju duž *c*-ose i izgrađeni su od osmočlanih (4,6 x 3,6 Å) i desetočlanih prstenova (7,5 x 3,1 Å). Treća vrsta kanala se pruža duž *a*-ose i izgrađena je od osmočlanih prstenova (4,7 x 2,8 Å) (Godelitsas i Armbruster, 2003). Na slici 1.13a dat je šematski prikaz strukture klinoptilolita. Na rogljevima se nalaze atomi kiseonika (prikazani sferama) preko kojih se povezuju atomi silicijuma i aluminijuma. Slika 1.13 b prikazuje sistem kanala i šupljina unutar kojih su smešteni hidratisani katjoni i molekuli vode.

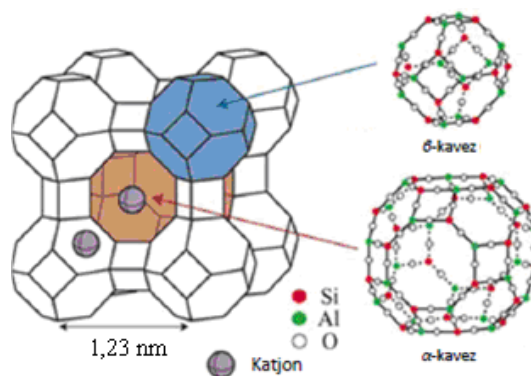




**Slika 1.13.** a) Šematski prikaz rešetke klinoptilolita koja se sastoji iz osmočlanih i desetočlanih kanala. Kanali su paralelni sa  $c$ -osom i normalni sa osmočlanim prstenom koji je dijagonalan sa  $a$ -osom. Poliedri predstavljaju atome silicijuma ili aluminijuma dok su atomi kiseonika prikazani malim sferama; b) Kanali i šupljine u rešetki klinoptilolita u kojima se nalaze molekuli vode (veće, tamnije kuglice) i hidratirani kationi (manje, svetlije kuglice) (Ockwig *et al.*, 2008).

### Sintetički zeoliti

Do danas je okarakterisano oko 200 različitih sintetičkih zeolita, od kojih se samo manji broj industrijski proizvodi i ima praktičnu primenu (Baerlocher *et al.*, 2007). U ovom radu ispitan je zeolit A pa će u daljem tekstu biti prikazana osnovna strukturna svojstva samo ovog sintetičkog zeolita.

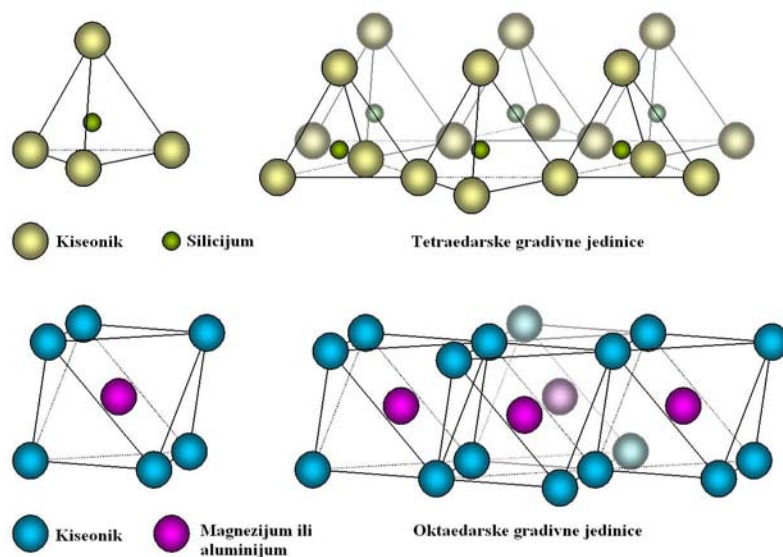


**Slika 1.14.** Struktura zeolita A (web 4).

Zeolit A je prvi sintetisani zeolit. Jedinična ćelija zeolita A prikazana je na slici 1.14. Sačinjava je osam manjih  $\beta$ -kaveza koji su smešteni na rogljevima kocke, čiji je prečnik 0,41 nm. U središtu kocke je najveća šupljina ( $\alpha$ -kavez) prečnika 1,14 nm. U obe vrste šupljina nalaze se katjoni natrijuma i molekuli vode (Baerlocher *et al.*, 2007). Zeolit A je našao primenu u industrijskoj proizvodnji deterdženata kao jono-izmenjivač, molekulska sito u razdvajanju smeša gasova kao i sredstvo za sušenje.

## Gline

Gline su hidratizirani alumosilikati sa slojevitom strukturom, pri čemu debljina slojeva iznosi oko 1 nm. Karakteriše ih velika specifična površina kao i sposobnost da bubre i da se raslojavaju. Slojevi kod glina nastaju povezivanjem tetraedarskih, odnosno oktaedarskih gradivnih jedinica preko rogljeva na kojima se nalaze atomi kiseonika. U središtu tetraedarskih gradivnih jedinica nalaze se atomi silicijuma, a u središtu oktaedarskih gradivnih jedinica nalaze se atomi aluminijuma, magnezijuma ili gvožđa (slika 1.15.). Povezivanjem oktaedarskih gradivnih jedinica sa Al ili Mg mogu nastati slojevi gipsitnog (dioktaedarski),  $\text{Al}_2(\text{OH})_6$ , ili brucitnog (trioктаedarski) tipa,  $\text{Mg}_3(\text{OH})_6$ .



Slika 1.15. Tetraedarske i oktaedarske gradivne jedinice glina (web 11).

Raspodela, broj i hemijski sastav slojeva izgrađenih od tetraedarskih (T) i oktaedarskih gradivnih jedinica (O) u slojevima određuju vrstu minerala gline, odnosno

njihova fizička i hemijska svojstva. U zavisnosti od broja i raspodele tetraedarskog i oktaedarskog sloja razlikujemo tri tipa strukture slojeva: tip 1:1 (1 T i 1 O), tip 2:1 (2 T i 1 O) i tip 2:1:1 (2 O, 1 T i 1 brucitni međusloj) (Bergaya *et al.*, 2006). Razlike u hemijskom sastavu između minerala gline u okviru jedne grupe često mogu biti posledica zamene jona metala u slojevima, što dalje može dovesti do stvaranja pozitivnog ili negativnog naelektrisanja na slojevima. Proces izmene katjona u tetraedarskim ili oktaedarskim gradivnim jedinicama katjonima slične veličine se naziva izomorfna supstitucija (Velde, 1992).

#### 1.5.5.1. Antibakterijska svojstva zeolita i glina

Ispitivanja su pokazala da gline i zeoliti ne ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Hrenović *et al.*, 2003; Top i Ulku, 2004; Malachova *et al.*, 2011; Jiraroj *et al.*, 2014). Međutim, ukoliko se modifikuju jonima metala pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost prema velikom broju mikroorganizama. Silikatni mineral paligorskit obogaćen jonima srebra i bakra pokazuje antibakterijska svojstva prema *E. coli* i *S. aureus* (Zhao *et al.*, 2006). Ag-paligorskit pokazuje baktericidni efekat prema *E. coli* nakon 6 h i prema *S. aureus* nakon 12 h. Cu-paligorskit postiže baktericidni efekat za 12 odnosno 24 h prema *E. coli* odnosno *S. aureus*, redom. Razlike u antibakterijskoj aktivnosti pripisane su različitoj građi ćelijskog zida ovih vrsta bakterija i izraženijoj aktivnosti Ag<sup>+</sup>. Tako, Gram-pozitivne bakterije (u ovom slučaju *S. aureus*) imaju deblji peptidoglikanski sloj od Gram-negativnih ćelija. Ovaj sloj štiti ćeliju od negativnih uticaja spoljne sredine, pa je iz tog razloga izraženija aktivnost jona teških metala prema Gram-negativnim bakterijama. Takođe, montmorilonit modifikovan jonima Ag, Cu i Zn pokazuje antibakterijsku i antifungalnu aktivnost prema Gram-negativnoj bakteriji *E. coli* i gljivama *Pycnopus cinnabarinus* i *Pleurotus ostreatus*. Aktivnost modifikovanog montmorilonita (MT) prema *E. coli* opada u sledećem redu: Ag-MT > Cu-MT ≈ Zn-MT, dok prema obe ispitivane gljive Ag-MT pokazuje najslabiju aktivnost. Antibakterijska aktivnost se objašnjava interakcijama katjona sa bakterijskom ćelijom, gde reaguju sa tiolnim grupama u citoplazmi. S obzirom da ovih grupa nema kod gljiva, time se objašnjava najmanja antifungalna aktivnost pomenutih katjona (Malachova *et al.*, 2011).

Aktivnost različitih metal-modifikovanih prirodnih zeolita ispitivana je prema velikom broju mikroorganizama, pri čemu najizraženiju aktivnost ispoljava Ag-modifikovani zeolit. Tako na primer, Ag-klinoptilolit pokazuje izraženiju aktivnost prema *P. aeruginosa* i *E. coli* od Cu- i Zn- modifikovanog zeolita. Rešetka Ag-obogaćenog zeolita otpušta jone srebra u malim koncentracijama (oko 1 %) pri čemu ovi zeoliti ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i *P. aeruginosa*. Ovaj klinoptilolit turskog nalazišta Gördes sa 43,4 mg Ag g<sup>-1</sup> zeolita pokazuje baktericidnu aktivnost prema *E. coli* za veoma kratak vremenski period (15-30 minuta) (Top i Ulku, 2004). Takođe, Ag-modifikovan zeolit ne samo da je dobar dezinficijens već i adsorbent za uklanjanje teških metala (Pb, Cd i Zn) (Akhigbe *et al.*, 2014). Antibakterijska aktivnost Ag-modifikovanog meksičkog zeolita čija je veličina zrna iznosila oko 2 mm ispitana je prema indikatorima fekalne zagađenosti voda, *E. coli* i *Streptococcus faecalis* (ova vrsta bakterija danas pripada rodu *Enterococcus*). Prema ovim bakterijama postignut je baktericidni efekat nakon 2, odnosno, 6 h za *E. coli* i *S. faecalis*, redom (Rivera-Garza, *et al.*, 2000). Meksički Ag-modifikovani zeolit takođe ispoljava i dobar antibakterijski efekat prema ukupnim koliformima u vodama (De la Rosa Gomez *et al.*, 2008a, 2008b, 2010). Poređenjem antimikrobne aktivnosti Cu i Ag modifikovanih prirodnih zeolita uočava se da Ag-modifikovani zeolit za kraće vreme postiže mikrobicidni efekat prema *E. coli* i *Candida albicans* (Rossainz-Castro *et al.*, 2016). Ispitana je i mogućnost primene klinoptilolita kao nosača nanočestica srebra i njegova antibakterijska aktivnost prema *E. coli* i *Salmonella typhi*. U kratkom vremenskom intervalu dolazi do smanjenja ukupnog broja ćelija bakterija *E. coli* (za manje od 60 minuta). U slučaju *S. typhi* zaključeno je da zeolit mora da sadrži veću količinu srebra da bi ispoljio baktericidno dejstvo (Guerra *et al.*, 2012). Takođe, i rumunski zeolit obogaćen jonima srebra ispoljava značajan antibakterijski efekat 99,8 i 93,5 % smanjenja broja ćelija bakterija *S. aureus* i *E. coli*; redom, dok je antifungalni efekat prema *C. albicans* nešto manji (24,5 %) (Đolić *et al.*, 2015). I sintetički zeoliti obogaćeni jonima Ag ispoljavaju antibakterijski efekat. Tako, 0,15 g dm<sup>-3</sup> srebro-modifikovanog zeolita X već nakon 45 minuta ispoljava baktericidni efekat prema *E. coli* dok je potrebno nešto duže vreme da bi se ovaj efekat ispoljio prema *P. aeruginosa* i *S. aureus* (Kwakye-Awuah *et al.*, 2008). Ag-A ispoljava baktericidni efekat prema *E. coli*, *S. aureus* i *B. subtilis*, pri čemu je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za

sve ispitivane sojeve manja od  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ag-zeolita, odnosno manja od  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  kada su na zeolitu prisutne nanočestice elementarnog srebra (Zhang *et al.*, 2009). Antibakterijska aktivnost srebro-modifikovanih zeolita pripisuje se jonima srebra izluženom iz alumosilikatne rešetke u vodeni medijum (Đolić *et al.*, 2015), nakon čega joni srebra deluju na bakterijsku ćeliju kako je već objašnjeno u poglavlju 1.2.2.1.

Antibakterijska aktivnost sintetičkih zeolita X i A modifikovanih jonima Ag, Cu i Zn ispitana je prema četiri različite vrste bakterija (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Bacillus cereus*), dva kvasca (*Candida albicans* i *Candida glabrata*) i dve plesni (*Aspergillus niger* i *Penicillium vinaceum*). MIK vrednosti za Ag-, Cu- i Zn-zeolit X prema *E. coli* iznose 64, 256 i  $512 \mu\text{g cm}^{-3}$ , redom, i može se zaključiti da srebro-modifikovani zeoliti ispoljava najizraženiji antibakterijski efekat. Isto tako, Ag-zeolit A ispoljavaju i najizraženiju antifungalnu aktivnost prema *Candida albicans*, pri čemu MIK vrednosti iznose 128, 1024 i  $2048 \mu\text{gcm}^{-3}$ , redom, za Ag-, Cu- i Zn-zeolit A. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da su bakar i cink esencijalni elementi za funkcionisanje mikroorganizama, pa se deo ovih jona iskoristi prvo za potrebe metabolizma mikroorganizama (Demirci *et al.*, 2014). Pored sintetičkog, i prirodni zeolit koji je sadržao oko 0,9 mas.%  $\text{Zn}^{2+}$ -jona pokazao je skoro baktericidni efekat prema fosfor akumulirajućoj bakteriji *Acinetobacter junii* (99 % smanjenje broja ćelija bakterija) (Stojaković, 2011b). Tokom ovih eksperimenata, izmerena količina izluženih metala iznosila je  $0,67 \text{ mg dm}^{-3}$ , što je u granicama maksimalno dozvoljenih koncentracija u vodi. Na osnovu prikazane vrednosti može se zaključiti da antibakterijsku aktivnost ispoljava sam Zn-zeolit, i da je mehanizam dejstva produkcija ROS vrsta.

Pored metal-modifikovanih zeolita, u literaturi je opisano i antibakterijsko dejstvo zeolita modifikovanih surfaktantima (površinski aktivnim materijama). Zeoliti obogaćeni heksadeciltrimetilamonijum-bromidom (HDTMA) ispoljavaju značajan efekat najpre u adsorpciji fosfat-jona, a zatim i u imobilizaciji fosfat akumulirajuće *A. junii* (Hrenović *et al.*, 2008). Bitno je napomenuti da je biološko uklanjanje fosfata iz otpadnih voda zasnovano na metabolizmu fosfor-uklanjajućih bakterija prisutnih u aktivnom mulju. Imobilizacija P-uklanjajućih bakterija na materijale koji služe kao nosači bakterija predstavlja mogućnost unapređenja ovog procesa jer se imobilizacijom postiže veća koncentracija bakterija kao i pojačana metabolička aktivnost. Prirodni

zeolit-klinoptilolit tretiran rastvorom benzalkonijum-hlorida (8,5 mas.% g<sup>-1</sup>) i rastvorom acetil-salicilne kiseline (1,9 mas.% AC g<sup>-1</sup>), pokazao je antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i *S. aureus*. Sintetisani materijali pokazali su baktericidnu aktivnost prema obe vrste bakterija nakon 24 h u koncentraciji od 0,1 g u 100,0 cm<sup>3</sup>. Ukoliko su u rastvoru prisutne koncentracije modifikovanih zeolita od 0,5 i 1,0 g u 100,0 cm<sup>3</sup> baktericidni efekat se postiže već nakon 1 h (Jevtić *et al.*, 2012). Mehanizam dejstva ovih materijala pripisuje se izluženom benzalkonijumu koji zatim ispoljava baktericidni efekat.

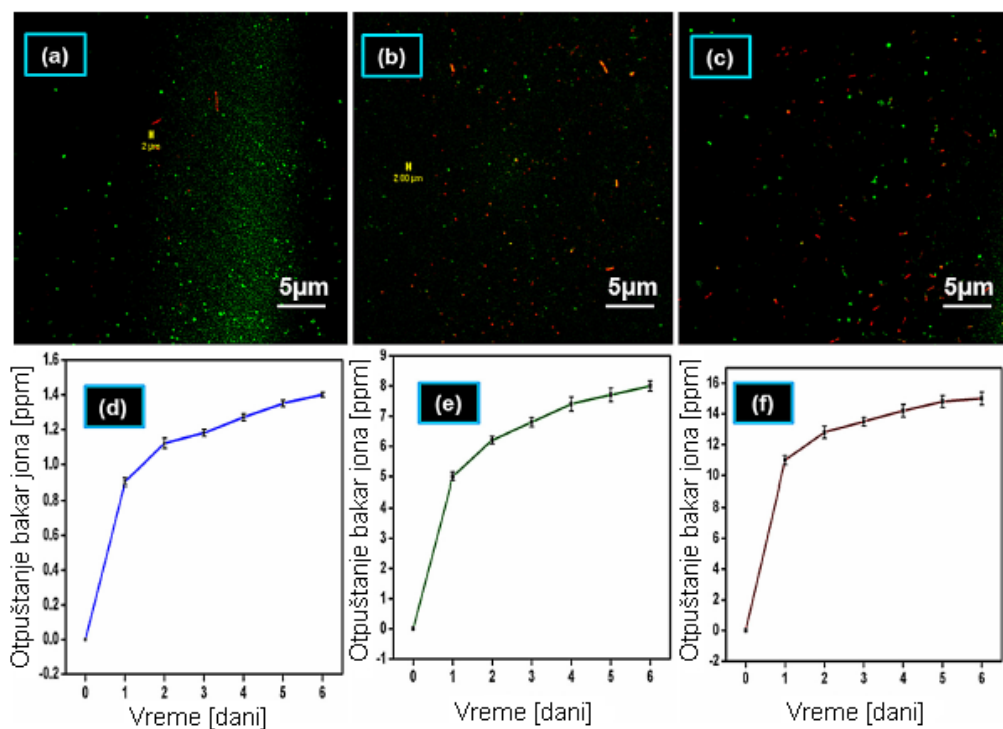
### 1.6. Novi polimerni materijali sa antimikrobnim svojstvima

Polimerni materijali su zbog svojih dobrih mehaničkih osobina našli primenu u proizvodnji potrošnog medicinskog materijala kao i u pripremi materijala za pakovanje i čuvanje hrane. Tako su endotrahijalni tubusi i kateteri napravljeni najčešće od poli(vinil-hlorida) (PVC), špricevi i posude za pakovanje lekova i uređaja, kao i posude za čuvanje hrane od poliolefina-polipropilena (PP) i polietilena (PE). Međutim, ovi materijali posle određenog vremena predstavljaju rezervoare za razne vrste bakterija. Iz tog razloga, ovi polimeri se obogaćuju agensima kako bi se poboljšala njihova antimikrobna svojstva, a da se pri tome ne utiče na reološka svojstva polimera. Poslednjih godina, zeoliti su našli primenu i kao punioci polimernih matrica, pri čemu pozitivno utiču na polimerna svojstva ovih materijala.

Kompoziti poli(vinil-hlorid) (PVC)/sintetski zeolit sa srebrom pokazali su dobru antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i *S. epidermidis*. Najizraženiju antibakterijsku aktivnost prema obe vrste bakterije ispoljili su kompoziti koji su sadržali 20 mas. % Ag-zeolita. Prisustvo zeolita u polimernoj matrici ne utiče na reološka svojstva polimera što je važan zaključak sa gledišta potencijalne ponovne obrade kompozita (Zampino *et al.*, 2011).

Antimikrobna svojstva komercijalnog Ag-zeolita (ZEOMIC AJ10D) kao punioca u poliestru, poliuretanu (PP) i silikonskoj gumi (SG) ispitivane su prema vrstama bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa* i prema kvascu *Candida tropicalis*. Kompozit na bazi PP sa 5% Ag-zeolita pokazuje izraženu antifungalnu aktivnost prema *C. tropicalis*, dok kompozit na bazi SG sa 5% Ag-zeolita pokazuje baktericidnu i fungicidnu aktivnost i prema *C. tropicalis* i *P. aeruginosa* (Kaali *et al.*, 2010).

Pored polimernih matrica, zeolit je ispitivan i kao dodatak želatinu, kako bi se takvi kompoziti primenjivali u potencijalne medicinske svrhe. Kompoziti želatin/fožasit modifikovan bakrom (Cu-X) pokazuju baktericidni efekat prema *E. coli*, a takođe je dobro pomoćno sredstvo u zarastanju *in vivo* uslovima (Ninan *et al.*, 2015). Na slici 1.16 su prikazani rezultati antibakterijske aktivnosti kompozita sa različitim sadržajem Cu-X.



**Slika 1.16.** Čelije bakterije *E. coli* pod konfokalnim mikroskopom na uzorcima sa Cu-X (mas. %) (a) 0,5% (b) 2,5; (c) 5%. Žive ćelije bakterije su prikazane zelenom a mrtve crvenom bojom. Otpuštanje bakra na uzorcima sa Cu-X (mas. %) (d) - 0,5; (e) - 2,5; (f) - 5 % (Ninan *et al.*, 2014) .

Sa slike 1.16. se jasno uočava da je broj mrtvih ćelija veći što je veća količina Cu-X u kompozitu. Tokom eksperimenta merena je i izlužena količina bakra sa kompozita, koja nakon 48 h dostiže konstantnu vrednost. Sa uzorka na kome se nalazi 0,5 % Cu-X otpušteno je oko  $1,4 \pm 0,015 \mu\text{g cm}^{-1}$  bakra nakon 6 dana, dok su veće količine otpuštene sa kompozita koji sadrže veću količinu Cu-X. Međutim, veće doze Cu su se pokazale kao letalne po ćelije u ljudskom organizmu tako da je kao optimum za korišćenje preporučen kompozit sa 0,5% Cu-X (Ninan *et al.*, 2014).

**EKSPERIMENTALNI DEO**



## 2.1. Korišćeni sojevi i izolati bakterija

U radu su korišćeni sledeći sojevi i izolati Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija:

- *Escherichia coli*:
  - Soj DSM 498 iz Nemačke banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH;
  - Izolati *E. coli* izolovani iz vodenih sredina u Republici Srbiji, dobijeni od Instituta za javno zdravlje Republike Srbije "Milan Jovanović Batut".
- *Acinetobacter baumannii*
  - Izolati *A. baumannii* izolovani u Splitskoj Univerzitetškoj bolnici (Internacionalni klon I i II i ST145). Internacionalni klonovi I i II prikupljeni su tokom dva različita vremenska intervala, prvo od 2002 do 2007 (IC I) i od 2009 do 2010 (IC II) u Kliničko bolničkom centru u Splitu (Hrvatska) (Goić Barišić *et al.*, 2009; Goić Barišić *et al.*, 2011). Soj ST145 izolovan je u Kliničko bolničkom centru u Splitu 2009 godine (Goić Barišić *et al.*, 2011).
  - Soj RUH 134 izolovan 1982. god. u Roterdamu, Holandija. Ovaj soj predstavlja prototip za Internacionalni klon II (Nigro i Hall, 2011).
- Soj *Staphylococcus aureus* DSM 799 iz Nemačke banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH.

## 2.2. Materijali i reagensi

U eksperimentima su korišćeni prirodni i sintetički zeoliti:

- 1) Zeolitski tufovi - iz rudnika Zlatokop (Vranjska Banja) – SZ  
- iz oblasti Semnan (Iran) - IZ.

U oba slučaja korišćene su frakcije zrna od 63 do 125 µm.

- 2) Sintetički zeolit A (Linde Type A, Ventron, Italija).

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- Natrijum-hlorid (NaCl, p.a., Carlo Erba);
- Bakar-sulfat-pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Carlo Erba);
- Srebro-nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , p.a., Lachner);
- Cink-sulfat-heptahidrat ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , p.a, Carlo Erba);
- Nikal-hlorid-heksahidrat ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , p.a, Carlo Erba);
- Magnezijum-sulfat ( $\text{MgSO}_4$ , p.a, Carlo Erba);

- Kalcijum-hlorid ( $\text{CaCl}_2$ , p.a, Carlo Erba);
- Kalijum-hlorid (KCl, p.a, Carlo Erba);
- Kalijum-dihidrogen-fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p.a, Carlo Erba);
- Natrijum-propionat ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_2$ , p.a, Carlo Erba);
- Tetrahidrofuran, (THF, p.a., Sigma Aldrich);
- D-Tirozin (D-Tyr, p.a., Sigma Aldrich);
- Amonijum-acetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , p.a, Carlo Erba);
- Kristal violet (Carlo Erba);
- Safranin(Carlo Erba);
- Lugolov rastvor (Carlo Erba);
- Bazični fuksin (Carlo Erba);
- Alcian blue (Sigma Aldrich);
- Hranljivi agar (Torlak, Srbija);
- Krvni agar (Biolife, Italija);
- MacConkey agar (Biolife, Italija);
- Fosfatni pufer (p.a., Sigma Aldrich);
- Baktotripton (Torlak, Srbija);
- Ekstrakt kvasca (Torlak, Srbija);
- Agar (Torlak, Srbija);
- Pepton (Torlak, Srbija).

## 2.3. Postupci

### 2.3.1. Modifikacija zeolitskog tufa

Uzorci tufova najpre su tretirani rastvorom NaCl koncentracije  $2 \text{ mol dm}^{-3}$  kako bi se obogatili jonima natrijuma. Uzorak SZ ili IZ suspendovan je u rastvor NaCl tako da maseni odnos čvrste i tečne faze bude 1:100. Suspenzija je mešana na magnetnoj mešalici tokom 48 h na sobnoj temperaturi, a čvrsti proizvodi su odvojeni filtracijom pomoću vodene vakuum pumpe, kroz filter hartiju srednje poroznosti. Uzorci označeni sa Na-SZ i Na-IZ ostavljeni su da se suše tokom 24 h na temperaturi od  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.3.2. Ispitivanje kinetike vezivanja Cu(II) i Ag za klinoptilolit (SZ i IZ) i zeolit A

Uzorci Na-SZ ili zeolita A suspendovani su u rastvore Cu(II)- ili Ag-soli različitih koncentracija ( $100-400 \text{ mg M}^+/\text{M}^{2+} \text{ dm}^{-3}$ ;  $M=\text{Ag, Cu}$ ) tako da je maseni odnos čvrste i tečne faze 1:100. Suspenzije su mešane u vodenom kupatilu (Memmert, WNB 22) pri brzini od 105 obrtaja/min na različitim temperaturama (25, 35, 45 i 55 °C). Razdvajanje suspenzija nakon određenih vremenskih intervala vršeno je filtriranjem kroz filter papir srednje poroznosti, uz pomoć vodene vakuum pumpe.

### 2.3.3. Dobijanje M-SZ, M-IZ i M-A (M- Ni, Cu, Zn i Ag)

Uzorci zeolita SZ, IZ i A koji su sadržali 5-26 mg Cu, Zn ili Ni, dobijeni su tretiranjem SZ (ili IZ) u rastvoru  $\text{MSO}_4$  ( $M=\text{konc. Cu, Zn ili Ni}$ ) koncentracije 400-600  $\text{mg M}^{2+}\text{dm}^{-3}$ . Suspenzije su mešane u vodenom kupatilu (Memmert, WNB 22) na 45 °C tokom 24 h. Uzorci zeolita SZ, IZ i A koji su sadržavali od 27 do 51  $\text{mg Ag g}^{-1}$  zeolita mešani su u vodenom kupatilu na 25 °C tokom 6 h. Odnos čvrste i tečne faze iznosio je 1:100. Čvrsta faza je iz suspenzije izdvojena filtracijom, isprana destilovanom vodom do negativne reakcije na  $\text{SO}_4^{2-}$ -jone i osušena u sušnici na 80 °C.

### 2.3.4. Dobijanje SZ sa nanočesticama NiO, CuO i ZnO

Uzorci SZ sa nanočesticama NiO, CuO i ZnO dobijeni su žarenjem Ni-SZ, Cu-SZ i Zn-SZ na 600°C prema postupku opisanom u literaturi (Rajić *et al.*, 2011). Ukratko, oksid-modifikovani zeoliti dobijeni su žarenjem metal modifikovanih zeolita (Cu-SZ, Zn-SZ i Ni-SZ) u peći za žarenje (Nabertherm B150, Nemačka) na temperaturi 550 °C sa zadržavanjem od 1 h pri čemu je brzina zagrevanja iznosila  $10 \text{ °C min}^{-1}$ . Žareni uzorci označeni su kao NiO-SZ, CuO-SZ i ZnO-SZ redom.

### 2.3.5. Priprema kompozita poli(vinil-hlorid)/M-SZ

Ag-SZ i Cu-SZ sa 0,5 mmol M po gramu zeolita ( $M = \text{Ag ili Cu}$ ) dodati su u različitim masenim procentima (1, 3, 5, 10, 15 mas. %) u rastvor u kome je 1,0 g komercijalnog endotrahijalnog tubusa (Rüsch, Teleflex Medical, Malezija) rastvoren u  $20 \text{ cm}^3$  tetrahidrofurana (THF). Suspenzije su mešane na magnetnoj mešalici 2 h na  $150 \text{ obr min}^{-1}$ , nakon čega su još 10 minuta mešane na  $8000 \text{ obr min}^{-1}$  (Ultra turrex, IKA T18, Nemačka). Nakon toga, suspenzije su izliven u Petri šolje prečnika 55 mm,

ostavljene da se suše na vazduhu 72 h i zatim u vakuum sušnici tokom 6 h (Duo-vac oven, Labline Instruments, Koči, Indija). Dobijeni kompoziti (debljine oko 350  $\mu\text{m}$ ) su zatim odvojeni i isečeni na pločice kvadratnog oblika površine 1  $\text{cm}^2$  (mase oko 0,05 g). Kompoziti su označeni kao SZ5, SZ10, SZ15, Cu-SZ5, Cu-SZ10, Cu-SZ15 i Ag-SZ1, Ag-SZ3, Ag-SZ5, Ag-SZ10, Ag-SZ15, gde broj označava procenat SZ, Ag-SZ ili Cu-SZ u kompozitu. Svi kompoziti su, pre ispitivanja antibakterijskih svojstava, sterilisani u 70 vol.% etanolu tokom 10 min i osušeni na 37 °C kako bi se izbeglo eventualno mikrobiološko zagađenje. Jedan deo svih sintetisanih, prethodno sterilisanih kompozita impregniran je rastvorom D-Tirozina (D-Tyr) tako što su suspendovani u rastvor D-Tyr koncentracije 100  $\text{mg dm}^{-3}$ . Suspenzije su ostavljene tokom 16 h na temperaturi 37 °C uz mešanje od 150  $\text{obr min}^{-1}$ . Nakon toga, kompoziti su isprani fosfatnim puferom (PBS), čija je pH vrednost iznosila 7,2.

### 2.3.6. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Pre svakog eksperimenta bakterijske kulture uzgajane su na čvrstoj hranljivoj podlozi (16 h, na 37 °C) kako bi dostigle *log*-fazu rasta, a zatim je sveža bakterijska biomasa suspendovana u 9,0  $\text{cm}^3$  sterilnog fiziološkog rastvora (0,85 mas.% NaCl). Bakterijska suspenzija je zatim homogenizovana na vorteksu (Kartell TK3S, Krakov, Poljska) tokom 3 min i korišćena u daljim eksperimentima. Broj vijabilnih ćelija bakterija u svim eksperimentima određivan je na samom početku eksperimenta, kao i nakon određenog vremenskog intervala. Mikroskopskim pregledom (svetlosni mikroskop Olympus, CX21, SAD) Gram bojenih bakterija utvrđeno je razređenje bakterijske suspenzije. Bojenje po Gramu izvođeno je standardnim postupkom (Stilinović i Hrenović, 2009, Prilog 3).

Suspenzije su razblaživane do  $10^{-9}$  ćelija bakterija  $\text{cm}^{-3}$  u sterilnom fiziološkom rastvoru nakon čega je zapremina od 0,1  $\text{cm}^3$  suspenzije zasejavana na čvrstu hranljivu podlogu (hranljivi agar dobijen mešanjem 41,3 g hranljivog agara i 1,0  $\text{dm}^3$  destilovane vode, Luria Bertani (LB), čiji je sastav prikazan u tabeli 2.1., ili MacConkey agar: 50 g MacConkey agara i 1,0  $\text{dm}^3$  destilovane vode). Kod uzoraka gde pregledom na svetlosnom mikroskopu nije utvrđen značajniji rast bakterija, suspenzije su filtrirane membranskom filtracijom kroz nitrocelulozne filtere (prečnik pora 0,20  $\mu\text{m}$ ), nakon čega su filteri ostavljeni na čvrstom hranljivom agaru. Zasejane ploče su termostatirane

tokom 24 h na 37 °C i potom su bakterijske kolonije prebrojane pomoću brojača kolonija (Stuart Colony Counter SC6, SAD). Broj ćelija bakterija je izražavan kao CFU cm<sup>-3</sup>, odnosno CFU cm<sup>-2</sup> (CFU-colony forming units).

**Tabela 2.1.** Sastav hranljivih medijuma.

Reagens	Medijum	
	Tečni LB	Čvrsti LB
Baktotripton	10,0 g	10,0 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g	5,0 g
NaCl	10,0 g	5,0 g
Agar	/	15,0 g
Destilovana voda	1,0 dm <sup>3</sup>	1,0 dm <sup>3</sup>

pH vrednost tečnog medijuma iznosila je 7,2.

### 2.3.6.1. Antibakterijska aktivnost prema *E. coli* DSM 498 i *S. aureus* DSM 799

*E. coli* DSM 498 i *S. aureus* DSM 799 najpre su uzgajane na čvrstom LB agaru a zatim suspendovane u sterilni fiziološki rastvor koji je homogenizovan na vorteksu.

Antibakterijska aktivnost ispitivana je u tri različita vodena medijuma:

- Tečni LB- medijum;
- Sintetička voda (1,0 g Na-propionata, 0,1 g peptona, 0,01 g MgSO<sub>4</sub>, 0,006 g CaCl<sub>2</sub>, 0,03 g KCl, 0,03 g ekstrakta kvasca i 0,02 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u destilovanoj vodi, do zapremine od 1,0 dm<sup>3</sup>)
- Realni efluent iz sekundarnog taložnika za prečišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (efluent je pre upotrebe profiltriran kroz tehnički filter, a zatim kroz Sartorius filtere prečnika pora 0,45 µm i 0,20 µm).

Vrednost pH svih medijuma podešana je na 7,0. U šotove boce zapremine 250,0 cm<sup>3</sup> odmereno je po 50,0 cm<sup>3</sup> svakog medijuma nakon čega su boce sterilisane u autoklavu (121°C, 20 min). Zatim je u boce dodato po 1,0 g prethodno sterilisanog Cu-, Zn- ili Ni-SZ (ili 1 ili 5 g CuO-, ZnO-, NiO-SZ) i 1,0 cm<sup>3</sup> pripremljene bakterijske suspenzije koje su potom ostavljane u vodenom kupatilu (Memmert, WNB22) tokom 1 i 24 h, pri mešanju od 105 obr min<sup>-1</sup>. Kontrolne boce sadržavale su 1,0 g SZ.

### 2.3.6.2. Antibakterijska aktivnost prema soju *E. coli* DSM 498 i izolatima *E. coli*

Sveže pripremljene bakterijske suspenzije *E. coli* DSM 498 kao i izolata *E. coli* dodate su u sledeće vodene medijume:

1. Peptonska voda (10,0 peptona-4 i 5,0 g NaCl rastvoreno je u 1,0 dm<sup>3</sup> destilovane vode) - PV
2. Voda iz Savskog jezera u Beogradu (profiltrirana kroz tehnički filter, a zatim kroz Sartorius filtere prečnika pora 0,45 µm i 0,20 µm) - SV
3. Komercijano dostupna voda (Jana, izvor Jamnica u Hrvatskoj) - JV

Antibakterijska aktivnost M-IZ i M-A (M=Cu, Zn, Ag) u realnim vodama (SV i JV) ispitana je na sličan način kao što je opisano u 2.3.6., suspendovanjem 0,1 g M-IZ ili M-A u 100 cm<sup>3</sup> vodenog medijuma. Suspenzije su ostavljene na mešanju tokom određenih vremenskih intervala (1, 3, 6 i 24 h) pri brzini od 105 obr min<sup>-1</sup>.

Kriva rasta *E. coli* DSM 498 i izolata *E. coli* kao i antibakterijska aktivnost M-IZ i M-A (M-Cu, Zn i Ag) u PV određena je merenjem optičke gustine suspenzije na 630 nm (OD<sub>630</sub>, engl. Optical Density-OD), korišćenjem Microplate reader-a (Elx808, BioTek Instruments, Inc., USA) sa softverskim programom Gen5<sup>TM</sup>. Najpre su bakterijski sojevi ostavljeni preko noći u hranljivom bujonu. Zatim su od tih prekonocnih kultura napravljene bakterijske suspenzije koje su sadržale oko 10<sup>5</sup> do 10<sup>6</sup> CFU cm<sup>-3</sup>. U otvore na sterilnoj mikrotitarskoj ploči dodata je suspenzija M-IZ ili M-A u PV (50 cm<sup>-6</sup>) i 50 cm<sup>-6</sup> prethodno pripremljene bakterijske suspenzije. Za kontrolne sisteme (negativne probe) korišćena je samo PV dok su kao pozitivne kontrole korišćene bakterijske suspenzije ispitivanih izolata i soja.

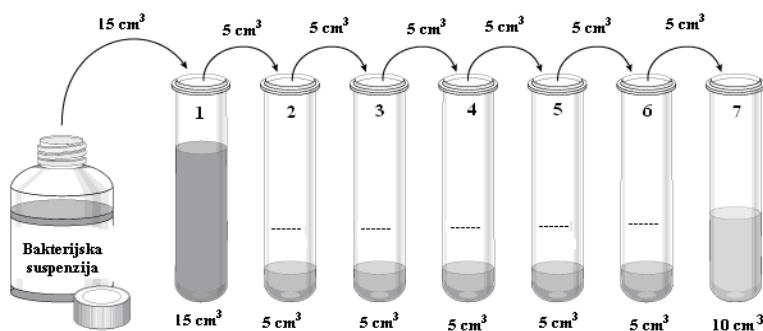
Optička gustina suspenzija merena je na svakih sat vremena tokom 24 h, uz mešanje pre svakog merenja. Rezultati su prikazani kao zavisnost OD<sub>630</sub> od vremena. Sva merenja rađena su u triplikatu.

### 2.3.6.3. Antibakterijska aktivnost prema kliničkim izolatima *A. baumannii* IC I i IC II

U ovim eksperimentima određivana je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) zeolita.

Sveže pripremljena bakterijska suspenzija (1,0 cm<sup>3</sup>) dodata je u 100,0 cm<sup>3</sup> sterilnog fiziološkog rastvora. U ovako pripremljenu suspenziju dodati su uzorci zeolita

u koncentraciji  $1000 \text{ mg dm}^{-3}$ . U sterilne epruvete dodato je po  $15,0 \text{ cm}^3$  pripremljene suspenzije i napravljeno 7 razblaženja u fosfatnom puferu kako je prikazano na slici 2.1. Uzorci su razblaženi standardnim postupkom razblaženja (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007).



**Slika 2.1.** Šematski prikaz ekperimenta. Koncentracija zeolita u epruvetama iznosila je: 1-  $1000 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 2-  $500 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 3-  $250 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 4-  $125 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 5-  $62,5 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 6-  $31,2 \text{ mg dm}^{-3}$ ; 7-  $15,6 \text{ mg dm}^{-3}$ .

Epruvete su ostavljene u inkubatoru tokom 1 i 24 h, na temperaturi od  $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , na magnetnoj mešalici pri  $120 \text{ obr min}^{-1}$ . Kontrolne epruvete su postavljene samo sa uzorcima SZ (konc.  $1000 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Broj vijabilnih ćelija bakterija određen je na početku ekperimenta, nakon 1 i 24 h standardnim postupkom. Prisustvo ekstracelularnih polisaharida, tj. biofilma potvrđeno je bojenjem kultura nakon 24 h sa Alcian blue bojom, standardnim postupkom (Stilinović i Hrenović, 2009).

#### **2.3.6.4. Antibakterijske aktivnosti kompozita PVC/M-SZ prema kliničkom izolatu *A. baumannii* ST145**

Bakterijska biomasa uzgajana je na krvnom agaru (16 h,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dok je bakterijska suspenzija napravljena suspendovanjem bakterijske biomase u PBS-puferu. U sterilne epruvete dodato je po  $5 \text{ cm}^3$  bakterijske suspenzije i oko 0,05 g PVC/M-SZ (M = Ag ili Cu). U boce koje su određene kao kontrola dodat je samo PVC. Broj planktonskih vijabilnih ćelija bakterija određen je na početku ekperimenta i nakon 24 h kontakta bakterijske suspenzije i kompozita. Broj ćelija imobilisanih na kompozitima određen je nakon 24 h zasejavanjem na hranljivom agaru, dok su imobilisane ćelije

odvojene od kompozita tako što je kompozit suspendovan u PBS-puferu i tretiran vorteksom tokom 5 minuta na 45 Hz.

Imobilisane bakterije su zatim zasejavane na čvrste hranljive podloge opisanim postupkom i broj ćelija bakterija predstavljen je kao CFU cm<sup>-2</sup>.

## 2.4. Metode i postupci

### 2.4.1. Određivanje koncentracije metala u rastvoru

Koncentracije jona bakra, cinka, nikla i srebra u rastvoru određivane su pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra (SpectrAA Varian 55B, Australija). Tačnost merenja iznosila je ± 2%. Vrednost je određena kao srednja vrednost tri merenja. Masa vezanih metala određena je prema formuli:

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_e)}{M}$$

gde su:

$q_t$  - količina Cu(II) na zeolitu;

$V$  - zapremina rastvora;

$C_0$  - početna Cu(II) koncentracija u rastvoru;

$C_e$  - ravnotežna Cu(II) koncentracija u rastvoru;

$M$  - masa zeolit.

### 2.4.2. Određivanje kapaciteta katjonske izmene zeolita (KKI)

Vrednost KKI je određena standardnim postupkom jonske izmene u rastvoru amonijum-acetata konc. 1,0 mol dm<sup>-3</sup> (Schollenberger i Simon, 1945). U filtratu je nakon razdvajanja suspenzije izmerena koncentracija jona Na, K, Ca i Mg metodom AAS (SpectrAA 55B, Varian, Australija). Vrednost KKI izražena je količinom jednovalentnih jona u 100,0 g uzorka {mmol M<sup>+</sup>/100 g SZ (IZ)}.

### 2.4.3. Identifikacija bakterijskih izolata

Bakterijske kulture su najpre uzgajane na MacConcey-evom agaru tokom noći na 37 °C. Identifikacija bakterijskih sojeva određena je na uređaju VITEK-MS (Bioremediex, Francuska) prema uputstvu proizvođača, upotrebom specifičnih matriksa.



#### 2.4.4. Određivanje antibiotske rezistencije bakterijskih sojeva

Otpornost ispitivanih bakterijskih sojeva prema antibioticima ispitana je na Institutu dr Milan Jovanović Batut, u Beogradu, na uređaju VITEK 2 Compact 15. Kako je već opisano u Milenković i saradnici (Milenković *et al.*, 2017) bakterijske ćelije su uzgajane na MacConkey-evom agaru, tokom 16 h na 37 °C. Za određivanje antibiograma korišćene su kartice AST-N204 kojima se utvrđuje antibiotska osetljivost Gram-negativnih sojeva. Antibiotska rezistencija određena je prema uputstvu proizvođača, u skladu sa EUCAST kriterijumima za kliničke sojeve bakterija (web 3).

#### 2.4.5. Analiza oslobođenog ćelijskog materijala

Količina oslobođenog ekstraćelijskog materijala određena je merenjem apsorbance na 260 nm (Carson *et al.*, 2002). Ukratko, bakterijske suspenzije koje su sadržale  $10^5$ - $10^6$  CFU  $\text{cm}^{-3}$  razblažene su u odnosu 1:100 i profiltrirane kroz filter čija veličina pora iznosi 0,22  $\mu\text{m}$ . U dobijene suspenzije dodat je M-IZ (M = Cu, Zn ili Ag) u koncentraciji 0,1 g M-IZ/100  $\text{cm}^3$ . Svi uzorci ostavljani su u inkubatoru na 37 °C tokom 1, 3 i 6 h (Cu- i Zn-IZ), ili 10, 20, 30 i 60 min (Ag-IZ). Apsorbance su izmerene upotrebom Shimadzu UV-1800 UV-VIS spektrofotometra. Sva merenja su rađena u triplikatu.

#### 2.4.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati dobijeni ispitivanjem antibakterijske aktivnosti, obrađeni su u programu Statistica Software 8.0 (StatSoft, Tulsa USA). Broj ćelija bakterija CFU  $\text{cm}^{-3}$  ili CFU  $\text{cm}^{-2}$  je, pre obrade podataka, prvo logaritmovan. Upoređivanje dobijenih podataka je rađeno jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) nakon čega je urađen Dankanov test da bi se uporedili odgovarajući parovi medijuma ili adsorbenata. Kao statistički značajni podaci uzeti su oni za koje je  $p < 0,05$ .

### 2.5. Karakterizacija uzoraka zeolita

#### 2.5.1. Rendgenska difrakcija praha (XRD)

Rendgenska analiza uzoraka zeolita vršena je na sobnoj temperaturi korišćenjem difraktometra za praškaste uzorke, Ital Structure APD2000 ( $\text{CuK}_\alpha$  zračenje 1,54178 Å). Svi difraktogrami su snimljeni u opsegu  $2\theta$  od 3 do 50° sa korakom 0,02° u sekundi.

### 2.5.2. Termogravimetrijska analiza (TG/DSC)

Za termičku analizu uzoraka zeolita korišćen je SDT Q600, TA Instruments. Analiza je izvedena u struji azota, ili vazduha, pri protoku od  $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , sa brzinom zagrevanja od  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ .

### 2.5.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija spregnuta sa X-zračnom energetsko-disperzivnom spektroskopijom (SEM/EDS)

Morfologija uzoraka ispitana je metodom SEM, dok je elementni sastav utvrđen EDS-analizom. Površina uzoraka zeolita sa imobilisanim bakterijama kao i elementni sastav uzoraka zeolita ispitani su pomoću elektronskog mikroskopa, JEOL JSM-6610 LV. Površina uzorka je pre analize, radi bolje provodnosti, naparena zlatom (LEICA SCD005).

Uzorci zeolita su pripremljeni tako što su zatapani u epoksidnu smolu nakon čega su ispolirani dijamantskom pastom i tankim slojem grafita. Na osnovu razlike u osvetljenosti površine uočava se prisustvo pojedinih mineralnih faza u zeolitskom tufu. Mikrobiološki preparati su pripremljeni tako što su tretirani rastvorima NaCl (0,1 mas.%) u etanolu (30, 50, 70, 96 vol. %, apsolutni etanol) tokom 2-5 min (Prilog 4). Osušeni materijal je aseptički prenet u sterilnu Petri šolju i ostavljen u eksikatoru do SEM-analize.

### 2.5.4. Analiza uzoraka biomase metodom proširene rendgenske spektroskopije za detalje strukture (EXAFS i XANES)

EXAFS i XANES analize uzorka biomase i standarda rađene su u laboratoriji ELETTRA u Trstu, Italija. Kao standardi korišćeni su spektri prethodno sintetisanih kompleksa srebra: Ag-alanina (Ag-Ala), Ag-imidazola (Ag-Imid) i Ag-cisteina (Ag-Cys) koji su sintetisani postupkom opisanim u literaturi (Gmelin, 1975) kao i Ag-citrat koji je sintetisan poznatim postupkom (Đokić, 2008). U svim sintezama je kao izvor srebra korišćen  $\text{AgNO}_3$ . Kompleksi su nakon sinteze čuvani u mraku, zaštićeni od svetlosti. Analiza je obavljena po proceduri objavljenoj u Bavenkamp i saradnici (Bavenkamp *et al.*, 2013b) uz korišćenje Si(111) monohromatora. Snimljeni spektri su analizirani IFEFFIT programom (Ravel i Newville, 2005). Hemijski sastav kompleksa

proveren je infracrvenom spektroskopijom. Biomasa bakterijskih ćelija pripremana je postupkom opisanim u Prilogu 5.

### 2.5.5. Karakterizacija uzoraka kompozita

Dinamički reološki parametri kompozita mereni su upotrebom reometra Discovery Hybrid HR2 (TA Instruments, USA). Merena su reološka svojstva rastopa kao i dinamičko-mehanička svojstva čvrstih uzoraka kako je opisano u referenci Milenković i saradnici (Milenković *et al.*, 2014). Reološka svojstva rastopa na temperaturama 180, 190 i 200 °C analizirana su koristeći periodične oglede između paralelnih ploča (prečnik: 25 mm; rastojanje 500 μm), u opsegu frekvencija 0,1-100 rad s<sup>-1</sup> i pri deformaciji 0,5%.

Dinamičko-mehanička svojstva čvrstih uzoraka pri uvijanju analizirana su u opsegu temperatura 25-120 °C, pri deformaciji 0,5 % i ugaonoj frekvenciji od 1 Hz. Uzorci u obliku epruveta (veličina epruveta 50 x 12 x 1 mm) pripremljeni su topljenjem PVC i PVC/NZ tankih filmova u metalnom kalupu na 180 °C tokom 1 h, i dalje kompresijom pri 1,5 MPa tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Kompleksna dinamička viskoznost uzoraka u obliku rastopa, dobijena na različitim temperaturama, korišćena je za izračunavanje energije aktivacije tečenja ( $E_a$ ). Energija aktivacije tečenja ( $E_a$ ) je izračunata koristeći Arenijusovu jednačinu:

$$\eta^* (T) = A e^{E_a/RT}$$

gde je  $\eta^*$  kompleksna dinamička viskoznost,  $T$  temperatura,  $R$  univerzalna gasna konstanta i  $A$  konstanta vezana za polimer.

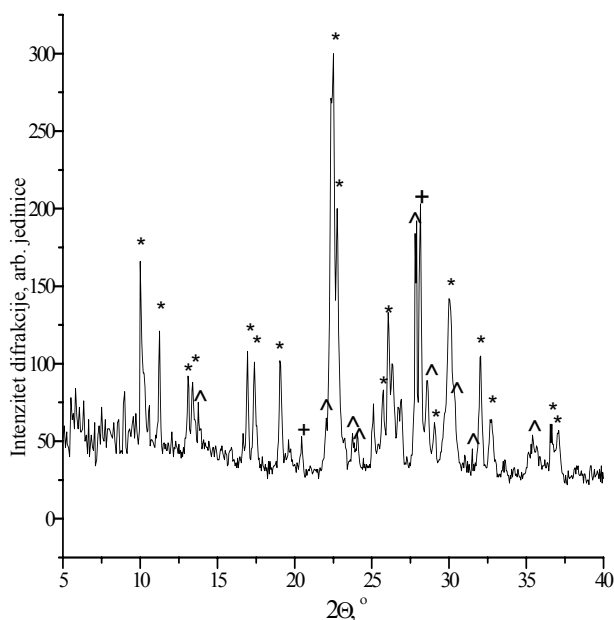
## **REZULTATI I DISKUSIJA**

### 3.1. Karakterizacija uzoraka zeolita

#### 3.1.1. Minerološka analiza zeolitskih tufova

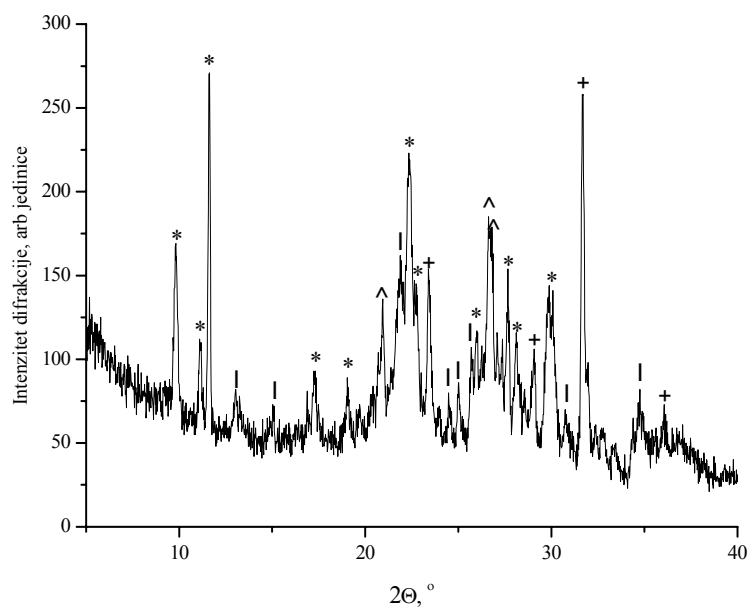
U radu su korišćena dva zeolitska tufa - iz rudnika Zlatokop u Vranjskoj Banji (SZ) i iz oblasti Semnan u Iranu (IZ) kao i sintetički, komercijalno dostupan zeolit A.

Sadržaj zeolitske faze u tufovima određen je kvantitativnom rendgenskom analizom (metoda Rietveld-ovog utičnjavanja). Na slici 3.1. prikazan je difraktogram praha uzorka tufa iz rudnika Zlatokop. Uočava se da je uzorak kristaliničan sa difrakcijama koje odgovaraju prisustvu klinoptilolita ( $2\Theta$ , °: 9,87; 11,2; 17,40; 22,46; 22,89; 26,47; 30,05; 32,03; 32,7; 36,71; 37,10) feldspata-plagioklasa ( $2\Theta$ , °: 20,4; 28,2) i kvarca (22,03; 27,87; 28,55; 30,62; 31,21; 35,51) (web 2). Uzorak sadrži 72,6 mas.% klinoptilolita, 14,6 mas.% feldspata-plagioklasa i 12,8 mas.% kvarca.



**Slika 3.1.** Difraktogram praha zeolitnog tufa SZ (značenje simbola: \* - klinoptilolit; +- feldspat; ^ - kvarc).

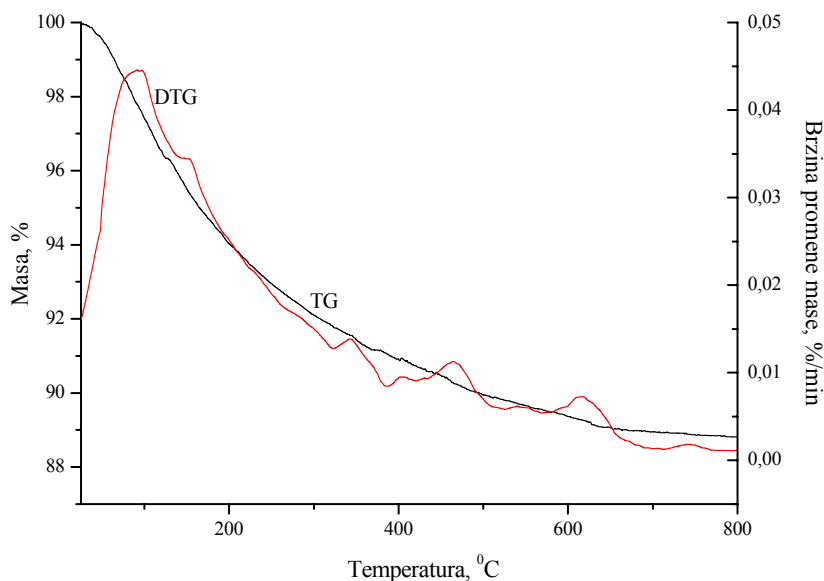
Na slici 3.2 prikazan je difraktogram uzorka IZ. Sadržaj klinoptilolita u ovom tufu iznosi oko 60 mas.%, dok su prateće mineralne faze pored kvarca (22,8 mas.%), kalcit (8,48 mas.%;  $2\Theta$ , °: 23,07; 29,42; 31,45 i 36,00) i anortit (14,8 mas.%;  $2\Theta$ , °: 13,57; 14,18; 15,31; 20,35; 21,99; 24,59; 24,70; 27,80; 29,35; 35,04).



**Slika 3.2.** Difraktogram prahe zeolitnog tufa IZ (značenje simbola: \*-klinoptilolit; ^-kvarc; +-kalcit; I-anortit).

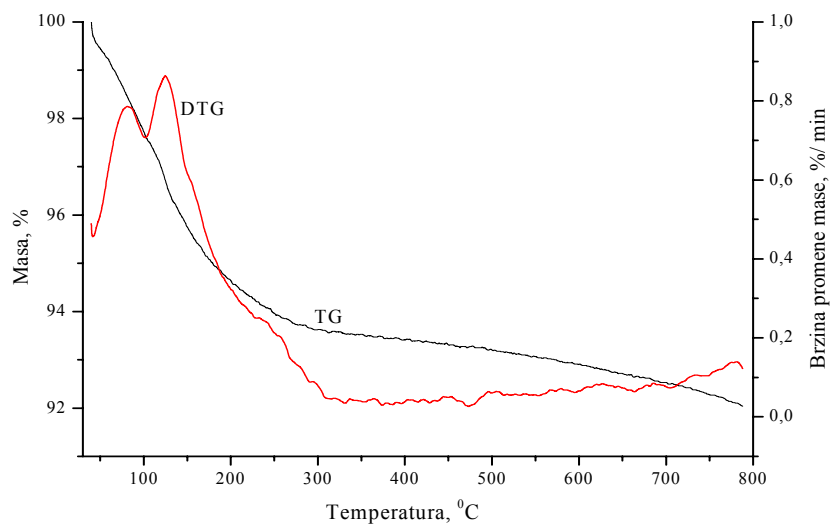
### 3.1.2. Termogravimetrijska analiza

Termijska analiza uzorka SZ (slika 3.3) pokazala je da zagrevanjem uzorka u temperaturnom intervalu od 25 do 620 °C gubitak mase iznosi 11,0 mas.%. Na DTG-krivoj zapažaju se maksimumi na 90, 340, 470 i 620 °C što upućuje na nekontinualan proces dehidracije.



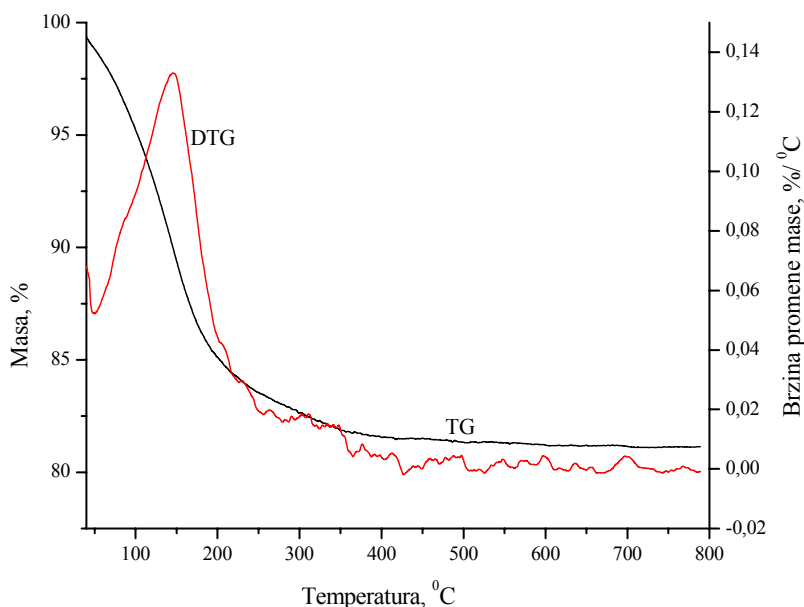
**Slika 3.3.** TG-DTG-krive uzorka SZ (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).

Uzorak IZ zagrevanjem do 800 °C gubi oko 8 mas.% (slika 3.4.). Proces dehidracije se razlikuje u odnosu na uzorak SZ. Na DTG-krivoj zapažaju se samo dva maksimuma na 90 i 120 °C. Proces dehidracije je najvećim delom završen na 400 °C kada je uzorak izgubio oko 8 mas.%.



**Slika 3.4.** TG-DTG-krive uzorka IZ (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).

Poređenja radi, na slici 3.5. prikazan je termogram zeolita A. Uzorak do 250 °C izgubi oko 20 mas.%. Dalje promene mase, zagrevanjem do 600 °C, se ne dešavaju. Maksimum na DTG-krivoj je na 145 °C.

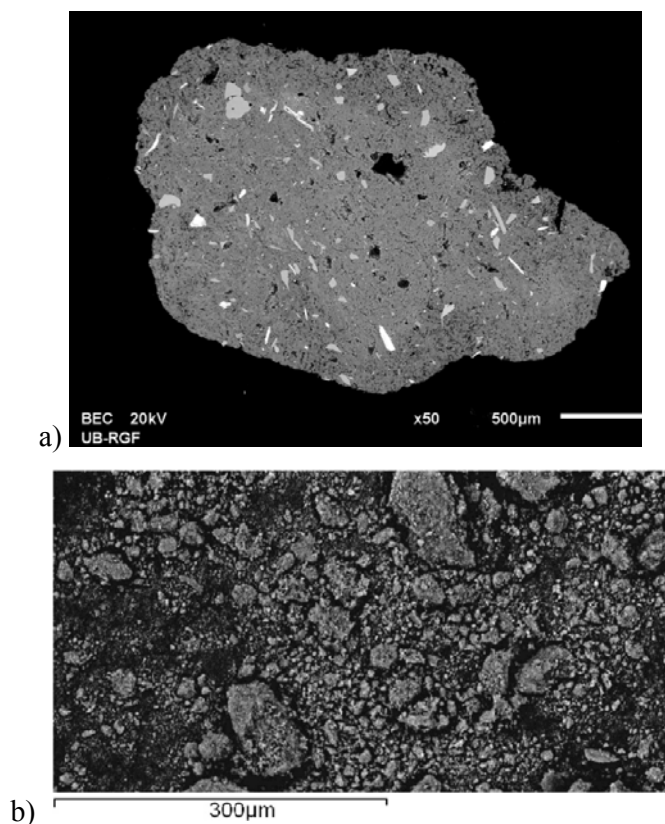


**Slika 3.5.** TG-DTG-krive zeolita A (TG kriva označena je crnom a DTG kriva crvenom linijom).

### 3.1.3. SEM i EDS-analiza

Morfologija i elementni sastav uzoraka SZ i IZ ispitani su metodom kuplovane SEM/EDS. Na slici 3.6. prikazana je površina zrna uzorka SZ i IZ koji su pripremljeni za metalografsku analizu. Zapažaju se različito osvetljene mineralne faze. Iz vrednosti molskog odnosa Si/Al koji je određen EDS-analizom, zaključeno je da područja sa glatkom površinom pripadaju feldspatu, dok nehomogena površina pripada klinoptilolitu.





**Slika 3.6.** SEM fotografije a) uzorak SZ i b) IZ. Tamnije sive površine predstavljaju klinoptilolit, dok svetlije sive površine predstavljaju kvarc.

Hemijski sastav uzoraka SZ i IZ prikazan je u tabeli 3.1.

**Tabela 3.1.** Elementni sastav uzoraka SZ i IZ.

at.%	Al	Si	Na	Mg	K	Ca	Fe
SZ	3,20	14,7	0,32	0,37	0,26	1,00	0,04
IZ	2,95	14,9	1,75	0,00	1,48	0,01	-

Molski odnos Si/Al u analiziranoj fazi uzorka SZ iznosi 4,60 dok je kod uzorka IZ ova vrednost 5,0. S obzirom da je molski odnos Si/Al kod klinoptilolita u opsegu 4,5-5,5 (Godelistas i Armbruster, 2003) možemo zaključiti da je EDS-metodom analizirana površina klinoptilolita.

Takođe, eksperimentalno su određene vrednosti katjonskog kapaciteta izmene (KKI). Vrednosti prikazane u tabeli 3.2. pokazuju trend koji nije u skladu sa određenim

molskim odnosom Si/Al i sadržajem klinoptilolita u uzorcima tufa. Naime, veća vrednost KKI očekivala bi se za uzorak sa većim sadržajem Al, tj. kod uzorka SZ u kome je i veći sadržaj klinoptilolita.

**Tabela 3.2.** Katjonski kapacitet izmene (KKI) zeolitskih tufova SZ i IZ.

Zeolit	Koncentracija (mmol M <sup>+</sup> /100g)				
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Σ
SZ	20,9	14,5	44,0	19,1	142,5
IZ	161,7	15,4	45,2	3,6	225,9

Na osnovu prikazanih koncentracija u tabeli 3.2. uočava se da je koncentracija natrijuma u uzorku IZ čak osam puta veća nego kod uzorka SZ. Koncentracije kalijuma i kalcijuma su slične, dok je koncentracija magnezijuma pet puta veća u uzorku SZ. Navedeno potvrđuje činjenicu da vrednost KKI tufova zavisi u velikoj meri od nalazišta kao i od prisustva drugih faza (Godelistas i Armbruster, 2003).

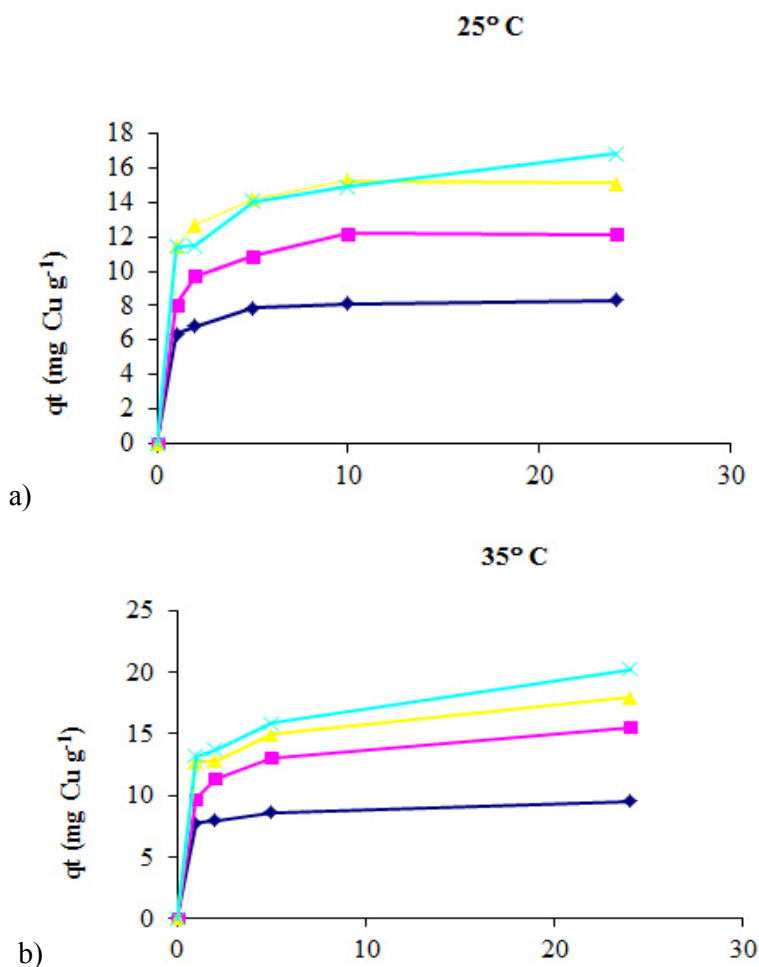
### 3.1.4. Ispitivanje kinetike i termodinamike adsorpcije katjona metala za klinoptilolit

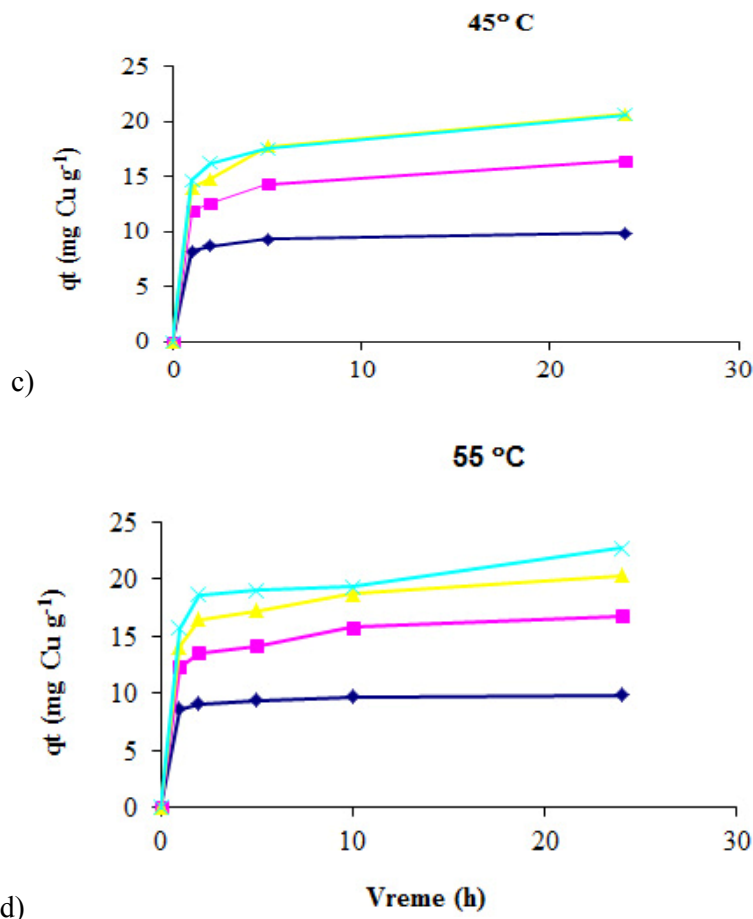
U prethodnim istraživanjima detaljno je ispitan afinitet prirodnog klinoptilolita (uzorak SZ) prema jonima nikla i cinka (Rajić *et al.*, 2010; Stojaković *et al.*, 2011b). Na 25°C, klinoptilolit pokazuje različit afinitet prema ispitivanim katjonima. Za početnu koncentraciju rastvora od 100 mg dm<sup>-3</sup> vezuje se 1,9 odnosno 5,5 mg M g<sup>-1</sup> zeolita (M= Ni i Zn, redom), dok se iz rastvora koncentracije 400 mg dm<sup>-3</sup> na istoj temperaturi vezuje 2,8 odnosno 9,5 mg Ni(II) odnosno Zn(II), redom. Sa porastom temperature raste i adsorbovana masa katjona metala za zeolit, pa se tako, na 45 °C, pri početnoj koncentraciji rastvora od 400 mg dm<sup>-3</sup> vezuje oko 8,5 odnosno 14 mg Ni odnosno Zn, redom. Masa vezanih katjona raste i sa porastom vremena kontakta zeolita i rastvora. Na primer, na temperaturi od 25 °C, iz rastvora koncentracije 100 mg dm<sup>-3</sup> tokom dva sata vezuje se oko 0,6 i 2 mg Ni(II) odnosno Zn(II), dok se za iste uslove nakon 24 h vezuje 1,9 odnosno 5,5 mg M g<sup>-1</sup>zeolita (M= Ni i Zn, redom). Na osnovu rezultata, može se izvesti zaključak da adsorbovana masa katjona metala za zeolit raste sa porastom početne koncentracije rastvora i temperature kao i sa vremenom kontakta.

U ovom radu biće prikazana detaljna kinetika i termodinamika vezivanja jona Cu(II) za prirodni zeolit SZ, kao i kinetika vezivanja Ag(I) za uzorak zeolita IZ i A.

### 3.1.4.1. Ispitivanje kinetike adsorpcije Cu(II) na SZ

Kao i u slučaju Ni(II) i Zn(II) jona, i adsorpcija Cu(II) ispitana je na različitim temperaturama i za različite početne koncentracije Cu(II) u rastvoru, u različitim vremenskim intervalima (slika 3.7.).



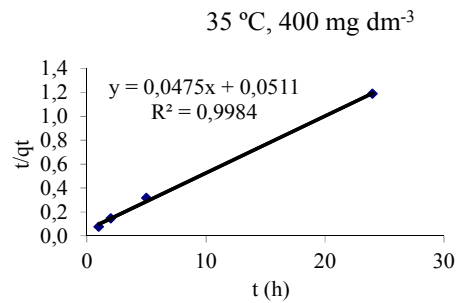
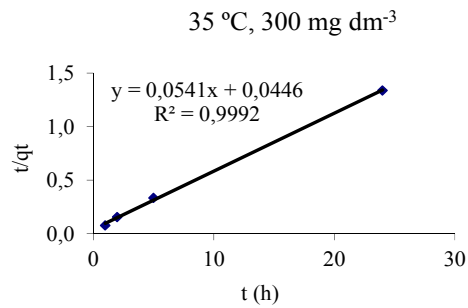
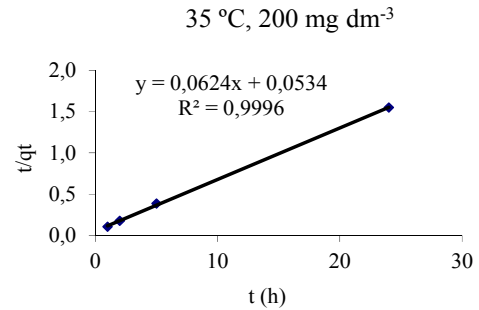
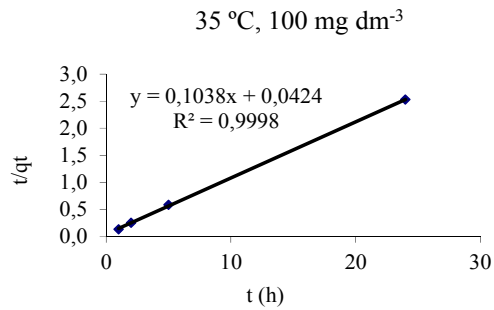
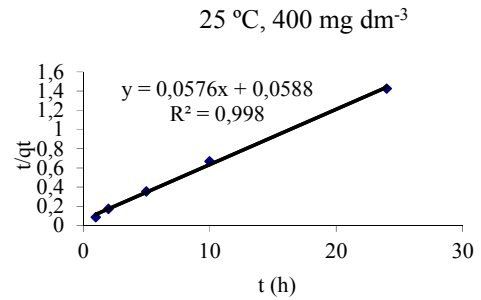
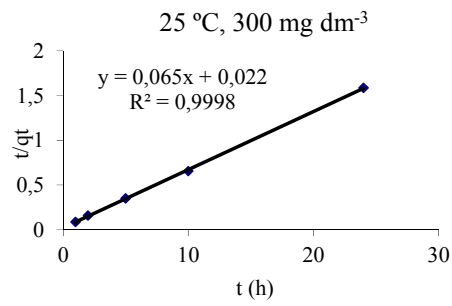
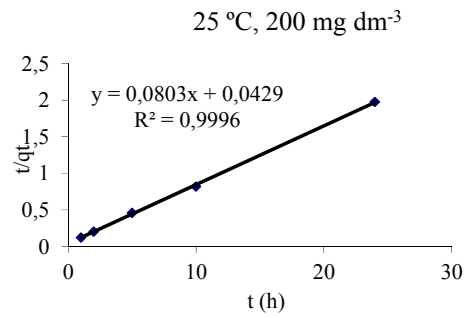
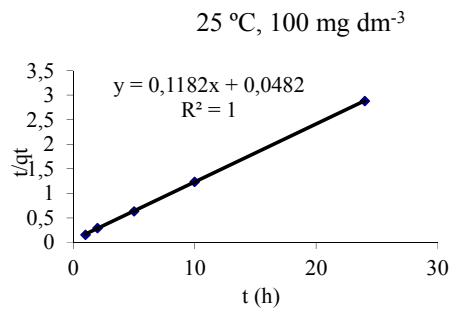


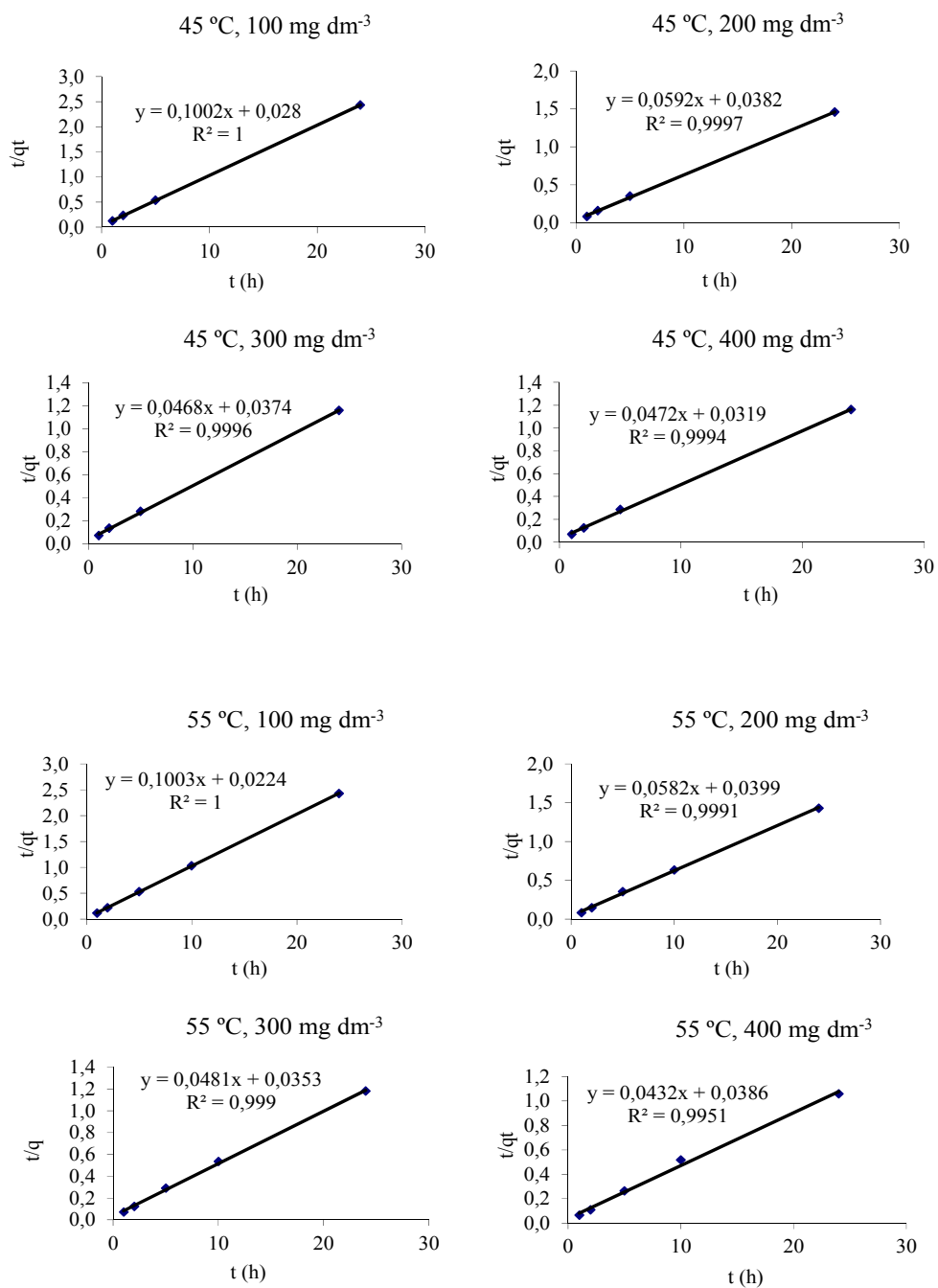
**Slika 3.7.** Koncentracija Cu(II) na uzorku SZ u zavisnosti od početne koncentracije rastvora i temperature tokom vremena ( $q_t$  - koncentracija Cu(II) u vremenu  $t$ , u  $\text{mg Cu g}^{-1}$ ;  $\bullet$  100,  $\blacksquare$  200,  $\blacktriangle$  300 i  $\blacklozenge$  400  $\text{mg Cu(II) dm}^{-3}$ ).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da uzorak SZ pokazuje dobru efikasnost u uklanjanju Cu(II)-jona iz vodenog rastvora. Masa vezanog Cu(II) na SZ raste sa porastom temperature i početne koncentracije rastvora. Na 25 °C iz rastvora čija je početna koncentracija 400  $\text{mg Cu dm}^{-3}$  veže se 16,8  $\text{mg Cu g}^{-1}$  dok se, za istu koncentraciju na 55 °C veže 22,69  $\text{mg Cu g}^{-1}$ . Takođe, na 25 °C, koncentracija Cu(II) na SZ, kada je početna koncentracija 400  $\text{mg Cu dm}^{-3}$ , skoro je dva puta veća nego kada je rastvor koncentracije 100  $\text{mg Cu dm}^{-3}$ . Koncentracija Cu(II) na SZ raste sa vremenom za sve ispitivane početne koncentracije rastvora, kao i za sve ispitivane temperature (slika 3.7.).

Efikasnost uklanjanja jona dvovalentnih metala prirodnim zeolitom SZ opada u sledećem nizu:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$  (Rajić *et al.*, 2010; Stojaković *et al.*, 2011b). Afinitet zeolita srazmeran je jonskom radijusu pa tako, na primer, jonski radijusi  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  jona iznose 73, 74 i 69 pm, redom, čime se objašnjava izraženiji kapacitet zeolita prema jonima bakra (Shannon, 1976). S obzirom na ne veliku razliku u dimenzijama jonskih radijusa  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , efikasnost adsorpcije bi se većim delom mogla pripisati uticaju geometrije hidratiranih katjona. U vodenom rastvoru,  $\text{Zn(II)}$  su uglavnom tetraedarski koordinisani, dok se  $\text{Ni(II)}$  nalazi u obliku heksaakva katjona koji je većih dimenzija u odnosu na tetraedarske jone (Huheey *et al.*, 1993). Za  $\text{Cu(II)}$  koji ima elektronsku konfiguraciju  $d^9$  karakterističan je Jan-Telerov efekat. Naime, oktaedarsko ligandno polje oko ovog jona je deformisano i može se očekivati da hidratirani  $\text{Cu(II)}$  lako gubi ligande u aksijalnom položaju, tj. prilagođava se lako novoj, manjoj koordinacionoj sferi (Cotton *et al.*, 1995). Prema navodima literature, pretpostavlja se da su dva molekula vode u  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  vezana slabim vezama i lako se izgube iz strukture, pri čemu  $\text{Cu(II)}$  onda obrazuje kompleks kvadratne geometrije (Stojaković *et al.*, 2011a). Ovo ukazuje na to da ovaj jon pri ulazu u rešetku klinoptilolita smanjuje svoje dimenzije i lakše difunduje.

Dobijeni rezultati obrađeni su različitim kinetičkim modelima koji su opisani u Prilogu 1. Najbolje slaganje dobijeno je za primenu Lagergrenovog modela pseudo drugog reda (slika 3.8.).





**Slika 3.8.** Primena Lagergrenovog modela pseudo-drugog reda na eksperimentalne podatke za različite početne koncentracije rastvora  $\text{Cu(II)}$  na temperaturama od 25 do 55 °C.

U tabeli 3.3. prikazane su vrednosti konstanti za kinetički model pseudo-drugog reda ( $k$ ), vrednosti korelacionog faktora ( $R^2$ ), kao i vrednosti ranotežnih koncentracija bakra na SZ.

**Tabela 3.3.** Vrednosti konstanti  $k$  za Lagergrenov model pseudo-drugog reda, korelacioni faktor  $R^2$  i ravnotežna koncentracija Cu(II),  $q_e$  za različite temperature i početne koncentracije rastvora.

$c_0$ , mg dm <sup>-3</sup>	25 °C			35 °C			45 °C			55 °C		
	$k$ , g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>	$k$ , g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>	$k$ , g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>	$k$ , g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>
<b>100</b>	0,2899	1	8,4602	0,2541	0,9998	9,6339	0,3586	1	9,9800	0,4491	1	9,9701
<b>200</b>	0,1503	0,9996	12,453	0,0729	0,9996	16,026	0,0917	0,9997	16,892	0,08489	0,9991	17,182
<b>300</b>	0,1920	0,9998	15,385	0,0656	0,9992	18,484	0,0589	0,9996	21,367	0,0655	0,999	20,790
<b>400</b>	0,0564	0,998	17,361	0,04415	0,9984	21,053	0,0698	0,9994	21,186	0,03195	0,9884	23,474

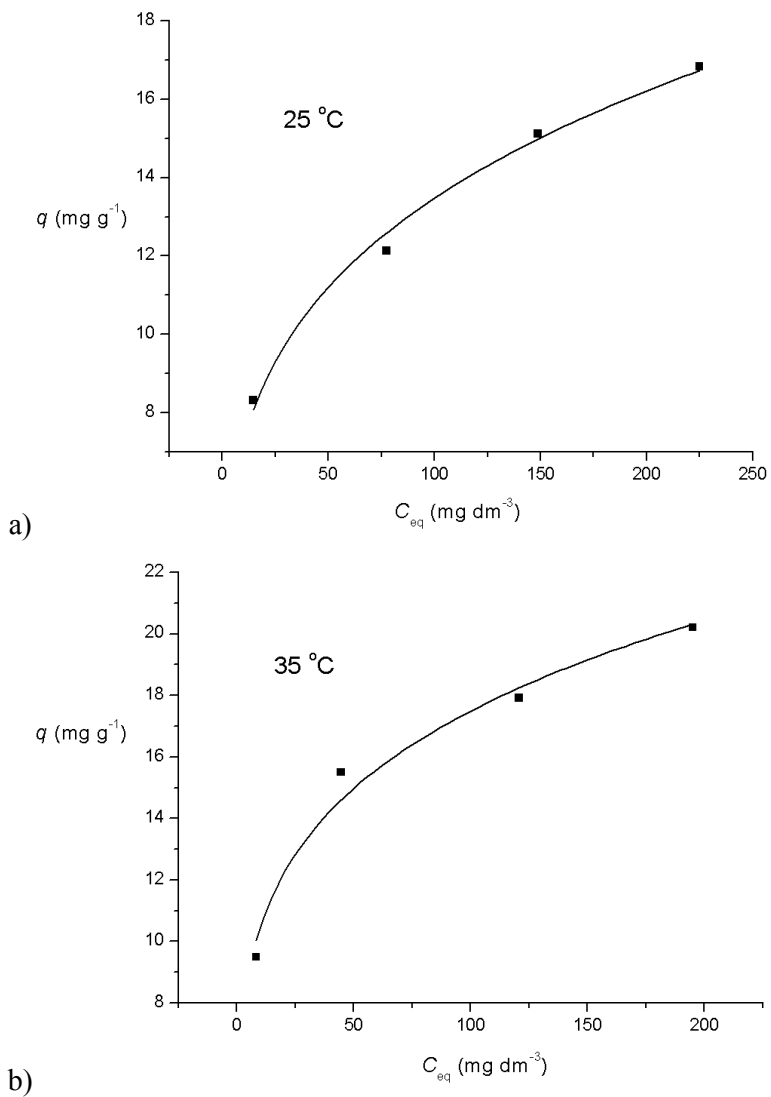
Na osnovu vrednosti korelacionog faktora  $R^2$  koji određuje pouzdanost modela može se zaključiti da Lagergrenov model pseudo-drugog reda dobro opisuje kinetiku apsorpcije Cu(II) iz vodenog rastvora za SZ. Takođe, eksperimentalno određene vrednosti  $q_t$  nakon 24 h pokazuju relativno dobro slaganje sa vrednostima  $q_e$  dobijenim modelovanjem.

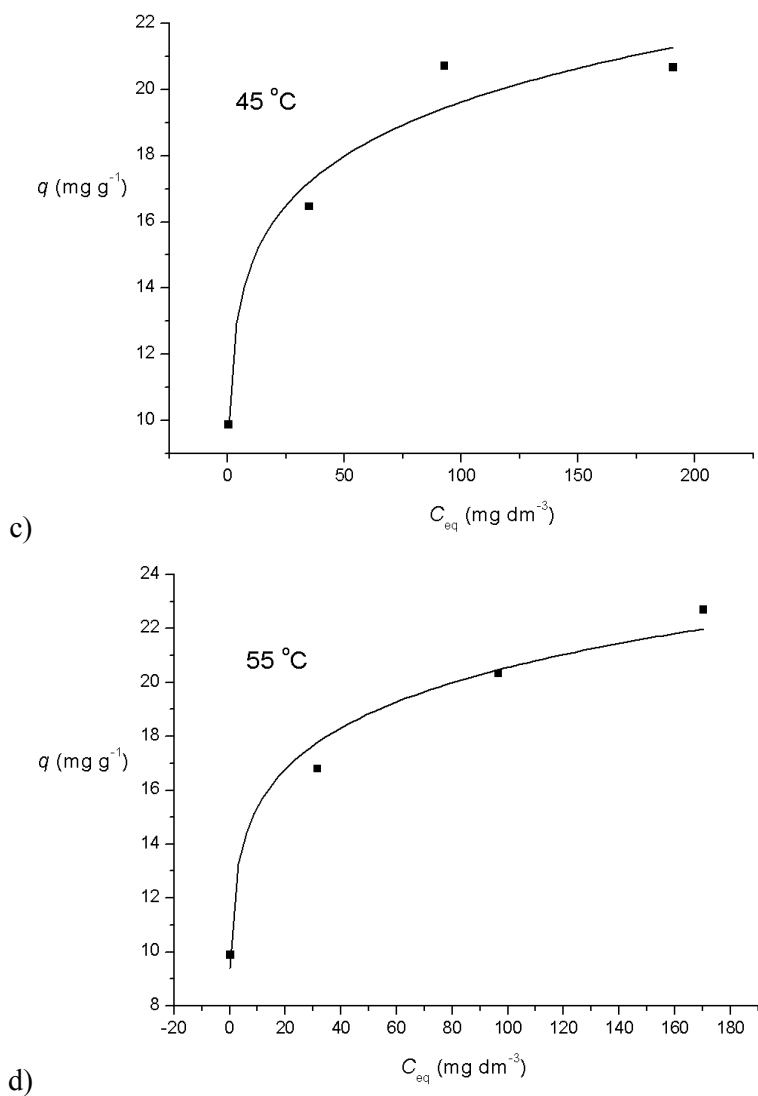


### 3.1.4.2. Ispitivanje termodinamike adsorpcije Cu(II)

Termodinamika adsorpcije bakra za SZ analizirana je pomoću različitih termodinamičkih modela (Prilog 2). U daljem tekstu prikazani su rezultati analizirani Frojndlihovom adsorpcionom izotermom za koju je dobijeno najbolje slaganje.

Na slici 3.9. su prikazane nelinearne Frojndlihove krive za različite početne koncentracije rastvora (100-400 mg dm<sup>-3</sup>) i za različite temperature (25-55 °C).





**Slika 3.9.** Frojndlihove adsorpcione izoterme na različitim temperaturama za sve ispitivane koncentracije: a) 25 °C; b) 35 °C; c) 45 °C; d) 55 °C.

Frojndlihov koeficijent ( $n$ ) se može smatrati parametrom koji zavisi od stepena heterogenosti sistema i predstavlja meru linearnosti izoterme (Kinniburgh, 1986, Weber *et al.*, 1992). Na osnovu vrednosti  $n$  može se izvesti zaključak o linearnosti - što je ovaj koeficijent bliže 1 to je izoterma linearnija. Ravnotežna raspodela adsorbata između tečne i čvrste faze je često linearna zavisnost, naročito ako je u tečnoj fazi koncentracija metala mala.

**Tabela 3.4.** Parametri Frojndlihove adsorpcione izoterme

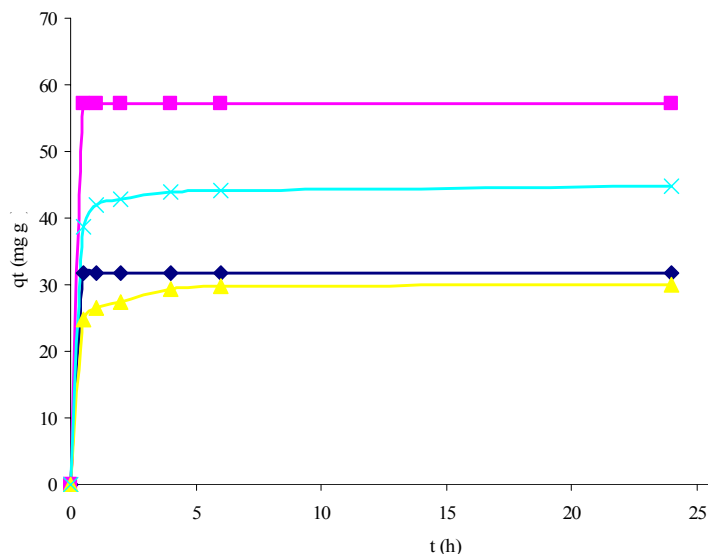
T, K	Parametri Frojndihove izoterme		
	$K_F, \text{dm}^3 \text{g}^{-1}$	$n, \text{dm}^3 \text{mg}^{-1}$	$R^2$
298	3,94	0,267	0,993
308	6,83	0,203	0,992
318	10,9	0,122	0,996
328	11,2	0,129	0,954

Na osnovu prikazanih rezultata (tabela 3.4) može se zaključiti da u ispitivanom sistemu postoji nelinearna ravnotežna raspodela. Stepem nelinearnosti raste sa kapacitetom adsorpcije  $K_F$  (koji raste sa porastom temperature).

#### 3.1.4.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije Ag-jona za IZ i zeolit A

S obzirom da joni srebra pokazuju dobru antibakterijsku aktivnost a da je jedan od ciljeva ove teze bio sinteza dezinficijensa na bazi zeolita, posebna pažnja u ovom radu bila je usmerena i ka ispitivanju kinetike vezivanja jona srebra za klinoptilolit i zeolit A.

Na slici 3.10. prikazana je promena koncentracije jona srebra na IZ i zeolit A tokom vremena, iz rastvora različitih početnih koncentracija ( $300$  i  $600 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Eksperimenti su izvođeni samo na  $25^\circ\text{C}$ , u mraku, s obzirom na osetljivost srebra prema svetlosti.



**Slika 3.10.** Kinetika vezivanja  $\text{Ag}^+$  za IZ i A (značenje simbola: —◆— zeolit A, 300 mg  $\text{Ag(I)} \text{ dm}^{-3}$ , —■— zeolit A, 600 mg  $\text{Ag(I)} \text{ dm}^{-3}$ , —▲— IZ, 300 mg  $\text{Ag(I)} \text{ dm}^{-3}$  i —×— IZ, 600 mg  $\text{Ag(I)} \text{ dm}^{-3}$ ).

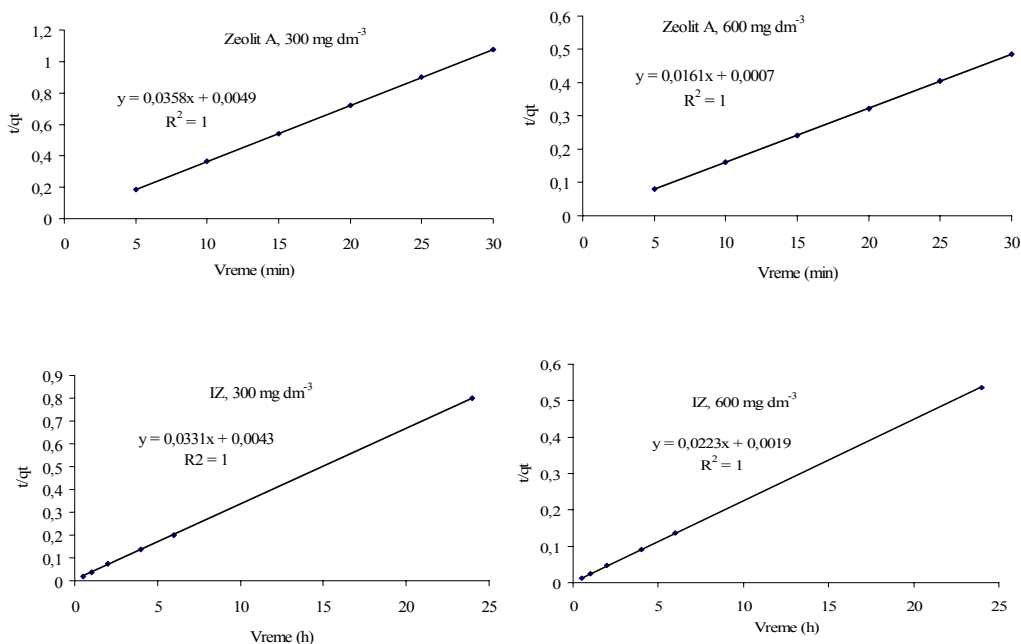
Celokupna količina srebra koja je prisutna u rastvoru adsorbuje se za zeolit A već u prvih 30 minuta ( $31$  i  $57 \text{ mg Ag}^+ \text{ g}^{-1}$ , iz rastvora čije su početne koncentracije  $300$  i  $600 \text{ mg Ag}^+ \text{ dm}^{-3}$ , redom).

Kod IZ, iz rastvora čija je početna koncentracija  $600 \text{ mg Ag}^+ \text{ dm}^{-3}$  tokom 6 h veže se za zeolit celokupna količina srebra koja je prisutna u rastvoru. Za koncentraciju  $600 \text{ mg Ag}^+ \text{ dm}^{-3}$  dolazi do uspostavljanja ravnoteže. Tokom 6 h za zeolit se veže  $45 \text{ mg Ag}^+ \text{ g}^{-1}$ .

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da oba zeolita pokazuju dobar afinitet prema jonima srebra i da se kinetika adsorpcije odigrava relativno brzo.

Dobijeni rezultati obrađeni su različitim kinetičkim modelima koji su opisani u Prilogu 1. S obzirom da se sva količina srebra iz rastvora za zeolit A veže u prvih 30 minuta, za ispitivanje kinetike korišćeni su rezultati adsorpcije u prvih 30 minuta (uzorci su uzimani na svakih 5 minuta).

Kao i u slučaju kinetike vezivanja bakra za zeolit, najbolje slaganje dobijeno je primenom Lagergrenovog modela pseudo drugog reda (slika 3.11.).



**Slika 3.11.** Primena Lagergrenovog modela pseudo-drugog reda na eksperimentalne podatke za početne koncentracije rastvora Ag(I) 300 i 600 mg dm<sup>-3</sup> na temperaturi od 25 °C.

U tabeli 3.5. su prikazane vrednosti konstanti  $k$ , korelacionog faktora i ravnotežne koncentracije  $q_e$ , dobijene modelovanjem rezultata.

**Tabela 3.5.** Vrednosti konstanti  $k$  za Lagergrenov model pseudo-drugog reda, korelacioni faktor  $R^2$  i ravnotežna koncentracija Ag(I),  $q_e$  za 25 °C i početne koncentracije 300 i 600 mg Ag dm<sup>-3</sup>.

$c_0$ , mg dm <sup>-3</sup>	IZ			Zeolit A		
	25 °C					
	$k$ , g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>	$k$ , g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	$R^2$	$q_e$ , mg g <sup>-1</sup>
<b>300</b>	0,25	1	30,21	0,26	1	31,84
<b>600</b>	0,26	1	44,84	0,37	1	57,14

Na osnovu vrednosti korelacionog faktora  $R^2$  može se zaključiti da Lagergrenov model pseudo-drugog reda dobro opisuje kinetiku adsorpcije Ag-jona iz vodenog rastvora za IZ i zeolit A. Iz tabele 3.5. se takođe može uočiti da eksperimentalno

određene vrednosti  $q_t$  nakon 24 h pokazuju dobro slaganje sa vrednostima  $q_e$  dobijenim modelovanjem što ukazuje na uspostavljenu ranotežu.

Detaljnijom termijskom analizom uzoraka M-SZ (M= Ni, Cu i Zn, Rajić *et al.*, 2011) utvrđeno da na oko 500 °C, usled potpune dehidracije, na površini SZ dolazi do obrazovanja finih nanočestica oksida prečnika 2-10 nm. U ovom radu je, pored uzoraka M-SZ, određena i antibakterijska aktivnost uzoraka MO-SZ (M= Ni, Cu i Zn).

### 3.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

#### 3.2.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti M-SZ (M= Ni, Cu, Zn) prema *Escherichia coli* DSM 498 i *Staphylococcus aureus* DSM 799

Uzorci SZ u kojima je sadržaj katjona prelaznih metala iznosio približno 0,1-0,4 mmol  $M^{2+}$   $g^{-1}$  (0,5 mas.%  $Ni^{2+}$ ; 2,6 mas.%  $Cu^{2+}$  i 1,5 mas.%  $Zn^{2+}$ ) ispitani su kao antibakterijski agensi. Antibakterijska aktivnost uzoraka Ni-, Cu- i Zn-SZ ispitana je prema reprezentativnim sojevima Gram-negativne *Escherichia coli* DSM 498 i Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* DSM 799, u različitim vodenim medijumima (LB medijum, sintetička i realna voda).

U ispitivanjima, kao kontrolni uzorci korišćeni su uzorci koji su sadržavali pored medijuma i čestice SZ. Dobijeni rezultati prikazani su u tabelama 3.6-3.8. gde je antibakterijska aktivnost izražena kao smanjenje broja ćelija bakterija u log CFU  $cm^{-3}$  (*engl.* CFU-colony forming units) u odnosu na kontrolne uzorke. Pored uzoraka M-SZ, ispitana je i antibakterijska aktivnost katjona  $M^{2+}$  u rastvoru čija je koncentracija odgovarala koncentraciji ovih metala u M-SZ u cilju poređenja antibakterijske aktivnosti slobodnih katjona i katjona imobilisanih na zeolitu.

Nakon jednog sata, ni u jednom od kontrolnih uzoraka sa bilo kojim medijumom nije zabeležena značajna promena broja ćelija bakterija. Nakon 24 h uočava se progresivni rast broja ćelija bakterija u hranljivom LB medijumu gde broj ćelija raste za oko 2,6 i 3,1 log CFU  $cm^{-3}$  za *E. coli* i *S. aureus*, redom. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima i činjenicom da SZ ne pokazuje antibakterijsku aktivnost (Hrenović *et al.*, 2012).

Kada je kao medijum korišćena sintetička voda, broj ćelija u kontrolnim uzorcima je takođe porastao nakon 24 h za 1,84 i 0,81 log CFU  $cm^{-3}$  za *E. coli* i *S. aureus*, redom. U kontrolnim uzorcima u kojima je kao medijum korišćen realni efluent primećeno je skoro beznačajno smanjenje broja ćelija u odnosu na početni broj ćelija *E. coli* (za 0,44 log CFU  $cm^{-3}$ ), dok broj ćelija *S. aureus* značajno opada (za 1,05 log

CFU cm<sup>-3</sup>). Smanjenje broja ovih ćelija može se objasniti činjenicom da *S. aureus* ne može da se razmnožava u otpadnim vodama čija je vrednost HPK relativno mala. Vrednost HPK efluenta iznosila je 1,206 mg dm<sup>-3</sup>.

U tabeli 3.6. prikazana je antibakterijska aktivnost Cu-SZ u različitim medijumima kao i aktivnost Cu(II) u efluentu pri koncentraciji koja je bila slična onoj u Cu-SZ. Smanjenje broja ćelija se zapaža već nakon jednog sata, i taj trend se nastavlja i nakon 24 h. Najizraženije smanjenje uočava se u realnom efluentu gde je broj ćelija *E. coli* nakon 1 h smanjen za 2,68, a nakon 24 h za 5,83 log CFU cm<sup>-3</sup>. Broj *S. aureus* smanjio se za 3,77 i 4,97 log CFU cm<sup>-3</sup> za 1 i 24 h, redom. Najmanju antibakterijsku aktivnost Cu-SZ ispoljava u hranljivom LB medijumu gde je broj ćelija *E. coli* nakon 1 h smanjen za samo 0,37, i za 0,50 log CFU nakon 24 h. Broj ćelija *S. aureus* je smanjen za 1,1 log CFU cm<sup>-3</sup> nakon 24 h.

Iz tabele 3.6. se uočava da Cu-SZ pokazuje veću aktivnost prema *E. coli* nego prema *S. aureus* u svim ispitivanim medijumima. Takođe, uočava se i da je u eksperimentima sa jonima Cu, antibakterijska aktivnost slobodnog Cu(II) izraženija nego kada je imobilisan u Cu-SZ.

**Tabela 3.6.** Broj ćelija *E. coli* i *S. aureus* u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja bakterija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.

Medijum	Kontrola,		Smanjanje broja ćelija,		pH
	log CFU cm <sup>-3</sup>		log CFU cm <sup>-3</sup>		
	1 h	24 h	1 h	24 h	
<i>E. coli</i>					
LB + Cu-SZ	6,72	9,28	0,37 <sup>A</sup>	0,50 <sup>A</sup>	6,74 <sup>A</sup>
Sintetička voda + Cu-SZ	6,56	8,40	1,27 <sup>A,B</sup>	7,97 <sup>A,B</sup>	5,89 <sup>A,B</sup>
Efluent +Cu-SZ	6,68	6,24	2,68 <sup>A,B,C</sup>	5,83 <sup>A,B,C</sup>	7,14 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Cu	6,28	6,68	4,73 <sup>A,B,C,D</sup>	6,68 <sup>A,B,C,D</sup>	7,87 <sup>A,B,C,D</sup>
<i>S. aureus</i>					
LB + Cu-SZ	7,22	10,28	0,03	1,10 <sup>A</sup>	6,76
Sintetička voda + Cu-SZ	7,19	8,00	3,07 <sup>A,B</sup>	6,99 <sup>A,B</sup>	5,95 <sup>A,B</sup>
Efluent +Cu-SZ	6,77	5,72	3,77 <sup>A,B,C</sup>	4,97 <sup>A,B</sup>	6,85 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Cu	7,02	6,18	5,10 <sup>A,B,C,D</sup>	6,17 <sup>A,B,C,D</sup>	7,46 <sup>A,B,C,D</sup>

$t_0$  *E. coli* ( $10^6$  CFU cm<sup>-3</sup>) = 3,49±1,02;  $t_0$  *S. aureus* ( $10^7$  CFU cm<sup>-3</sup>) = 1,51±0,26;

značajno različite vrednosti u poređenju sa <sup>A</sup> - kontrolom; <sup>B</sup>-LB medijumom +Cu-SZ; <sup>C</sup>- sintetičkom vodom + Cu-SZ; <sup>D</sup>-efluentom + Cu-SZ. Prikazane su srednje vrednosti za tri probe. Smanjenje broja ćelija računato je kao razlika log CFU cm<sup>-3</sup> u odnosu na kontrolu.

Antibakterijska aktivnost Zn-SZ u različitim vodenim medijumima kao i antibakterijska aktivnost Zn<sup>2+</sup> u efluentu u količini koja je ekvivalentna količini u SZ prikazana je u tabeli 3.7. Nakon jednog sata u svim ispitivanim medijumima uočava se skoro beznačajna antibakterijska aktivnost. Nakon 24 h u svim sistemima Zn-SZ ispoljava se sličan antibakterijski efekat kao i u slučaju Cu-SZ. Zn-SZ takođe ne pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost u hranljivom LB medijumu (nakon 24 h broj ćelija je redukovano za 0,47 i 1,1 log CFU cm<sup>-3</sup> za *E. coli* i *S. aureus*, redom). Antibakterijska aktivnost Zn-SZ prema *E. coli* u sintetičkoj vodi i realnom efluentu se značajno razlikuje od antibakterijske aktivnosti u LB medijumu. *S. aureus* je otporniji na delovanje Zn-SZ od *E. coli* u efluentu.



**Tabela 3.7.** Broj ćelija *E. coli* i *S. aureus* u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja ćelija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.

Medijum	Kontrola, log CFU cm <sup>-3</sup>		Smanjanje broja ćelija, log CFU cm <sup>-3</sup>		pH
	1 h	24 h	1 h	24 h	
<i>E. coli</i>					
LB medijum + Zn-SZ	6,72	9,28	0,33 <sup>A</sup>	0,47 <sup>A</sup>	6,77
Sintetička voda + Zn-SZ	6,56	8,40	0,41 <sup>A,B</sup>	7,89 <sup>A,B</sup>	6,70 <sup>A,B</sup>
Efluent +Zn-SZ	6,68	6,24	0,54 <sup>A,B,C</sup>	5,93 <sup>A,B,C</sup>	7,16 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Zn	6,28	6,68	1,82 <sup>A,B,C,D</sup>	6,68 <sup>A,B,C,D</sup>	7,81 <sup>A,B,C,D</sup>
<i>S. aureus</i>					
LB medijum + Zn-SZ	7,22	10,28	0,03	1,10 <sup>A</sup>	6,74
Sintetička voda + Zn-SZ	7,19	8,00	0,24 <sup>A,B</sup>	6,59 <sup>A,B</sup>	6,62 <sup>A</sup>
Efluent +Zn-SZ	6,77	5,72	0,19 <sup>A,B</sup>	4,70 <sup>A,B</sup>	7,11 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Zn	7,02	6,18	1,15 <sup>A,B,C,D</sup>	6,17 <sup>A,B,C,D</sup>	8,7 <sup>A,B,C,D</sup>

$t_0$  *E. coli* ( $10^6$  CFU cm<sup>-3</sup>) = 3,49±1,02;  $t_0$  *S. aureus* ( $10^7$  CFU cm<sup>-3</sup>) = 1,51±0,26; značajno različite vrednosti u poređenju sa <sup>A</sup> - kontrolom; <sup>B</sup>-LB medijumom +Zn-SZ; <sup>C</sup>-sintetičkom vodom + Zn-SZ; <sup>D</sup>-efluentom + Zn-SZ. Prikazane su srednje vrednosti za tri probe. Smanjenje broja ćelija računato je kao razlika log CFU cm<sup>-3</sup> u odnosu na kontrolu.

Uticaj Ni-SZ u ispitivanim medijumima prema *E. coli* i *S. aureus* nakon 1 i 24 h prikazan je u tabeli 3.8. Nakon jednog sata ne dolazi do značajnog smanjenja broja ćelija ni *E. coli* ni *S. aureus*. Smanjenje broja ćelija *E. coli* i *S. aureus* u svim ispitivanim medijumima nakon 24 h je nešto veće, međutim ne prelazi 20 %. Ni-SZ pokazuje najmanju antibakterijsku aktivnost u LB medijumu. U ovom medijumu, aktivnost Ni(II) je znatno veća u odnosu na Ni-SZ, gde je prema *E. coli* postignut skoro baktericidni efekat. Prema *S. aureus* smanjenje broja ćelija iznosi 0,56 log CFU cm<sup>-3</sup>.

**Tabela 3.8.** Broj ćelija *E. coli* i *S. aureus* u različitim medijumima (Luir Bertani – LB, sintetička voda i realni efluent) u kontrolnim uzorcima, smanjenje broja ćelija nakon 1 i 24 h i pH-vrednost na kraju eksperimenta.

Medijum	Kontrola,		Smanjanje broja ćelija,		pH
	log CFU cm <sup>-3</sup>		log CFU cm <sup>-3</sup>		
	1 h	24 h	1 h	24 h	
<i>E. coli</i>					
LB medijum + Ni-SZ	6,72	9,28	0,09 <sup>A</sup>	0,30 <sup>A</sup>	6,93 <sup>A</sup>
Sintetička voda + Ni-SZ	6,56	8,40	0,09	1,62 <sup>A,B</sup>	7,82 <sup>A,B</sup>
Efluent +Ni-SZ	6,68	6,24	0,12 <sup>A</sup>	1,15 <sup>A,B</sup>	7,95 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Ni	6,28	6,68	0,77 <sup>A,B,C,D</sup>	6,29 <sup>A,B,C,D</sup>	8,29 <sup>A,B,C,D</sup>
<i>S. aureus</i>					
LB medijum + Ni-SZ	7,22	10,28	0,02	0,45 <sup>A</sup>	6,91 <sup>A</sup>
Sintetička voda + Ni-SZ	7,19	8,00	0,09	0,81 <sup>A,B</sup>	7,73 <sup>A,B</sup>
Efluent +Ni-SZ	6,77	5,72	0,08	0,56 <sup>A,B</sup>	7,88 <sup>A,B,C</sup>
Efluent +Ni	7,02	6,18	0,43	3,24 <sup>A,B,C,D</sup>	8,5 <sup>A,B,C,D</sup>

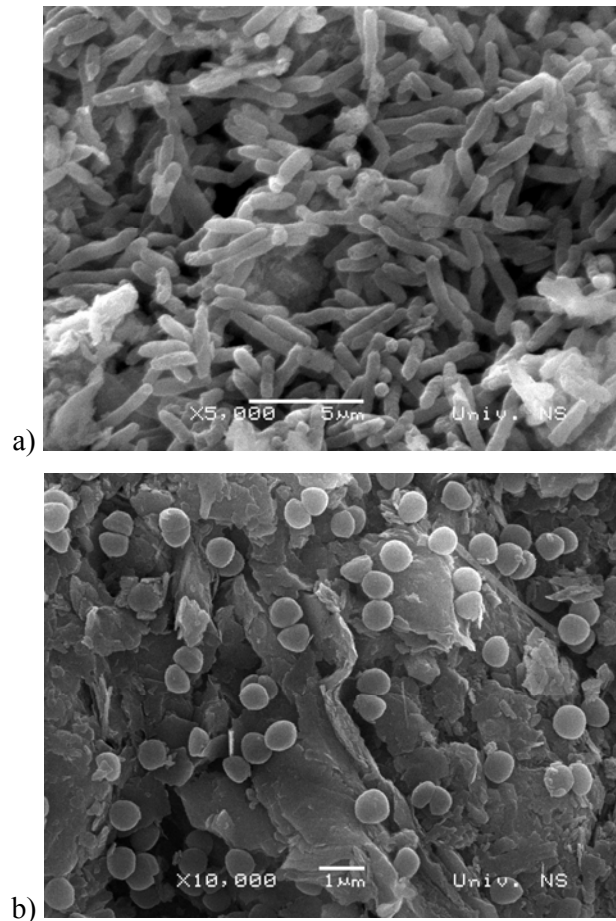
$t_0$  *E. coli* ( $10^6$  CFU cm<sup>-3</sup>) =  $3,49 \pm 1,02$ ;  $t_0$  *S. aureus* ( $10^7$  CFU cm<sup>-3</sup>) =  $1,51 \pm 0,26$ ; značajno različite vrednosti u poređenju sa <sup>A</sup> - kontrolom; <sup>B</sup>-LB medijumom +Ni-SZ; <sup>C</sup>- sintetičkom vodom + Ni-SZ; <sup>D</sup>-efluentom + Ni-SZ. Prikazane su srednje vrednosti tri probe. Smanjenje broja ćelija računato je kao razlika log CFU cm<sup>-3</sup> u odnosu na kontrolu.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti Ni-, Cu- i Zn-SZ pokazuju da su ovi uzorci aktivniji u sintetičkoj vodi i efluentu nego u hranljivom LB medijumu. Kao objašnjenje mogla bi se ponuditi činjenica da hranljivi medijumi generalno imaju veliku vrednost HPK što upućuje na visok sadržaj organskih materija pri čemu katjoni ispitivanih metala obrazuju komplekse sa komponentama prisutnim u hranljivom medijumu što onda smanjuje njihovu antibakterijsku aktivnost.

Katjoni ispitivanih metala u rastvoru pokazuju veću antibakterijsku aktivnost u odnosu na uzorke M-SZ što bi se moglo pripisati njihovoj imobilizaciji u rešetki SZ.

Na slici 3.12. prikazani su uzorci SZ iz kontrolnih sistema sa LB hranljivim medijumom nakon 24 h. Zapaža se da dolazi do imobilizacije bakterija na površini SZ.

Ovaj rezultat ukazuje da površina zeolita može da posluži i kao nosač bakterija. Rezultat je značajan sa gledišta primene bakterija u bioreaktorima.



**Slika 3.12.** SEM fotografija površine SZ iz kontrolnih sistema: a) *E. coli* i b) *S. aureus*.

Vrednosti pH se tokom eksperimenata nisu značajno menjale i bile su u opsegu koji je optimalan za rast ispitivanih bakterija (Garrity *et al.*, 2005) što ukazuje na činjenicu da antibakterijska aktivnost nije u vezi sa promenom pH-vrednosti, već je posledica aktivnosti uzoraka zeolita.

Kako bi se stekao što bolji uvid u mehanizam antibakterijskog dejstva, nakon svih eksperimenata određivana je koncentracija metala u efluentu. Izmerene koncentracije prikazane su u tabeli 3.9.

**Tabela 3.9.** Koncentracije i procenti izluženih katjona metala u efluentu.

Uzorak	Koncentracija (mg M 100 cm <sup>-3</sup> )		% izluženog M	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Cu-SZ	-	-	-	-
Zn-SZ	0,2	0,2	1,6	1,1
Ni-SZ	0,2	0,5	3,4	9,1

Uočava se da koncentracija izluženih metala opada u skladu sa sledećim redosledom:  $Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$ . Ovaj trend se može objasniti time što selektivnost zeolita prema svim katjonima nije ista i upravo opada u nizu  $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$  (Rajić *et al.*, 2010; Stojaković *et al.* 2011a; Stojaković *et al.* 2011b). Međutim, značajno je naglasiti da su koncentracije izluženih katjona uglavnom u granicama maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) za pijaću vodu u R. Srbiji (web 6) sem za nikel. S obzirom da Ni-SZ nije pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost, ovaj rezultat nema veći značaj.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se antibakterijska aktivnost Cu-SZ i Zn-SZ ne bi mogla pripisati izluženim katjonima metala već upravo ispitivanim uzorcima zeolita.

### 3.2.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti MO-SZ prema *E.coli* DSM 498 i *S. aureus* DSM 799

Antibakterijska aktivnost MO-SZ (M=  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ ) ispitana je u realnom efluentu nakon 1 i 24 h. Rezultati su prikazani u tabeli 3.10.

**Tabela 3.10.** Smanjenje broja ćelija *E. coli* ili *S. aureus* u realnom efluentu i kontrolnim uzorcima, nakon 1 i 24 h.

Vreme, h	Kontrola	Smanjenje broja ćelija			Kontrola	Smanjenje broja ćelija,		
		CuO-SZ	ZnO-SZ	NiO-SZ		CuO-SZ	ZnO-SZ	NiO-SZ
		<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>		
1	6,68	0,45 <sup>A</sup>	0,14 <sup>A,B</sup>	0,07 <sup>B</sup>	6,77	2,77 <sup>A</sup>	0,19 <sup>A,B</sup>	0,11 <sup>A,B,C</sup>
24	6,24	5,44 <sup>A</sup>	3,35 <sup>A,B</sup>	0,16 <sup>A,B,C</sup>	5,72	5,37 <sup>A</sup>	3,90 <sup>A,B</sup>	0,38 <sup>B,C</sup>

$t_0$  *E. coli* ( $10^6$  CFU  $\text{cm}^{-3}$ ) =  $3,49 \pm 1,02$ ;  $t_0$  *S. aureus* ( $10^7$  CFU  $\text{cm}^{-3}$ ) =  $1,51 \pm 0,26$ ; značajno različite vrednosti u poređenju sa <sup>A</sup> - kontrolom; <sup>B</sup> - CuO-SZ; <sup>C</sup> - ZnO-SZ. Prikazane su srednje vrednosti tri probe. Vrednosti kontrolnih uzoraka i smanjenja broja ćelija prikazane su u jedinicama log CFU  $\text{cm}^{-3}$ . Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.

Kao što se može uočiti, nakon 1 h svi MO-SZ pokazuju uglavnom slabu antibakterijsku aktivnost prema oba ispitivana soja, osim CuO-SZ, kod koga je došlo do smanjenja broja ćelija *S. aureus* za 2,77 log CFU  $\text{cm}^{-3}$ . Smanjenje je očigledno nakon 24 h. Broj ćelija *E. coli* smanjuje se za 5,44 (CuO-SZ) i 3,35 log CFU  $\text{cm}^{-3}$  za ZnO-SZ. Do sličnog smanjenja broja ćelija dolazi i kod *S. aureus* (5,37 kod CuO-SZ i 3,90 log CFU  $\text{cm}^{-3}$  za ZnO-SZ).

NiO-SZ ne pokazuje značajno smanjenje broja ćelija nakon 24 h (smanjenje broja ćelija iznosi 0,16 odnosno 0,38 log CFU  $\text{cm}^{-3}$  za *E. coli* i *S. aureus*, redom). Usled tako malog smanjenja broja ćelija određen je i broj imobilisanih ćelija na NiO-SZ za *E. coli* i *S. aureus*. Broj imobilisanih ćelija je sličan broju imobilisanih ćelija na SZ što potvrđuje da NiO-SZ ne ispoljava značajan antibakterijski efekat na ispitivane sojeve.

Ispitivana je i antibakterijska aktivnost MO-SZ prema *E. coli* u nesterilnom realnom efluentu kao medijumu pri koncentraciji suspenzije od 1 i 5 g MO-SZ u 100,0  $\text{cm}^{-3}$  (tabela 3.11.). Nakon 1 h CuO- i ZnO-SZ postigli su baktericidnu aktivnost prema ispitivanoj bakteriji u nižoj ispitivanoj koncentraciji. Nakon kontakta 1 g NiO-SZ u 100,0  $\text{cm}^{-3}$  tokom 24 h nije postignuta baktericidan efekat prema ispitivanoj bakteriji. Kada je korišćena koncentracija od 5 g NiO-SZ u 100,0  $\text{cm}^{-3}$  baktericidni efekat je postignut već u prvom satu (tabela 3.11.). Antibakterijska aktivnost NiO-SZ se značajnije nije menjala sa promenom koncentracije. Na osnovu prikazanih rezultata može se izvesti zaključak da antibakterijska aktivnost zavisi od tipa metala na zeolitu.

**Tabela 3.11.** Broj ćelija *E. coli* u nesterilnom realnom efluentu i kontrolnim uzorcima, tokom 24 h.

Vreme, h	Kontrola	Smanjenje broja bakterija, konc. 1 g MO-SZ 100 cm <sup>-3</sup>			Kontrola	Smanjenje broja bakterija, konc. 5 g MO-SZ 100 cm <sup>-3</sup>		
		CuO-SZ	ZnO-SZ	NiO-SZ		CuO-SZ	ZnO-SZ	NiO-SZ
1	2,23	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A</sup>	0,36 <sup>A,B,C</sup>	2,23	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A,B,C</sup>
2	2,22	2,22 <sup>A</sup>	2,22 <sup>A</sup>	0,83 <sup>A,B,C</sup>	2,22	2,22 <sup>A</sup>	2,22 <sup>A</sup>	2,22 <sup>A,B,C</sup>
3	2,23	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A</sup>	0,69 <sup>A,B,C</sup>	2,23	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A</sup>	2,23 <sup>A,B,C</sup>
4	2,84	2,84 <sup>A</sup>	2,84 <sup>A</sup>	0,74 <sup>A,B,C</sup>	2,84	2,84 <sup>A</sup>	2,84 <sup>A</sup>	0,91 <sup>A,B,C</sup>
5	3,04	3,04 <sup>A</sup>	3,04 <sup>A</sup>	0,14 <sup>A,B,C</sup>	3,04	3,04 <sup>A</sup>	3,04 <sup>A</sup>	1,39 <sup>A,B,C</sup>
24	3,57	3,57 <sup>A</sup>	3,57 <sup>A</sup>	1,91 <sup>A,B,C</sup>	3,57	3,57 <sup>A</sup>	3,57 <sup>A</sup>	2,02 <sup>A,B,C</sup>

$t_0$  *E. coli* (10<sup>2</sup> CFU cm<sup>-3</sup>)= 1,55±0,22; značajno različite vrednosti u poređenju sa <sup>A</sup> - kontrolom; <sup>B</sup> - CuO- SZ; <sup>C</sup> -ZnO-SZ. Prikazane su srednje vrednosti tri probe. Vrednosti kontrolnih uzoraka i smanjenja broja ćelija prikazano je u jedinicama log CFU cm<sup>-3</sup>. Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.

Vrednost pH se tokom izvođenja eksperimenata nije značajno menjala (0,2-0,8 pH jedinica) što pokazuje da antibakterijska aktivnost nije posledica promene pH.

U efluentu je, nakon 24 h eksperimenta, određena i koncentracija izluženih katjona (tabela 3.12.) kako bi se imao što jasniji uvid u mehanizam delovanja MO-SZ.

**Tabela 3.12.** Koncentracije i procenti izluženih metala sa MO-SZ nakon eksperimenta.

Uzorak	Koncentracija (mg M 100 cm <sup>-3</sup> )		% izluženog metala	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
CuO-SZ	-	-	-	-
ZnO-SZ	0,04	0,14	0,25	0,95
NiO-SZ	0,03	0,04	0,51	0,65

Koncentracije izluženih katjona su u granicama MDK (web 6) i moglo bi se zaključiti da se antibakterijska aktivnost može pripisati MO-SZ a ne izluženim katjonima.

Uočava se da je antibakterijska aktivnost M-SZ (M=Cu, Zn) tokom 1 i 24 h kontakta izraženija od aktivnosti MO-SZ.

### **3.2.3. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti M-IZ i M-A prema izolatima *E. coli***

U ovom radu su, osim *E. coli* DSM 498, za ispitivanje antibakterijske aktivnosti korišćena i dva izolata ove vrste koji su izolovani iz prirodnih voda u R. Srbiji. Ispitana je antibakterijska aktivnost uzoraka M-IZ i M-A (M – Cu, Zn, Ag). U svim uzorcima zeolita koncentracija katjona M iznosila je 0,25 mmol g<sup>-1</sup>.

Vitek-MS metodom potvrđeno je da su izolati (izolat I i izolat II) iz realnih voda zaista sojevi *E. coli*. Profil antibiotske otpornosti izolata određen je VITEK-metodom i prikazan je u tabeli 3.13.

**Tabela 3.13.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u mg dm<sup>-3</sup> ispitivanih antibiotika prema izolatima *E. coli*.

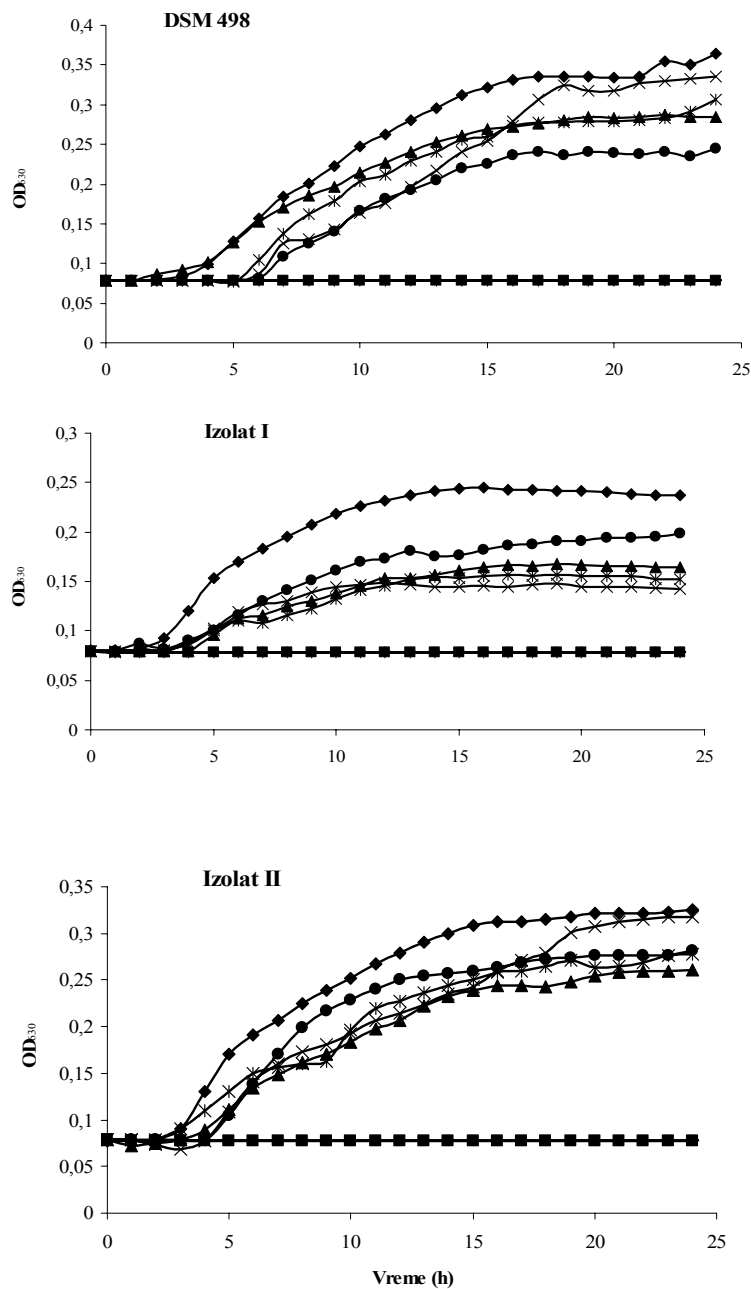
Antibiotik	DSM 498		Izolat I		Izolat II	
	MIC	Profil	MIC	Profil	MIC	Profil
Ampicilin	4	S	>16	R	≤2	S
Amoksicilin/ Klavulanska kiselina	4	S	8	S	≤2	S
Piperacilin/ Tazobactam	≤4	S	≤4	S	≤4	S
Cefotaksim	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Ceftazidim	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Cefepim	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Ertapenem	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S
Imipenem	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S
Meropenem	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S
Amikacin	≤2	S	≤2	S	≤2	S
Gentamicin	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Ciprofloksacin	≤0,25	S	>2	R	≤0,25	S
Norfloksacin	≤0,5	S	>8	R	≤0,5	S
Fosfomicin	≤16	S	≤16	S	≤16	S
Nitrofurantoin	≤16	S	≤16	S	≤16	S
Sulfametoksazol / Trimetoprim	≤20	S	≤160	R	≤20	S

\*S- osjetljiv; R- otporan.

Na osnovu profila antibiotske otpornosti utvrđeno je da su DSM 498 i izolat II osjetljivi na sve ispitivane antibiotike, dok je izolat I otporan na 4 vrste antibiotika (ampicilin, ciprofloksacin, norfloksacin i sulfametoksazol/trimetoprim).

Antibakterijska aktivnost uzoraka zeolita prvo je ispitana u hranljivom medijumu –peptonskoj vodi. Rezultati su prikazani na slici 3.13.





**Slika 3.13.** Antibakterijska aktivnost uzoraka zeolita u peptonskoj vodi prema *E. coli*:

a) DSM 498; b) Izolat I; c) Izolat II.

\*(Značenje simbola: ◆ Pozitivna kontrola; ■ Negativna kontrola; ▲ Cu-IZ; × Cu-A; \* Zn-IZ; ● Zn-A; + Ag-IZ; - Ag-A (linije koje pokazuju antibakterijsku aktivnost Ag-IZ i Ag-A paralelne su sa negativnom kontrolom)).

Ag-IZ i Ag-A u peptonskoj vodi ispoljavaju baktericidni efekat već nakon pola sata prema sva tri izolata (slika 3.13.). S obzirom na činjenicu da ovi uzorci pokazuju

baktericidni efekat za kratko vreme u medijumu bogatom hranljivim materijama (HPK=17900 mg O<sub>2</sub> dm<sup>-3</sup>), antibakterijska aktivnost nije ispitivana u realnoj vodi u kojoj je vrednost HPK značajno manja. Antibakterijska aktivnost Cu- i Zn-Z u peptonskoj vodi je mala, ispod 50 % za sve ispitivane sojeve bakterija.

Antibakterijska aktivnost M-IZ i M-A (M=Cu, Zn) ispitana je prema sva tri izolata i u realnim vodama-vodi iz Savskog jezera u Beogradu (SV) i jednoj komercijalno dostupnoj vodi (JV). Rezultati su prikazani u tabelama 3.14.-3.16.

**Tabela 3.14.** Smanjenje broja ćelija *E. coli* DSM 498 u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.

a)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1 h	3 h	6 h	24 h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	6,84	6,73	6,74	6,73	7,74
IZ	0,00	-0,09	0,02	-0,07	7,89
Cu -IZ	2,93 <sup>A</sup>	5,52 <sup>A</sup>	6,74 <sup>A</sup>	6,73 <sup>A</sup>	6,77
Zn -IZ	0,88 <sup>A</sup>	4,67 <sup>A</sup>	6,74 <sup>A</sup>	6,73 <sup>A</sup>	6,69
Komercijalno dostupna voda (JV)					
Kontrola*	7,36	7,30	7,41	7,14	7,76
IZ	0,04	0,02	0,17	-0,02	6,89
Cu-IZ	4,96 <sup>A</sup>	7,30 <sup>A</sup>	7,41 <sup>A</sup>	7,14 <sup>A</sup>	6,78
Zn-IZ	0,81 <sup>A</sup>	3,62 <sup>A</sup>	4,10 <sup>A</sup>	4,22 <sup>A</sup>	6,81

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,1±0,3.

b)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1h	3h	6h	24h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	7,22	7,17	7,24	7,24	7,69
A	0,05	0,06	0,13	0,13	9,25
Cu -A	3,45 <sup>A</sup>	7,17 <sup>A</sup>	7,24 <sup>A</sup>	7,24 <sup>A</sup>	8,88
Zn -A	0,19	0,06	0,05	0,11	8,69
Komercijalno dostupna voda (JV)					
Kontrola*	7,36	7,30	7,41	7,14	7,76
A	0,09	-0,01	0,19	0,15	9,89
Cu-A	4,45 <sup>A</sup>	5,28 <sup>A</sup>	6,39 <sup>A</sup>	7,14 <sup>A</sup>	8,78
Zn-A	-0,04	0,01	0,20	-0,02	8,81

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,3±0,2.

Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Najniži nivo osetljivosti je 10 CFU cm<sup>-3</sup>. <sup>A</sup> – značajno različito u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Vrednosti kontrolnih uzoraka i smanjenja broja ćelija prikazano je u jedinicama log CFU cm<sup>-3</sup>. Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.

Cu-IZ pokazuje baktericidni efekat prema *E. coli* DSM 498 u SV nakon 6 h dok se u JV baktericidni efekat ostvaruje nakon 3 h. Zn-IZ takođe ispoljava baktericidni efekat prema izolatu DSM 498 u SV, dok se u JV uočava smanjenje broja ćelija za oko 3 log CFU. Cu-A ispoljava baktericidni efekat prema ispitivanom soju nakon 3 h u SV, odnosno nakon 24 h u JV (tabela 3.14).

**Tabela 3.15.** Smanjenje broja bakterija *E. coli* Izolat I u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.

a)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1h	3h	6h	24h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	7,31	7,14	7,23	7,02	7,43
IZ	-0,01	-0,07	0,06	-0,11	6,89
Cu -IZ	5,38 <sup>A</sup>	7,14 <sup>A</sup>	7,23 <sup>A</sup>	7,02 <sup>A</sup>	6,80
Zn -IZ	2,95 <sup>A</sup>	7,14 <sup>A</sup>	7,23 <sup>A</sup>	7,02 <sup>A</sup>	6,85
Komerrijalno dostupna voda, JV					
Kontrola*	7,10	7,07	6,87	6,65	7,76
IZ	0,02	0,14	-0,16	-0,12	6,87
Cu-IZ	6,00 <sup>A</sup>	7,07 <sup>A</sup>	6,87 <sup>A</sup>	6,65 <sup>A</sup>	6,78
Zn-IZ	5,83 <sup>A</sup>	6,67 <sup>A</sup>	6,87 <sup>A</sup>	6,65 <sup>A</sup>	6,89

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,2±0,1.

b)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1h	3h	6h	24h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	7,31	7,14	7,23	7,02	7,43
A	0,05	-0,03	0,06	-0,10	9,92
Cu -A	4,44 <sup>A</sup>	7,14 <sup>A</sup>	7,23 <sup>A</sup>	7,02 <sup>A</sup>	9,08
Zn -A	0,10	-0,08	0,06	0,12	9,80
Komerrijalno dostupna voda (JV)					
Kontrola*	7,10	7,07	6,87	6,66	7,76
A	0,03	0,34	0,18	0,64	9,59
Cu-A	5,94 <sup>A</sup>	7,07 <sup>A</sup>	6,87 <sup>A</sup>	6,66 <sup>A</sup>	8,87
Zn-A	-0,02	0,29	0,21	1,76	8,88

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,2±0,1.

\*Broj bakterija u kontroli izražen je kao log CFU cm<sup>-3</sup>. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Najniži nivo osetljivosti je 10 CFU cm<sup>-3</sup>. <sup>A</sup> – značajno različito u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Vrednosti kontrolnih uzoraka i smanjenja broja ćelija prikazano je u jedinicama log CFU cm<sup>-3</sup>. Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.

Cu-IZ i Cu-A nakon 3 h pokazuju baktericidni efekat prema izolatu I (tabela 3.15.) u oba ispitivana medijuma. Zn-IZ ispoljava baktericidni efekat nakon 3 h u SV i nakon 6 h u JV.

**Tabela 3.16.** Smanjenje broja bakterija *E. coli* Izolat II u odnosu na kontrolu tokom 24 h izraženo kao redukcija log CFU u realnim vodama za: a) IZ, Cu- i Zn-IZ; b) zeolit A, Cu- i Zn-A i vrednosti pH na kraju eksperimenta.

a)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1h	3h	6h	24h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	7,34	7,44	7,45	7,47	7,50
IZ	-0,13	0,11	0,22	0,14	6,79
Cu -IZ	4,42 <sup>A</sup>	4,43 <sup>A</sup>	7,45 <sup>A</sup>	7,47 <sup>A</sup>	6,78
Zn -IZ	0,73	3,71 <sup>A</sup>	5,80 <sup>A</sup>	7,47 <sup>A</sup>	6,84
Komerrijalno dostupna voda (JV)					
Kontrola*	7,05	6,85	6,92	6,79	7,52
Z	0,07	0,02	-0,22	-0,01	6,70
Cu-IZ	4,51 <sup>A</sup>	6,85 <sup>A</sup>	6,92 <sup>A</sup>	6,79 <sup>A</sup>	6,87
Zn-IZ	1,88 <sup>A</sup>	3,58 <sup>A</sup>	6,92 <sup>A</sup>	6,79 <sup>A</sup>	6,82

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,2±0,2.

b)

Zeolit	Smanjenje broja ćelija				pH
	1h	3h	6h	24h	
Voda iz Savskog jezera (SV)					
Kontrola*	7,34	7,44	7,45	7,47	7,50
A	0,02	0,06	0,14	0,30	9,95
Cu -A	3,75 <sup>A</sup>	7,44 <sup>A</sup>	7,45 <sup>A</sup>	7,47 <sup>A</sup>	8,82
Zn -A	0,23	0,69	0,53	0,52	8,81
Komerrijalno dostupna voda (JV)					
Kontrola*	7,05	6,85	6,92	6,79	7,52
A	0,12	0,09	0,00	0,41	9,92
Cu-A	4,37 <sup>A</sup>	6,85 <sup>A</sup>	6,92 <sup>A</sup>	6,79 <sup>A</sup>	8,80
Zn-A	0,14	0,19	0,35	0,95	8,97

$t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,2±0,2.

\*Broj bakterija u kontroli izražen je kao log CFU cm<sup>-3</sup>. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Najniži nivo osetljivosti je 10 CFU cm<sup>-3</sup>. <sup>A</sup> – značajno različito u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Vrednosti kontrolnih uzoraka i smanjenja broja ćelija prikazano je u jedinicama log CFU cm<sup>-3</sup>. Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika u odnosu na kontrolu.

Izolat II je pokazao veću otpornost od izolata I prema Cu-IZ. Baktericidni efekat se u SV postiže nakon 6 h, dok se u JV postiže za 3 h (tabela 3.16.). Takođe, ovaj izolat je od izolata I otporniji i na dejstvo Zn-IZ, gde se tek nakon 24 h postiže baktericidni efekat u SV dok u JV baktericidno dejstvo Zn-IZ ispoljava nakon 6 h. Cu-A i u SV i u JV ispoljava baktericidni efekat prema ovom izolatu za 3 h.

Zn-A ne ispoljava baktericidne efekte ni prema jednom od ispitivanih izolata (tabele 3.13.-3.15). Prema izolatima I i II u SV nakon 24 h ispoljava se antibakterijski efekat, pri čemu se broj ćelija smanjuje za 1,76 i 0,95 log CFU cm<sup>-3</sup> za izolat I odnosno II, redom, u JV dok ne ispoljava nikakav efekat prema DSM 498 (tabela 3.14).

Na osnovu prikazanih rezultata može se izvesti zaključak da antibakterijska aktivnost M-Z u sva tri ispitivana vodena medijuma opada u sledećem nizu: Ag-IZ≈Ag-A>Cu-IZ≈Cu-A>Zn-IZ>>>Zn-A. Iz priloženog niza može se pretpostaviti da antibakterijska aktivnost uglavnom zavisi od metala a ne od tipa zeolita.

U tabelama 3.13-3.15. prikazane su i pH-vrednosti na kraju eksperimenta. Kao što se može primetiti iz tabela, pH-vrednost je u granicama 6,70-9,92, što je iznad gornje granice za normalan rast *E. coli* (Garrity *et al.*, 2005). Međutim, razlika u pH-vrednostima na kraju eksperimenta se ne smatra razlogom antibakterijske aktivnosti M-IZ i M-A, jer se ova razlika uočava i kod nemodifikovanih zeolita (IZ i A) koji ne ispoljavaju antibakterijski efekat. Poznato je da ni prirodni, ni sintetički zeoliti, ne pokazuju antibakterijski efekat ukoliko nisu obogaćeni teškim metalima (Hrenović *et al.*, 2012; Jiraroj *et al.*, 2014).

Nakon 1 h, koncentracija srebra izlužena u peptonsku vodu sa Ag-A iznosila je 4,17 mg Ag dm<sup>-3</sup>. Sa Ag-IZ izluženo je 0,81 mg Ag dm<sup>-3</sup>. Koncentracija izluženog srebra sa Ag-A je nešto veća nego MIK vrednost za *E. coli* (3,996 mg Ag<sup>+</sup> dm<sup>-3</sup>, Mulley *et al.*, 2014) dok je u slučaju Ag-IZ značajno manja. Ova činjenica ukazuje da se antibakterijska aktivnost može pripisati ne samo uzorcima zeolita već i slobodnim jonima srebra. Koncentracije izluženog Ag su veće od vrednosti MDK, pa se upotreba Ag-A i Ag-Z ne bi mogla preporučiti u procesima dezinfekcije voda.

Sa ciljem definisanja antibakterijskog mehanizma delovanja M-IZ i M-A izmerena je količina bakra i cinka izluženih sa Cu- i Zn-IZ i A u realnim vodama kao i optička gustina oslobođenog ćelijskog materijala (OD<sub>260</sub>).

Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 3.17. uočava se da je koncentracija izluženih metala manja od MDK vrednosti za vode (WHO, 2003a, i b) kao i da su izlužene vrednosti značajno manje od MIK vrednosti ovih metala za *E. coli* (1mM;

Navarro, 2013). Ovi rezultati upućuju na zaključak da antibakterijski efekat ispoljavaju uzorci zeolita a ne slobodni katjoni metala.

**Tabela 3.17.** Izlužene količine Cu i Zn sa metal-modifikovanih zeolita.

Uzorak	Količina izluženih metala (mg M dm <sup>-3</sup> )		
	DSM 498	Izolat 1	Izolat 2
	SV		
Cu-A	0,17	0,06	0,33
Cu-IZ	0,19	0,30	0,08
Zn-A	0,01	0,01	0,01
Zn-IZ	0,39	0,36	0,47
	JV		
Cu-A	0,22	0,24	0,17
Cu-IZ	0,30	0,25	0,33
Zn-A	0,01	0,01	0,07
Zn-IZ	0,28	0,26	0,17

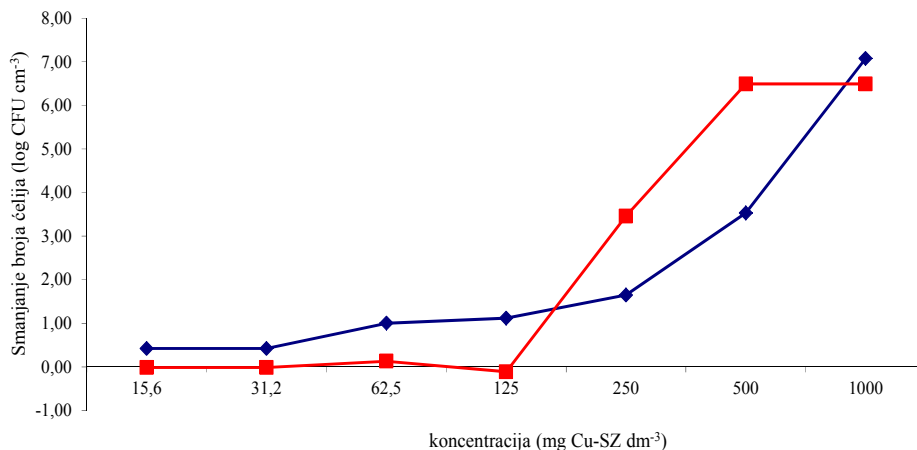
Sa ciljem ispitivanja da li M-IZ i M-A izazivaju oštećenje citoplazmatične membrane i oslobađanje ćelijskog materijala kroz membranu, merena je optička gustina na 260 nm (Cox *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; de Souza *et al.*, 2010). Prilikom merenja ni u jednom od ispitivanih sistema nije uočena promena vrednosti OD<sub>260</sub>. Ovo upućuje na zaključak da primarni mehanizam antibakterijskog delovanja M-Z nije oštećenje citoplazmatične membrane *E. coli*.

Imajući u vidu ispoljenu antibakterijsku aktivnost ispitivanih uzoraka zeolita, promene vrednosti pH, kao i izlužene koncentracije katjona metala, može se zaključiti da bi Cu-IZ, Cu-A, Zn-IZ mogli naći primenu u postupku dezinfekcije vode.

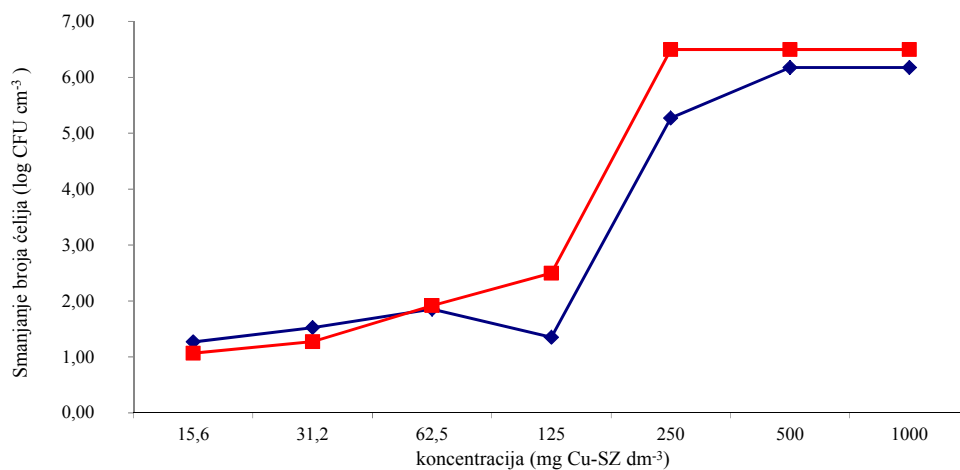
#### **3.2.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti M-SZ prema kliničkom izolatu *A. baumannii***

S obzirom na antibakterijsku aktivnost uzoraka zeolita prema *E. coli* i *S. aureus*, ispitana je i aktivnost M-SZ (M= Ni, Cu, Zn, Ag) prema multirezistentnoj vrsti bakterija *Acinetobacter baumannii* čiji klonovi pripadaju Internacionalnom klonu I i II, klinički izolovanim iz Splitske Univerzitetske bolnice. Rezultati ispitivanja antibakterijske

aktivnosti prikazani su na slikama 3.14 i 3.15. Prema IC I i II ispitivana je i antibakterijska aktivnost Ni- i Zn -SZ. Ovi uzorci nisu pokazali aktivnost ni prema jednom od klonova u ispitivanom opsegu ( $15,6-1000 \text{ mg M-SZ g}^{-1}$ ).



a)

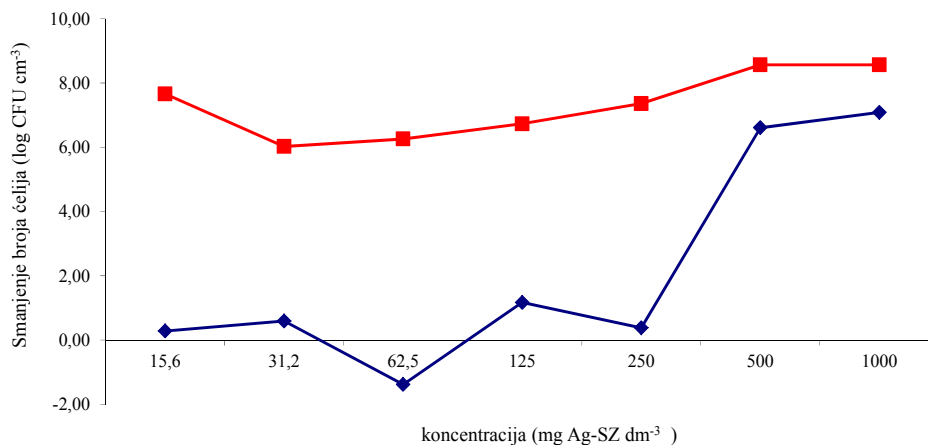


b)

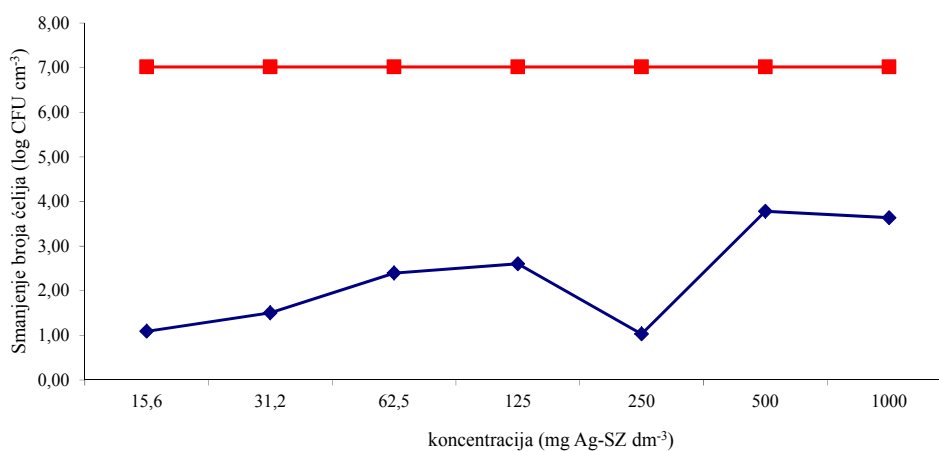
**Slika 3.14.** Antibakterijska aktivnost različitih koncentracija Cu-SZ nakon 1 (plava linija) i 24 h (crvena linija) prema kliničkom izolatu *Acinetobacter baumannii* a) IC I; b) IC klon II. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Početni broj ćelija iznosio je  $t_0$  IC I ( $10^6 \text{ CFU cm}^{-3}$ )= $8,80 \pm 0,17$ ;  $t_0$  IC II ( $10^7 \text{ CFU cm}^{-3}$ )= $1,40 \pm 0,17$ .

Kao što se sa grafika može zapaziti, antibakterijska aktivnost Cu-SZ raste sa porastom koncentracije Cu-SZ u suspenziji kao i sa porastom vremena kontakta (slika 3.14.). IC I je otporniji od klona II i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) Cu-

SZ prema klonu I iznosi  $250 \text{ mg dm}^{-3}$  dok za klon II  $125 \text{ mg dm}^{-3}$ . Vrednost za MIK su za jedan red veličine manje od MBK vrednosti.



a)



b)

**Slika 3.15.** Antibakterijska aktivnost različitih koncentracija Ag-SZ 1 (plava linija) i 24 h (crvena linija) prema kliničkom izolatu *Acinetobacter baumannii* a) IC I; b) IC klon II. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja. Početni broj ćelija iznosio je  $t_0$  IC I ( $10^6 \text{ CFU cm}^{-3}$ )= $8,80 \pm 0,17$ ;  $t_0$  IC II ( $10^7 \text{ CFU cm}^{-3}$ )= $1,40 \pm 0,17$ .

Antibakterijska aktivnost Ag-SZ raste sa porastom vremena i koncentracije Ag-SZ u suspenziji (slika 3.15). MBK Ag-SZ prema klonu I iznosi  $250 \text{ mg dm}^{-3}$  dok je prema klonu II značajno manja -  $31,2 \text{ mg dm}^{-3}$  što ukazuje da je klon I otporniji od klona II prema Ag-SZ. MIK vrednosti Ag-SZ za klon I iznose  $62,5 \text{ mg dm}^{-3}$  i  $15,6 \text{ mg dm}^{-3}$  za klon I i II, redom.



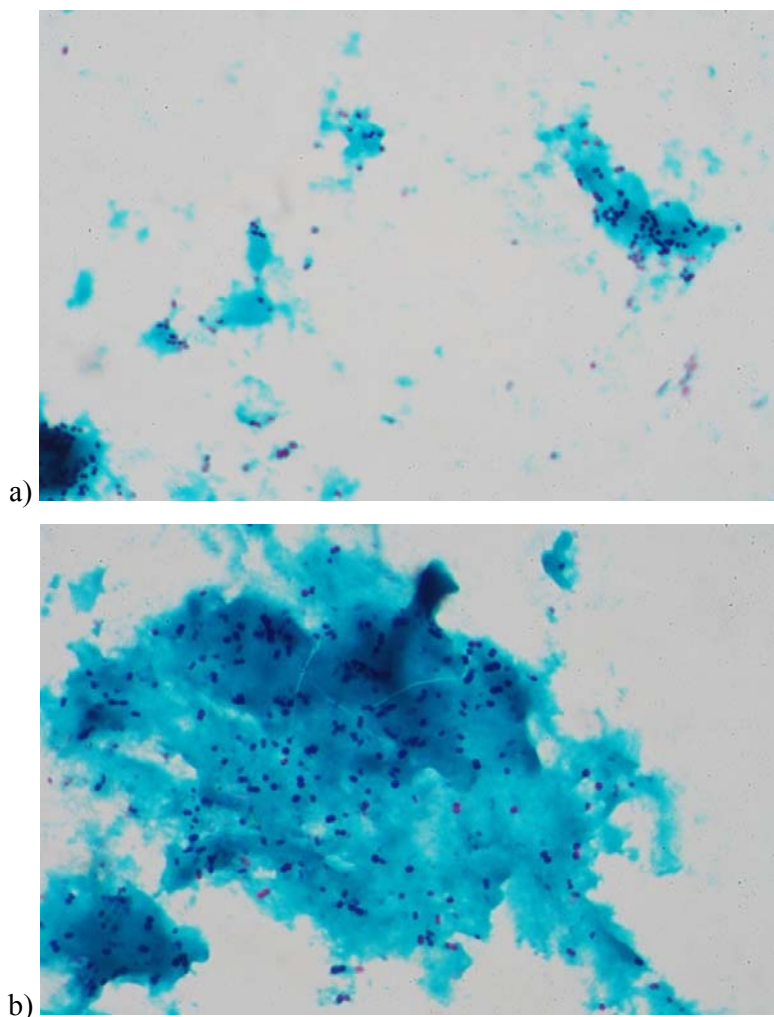
Takođe, i u ovim eksperimentima određena je koncentracija Cu i Ag izluženih sa Cu- i Ag-SZ i rezultati su prikazani u tabeli 3.18.

**Tabela 3.18.** Koncentracije izluženih katjona u suspenzijama za koje su utvrđene vrednosti MBK i MIK. Pored koncentracije katjona, prikazan je i procenat izluživanja.

	Konc. mg dm <sup>-3</sup>	% izluživanja	Konc. mg dm <sup>-3</sup>	% izluživanja
	Cu		Ag	
Klon I				
MBK	0,40	7,9	0,09	0,7
MIK	0,52	20,3	0,06	1,9
Klon II				
MBK	0,10	4,1	0,13	8,2
MIK	0,12	9,5	0,08	10,6

Izlužene koncentracije su u granicama vrednosti MDK propisanih za R. Srbiju (web 6). Ovi rezultati ukazuju da se katjoni imobilisani na zeolitu izlužuju od 4 do 20 % što bi moglo da ukaže na antibakterijsku aktivnost kako katjona, tako i samih zeolita.

Bojenjem ćelija dokazano je postojanje tankog sloja ekstracelularne tečnosti kod oba klona *A. baumannii* (slika 3.16.). Ekstracelularna tečnost ima značajnu ulogu u detoksikaciji teških metala tako što sprečava da katjoni teških metala dospeju do same bakterijske ćelije (Jayasankar *et al.*, 2008). S obzirom da se infekcije izazvane bakterijom *A. baumannii* vrlo teško kontrolišu i da je ovaj soj poznat kao multirezistentan, razvoj novih antimikrobnih agenasa jedan je od prioritarnih zadataka u mikrobiologiji. Prikazani rezultati ukazuju da ispitivani zeoliti mogu da budu osnova za iznalaženje rešenja u ovoj oblasti.

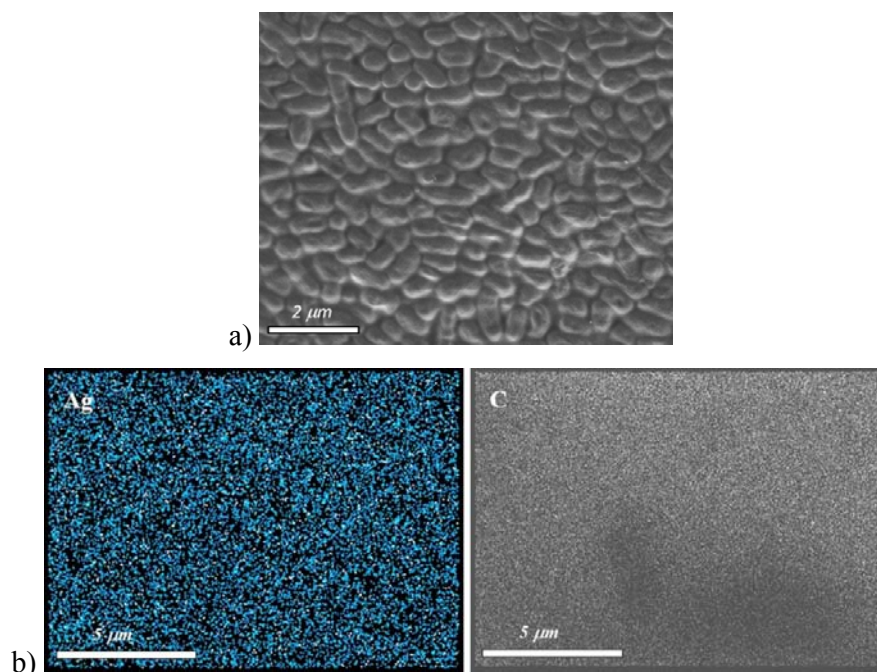


**Slika 3.16.** Tanak sloj ekstracelularne tečnosti (plava boja) bakterijskih izolata *A. baumannii* a) IC I; b) IC klon II. Čelije *A. baumannii* obojene su crveno.

### 3.3. Mehanizam antibakterijskog delovanja

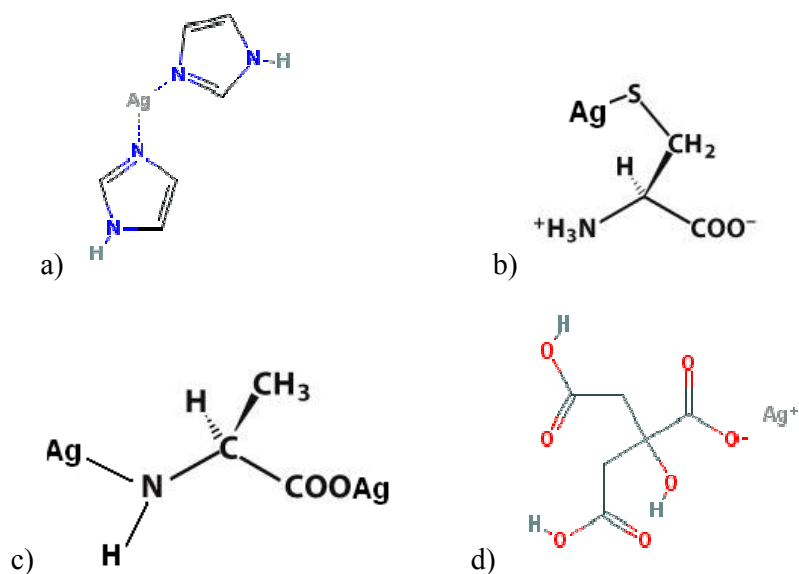
Podaci u vezi sa mehanizmom antibakterijskog dejstva, naročito kada je u pitanju multirezistentan *A. baumannii*, u literaturi su vrlo oskudni. Kako je u ovom radu pokazano da Ag-SZ pokazuje baktericidni efekat prema *A. baumannii* pri čemu se sa Ag-SZ izluži oko 10 % Ag, ispitana je priroda veze koju srebro ostvaruje sa biomasom *A. baumannii*. Za ove eksperimente odabran je soj RUH 134 koji je usvojen kao referentni za Internacionalni klon II (Nigro i Hall, 2012).

EDAX metodom najpre je ispitan koncentracioni profil srebra na površini biomase i pokazano je da se srebro ravnomerno raspoređuje (slika 3.17b). Kao što se može uočiti sa slike 3.17a, bakterijske ćelije su gusto raspoređene i nisu oštećene.



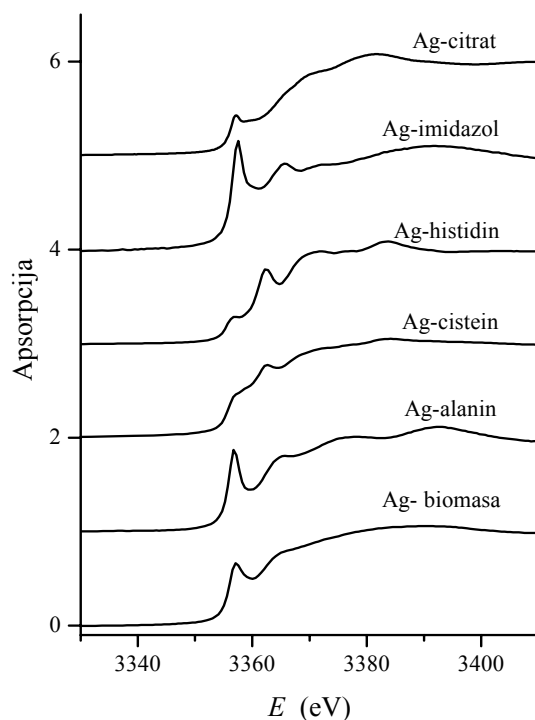
**Slika 3.17.** a) SEM fotografija bakterijske biomase i b) koncentracija Ag i C na površini biomase.

Priroda veze između srebra i biomase ispitana je EXAFS/XANES metodom. Za potrebe analize sintetisani su kompleksi srebra sa različitim aminokiselinama kao i Ag-citrat. Kod ovih kompleksa atomi Ag ostvaruju koordinacione veze sa atomima N, O i/ili S. Sintetisani kompleksi su korišćeni kao referentni uzorci - standardi. Prostorni raspored atoma u četiri sintetisana standarda prikazan je na slici 3.18.



**Slika 3.18.** Prostorni raspored atoma u standardima a) Ag-imidazola; b) Ag-cisteina; c) Ag-alanina; d) Ag-citrata.

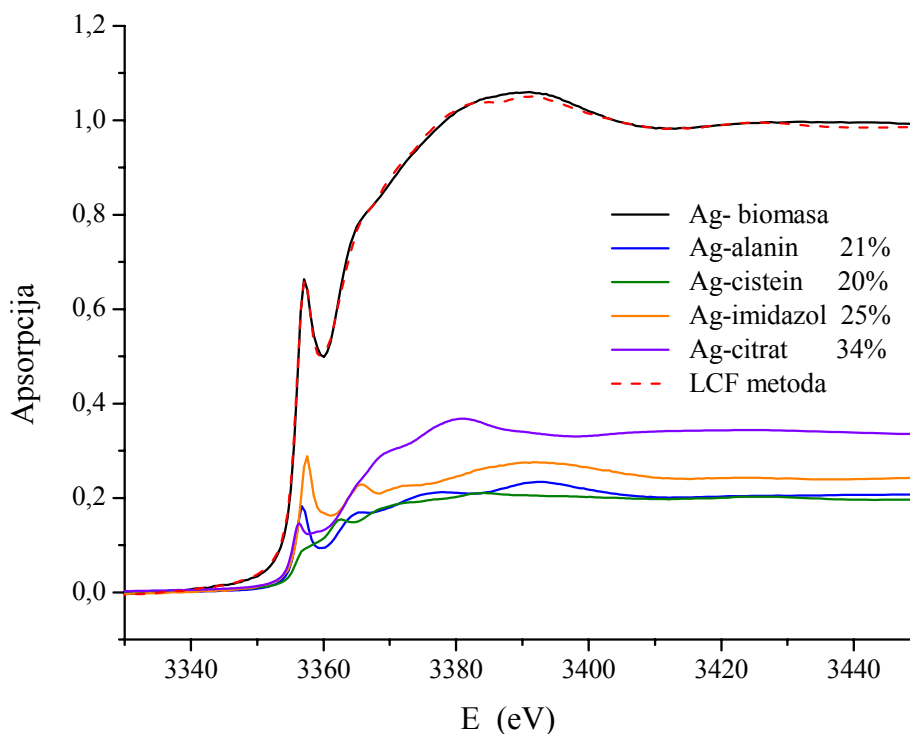
Poređenjem spektara standarda i uzorka dobija se tačan uvid u prirodu koordinacione veze (Bovenkamp *et al.*, 2013b; Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Na slici 3.19. su prikazani dobijeni XANES-spektri. Najizraženiji pik u snimljenom spektru naziva se „bela linija“ (*engl.* white line) i kod srebro-oksida se javlja na oko 3350 eV. U slučaju Ag(I) ovaj pik se pripisuje kovalentnoj vezi između Ag i liganda, a intenzitet apsorpcije se povećava sa „5s→4d“ hibridizacijom (Behrens *et al.*, 1999). U odnosu na AgNO<sub>3</sub>, položaj „bele linije“ tretirane biomase se pomera za oko 1 eV što je u skladu sa rezultatima objavljenom u radu Bovenkamp i saradnici (Bovenkamp *et al.*, 2013b). Najbolje slaganje zapaža se u slučaju Ag-citrata i Ag-imidazola i tretirane biomase.



**Slika 3.19.** XANES-spektri biomase *A. baumannii* tretirane srebrom kao i spektri standarda.

Slaganje spektara dalje je matematički obrađeno metodom lineranog fitovanja (*engl.* linear combination fitting, LCF). Dobijeni rezultati ukazali su da se spektar tretirane biomase može razmatrati kao kombinacija spektara kompleksa, i to: Ag-citrata (34 %), Ag-imidazol (25 %), Ag-alanin (21 %) i Ag-cistein (20 %). Greška LCF metode iznosila je  $\pm 10\%$ , što je u skladu s rezultatima slične analize za *E. coli* i *S. aureus* (Bovemkamp *et al.*, 2013b).

U kompleksu Ag-cisteina (slika 3.18b) srebro je u donorsko-akceptorskoj vezi sa atomima sumpora, dok se kod Ag-alanina veza ostvaruje preko dva donorska atoma: kiseonika i azota (slika 3.18c). Kod Ag-imidazola koordinaciona veza se ostvaruje preko azota (slika 3.18a). Rezultati LCF metode upućuju na zaključak da je celokupna količina srebra vezana i da nema slobodnih jona srebra u uzorku biomase.



**Slika 3.20.** XANES spektar *A. baumannii* tretiranog srebrom (puna linija) i najbolje slaganje sa referentnim standardima. Udeo standarda dat je u procentima.

Sa slike 3.20. se uočava da je u tretiranoj biomasi udeo veza Ag-S najmanji (20 %). Ovo je donekle neočekivan rezultat s obzirom da su atomi sumpora („meke baze“) dobri donori elektrona za „meke kiseline“. Međutim, kako su –SH grupe prisutne u samo dve aminokiseline - cisteinu i metioninu (Bovenkamp *et al.*, 2013b) logično je pretpostaviti da je ovo razlog maloj zastupljenosti „Ag-S“ veze.

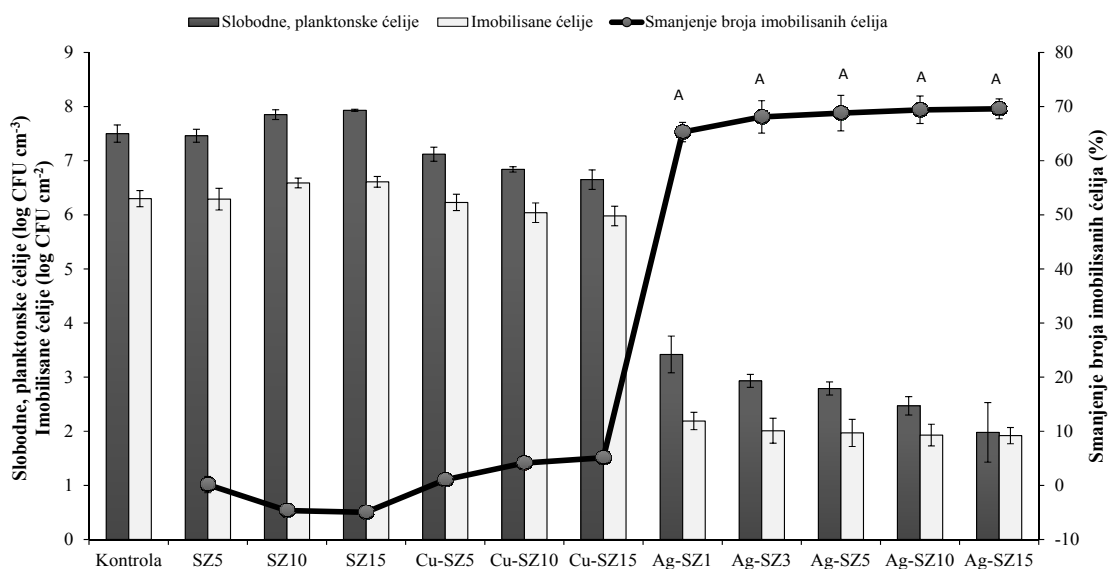
U tretiranoj biomasi najzastupljenije su veze Ag-O (34 %) i Ag-N (25 %) kao i Ag-(O,N) (21 %). Na osnovu prikazanih rezultata, može se izvesti zaključak da joni srebra sa biomasom ostvaruju veze preko –NH i –OH grupa, i u manjem procentu preko –SH. Vezivanje srebra za amino (-NH) i hidroksi (-OH) grupe upućuje da se mehanizam antibakterijskog delovanja može dovesti u vezu sa vezivanjem srebra za molekule DNK izazivajući genotoksičnost, ali i za spoljašnju membranu uzrokujući oštećenje funkcija membrane.

### 3.4. Sinteza novih materijala sa antibakterijskim dejstvom

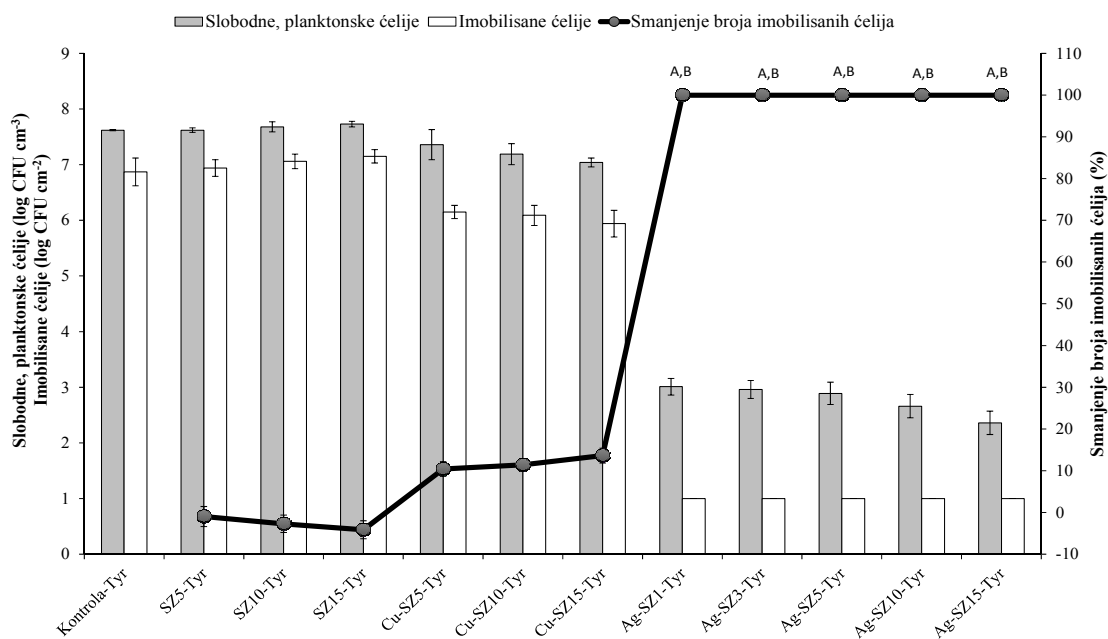
S obzirom da endotrahijalni tubusi i kateteri (koji su izrađeni od različitih termoplastičnih polimera) predstavljaju rezervoare za patogene bakterije, u ovom radu je ispitano i da li je moguće modifikacijom jednog komercijalnog termoplastičnog polimera dobiti materijal sa antibakterijskim delovanjem. U tu svrhu, uzorak komercijalnog tubusa rastvoren je u tetrahidrofuranu (THF) i u rastvor je dodat M-SZ (M=Cu, Ag) u različitoj koncentraciji. Nakon sušenja dobijenih suspenzija, ispitana je antibakterijska aktivnost dobijenih kompozita, kao i to da li dodatak zeolita utiče na preradljivost i obradu polimerne matrice (poli(vinil-hlorid), PVC).

Antibakterijska aktivnost kompozita koji su sadržavali 1-15 mas % SZ ili M-SZ, ispitana je prema *A. baumannii* ST 145. S obzirom na činjenicu da D-aminokiseline ometaju obrazovanje biofilma, (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Hochbaum *et al.*, 2011; Xu i Lui, 2011) dobijeni kompoziti su bili i dodatno modifikovani tj. impregnirani D-tirozinom (D-Tyr). Rezultati su prikazani na slici 3.21.

a)



b)



**Slika 3.21.** Antibakterijska aktivnost sintetisanih kompozita prema vrsti bakterije *A. baumannii* bez (a) i sa impregnacijom D-Tyr (b). Koncentracija zeolita u kompozitu prikazana je brojem u oznakama kompozita.  $t_0$  (log CFU cm<sup>-3</sup>) = 7,79 ± 0,2. Smanjenje broja bakterija računato je kao razlika log CFU u odnosu na kontrolu.

Rezultati na slici 3.21. pokazuju da kompoziti sa SZ ne pokazuju antibakterijska svojstva. U poređenju sa kontrolnim uzorcima, kompoziti sa Ag-SZ pokazuju značajnu



antibakterijsku aktivnost. Antibakterijska aktivnost blago raste sa porastom količine Ag-SZ u kompozitima, pa se broj planktonskih ćelija smanjuje za 4,7 odnosno 5,5 log CFU cm<sup>-3</sup> za kompozite koji sadrže 1 i 15 mas.% Ag-SZ, redom. Smanjenje broja imobilisanih ćelija beznačajno varira u zavisnosti od koncentracije Ag-SZ u kompozitima (broj imobilisanih ćelija se smanjuje za 4,1 odnosno 4,4 log CFU za kompozite sa 1 i 15 mas.% Ag-SZ, redom). Kompozit sa 15 mas.% Cu-SZ pokazao je antibakterijsku aktivnost od 5 % smanjenja broja imobilisanih ćelija, dok kompoziti sa manjim sadržajem Cu-SZ ne pokazuju antibakterijski efekat.

Impregnacija kompozita SZ sa D-tirozinom nije imala uticaj na antibakterijsku aktivnost (slika 3.21b). Takođe, impregnacija kompozita sa Ag-SZ nije značajnije uticala na antibakterijsku aktivnost prema planktonskim ćelijama (slika 3.21b). Broj planktonskih ćelija je smanjen za 4,6 odnosno za 5,3 log CFU cm<sup>-3</sup> za kompozite sa 1, odnosno 15 mas. % Ag-SZ. Impregnacija kompozita Ag-SZ sa D-Tyr povećala je aktivnost. Postignut je baktericidni efekat prema imobilisanim ćelijama za sve koncentracije Ag-SZ. Kod Cu-SZ impregnacijom je postignuta antibakterijska aktivnost prema imobilisanim ćelijama od 10, odnosno 14 % za kompozite sa 5 i 15 mas. % Cu-SZ, redom.

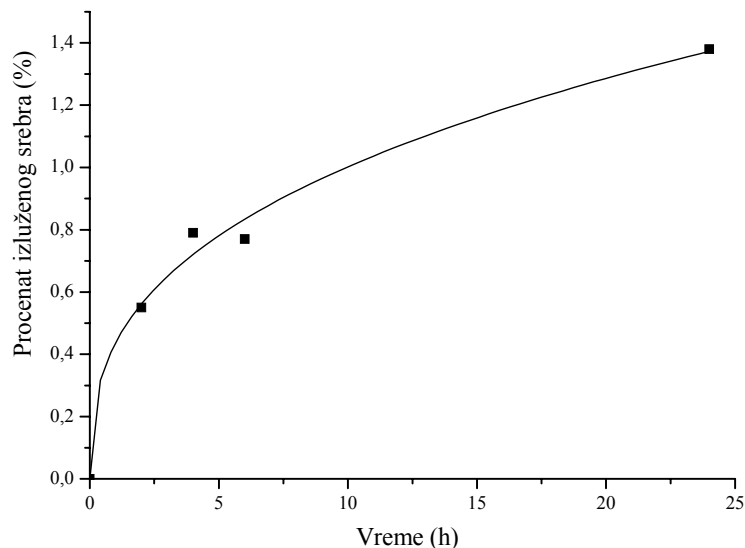
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 3.21. može se izvesti zaključak da kompoziti sa Cu-SZ ne pokazuju značajan antibakterijski efekat prema ispitivanoj vrsti bakterije. S druge strane, kompoziti sa 1 mas. % Ag-SZ pokazuju značajan antibakterijski efekat, a impregnacijom sa D-Tyr se postiže baktericidni efekat. Ovo ukazuje na to da kompoziti, po prvi put sintetisani u ovom radu, mogu naći primenu kao potrošni medicinski materijal. Poređenja radi, upotreba hidrogelova na bazi polivinil alkohola koji sadrže nanočestice srebra smanjuje broj *P. aeruginosa* za 2 log CFU cm<sup>-3</sup> i *S. aureus* za 1 log CFU cm<sup>-3</sup> nakon 24 h (Loo *et al.*, 2014). Takođe, poliuretan sa česticama srebra pokazuje smanjenje broja *S. epidermidis* za 2,5-3,8 log CFU (Dowling *et al.*, 2001). U skorije vreme, objavljeno je i da PVC sa 10 mas.% Ag smanjuje broj *E. coli* i *S. epidermis* za 4 do 6 log CFU (Zampino *et al.*, 2011).

Takođe, ispitana je i antibakterijska aktivnost D-Tyr u koncentraciji od 100 mg dm<sup>-3</sup> kako bi se utvrdilo da li se antibakterijska aktivnost pripisuje sinergističkom dejstvu D-Tyr i kompozita, ili samo D-Tyr. D-Tyr ne pokazuje antibakterijsku aktivnost (smanjenje broja ćelija je 0,04 log CFU cm<sup>-3</sup>).

S obzirom da je sa gledišta potencijalne primene kompozita značajno da li izlužuju katjone metala, izmerena je koncentracija Ag i Cu nakon 24 h kontakta kod

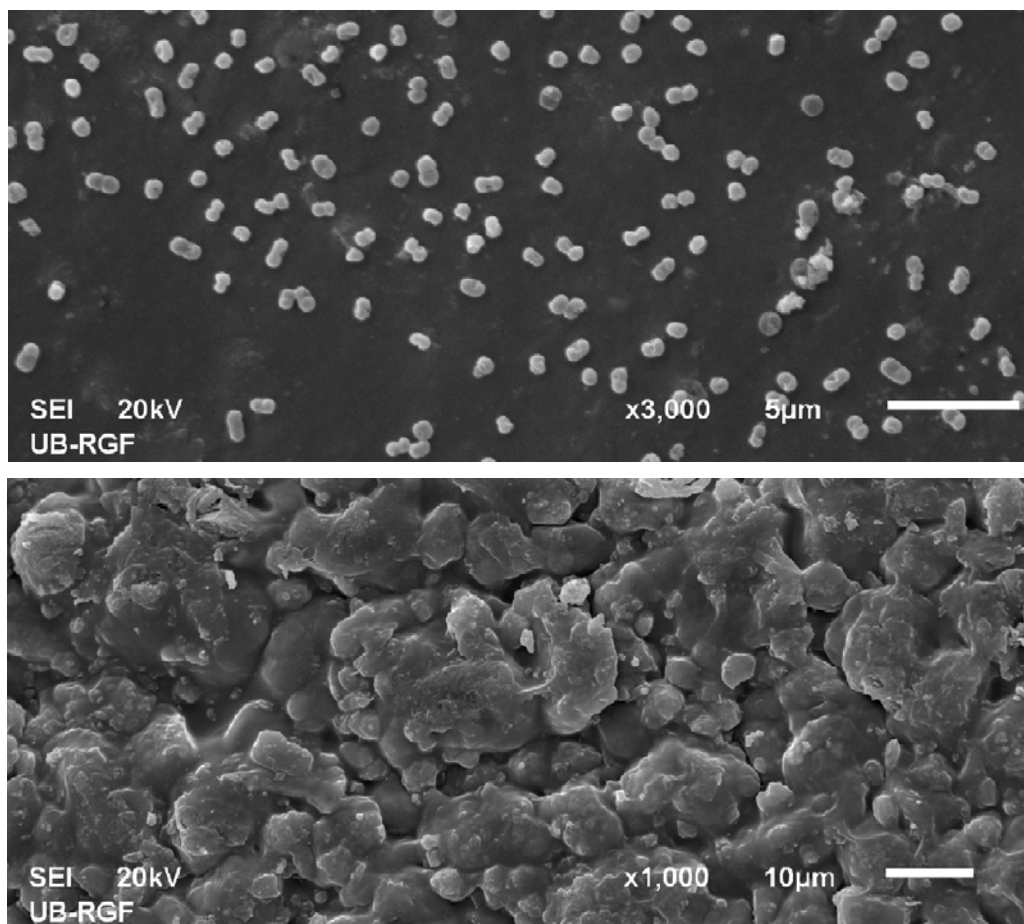
kompozita sa najvećim sadržajem M-SZ (15 mas.%). Nakon 24 h, iz kompozita je izluženo oko 1 % Cu ili Ag.

U slučaju kompozita sa Ag-SZ ispitana je i kinetika izluživanja srebra (slika 3.22.). Kinetički podaci prate Krosmajers-Pepasov model,  $F = k \cdot t^n$  (F – procenat izluživanja Ag sa površine kompozita,  $k$  – kinetička konstanta,  $n$  – eksponent koji opisuje mehanizam izluživanja). Na osnovu vrednosti eksponenta  $n = 0,36$ , zaključeno je da je kinetika izluživanja limitirana procesom difuzije (Costa i Sousa Lobo, 2001).



**Slika 3.22.** Kinetika izluživanja srebra iz kompozita PVC-Ag-SZ. Simboli – eksperimentalni podaci, linija - Krosmajers-Pepasov model.

Slika 3.23. pokazuje da se ćelije *A. baumannii* vezuju za površinu Ag-SZ15 (slika a), dok impregnacija D-Tyr sprečava vezivanje (slika b). Ovo potvrđuje da D-Tyr sprečava nastajanje biofilma.

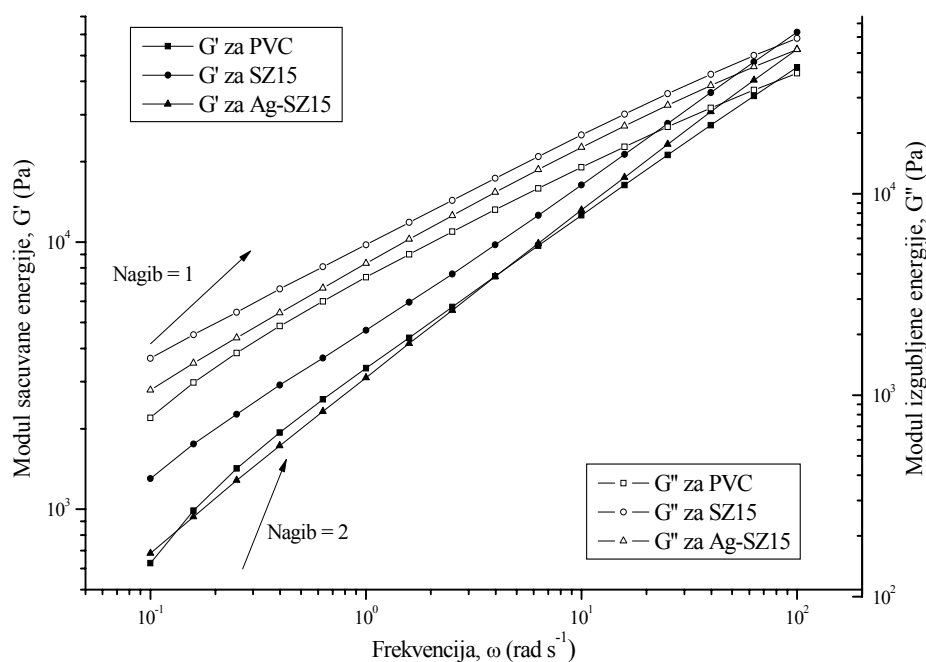


**Slika 3.23.** SEM fotografije nakon 24 h kontakta ćelija i kompozita sa 15 mas.% Ag-SZ bez (a) i sa impregnacijom D-Tyr (b).

Vrednosti pH na početku i na kraju eksperimenta nisu se značajno razlikovale (razlike nisu bile veće od 0,5 jedinica pH). Najmanja i najveća izmerena vrednost pH iznosila je 6,8 i 7,5, redom. S obzirom da je optimalna vrednost pH za rast soja *Acinetobacter* 5-8 (Garrity *et al.*, 2005), može se zaključiti da antibakterijska aktivnost kompozita nije vezana za promenu pH.

Uticaj zeolita na prerađljivost PVC ispitana je analizom reoloških svojstava kompozita (slike 3.24. i 3.25.) iz rastopa, koristeći periodična reološka merenja. Modul sačuvane energije ( $G'$ ), modul izgubljene energije ( $G''$ ) i dinamička kompleksna viskoznost ( $\eta^*$ ) PVC kao i kompozita sa 15 mas.% SZ ili Ag-SZ merena su u oblasti frekvencija od 0,1-100 rad s<sup>-1</sup> na 180, 190 i 200 °C. Moduli sačuvane i izgubljene energije predstavljaju meru elastičnog i viskoznog ponašanja materijala pod dejstvom deformacija.

Dodatak SZ povećava vrednost  $G'$  PVC-a, dok Ag-SZ utiče na  $G'$  samo na visokim frekvencijama. Vrednost  $G''$  poboljšana je dodatkom kako SZ tako i Ag-SZ, nezavisno od frekvencije. Tabela 3.19. prikazuje vrednosti modula i dinamičke viskoznosti pri niskim i visokim frekvencijama. Primećuje se da je dinamička viskoznost veća od viskoznosti referentnog uzorka (PVC) nezavisno od frekvencije, kao i da kompozit sa SZ15 ima najveću vrednost viskoznosti. Sličan trend se zapaža i za zavisnost modula sačuvane i izgubljene energije od frekvencije (slika 3.24.).

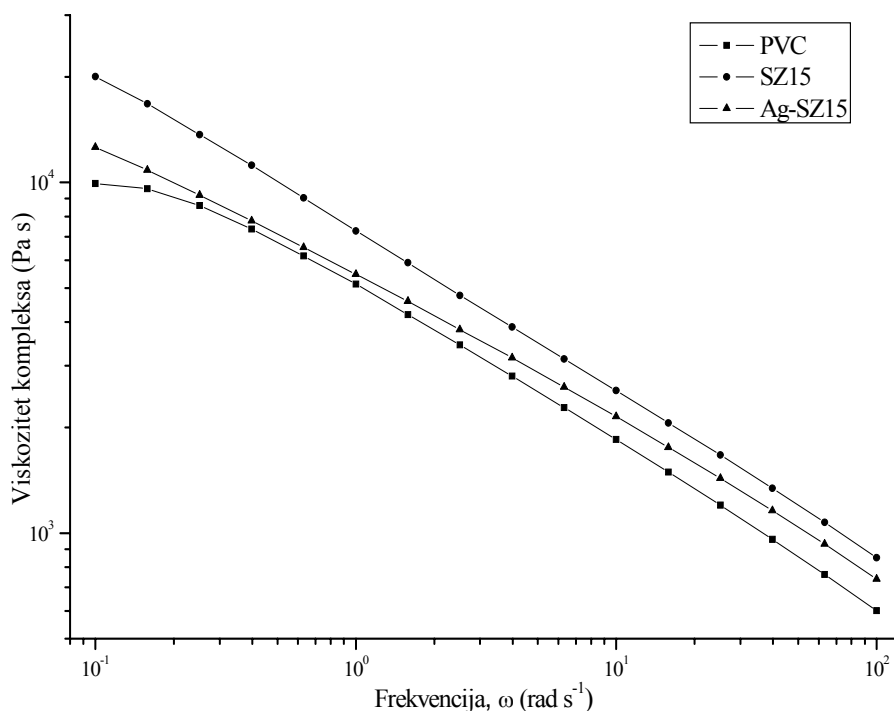


**Slika 3.24.** Zavisnost modula sačuvane ( $G'$ ) i izgubljene energije ( $G''$ ) od frekvencije na  $0,1-100 \text{ rad s}^{-1}$  za uzorke PVC, SZ15 i Ag-SZ15 u stanju rastopa na  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Zavisnost modula od frekvencija pokazuju da  $G'$  i  $G''$  za PVC i kompozite rastu sa porastom frekvencije. Na osnovu zavisnosti kompleksne viskoznosti od frekvencije primećuje se da PVC i kompoziti pokazuju nenjutnovsko ponašanje, tj. da  $\eta^*$  opada sa porastom frekvencije povezano sa postojanjem prepletaja makromolekulskih lanaca (slika 3.25.). Za razliku od kompozita, kod PVC-a je prisutan plato na niskim frekvencijama.

Vrednosti nagiba ( $m$ ,  $n$ ,  $p$ ) zavisnosti  $G'(\omega)$ ,  $G''(\omega)$  i  $\eta^*(\omega)$  pri niskim frekvencijama su prikazane u tabeli 3.19. Zeolit utiče na smanjenje vrednosti nagiba što se može pripisati efektu ojačavanja polimerne matrice, kao i interakcijama između

PVC-a i čestica zeolita. Treba napomenuti da su vrednosti  $m$  (0,89),  $n$  (0,81) za PVC manje od vrednosti nagiba karakteristične za rastope polimera u potpuno relaksiranom stanju ( $m=2$ ,  $n=1$ ), što se može pripisati interakciji plastifikatora sa PVC-om (Persico *et al.*, 2009). Vrednost energije aktivacije,  $E_a$ , kod kompozita veća je od vrednosti  $E_a$  za PVC što ukazuje da dodatak zeolita smanjuje tečljivost PVC-a pod dejstvom deformacije.



**Slika 3.25.** Zavisnost viskoziteta kompleksa ( $\eta^*$ ) u opsegu od frekvencije na 0,1-100 rad s<sup>-1</sup> za uzorke PVC, SZ15 i Ag-SZ15 u stanju rastopa na 200 °C.

Dinamičko-mehanička svojstva kompozita ispitivana su na čvrstim uzorcima u temperaturnom opsegu od 25 do 120 °C (rezultati nisu prikazani) pri deformaciji 0,1 % i frekvenciji 1 Hz. Dodatak SZ15 ili Ag-SZ15 povećava modul sačuvane energije polimerne matrice u oblasti gumolikog ponašanja ( $T > 60$  °C), kao i na 25 °C.

**Tabela 3.19.** Parametri mehaničko-dinamičke analize za PVC i kompozite.

Uzorak	Uzorak u čvrstom stanju		Rastopi				
	$G'$ na 25 °C, (MPa)	$G'$ na 100 °C, (MPa)	$\eta^*$ , kPa s, na 0.1 rad s <sup>-1</sup>	$\eta^* \sim \omega^{-p}$	$G' \sim \omega^m$	$G'' \sim \omega^n$	Energija aktivacije, (kJ mol <sup>-1</sup> )
SZ0	24,0	4,14	9,9	0,077	0,889	0,808	38,5
SZ15	75,0	8,40	20,1	0,415	0,603	0,575	75,5
Ag-SZ15	58,0	7,40	12,6	0,342	0,685	0,647	82,0

\* $G'$  modul sačuvane energije;  $\eta^*$  viskozitet kompleksa;  $\omega$  frekvencija;  $G''$  modul izgubljene energije;

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da, dodatak Ag-SZ dovodi do malog porasta dinamičkih reoloških parametara rastopa PVC, međutim, ova promena nema bitnijeg uticaja na prerađljivost PVC-a, što je u skladu sa do sada objavljenim literaturnim rezultatima (Zampino *et al.*, 2011). Porast reoloških parametara i pojava nenjutnovskog ponašanja na niskim frekvencijama kod rastopa kompozita se mogu pripisati dipol-dipol interakcijama između PVC lanaca i čestica zeolita (Wan *et al.*, 2003) s obzirom da elektronegativni atomi hlora u PVC lancima omogućavaju da PVC bude izrazito polaran. Zeoliti takođe imaju elektronegativnu površinu, što ukazuje na to da je i zeolit polaran, pa se zeolit može smatrati fizičkim umreživačem u PVC-u (Sodeifian *et al.*, 2012).

S obzirom da dodatak Ag-SZ u malom procentu (1 %) znatno poboljšava antibakterijsku aktivnost komercijalnog tubusa, a da sa druge strane dodatak zeolita ne utiče na prerađljivost i ponovnu obradu polimerne matrice, ovako sintetisani materijali mogu se smatrati veoma značajnim sa gledišta primene u proizvodnji potrošnog medicinskog materijala.

## **ZAKLJUČAK**

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Prirodni klinoptilolit i zeolit A moguće je obogatiti katjonima Ni, Cu, Zn i Ag u željenoj koncentraciji, polazeći od definisane početne koncentracije vodenog rastvora soli ispitivanih metala, temperature i vremena kontakta pri odnosu čvrste i tečne faze 1:100. Ispitivani metali vezuju se za zeolite po mehanizmu jonske izmene, prema reakciji:



Kinetika vezivanja bakra za prirodni zeolit kao i kinetika vezivanja srebra za klinoptilolit i zeolit A prati Lagergrenov model pseudo-drugog reda, pri čemu promena konstante brzine ne pokazuje jasan trend.

Termodinamika procesa vezivanja bakra za klinoptilolit najbolje se opisuje Frojndlihovom izotermom.

U slučaju svih postignutih koncentracija metala u zeolitima, kristaliničnost uzoraka ostaje nepromenjena.

2. Prirodni klinoptilolit i zeolit A obogaćeni katjonima Ni, Cu, Zn i Ag pokazuju antibakterijsku aktivnost prema ispitivanim Gram-negativnim (*E. coli*, *A. baumannii*) i Gram-pozitivnoj bakteriji – *S. aureus*. Antibakterijska aktivnost zavisi od:

- HPK vrednosti medijuma - što je vrednost HPK veća, antibakterijska aktivnost je manja. Aktivnost ispitivanih zeolita je veća u realnim vodama nego u hranljivim medijumima.
- Vrste metala – Antibakterijska aktivnost zeolita prati sledeći trend:

*Escherichia coli*: klinoptilolit (Z): Ag-Z>Cu-Z>Zn-Z>>>Ni-Z

zeolit A: Ag-A>Cu-A>>>>Zn-A.

*Acinetobacter baumannii*: klinoptilolit (Z): Ag-Z>Cu-Z>>>Zn-Z>>>Ni-Z.

*Staphylococcus aureus*: klinoptilolit (Z): Cu-Z>Zn-Z>>>Ni-Z.



3. Za ispitivane vrste bakterija, baktericidna aktivnost utvrđena je pri sledećim uslovima:
- *Escherichia coli*:  
Ag-Z i Ag-A ( $0,25 \text{ mmol Ag}^+ \text{ g}^{-1}$ ) u koncentraciji od  $0,1 \text{ g dm}^{-3}$  u peptonskoj vodi nakon 30 minuta;  
Cu-Z i Cu- A ( $0,25 \text{ mmol Cu}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ) u koncentraciji od  $0,1 \text{ g dm}^{-3}$  u realnoj vodi nakon 3 h.  
Zn-Z ( $0,25 \text{ mmol Zn}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ) u koncentraciji od  $0,1 \text{ g dm}^{-3}$  u realnoj vodi nakon 6 h.
  - *Acinetobacter baumannii*  
Internacionalni klon I- Ag-Z i Cu-Z u koncentraciji od  $0,25 \text{ g dm}^{-3}$  nakon 24 h.  
Internacionalni klon II- Ag-Z i Cu-Z u koncentraciji od  $0,0312$  odnosno  $0,125 \text{ g dm}^{-3}$  za Ag-Z i Cu-Z, redom.  
Koncentracija jona iznosila je  $0,47$  odnosno  $0,32 \text{ mmol Ag}^+$  odnosno  $\text{Cu}^{2+} \text{ g}^{-1}$  zeolita, redom.
4. Antibakterijska aktivnost klinoptilolita obogaćenog nanočesticama oksida Ni, Cu i Zn zavisi od hemijske prirode nanočestica. Prema *E. coli* i *S. aureus* aktivnost opada u nizu: CuO-Z>ZnO-Z>>NiO-Z, pri čemu najizraženiju aktivnost (gotovo baktericidnu) ima CuO-Z dok ZnO-Z ispoljava značajnu antibakterijsku aktivnost prema obe ispitivane vrste bakterija u realnim vodama. U nesterilnom medijumu, prema *E. coli* CuO- i ZnO-Z pokazuju baktericidnu aktivnost. NiO-Z ne pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost prema ispitivanim sojevima.
5. Nakon 24 h, u bakterijskim suspenzijama dolazi do izluživanja katjona metala. Koncentracije izluženih katjona metala zavise od vrste katjona i vrste zeolita.
- U slučaju Ni(II), koncentracija izluženih katjona je veća od MDK što nije od posebnog značaja jer Ni-Z kao ni NiO-Z ne pokazuju značajniji antibakterijski efekat.
  - Katjoni Cu(II) i Zn(II) izlužuju se u koncentraciji koja je u granicama MDK.

- Katjoni Ag izlužuju se sa Ag-Z u realnoj vodi u koncentraciji manjoj od MDK.
6. Mehanizam baktericidnog dejstva katjona Ag prema *A. baumannii* ispitan je metodama EXAFS/XANES. Za bakterijsku biomasu Ag se vezuje uglavnom preko –OH i –NH grupa, i u manjem stepenu preko –SH grupe. Ovo navodi na zaključak da Ag-joni imaju genotoksičan efekat usled vezivanja za DNK i izazivaju oštećenje funkcije membrane vezujući se za spoljašnju membranu.
  7. Ag-Z može se dodati termoplastičnim polimerima (poput poli(vinil-hlorida)) u cilju dobijanja antibakterijskih materijala. Polimeri zadržavaju preradljivost i reološka svojstva kada im se doda Ag-Z (0,4 mmol Ag g<sup>-1</sup>) u koncentracijama 1-15 mas.%. Kompozit sa 1 mas.% zeolita smanjuje broj ćelija za 4,7 log CFU cm<sup>-3</sup>. Antibakterijska aktivnost značajno se povećava impregnacijom kompozita sa D-tirozinom. Ovaj kompozit ispoljava baktericidni efekat prema imobilisanim ćelijama *A. baumannii* tokom 24 h. Baktericidni efekat pripisuje se sinergističkoj aktivnosti D-tirozina i zeolita.

Rezultati istraživanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da se prirodni zeolit – klinoptilolit i zeolit A, kao sirovine prihvatljive sa ekološkog i ekonomskog stanovišta, mogu koristiti za dobijanje dezinficijensa koji bi našli primenu kako u postupcima obrade vode, tako i za pripremu novih vrsta materijala sa antibakterijskim delovanjem.

## **LITERATURA**

- Acharya T., Peptidoglycan (Murein/Mucopeptide): Structure and Medical Significance in Microbiology for beginners-structure of bacterial cells, Microbe online, 2013.
- Akhigbe L., Ouki S., Saroj D., Min Lim X., Silver-modified clinoptilolite for the removal of *Escherichia coli* and heavy metals from aqueous solutions, Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21:10940-10948.
- Ansari M. A., Khan H. M., Khan A. A., Cameotra S. S., Saquib Q., Musarrat J., Interaction of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with *Echerichia coli* and their cell envelope biomolecules, Journal of Applied Microbiology, 2014, 116:772–783.
- Applerot G., Lellouche J., Perkas N., Nitzan Y., Gedanken A., Banin E., ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility, RSC Advances, 2012, 2:2314–2321.
- Asakura K., Satoh H., Chiba M., Okamoto M., Serizawa K., Nakano M., Omae K., Genotoxicity studies of heavy metals: lead, bismuth, indium, silver and antimony, Journal of Occupational Health, 2009, 51:498–512.
- Baek Y.W., An Y.J., Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*, The Science of the Total Environment, 2011, 409:1603–1608.
- Baerlocher C., McCusker L. B., Olson D. H., Atlas of Zeolite Framework, Sixth Revised Edition. Netherlands, Elsevier. 2007.
- Baras J., Veljković V., Popov S., Povrenović D., Lazić M., Zlatković B., Osnovi bioprocenog inženjerstva, Tehnološki fakultet Leskovac, 2009.
- Behrens P, Aßmann S, Bilow U, Linke C, Jansen M., Electronic structure of silver oxides investigated by AgL XANES spectroscopy, Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, 1999, 625:111–116.
- Belly R.T., Kydd G.C., Silver resistance in microorganisms, Developments in Industrial Microbiology, 1982, 23:567–577.
- Bergaya F., Benny K.G.T., Lagaly G., Handbook of Clay science, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- Beyth N., Hour-Haddad Y., Domb A., Khan W., Hazan R., Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, Article ID 246012
- Blecher K., Nasir A., Friedman A., The growing role of nanotechnology in combating infectious disease, Virulence, 2011, 2:395–401.

- Bovenkamp L., X-Ray Absorption Spectroscopy in Biological Systems, Opportunities and Limitations, Universitat Bonn, Physikalisches Institut, 2013a, pp. 68-76.
- Bovenkamp G.L., Zanzen U., Krishna K.S., Holmes J., Prange A., X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 2013b, 79:6385–6390.
- Boyd G.E., Adamson A.W., Myers Jr L.S., The exchange adsorption of ions from aqueous solutions on organic zeolites, Kinetics II, Journal of the American Chemical Society, 1947, 69:2836-2842.
- Brady-Estévez A.S., Kang S., Elimelech M.A., A single-walled-carbon-nanotube filter for removal of viral and bacterial pathogens, Small, 2008, 4:481–484.
- Bragg P.D., Rainnie D.J., The effect of silver ion on the respiratory chain of *Escherichia coli*, Canadian Journal of Microbiology, 1974, 20:883–889.
- Breck D.W., Zeolite molecular sieve structure, Chemistry and Use, Wiley Interscience, New York, 1974.
- Brown L., Wolf J., Prados-Rosales R., Casadevall A., Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi, Nature Reviews Microbiology, 2015, 13:620–630.
- Bush K., Jacoby G.A., Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54:969–976.
- Cabral J.P.S., Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, 7: 3657–3703.
- Calderón I.L., Elías A.O., Fuentes F.L., Pradenas G.A., Castro M.E., Arenas F.A., Pérez J.M., Vásquez C.C., Tellurite-mediated disabling of [4Fe–4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases, Microbiology, 2009, 155:1840–1846.
- Carson C., Mee B., Riley T., Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46:1914-1920.
- Cava F., de Pedro M.A., Lam H., Davis B.M., Waldor M.K., Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids, EMBO Journal, 2011a, 30:3442–3453.

- Cava F., Lam H., de Pedro M.A., Waldor M.K., Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011b, 68:817–831.
- Chambers H.F., DeLeo F.R., Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era, *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7:629-641.
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J., Different inactivation behavior of MS-2 phase and *E. coli* in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection, *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71:270–275.
- Chung Y.C., Wang H.L., Chen Y.M., Li S.L., Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens, *Bioresource Technology*, 2003, 88:179–184.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 17th informational supplement, M100-S17 CLSI, Wayne, PA, 2007.
- Costa P., Sousa Lobo J.M., Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13:123–133.
- Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J., How bacteria stick, *Scientific American*, 1978, 238:86-95.
- Costerton J.W., Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *TRENDS in Microbiology*, 2001, 9:50-53.
- Cotton F.A., Wilkinson G., Gaus P.L., *Basic Inorganic Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1995, p. 580.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., Determining the antimicrobial actions of tea tree oil, *Molecules*, 2001, 6:87-91.
- Danilczuk M., Lund A., Saldo J., Yamada H., Michalik J., Conduction electron spin resonance of small silver particles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2006, 63:189-91.
- Dastjerdi R., Montazer M., A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 79:5-18.
- De la Rosa G.I., Olguin M.T., Alcantara D., Antibacterial behaviour of silver-modified clinoptilolite-heulandite rich tuff on coliform microorganisms from wastewater in a column system, *Journal of Environmental Management*, 2008a, 40:853–863.

- De la Rosa G.I., Olguin M.T., Alcantara D., Bactericides of coliform microorganisms from wastewater using silver-clinoptilolite rich tuffs, *Applied Clay Science*, 2008b, 40:45–53.
- De la Rosa G.I., Olguin M.T., Alcantara D., Silver-modified Mexican clinoptilolite-rich tuffs with various particle sizes as antimicrobial agents against *Escherichia coli*, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2010, 54:139–142.
- de Souza E.L., de Barros J.C., Eduardo C., de Oliveira V., da Conceição M.L., Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137:308–311.
- Deckers A.S., Loo S., L'Hermite M.M., Boime N.H., Menguy N., Reynaud C., Gouget B., Carrière M., Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxidenanoparticles and carbon nanotubes towards bacteria, *Environmental Science & Technology*, 2009, 43:8423–8429.
- Demirci S., Ustaoglu Z., Yilmazer G.A., Sahin F., Baç N., Antimicrobial properties of zeolite-X and zeolite-A ion-exchanged with silver, copper and zinc against a broad range of microorganisms, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172:1652–1662.
- Đokić S., Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver Citrate Complexes Hindawi Publishing Corporation *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2008, Article ID 436458, doi:10.1155/2008/436458.
- Đolić M., Rajaković-Ognjanović V., Štrbac S., Rakočević Z., Veljović Đ., Dimitrijević S., Rajaković Lj., The antimicrobial efficiency of silver activated sorbents, *Applied Surface Science*, 2015, 357:819–831.
- Dong L., Henderson A., Field C., Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes Suspended in Different Surfactants, *Journal of Nanotechnology*, Volume 2012, Article ID 928924, doi:10.1155/2012/928924
- Donlan R.M., Costerton J.W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15:167-93.
- Dowling D.P., Donnelly K., McConnell M.L., Eloy R., Arnaud M.N., Deposition of antibacterial silver coatings on polymeric substrates, *Thin Solid Films*, 2001, 398 – 399:602–606.
- Đukić D., Gajin S., Matavulj M., Mandić, L., *Mikrobiologija voda, Prosveta*, Beograd, 2000.

- Durán N., Durán M., de Jesus M. B., Seabra A., Fávaro W., Nakazato G., Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, 12:789–799.
- Erskine P.T., Senior N., Awan S., Lambert R., Lewis G., Tickle I.J., Sarwar M., Spencer P., Thomas P., Warren M.J., Shoolingin-Jordan P.M., Wood S.P., Cooper J.B., X-ray structure of 5-aminolaevulinic acid dehydratase, a hybrid aldolase, *Nature Structural & Molecular Biology*, 1997, 4:1025–1031.
- Fauchon M., Lagniel G., Aude J.C., Lombardia L., Soularue P., Petat C., Marguerie G., Sentenac A., Werner M., Labarre J., Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand, *Molecular Cell*, 2002, 9:713–723.
- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2000, 52:662–668.
- Freundlich H.M.F., Over the adsorption in solution, *The Journal of Physical Chemistry A*, 1906, 57:385–470.
- Fuhrmann G.F., Rothstein A., The mechanism of the partial inhibition of fermentation in yeast by nickel ions, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1968, 163:331–338.
- Furr J. R., Russell A. D., Turner T. D., Andrews A., Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate, *Journal of Hospital Infection*, 1994, 27:201–208.
- Garcia-Fuentes M., Alonso M.J., Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?, *Journal of Controlled Release*, 2012, 161:496–504.
- Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Part B, vol. 2, Springer, New York, 2005. pp. 425–437.
- Ghandour W., Hubbard J., Deistung J., Hughes M., Poole R., The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: toxic effects and interaction with copper ions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988, 28:559–565.
- Giamarellou H., Antoniadou A., Kanellakopoulou K., *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 32:106–119.
- Gmelin handbuch der anorganischen chemie, Springer, Berlin, Volume 61/B6, 1975.
- Godelitsas A., Armbruster T., HEU-type zeolites modified by transition elements and lead, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2003, 61:3–24.
- Goić-Barišić I., Bedenić B., Tonkić M., Novak A., Katić S., Kalenić S., Punda-Polić V., Towner K.J., Occurrence of OXA-107 and IS<sub>Aba1</sub> in Carbapenem-Resistant



- Isolates of *Acinetobacter baumannii* from Croatia Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47:3348-3349.
- Goić-Barišić I., Towner K.J., Kovačić A., Sisko-Kraljević K., Tonkić M., Novak A., Punda-Polić V., Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase, Journal of Hospital Infection, 2011, 77:368-369.
- Gotz F., Bannerman T., Schleifer K.H., The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In The Prokaryotes, 3rd edition, Vol. 4 Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria,. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York, NY: Springer 2006, pp. 5–75.
- Grass G., Rensing C., Solioz M., Metallic copper as an antimicrobial surface, Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77:1541–1547.
- Green B.N., Johnson C.D., Egan J.T., Rosenthal M., Griffith E.A., Evans M.W., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists, Journal of Chiropractic Medicine, 2012, 11:64–76.
- Green M. H., Muriel W. J., Bridges B. A., Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Research, 1976, 38:33–42.
- Guerra R., Lima E., Viniegra M., Guzman A., Lara V., Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites, Microporous and Mesoporous Materials, 2012, 147:267-273.
- Haefli C., Franklin C., Hardy K., Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine, Journal of Bacteriology, 1984, 158:389–392.
- Harrison J.J., Tremaroli V., Stan M.A., Chan C.S., Vacchi-Suzzi C., Heyne B.J., Parsek M.R., Ceri H., Turner R.J., Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance, Environmental Microbiology, 2009, 11:2491–2509.
- Hatchett D.W., Henry S., Electrochemistry of sulfur adlayers on low-index faces of silver, Journal of Physical Chemistry, 1996, 100:9854-9859.
- Hernandez-Lauzardo A.N., Bautista-Banos S., Velazquez-del Valle M.G., Mendez-Montealv M.G., Sanchez-Rivera M.M., Bello-Perez L.A., Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill, Carbohydrate Polymers, 2008, 73:541–547.

- Higgins P.G., Dammhayn C., Hackel M., Seifert H., Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65:233–238.
- Ho Y.S., Review of Second Order Models for Adsorption Systems, *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 136:681-689.
- Hochbaum A.I., Kolodkin-Gal I., Foulston L., Kolter R., Aizenberg J., Losick R., Inhibitory Effects of D-Amino Acids on *Staphylococcus aureus* Biofilm Development, *Journal of Bacteriology*, 2011, 193:5616–5622.
- Holappa J., Hjálmsarsdóttir M., Másson M., Rúnarsson Ö., Asplund T., Soininen P., Nevalainen T., Jarvinene T., Antimicrobial activity of chitosan N-betainates, *Carbohydrate Polymers*, 2006, 65:114–118.
- Hong R., Kang T.Y., Michels C.A., Gadura N., Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78:1776-1784.
- Hossain F., Perales-Perez O.J., Hwang S., Román F., Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives, *Science of the Total Environment*, 2014, 466–467:1047–1059.
- Hrenović J., Büyükgüngör H., Orhan Y., Use of Zeolite to Upgrade Activated Sludge, *Food Technology and Biotechnology*, 2003, 41:157–165.
- Hrenović J., Goić-Barišić I., Kazazić S., Kovačić A., Ganjto M., Tonkić M. Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014, *Euro Surveill*, 2016, 21:30195-30205.
- Hrenović J., Milenković J., Ivanković T., Rajić N., Antibacterial activity of heavy metal-loaded natural zeolite, *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 201–202:260–264.
- Hrenović J., Rožić M., Sekovanić L., Anić-Vučinić A., Interaction of surfactant modified zeolites and phosphate accumulating bacteria, *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 156:576-582.
- Huang L., Li D.Q., Lin Y.J., Wei M., Evans D.G., Duan X., Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, 99:968–993.
- Huh A.J., Kwon Y.J., ‘Nanoantibiotics’: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era, *Journal of Controlled Release*, 2011, 156:128–145.

- Huheey J.E., Keiter E.A., Keiter R.L., Inorganic Chemistry: Principles of Structure & Reactivity, HarperCollins College Publisher, New York, 1993, pp. 114–117.
- Imlay J.A., Chin S.M., Linn S., Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*, *Science*, 1988, 240:640–642.
- Ingraham J.L., Marr A.G, Effects of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In: Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press; 1996. pp. 1570–1578.
- Jann, K., Jann B., Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance, *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38:705–710.
- Jaysankar D., Ramaiah N., Vardanyan L., Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury, *Marine Biotechnology*, 2008, 10:471-477.
- Jevtić S., Grijčić S., Hrenović J., Rajić N., Surfactant-modified clinoptilolite as a salicylate carrier, salicylate kinetic release and its antibacterial activity, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2012, 159:30-35.
- Jin T., Sun D., Su J.Y., Zhang H., Sue H.J., Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Food Science*, 2009, 74:M46–M52.
- Jiraroj D., Tungasmita S., Tungasmita D.N., Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity, *Powder Technology*, 2014, 264:418–422.
- Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H., Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74:2171-2178.
- Kaali P., Stromberg E., Aune R., Cyel G., Momčilović D., Karlsson S., Antimicrobial properties of Ag<sup>+</sup> loaded zeolite polyester polyurethane and silicone rubber and long term properties after exposure to *in vitro* ageing, *Polymer degradation and Stability*, 2010, 95:1456-1465.
- Kang S., Pinault M., Pfefferle L.D., Elimelech M., Single walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity, *Langmuir*, 2007, 23:8670–8673.
- Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., Elimelech M., Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter, *Langmuir*, 2008, 24:6409–6413.

- Karageorgopoulos D.E., Falagas M.E., Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections, *The Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8:751–762.
- Kasraei S., Sami L., Hendi S., AliKhani M.Y., Rezaei-Soufi L., Khamverdi Z., Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*, *Restorative Dentistry & Endodontics*, 2014, 39:109–114.
- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.H., Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3:95–101.
- Kinniburgh D.G., General purpose adsorption isotherms, *Environmental Science and Technology*, 1986, 20:895-904.
- Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., Clardy J., Kolter R., Losick R., Inhibitory effects of D-Amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development, *Journal of Bacteriology*, 2011, 193:5616-5622.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144:51–63.
- Kwakye-Awuah B., Williams C., Kenward M.A., Radecka I., Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X, *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104:1516-1524.
- Lagergren S., Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster. K. Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar 1898, 4:1-39.
- Lam H., Oh D.C., Cava F., Takacs C.N., Clardy J., de Pedro M.A., Waldor M.K., D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria, *Science*, 2009, 325:1552–1555.
- Langmuir I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids, Part I: Solids *Journal of the American Chemical Society*, 1916, 38:2221-2295.
- Lee H.W., Koh Y. M., Kim J., Lee J.-C., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim J., Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces, *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14: 49–54.

- Lemire J., Harrison J., Turner R., Antimicrobial activity of metals: mechanism, molecular targets and applications, *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11:371-384.
- Li Q., Mahendra S., Lyon D.Y., Brunet L., Liga M.V., Li D., Alvarez P.J., Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications, *Water Research*, 2008, 42:4591-4602.
- Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zeng H.Y., Yang Y.S. Chen Y.B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85:1115-1122.
- Linley E., Denyer S. P., McDonnell G., Simons C., Maillard J. Y., Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67:1589-1596.
- Liu Y., He L., Mustapha A., Li H., Hu Z. Q., Lin M., Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107:1193-1201.
- Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W., Sun H., Tam P.K.H., Chiu J.F., Che C.M., Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles, *Journal of Proteome Research*, 2006, 5:916-924.
- Loo C.Y., Young P.M., Lee W.H., Cavaliere R., Whitchurch C.B., Rohanizadeh R., Non cytotoxic silver nanoparticle-polyvinyl alcohol hydrogels with anti-biofilm activity designed as coatings for endotracheal tube materials, *Biofouling*, 2014, 30:773-788.
- Macomber L., Rensing C., Imlay J.A., Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 2007, 189:1616-1626.
- Mah T.F.C., Toole G., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 2001, 9:34-39.
- Malachova K., Praus P., Rybkova Z., Kozak O., Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites, *Applied Clay Science*, 2011, 53:533-766.
- Malka E., Perelshtein I., Lipovsky A. Shalom Y., Naparstek L., Perkas N., Patick T., Lubart R., Nitzan Y., Banin E., Gedanken A., Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite, *Small*, 2013, 9:4069-4076.
- Maragakis L.L., Perl T.M., *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment, *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 46:1254-1263.

- Matsumura Y., Yoshikata K., Kunnisaki S., Tsuchido T., Mode of bactericidal Action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:4278-4281.
- Milenković J., Hrenović J., Goić-Barišić I., Tomić M., Đonlagić J., Rajić N., Synergistic anti-biofouling effect of Ag-exchanged zeolite and D-Tyrosine on PVC composite against the clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*, *Biofouling*, 2014, 30:965-973.
- Milenković J., Hrenović J., Matijašević D., Nikšić M., Rajić N., Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates, *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24:20273–20281.
- Mulley G., A. Jenkins T.A., Waterfield N.R., Inactivation of the Antibacterial and Cytotoxic Properties of Silver Ions by Biologically Relevant Compounds, *PLoS ONE*, 2014, 9: e94409.
- Murray R.G.E., Steed P., Elson H.E., The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria, *Canadian Journal of Microbiology*, 1965, 11:547-560.
- Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M.M., Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1987, 6:829–831.
- Navarro C. A., von Bernath D., Jerez C.A., Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: Importance for biomining and bioremediation, *Biological Research*, 2013, 46: 363-371.
- Nigro S.J., Hall R.M., Antibiotic resistance islands in A320 (RUH134), the reference strain for *Acinetobacter baumannii* global clone 2, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67:335-338.
- Ninan N., Muthiah M., BtYahaya N.A., Park I.K., Elain A., Wong T.W., Thomas S., Grohens Y., Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds, *Colloids and Surface B: Biointerferences*, 2014, 115:244-252.
- Nishioka H., Mutagenic activities of metal compounds in bacteria, *Mutation Research*, 1975, 31:185–189.
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P., Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74:65–72.

- Nunoshiba T., Obata F., Boss A.C., Oikawa S., Mori T., Kawanishi S., Yamamoto K., Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274:34832–34837.
- Ockwig N.W., Cygan R.T., Criscentia L.J., Nenof T.M., Molecular dynamics studies of nanoconfined water in clinoptilolite and heulandite zeolites, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008, 10:800–807.
- Ogunseitan O.A., Yang S., Ericson J., Microbial  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments, *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32:1899–1906.
- Olorunmola F. O., Kolawole D.O., Lamikanra A., Antibiotic Resistance and Virulence Properties in *Escherichia Coli* Strains from Cases of Urinary Tract, *Infections African Journal of Infectious Diseases*, 2013, 7: 1-7.
- Pal S., Tak Y.K., Song J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram negative bacterium *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73:1712-1720.
- Pelgrift R. Y., Friedman A. J., Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65:1803–1815.
- Pereira Y., Lagniel G., Godat E., Baudouin-Cornu P., Junot C., Labarre J., Chromate causes sulfur starvation in yeast, *Toxicological Sciences*, 2008, 106:400–412.
- Persico P., Ambrogi V., Acierno D., Carfagna C., Processability and mechanical properties of commercial PVC plastisols containing low-environmental-impact plasticizers, *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 2009, 15:139–146.
- Pey P., Packiyaraj M. S., Nigam H., Agarwal G. S., Singh B., Patra M. K., Antimicrobial properties of CuO nanorods and multi-armed nanoparticles against *B. anthracis* vegetative cells and endospores, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, 5:789–800.
- Prabhu S., Poulouse E., Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *International Nano Letters*, 2012, 2:32-42.
- Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 2004, 339:2693–2700.
- Qiu H., Pan B., Zhang Q.J., Zhang W.M., Zhang Q.X., Critical review in adsorption kinetic models, *Journal of Zhejiang University Science A*, 2009, 10:716-724.

- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly J.W., Leonard C.F., Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 2002, pp. 536
- Raafat D., Barga K.V., Hass A., Sahl H.G., Insights into the mode of action of chitosan as an antimicrobial compound, Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74:3764–3773.
- Rabae E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W., Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action, Biomicromolecules, 2003, 4:1457–1465.
- Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C., Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles, Langmuir, 2011, 27:4020–4028.
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, Biotechnology Advances, 2009, 27:76–83.
- Rai M.K., Desmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K., Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria, Journal of Applied Microbiology, 2012, 112:841-852.
- Rajić N., Stojaković Đ., Jovanović M., Zabukovec Logar N., Mazaj M., Kaučič V., Removal of nickel(II) ions from aqueous solutions using the natural clinoptilolite and preparation of nano-NiO on the exhausted clinoptilolite, Applied Surface Science, 2010, 257:1524–1532.
- Rajić N., Stojaković Đ., Daneu N., Rečnik A., The formation of oxide nanoparticles on the surface of natural clinoptilolite, Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2011, 72:800–803.
- Rani J., Hemambika B., Hemaprya J., Rajeshkannan V., Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: a biosorption approach, Global Journal of Environmental Research, 2010, 4:23-30.
- Rasheed M.U., Thajuddin N., Ahamed P., Teklemariam Z., Jamil K., Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2014, 56:341-346.
- Ravel B., Newville M., ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, Journal of Synchrotron Radiation, 2005, 12: 537–541.



- Reddy L. S., Nisha M. M., Joice M., Shilpa P. N., Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*, *Pharmaceutical Biology*, 2014, 52:1388-1397.
- Rice L.B., Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE, *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197:1079–1081.
- Rivera-Garza M., Olguin M.T., Garcia-Sosa I., Alcantara D., Rodriguez-Fuentes G., Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2000, 39:431-444.
- Rossainz-Castro L.G., De la Rosa-Gomez I., Olguín M.T., Alcantara-Díaz D., Comparison between silver- and copper-modified zeolite-rich tuffs as microbicidal agents for *Escherichia coli* and *Candida albicans*, *Journal of Environmental Management*, 2016, 183:763-770.
- Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherji S., Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomaterialia*, 2008, 3:707–716.
- Sáenz Y., Briñas L., Domínguez E., Ruiz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C., Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48:3996–4001.
- Scaletsky I. C., Fabbriotti S. H., Carvalho R. L., Nunes C. R., Maranhao H. S., Morais M. B., Fagundes-Neto U., Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: A case-control study, *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:645–658.
- Schollenberger C.J., Simon R.H., Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soli-ammonium acetate method, *Soil Science*, 1945, 59:13-24.
- Schreurs W.J.A., Rosenberg H., Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 1982, 152:7-13.
- Seruga Music M., Hrenović J., Goić-Barišić I., Hunjak B., Skorić D., Ivanković T., Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment, *Journal of Hospital Infection*, 2017, 96:323-327.
- Shannon R.D., Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, *Acta Crystallographica Section A* 1976, A32:751–67.

- Shi L.E., Xing L., Hou B., Ge H., Guo X., Tang Z., Inorganic nano metal oxides used as anti microorganisms agents for pathogen control. In: Mendez-Vilas A, editor. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology; Formatex, USA, 2010.
- Shockman G.D., Barrett J.F., Structure, function and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria, Annual Review in Microbiology, 1983, 37:501-527.
- Si X., Quana X., Li Q., Wua Y., Effects of D-amino acids and norspermidine on the disassembly of large, old-aged microbial aggregates, Water Research, 2014, 54:247-253.
- Sips R., Structure of a catalyst surface The Journal of Chemical Physics 1948, 16:490-495.
- Sisson G., Ayis S., Sherwood R.A, Bjarnason I., Randomised clinical trial: A liquid multi-strain probiotic vs. placebo in the irritable bowel syndrome--a 12 week double-blind study, Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2014, 40:51-62.
- Sixma T.K., Pronk S.E., Kalk K.H., Wartna E.S., van Zanten B.A., Witholt B., Hol W.G., Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*, Nature, 1991, 351:371-377.
- Sixma T.K., Kalk K.H., van Zanten B.A., Dauter Z., Kingma J., Witholt B., Hol W.G., Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin, Journal of Molecular Biology, 1993, 230:890-918.
- Slawson R.M., Van Dyke M.I., Lee H., Trevors J.T., Germanium and Silver Resistance, Accumulation and Toxicity in Microorganisms, Plasmid, 1992, 27:72-79.
- Sodeifian G., Nikooamal H.Z., Yousefi A.A., Molecular dynamics study of epoxy/clay nanocomposites: rheology and molecular confinement, Journal of Polymer Research, 2012, 19:9897-9908.
- Somani S.B., Ingole N.W., Alternative approach to chloration for disinfection of drinking water-an overview, International Journal of Advanced Engineering Research and Studies, 2011, 1:47-50.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, Journal of Colloid and Interface Science, 2004, 275:177-182.
- Spadaro J.A., Berger T.J., Barranco S.D., Chapin S.E., Becker R.O., Antibacterial Effects of Silver Electrodes with Weak Direct Current, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1974, 6:637-642.

- Stadtman E.R., Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62:797-821.
- Stilinović B., Hrenović J., *Praktikum iz bakteriologije*, Zagreb, 2009.
- Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J., Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, *Langmuir*, 2002, 18:6679–86.
- Stojaković Đ., Milenković J., Daneu N., Rajić N., A study of the removal of the copper ions from aqueous solution using clinoptilolite from Serbia, *Clays and Clay Minerals*, 2011a, 59:277–285.
- Stojaković Đ., Hrenović J., Mazaj M., N. Rajić, On the zinc sorption by the Serbian natural clinoptilolite and the disinfecting ability and phosphate affinity of the exhausted sorbent, *Journal of Hazardous Materials*, 2011b, 185: 408–415.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W., Biofilms as Complex Differentiated Communities, *Annual Review in Microbiology*, 2002, 56:187–209.
- Sumner E., Shanmuganathan A., Sideri T., Willetts S., Houghton J., Avery S., Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast, *Microbiology*, 2005, 151:1939–1948.
- Taylor L. H., Latham S. M., Woolhouse M. E., Risk factors for human disease emergence, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 2001, 356: 983–989.
- Tong S.Y. C., Schaumburg F., Ellington M.J., Corander J., Pichon B., Leendertz F., Bentley S.D., Parkhill J., Holt D.C., Peters G., Giffard P.M., Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the nonpigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65:15–22.
- Tonkić M., Dobec M., Abram M., *Medicinska mikrobiologija*, 1. hrvatsko izdanje, Placebo d.o.o., Split, 2015 (prevod: Jawetz Melnick & Adelbergs: Medical Microbiology)
- Top A., Ulku S., Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity, *Applied Clay Science*, 2004, 27:13-19.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., *Microbiology: an introduction-10th edition* Pearson Education, publishing as Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2010.

- Touati D., Jacques M., Tardat B., Bouchard L., Despied S., Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase, *Journal of Bacteriology*, 1995, 177:2305–2314.
- Towner K., The genus *Acinetobacter*, iz: *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. Springer, New York. 2006. Volume 6, pp. 746-758.
- Vaseduvan P., Nair M.L., Annamalia T., Venkitanarayanan K.S., Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 2003, 92:179-85.
- Velde B., *Introduction to clay minerals: chemistry, origins, uses and environmental significance*, Chapman and Hall Ltd., London, 1992.
- Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kump P., Pelicon P., Nečemer M., Vavpetič P., Koren Š., Regvar M., *Analytical Tools for Exploring Metal Accumulation and Tolerance in Plants. Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ranton, FL. 2012, p. 443
- Wan C., Qiao X., Zhang Y., Zhang Y., Effect of different clay treatment on morphology and mechanical properties of PVC-clay nanocomposites, *Polymer Testing*, 2003, 22:453–461.
- Wang X., Qiao F., Yu R., Gao Y., Zong Z., Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study, *BMC Microbiology*, 2013, 13:234-242.
- Warnes S. L., Keevil C. W., Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77:6049–6059.
- Warnes S. L., Caves V., Keevil C. W., Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria, *Environmental Microbiology*, 2012, 14:1730–1743.
- Watanabe T., Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria, *Bacteriology Reviews*, 1963, 27:87-115.

- Waterman, S.R., Small P.L., Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of shigalike toxin-producing *Escherichia coli*, *Infection and Immunity*, 1996, 64:2808–2811.
- web 1: <http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf> - dostupno 15.01.2018.
- web 2: <http://rruff.info/> - dostupno 15.01.2018.
- web 3: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) - dostupno 15.01.2018.
- web 4: <http://www.sssj.org/ejsnt/duan-small.jpg> - dostupno 15.01.2018.
- web 5: [http://www.who.int/whr/1996/media\\_centre/press\\_release/en/](http://www.who.int/whr/1996/media_centre/press_release/en/) - dostupno 15.01.2018.
- web 6: <http://www.zjz.org.rs/wp-content/uploads/2013/04/pravilnik-o-higijenskoj-ispravnosti-vode-za-pice.pdf> - dostupno 15.01.2018.
- web 7: <http://www.biofilm.org/> - dostupno 15.01.2018.
- web 8: [https://online.science.psu.edu/micrb106\\_wd/node/6122](https://online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6122) - dostupno 15.01.2018.
- web 9: <https://prezi.com/zhjynve3vpts/prokaryotic-and-eukaryotic-cells/> - dostupno 15.01.2018.
- web 10: <https://sr.wikipedia.org/wiki/Hitozan#/media/File:Chitosan2.jpg> - dostupno 15.01.2018.
- web 11: <https://gsoil.wordpress.com/2014/09/05/lightening-the-clay-i/> - dostupno 15.01.2018.
- Weber W. J., Morris Jr, J.C., Advances in water pollution research from waste waters by adsorption, Proceedings of International Conference on Water Pollution Symposium, 2, Pergamon Press, Oxford, 1962, 231-266.
- Weber W.J., McGinley P.M., Katz L.E., A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments, *Environmental Science and Technology*, 1992, 26:1955-1962.
- Welch R.A., The Genus *Escherichia*, *Prokaryotes*, 2006, 6:60–71.
- Wong P. K., Mutagenicity of heavy metals, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1988, 40:597–603.
- World Health Organization. The World Health Report 1999: Making a Difference. 1999. dostupno 15.01.2018. na <http://www.who.int/whr/1999/en/>
- World Health Organization. Zinc in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. (2003a), Geneva, dostupno 15.01.2018. na [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/zinc.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/zinc.pdf)

- World Health Organization. Copper in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. (2003b) Geneva, dostupno 15.01.2018. na [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/copper.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf)
- Xu F.F., Imlay J.A., Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78:3614–3621.
- Xu H., Lui Y., D-Amino acid mitigated membrane biofouling and promoted biofilm detachment, Journal of Membrane Science, 2011, 376:266-274.
- Yaganza E. S., Rioux D., Simard M., Arul J., Tweddell R. J., Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite, Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70:6800–6808.
- Yakabe Y., Sano T., Ushio H., Yasunaga T., Kinetic studies of the interaction between silver ion and deoxyribonucleic acid, Chemistry Letters, 1980, 4:373-376.
- Yamanaka M., Hara K., Kudo J., Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis, Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71:7589–7593.
- Yang C., Mamouni J., Tang Y., Yang L., Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes: length effect, Langmuir, 2010, 26:16013–16019.
- Yang R. T., Adsorbents: Fundamentals and Applications: Wiley, 2003.
- Yoon K.Y., Byeon J.H., Park J.H., Hwang J., Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, Science of the Total Environment, 2007, 373:572–575.
- Zampino D., Ferreri T., Puglisi C., Mancusi M., Zaccone R., Scaffaro R., Bennardo D., PVC silver zeolite composites with antimicrobial properties, Journal of Materials Science, 2011; 46:6734-6743.
- Zhang Y. M., Rock C. O., Membrane lipid homeostasis in bacteria, Nature Reviews Microbiology, 2008, 6:222–233.
- Zhang Y., Zhong S., Zhang M., Lin Y., Antibacterial activity of silver-loaded zeolite A prepared by a fast microwave-loading method, Journal of Materials Science, 2009, 44:457–462.

Zhao D., Zhou J., Liu N., Preparation and characterization of Mingguang palygorskite supported with silver and copper for antibacterial behavior, *Applied Clay Science*, 2006, 33:161-170.

Zhao G.J., Stevens S.E., Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion, *Biometals*, 1998, 11:27-32.

**PRILOG**



**Prilog 1****Kinetika jonske izmene**

Kinetika vezivanja jona za zeolit ispituje se različitim kinetičkim modelima. Najčešće korišćeni modeli koji opisuju kinetiku jonske izmene su Lagergrenovi modeli pseudo-prvog i pseudo-drugog reda kao i model međučestične difuzije, pri čemu u većini slučajeva kinetika prati Lagergrenov model pseudo-drugog reda. Najčešće korišćeni kinetički modeli i njihove jednačine su (Qiu *et al.*, 2009):

1. Lagergrenov model pseudo-prvog reda ( $\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t)$ , (Lagergren, 1898);
2. Lagergrenov model pseudo-drugog reda ( $\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2$ , (Lagergren, 1898);
3. Model međučestične difuzije ( $q_t = k_3 t^{1/2}$ , Weber, 1992);
4. Model međufazne difuzije ( $\ln(1-F) = k_{fd} t$  gde je  $F = q_t/q_{eq}$ , Boyd *et al.*, 1945)

**Lagergrenov model pseudo-prvog reda**

Lagergrenov model pseudo-prvog reda se može prikazati jednačinom (Lagergren, 1898):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

gde je:

$q_e$  – ravnotežna količina adsorbovanih jona na zeolitu;

$q_t$  – količina adsorbovanih jona na zeolitu u određenom vremenskom trenutku  $t$ ;

$k_1$  – Lagergrenova konstanta brzine reakcije prvog reda.

Ako se prethodna jednačina integriramo u granicama  $t=0$  do  $t=t$  i od  $q=0$  do  $q=q_e$ , dobija se sledeći oblik:

$$\ln\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = k_1 t \quad (2)$$

Jednačina (2) se dalje može prevesti u linearan oblik koji je pogodan za primenu na eksperimentalnim podacima:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (3)$$

Ukoliko je eksperimentalna zavisnost  $\log(q_e - q_t)$  od  $t$  linearna, može se govoriti o primenljivosti ovog modela. Vrednosti  $q_e$  i  $k_1$  se mogu dobiti kao odsečak i nagib linearne funkcije zavisnosti  $\log(q_e - q_t)$  i  $t$ .

**Lagergrenov model pseudo-drugog reda**

Lagergrenov model pseudo-drugog reda može se prikazati jednačinom (Lagergren, 1898):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (4)$$

gde je  $k_2$  – konstanta brzine drugog reda.

Integraljenjem ove jednačine u granicama:  $t=0$  do  $t=t$  i  $q=0$  do  $q=q_e$  dobija se:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (5)$$

Jednačina (5) se dalje može prevesti u linearan oblik, pogodan za primenu na eksperimentalnim podacima:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (6)$$

I ovde se vrednosti  $q_e$  i  $k_2$  mogu odrediti iz odsečaka i nagiba linearne funkcije zavisnosti  $t/q_t$  i  $t$ .

**Model međučestične difuzije**

Kada difuzija čestica adsorbata kroz adsorbent ograničava brzinu adsorpcije, kinetika se opisuje modelom međučestične difuzije ili Veber-Morisovim modelom (Weber-Morris) koji se prikazuje jednačinom (Weber i Morris, 1963):

$$q_t = k_i t^{1/2} \quad (7)$$

gde  $k_i$  označava konstantu brzine međučestične difuzije ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ ) koji se dobija iz zavisnosti  $q_t$  od  $t^{1/2}$ .

## Prilog 2

### Određivanje termodinamičkih parametara

Afinitet zeolita prema nekom jonu u vodenom rastvoru može se prikazati adsorpcionim izotermama na konstantnim temperaturama. Adsorpciona izoterma prikazuje zavisnost koncentracije jona iz vodenog rastvora koji je vezan za zeolit (y-osa) od ravnotežne koncentracije jona u rastvoru (x-osa). U literaturi se može naći veliki broj modela izoterma, pri čemu su za uklanjanje teških metala iz vodenih rastvora najčešće koristi Frojndlihova, Lengmirova i Sipsova (Lengmir-Frojndlihova) izoterma (Ho, 2001).

#### *Frojndlihova adsorpciona izoterma*

Prvi oblik jednačine za adsorpcionu izotermu, izložio je Frojndlih (Freundlich, 1906). Ovaj empirijski model se primenjuje kod neidealne sorpcije na heterogenim površinama, kao i kod višeslojne sorpcije i izražava se sledećom jednačinom:

$$q_e = K_F C_e^n \quad (9)$$

gde  $q_e$  (mg g<sup>-1</sup>) ravnotežna masa,  $K_F$  (dm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>) je Frojndlihova konstanta,  $C_e$  (mg dm<sup>-3</sup>) je ravnotežna koncentracija rastvora,  $n$  je eksponent Frojndlihovog modela.  $K_F$  i  $n$  su karakteristike sistema i oni su indikatori kapacitivnosti adsorbenta (ili afiniteta prema adsorbatu), odnosno jačine adsorpcije.

#### *Lengmirova adsorpciona izoterma*

Lengmirova (Langmuir) adsorpciona izoterma koristi se kako za adsorpciju iz gasovitih, tako i iz tečnih rastvora (Langmuir, 1916). Lengmirov model je verovatno najpoznatiji i najšire primenjivan model adsorpcione izoterme. Ovaj model pruža dobra slaganja sa raznovrsnim eksperimentalnim podacima i može se predstaviti sledećom jednačinom:

$$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e} \quad (10)$$

gde  $q_e$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju jona na adsorbentu (mg g<sup>-1</sup>),

$C_e$  –ravnotežnu koncentraciju jona u rastvoru (mg dm<sup>-3</sup>)

$K_L$ -Lengmirova ravnotežna konstanta (dm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)

$a_L$ -Lengmirova konstanta (dm<sup>3</sup> mg<sup>-1</sup>)

Maksimalni kapacitet se označava sa  $q_m$  (mg g<sup>-1</sup>) i dobija se iz odnosa  $K_L/a_L$ .

Treba napomenuti da se pri adsorpciji iz gasovitih rastvora, koncentracija adsorbata u rastvoru, u jednačini (10) izražava preko parcijalnog pritiska. Takođe, može se primetiti da se pri niskim koncentracijama adsorbata jednačine svode na linearan oblik, koji se stoga svodi na Henrijev zakon. Alternativno, pri visokim koncentracijama adsorbata, može se pretpostaviti da je došlo do zasićenja, odnosno stvaranja monosloja adsorbata.

### **Sipsova izoterma (Lengmir-Frojdlihova izoterma)**

Lengmir je takođe razmatrao slučaj kada adsorbat zauzima dva mesta na adsorbentu. U takvim slučajevima, originalna Lengmirova izoterma prikazana jednačinom (11) menja oblik i određuje se uz pretpostavku da su brzine adsorpcije i desorpcije proporcionalne vrednostima  $(1-\theta)^2$  i  $\theta^2$ , respektivno, gde je  $\theta$  udeo površine pokrivene adsorbatom. Stoga, jednačina brzine adsorpcije postaje:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a C(1-\theta)^2 - k_d \theta^2 \quad (11)$$

Uopštavanjem za broj mesta  $m$  i pretpostavljanjem ravnoteže, dobija se Sipsova sorpciona izoterma (Sips, 1948):

$$q_e = \frac{q_m (a_s C_e)^{n_s}}{1 + (a_s C_e)^{n_s}} \quad (12)$$

Odnosno, u Lengmir-Frojdlihovoj formi:

$$q_e = \frac{K_{LF} C_e^{LF}}{1 + (a_{LF} C_e)^{n_{LF}}} \quad (13)$$

Pri niskim koncentracijama sorbenta ova izoterma se svodi na Frojdlihovu izotermu i usled toga ne sledi Henrijev zakon. Pri visokim koncentracijama sorbata, pretpostavlja se jednoslojni sorpcioni kapacitet karakterističan za Lengmirovu izotermu.

**Prilog 3****Bojenje bakterija po Gram-u**

Metoda bojenja po Gram-u je standardna metoda koja se koristi u mikrobiologiji. Na početku pripreme preparata predmetnica se odmasti i očisti provlačenjem kroz plamen. Zatim se, sterilnom bakteriološkom ezom stavi 2-3 kapi obične vode. Uz pomoć eze se dalje, sa hranljivog agara, nanese mala količina ćelija i razvuče po površini predmetnice u što tanjem sloju. Tako pripremljen preparat ostavi se da se osuši na sobnoj temperaturi, a zatim se preparat fiksira provlačenjem iznad plamena tri puta. Priprema reagenasa koji su potrebni za metodu bojenja po Gramu opisana je u nastavku.

<b>Reagens</b>	<b>Sastav</b>
<b>Kristal violet</b>	Rastvor A
Kristal violet	2,0 g
Etanol 96%	20,0 cm <sup>3</sup>
	Rastvor B
Amonijum-oksalat	0,8 g
Destilovana voda	80,0 cm <sup>3</sup>
Nakon pripreme rastvori A i B se pomešaju	

<b>Lugolov rastvor</b>	
Jod	1,0 g
Kalijum-jodid	2,0 g
Destilovana voda	300,0 cm <sup>3</sup>
<b>Karbol fuksin</b>	Rastvor A
Bazični fuksin	0,3 g
Etanol (96%)	10,0 cm <sup>3</sup>
	Rastvor B
Fenol	5,0 g
Destilovana voda	95,0 cm <sup>3</sup>
Nakon pripreme rastvori A i B se pomešaju.	

Obojeni i osušeni preparat ostavlja se u kadici za bojenje:

Kristal violet                      3 minuta

Ispiranje vodom

Lugol                                      1 minut

Ispiranje etanolom (96%)

Ispiranje vodom

Karbol fuksin                      20 sekundi

Ispiranje vodom

Gram-pozitivne bakterije boje se u plavo ljubičastu, dok se Gram-negativne bakterije boje u ružičastu boju.

## **Prilog 4**

### **Priprema uzoraka za SEM analizu**

Sušenje bakterijskih preparata obavlja se tretiranjem materijala rastvorima alkohola sledećim redosledom:

- 30 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      2 minuta
- 50 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      2 minuta
- 70 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      5 minuta
- 96 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      5 minuta
- 100 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      5 minuta
- 100 vol.% etanol + 0,1% NaCl                      5 minuta

Osušeni materijal se aseptički prenosi u sterilnu Petri šolju i ostavlja u eksikatoru do SEM analize.

**Prilog 5****Priprema biomase za EXAFS-analizu**

EXAFS analiza rađena je na biomasi ćelija bakterija *A. baumannii* RUH 134. Biomasa je uzgajana u 300 cm<sup>3</sup> tečnog hranljivog medijuma tokom 16 h na temperaturi od 37 °C. Nakon toga, biomasa ćelija je odvojena centrifugiranjem i isprana sterilnom destilovanom vodom u cilju uklanjanja hranljivih materija. Biomasa je zatim suspendovana u 1 cm<sup>3</sup> rastvora AgNO<sub>3</sub> koncentracije 0,5 g dm<sup>-3</sup> i ostavljena na sobnoj temperaturi tokom 2 h uz mešanje od 150 obr min<sup>-1</sup>. Sadržaj epruvete je zatim razdvojen centrifugiranjem, u talog je dodata voda kako bi se isprao višak jona srebra. Suspenzija je opet centrifugirana na 10000 obr min<sup>-1</sup> tokom 5 minuta. Biomasa je ostavljena da se suši u suvom sterilizatoru na 50 °C tokom 2 h.



## BIOGRAFIJA AUTORA

---

Jelena Milenković rođena je 17.11.1985. u Kruševcu gde je završila osnovnu i srednju školu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, upisala je šk. 2004/2005. gde je i diplomirala 2010. god., odbranila master rad 2011. god. i šk. 2011/2012. upisala doktorske studije, studijski program Hemija, pod mentorstvom prof. dr Nevenke Rajić.

J. Milenković zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač-pripravnik od oktobra 2011., a od aprila 2013. kao istraživač saradnik, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Porozni materijali na bazi oksida u zaštiti životne sredine od genotoksičnih supstanci“. Angažovana je na izvođenju vežbi iz predmeta Hemija životne sredine na master studijama i iz Opšte hemije I, na osnovnim studijama.

U toku doktorskih studija bila je angažovana na više međunarodnih projekata: EUREKA - E14208, HERD projektu „The use of natural zeolite (clinoptilolite) for treatment of farm slurry and as a fertilizer carrier“ (2012-2014), projektu Hrvatske zaklade za znanost „Natural habitat of clinically important *Acinetobacter baumannii*“ (2015-2019) i projektima bilateralne saradnje: 1) između R. Srbije i R. Hrvatske „Dvojna funkcionalnost prirodnog klinoptilolita u preradi otpadnih voda: antibakterijska aktivnost i svojstvo nosača u bisorpciji“ (2011-2012); 2) između R. Srbije i R. Slovačke „Zeolite-based adsorbents for environmental remediation“ (2017-2018). U periodu 2011-2013 boravila je 3 meseca na Biološkom odseku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Oblast naučno-istraživačkog rada J. Milenković obuhvata sintezu, karakterizaciju, modifikaciju i primenu zeolita, pre svega, kao antimikrobnih agenasa.

J. Milenković autor je tri i koautor sedam štampanih radova u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Održala je predavanje po pozivu na skupu međunarodnog značaja, dva usmena saopštenja na konferencijama nacionalnog značaja i šesnaest posterskih saopštenja na konferencijama međunarodnog i nacionalnog značaja. Član je Zeolitskog društva Srbije.

## **OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. Đorđe Stojaković, **Jelena Milenković**, Nina Daneu, Nevenka Rajić, „A study of the removal of the copper ions from aqueous solution using clinoptilolite from Serbia”, *Clays and Clay Minerals*, 59 (2011) 277–285.
2. Jasna Hrenović, **Jelena Milenković**, Tomislav Ivanković, Nevenka Rajić „Antibacterial activity of heavy metal-loaded natural zeolite” *Journal of Hazardous Materials*, 201–202 (2012) 260–264.
3. Jasna Hrenović, **Jelena Milenković**, Nina Daneu, Renata Matonickin Kepcija, Nevenka Rajić, „Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles supported onto natural clinoptilolite” *Chemosphere*, 88 (2012) 1103-1107.
4. Jasna Hrenović, **Jelena Milenković**, Ivana Goić-Barišić, Nevenka Rajić, „Antibacterial activity of modified natural clinoptilolite against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*” *Microporous and Mesoporous Materials*, 169 (2013) 148-152.
5. **Jelena Milenković**, Jasna Hrenović, Ivana Goić-Barišić, Miloš Tomić, Jasna Đonlagić, Nevenka Rajić, „Synergistic anti-biofouling effect of Ag-exchanged zeolite and D-Tyrosine on PVC composite against the clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*”, *Biofouling*, 30 (2014) 965-973.
6. **Jelena Milenković**, Jasna Hrenović, Ivana Goić-Barišić, Miloš Tomić, Nevenka Rajić, „Antibacterial activity of copper-containing clinoptilolite/PVC composites toward clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*” *Journal of Serbian Chemical Society*, 80 (2015) 819–826.
7. **Jelena Milenković**, Jasna Hrenović, Danka Matijašević, Miomir Nikšić, Nevenka Rajić, Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates, *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (2017) 20273–20281.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Миленковић

Број индекса 4047/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Синтеза и карактеризација алтернативних дезинфицијенаса на бази зеолита“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 20.11.2017.

\_\_\_\_\_

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јелена Миленковић

Број индекса 4047/2011

Студијски програм Хемија

Наслов рада “Синтеза и карактеризација алтернативних дезинфицијенаса на бази  
зеолита“

Ментор Проф. др Невенка Рајић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 20.11.2017.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Синтеза и карактеризација алтернативних дезинфицијенаса на бази зеолита“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прерада
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

---

У Београду, 20.11.2017.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.