Antibakterijski učinak zeolita sa sadržajem bakra

Vujica, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:635803

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Vujica

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK ZEOLITA SA SADRŽANJEM BAKRA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Hrenović te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog stjecanja zvanja profesora biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Hrenović na ljubaznosti i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, bratu i sestri na ljubavi, strpljenju, potpori i velikoj pomoći tijekom cijelog mog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Antibakterijski učinak zeolita sa sadržajem bakra

Marija Vujica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Teški metali zbog svoje toksičnosti, stabilnosti i sklonosti nakupljanja u živim organizmima, predstavljaju ozbiljni ekološki problem. Stoga ih je potrebno ukloniti iz otpadnih voda prije ispuštanja u prirodni prijemnik. Prirodni zeolitni tuf pokazao se kao pogodan materijal s velikim kapacitetom vezanja iona Cu^{2+} iz otpadnih voda. U radu je ispitana antibakterijska aktivnost zeolitnog tufa koji sadrži 2,60 % masenog udjela (eng. percentage by weight, wt.%) Cu^{2+} u odnosu na bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, nakon 1 h i 24 h kontakta s zeolitom u tri vodena medija: hranjivom mediju Luria Bertani (LB), sintetskoj otpadnoj vodi i realnoj otpadnoj vodi. Utvrđeno je da zeolitni tuf obogaćen bakrom pokazuje antibakterijsku aktivnost u odnosu na Gram - pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus* i Gram - negativnu bakteriju *Escherichia coli*. Nakon 24 h kontakta dolazi do redukcije broja bakterija u sintetskoj (87,35 – 95,67%) i realnoj otpadnoj vodi (86,79 – 93,54%), dok u Luria Bertani (LB) mediju (5,54 – 10,69%) redukcija nije bila učinkovita. Ne dolazi do izlučivanja toksičnih Cu^{2+} iona u vodenu otopinu što zeolit s Cu^{2+} čini obećavajućim antibakterijskim materijalom za dezinfekciju otpadnih voda.

(40 stranica, 15 slika, 2 tablice, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, otpadna voda, bakar, teški metali, zeolit.
Voditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.
Pomoćni voditelj: Dr.sc. Tomislav Ivanković
Ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.
Dr. sc. Hrvoje Vančik, prof.
Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.
Zamjena: Dr. sc. Draginja Mrvoš - Sermek, izv. prof.

Rad prihvaćen: Svibanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Graduation thesis

Antibacterial effect of copper - loaded zeolite

Marija Vujica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Heavy metals pollution is one of the most important environmental problems, due of their toxicity, stability, and tendency to accumulate in living organisms. Therefore, heavy metals should be removed from the wastewater before it can be discharged into a natural recipient. Natural zeolitized tuff was proved to be a suitable material with high capacity binding of Cu^{2+} ions from wastewater. The antibacterial activity of natural zeolitized tuff containing 2.60 percentage by weight (wt.%) Cu^{2+} were tested against bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* after 1 h and 24 h of contact with zeolit in three different media, namely: Luria Bertani (LB) medium, synthetic wastewater and real wastewater. The copper – loaded zeolitized tuff showed antibacterial activity against Gram - positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram - negative bacteria *Escherichia coli*, after 24 h of contact. The reduction of bacterial numbers was efficient in synthetic water (87,35 – 95,67%) and real effluent water (86,79 – 93,54%), while in the Luria Bertani (LB) medium the reduction was not efficient (5,54 – 10,69%). Since there was not leaching of toxic Cu^{2+} ions in the aqueous solution, Cu - loaded zeolite can be regarded as promising antibacterial material for disinfection of wastewater.

(40 pages, 15 figures, 2 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* wastewater, copper, hevy metals, zeolite.
Supervisor: PhD. Jasna Hrenović, Assoc. prof.
Assistant supervisor: PhD. Tomislav Ivanković
Reviewers: PhD. Jasna Hrenović, Assoc. prof.
PhD. Hrvoje Vančik, prof.
PhD. Ines Radanović, Assoc. prof.
Replacement: PhD. Draginja Mrvoš - Sermek, Assoc, prof

Thesis accepted: May, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

1.1. Problematika i obrada otpadnih voda ... 2

1.2. Bakar u otpadnim vodama ... 6

1.2.1. Bakar i njegovi spojevi ... 6

1.3. Bakterije u otpadnim vodama ... 8

1.3.1. *Bakterija Escherichia coli* ... 11

1.3.2. *Bakterija Staphylococcus aureus* ... 13

1.4. Zeoliti ... 15

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 18

3. MATERIJALI I METODE ... 19

3.1. Priprema zeolita ... 19

3.2. Bakterijski sojevi ... 20

3.3. Priprema hranjivih medija ... 20

3.4. Mjerenje pH vrijednosti ... 21

3.5. Izvedba rada ... 21

3.6. Analitičke metode ... 22

3.6.1. Mjerenje broja bakterija ... 22

3.6.2. Postupak ispiranja Cu^{2+} iona iz CuNZ ... 23

3.7. Obrada podataka ... 23

4. REZULTATI ... 25

4.1. Kemijski sastav zeolita ... 25

4.2. Djelovanje NaNZ na bakterije ... 26

4.3. Antibakterijska aktivnost CuNZ ... 28

4.4. Antibakterijska aktivnost Cu^{2+} iz $CuCl_2$ ... 29

4.5. Ispiranje Cu^{2+} iona s CuNZ ... 29

4.6. Utjecaj pH vrijednosti na antibakterijsku aktivnost ... 30

5. RASPRAVA ... 31

6. ZAKLJUČAK ... 34

7. LITERATURA ... 35

8. ŽIVOTOPIS ... 40

1. UVOD

Uklanjanje teških metala iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda neophodna je kako bih se spriječilo njihovo dospijevanje u površinske vode. Teški metali zbog svoje toksičnosti, stabilnosti i sklonosti nakupljanja u živim organizmima, predstavljaju ozbiljni ekološki problem. Uklanjanje i pročišćavanje teških metala iz otpadnih voda do vrlo niskih koncentracija, može se postići postupcima trećeg stupnja obrade (Tušar 2009).

Posljednjih 40-ak godina važnu primjenu imaju procesi ionske izmjene i adsorpcije na prirodnom zeolitu (Trgo i sur. 2007). Zeoliti su hidratizirani alumosilikati koji se odlikuju izrazitom sposobnošću zamjene alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa iz svoje strukture s ionima teških metala iz vodenih otopina (Vojnović i sur. 2013). Izmjenjivi kationi Na, K, Ca, Mg iz zeolitne strukture nisu toksični, što ih čini ekološki prihvatljivim materijalom (Trgo i sur. 2007). Prirodni alumosilikati se zbog svoje pristupačnosti, niske cijene, poroznosti, velike površine, koja pruža kolonizaciju velikog broja bakterija i otpornosti na različite fizikalno-kemijske čimbenike (pH, temperatura, radijacija) smatraju potencijalno zadovoljavajućim nosačima bakterija (Hrenović i sur. 2011).

U ovom radu testirana je antibakterijska aktivnost natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ), i bakrom obogaćenog zeolita (CuNZ) u odnosu na bakterije *Escherichia coli* i *Staphyloccoccus aureus*, imajući na umu mogućnost njihove upotrebe za uklanjanja patogenih bakterija u tercijarnoj fazi obrade otpadnih voda.

1.1. Problematika i obrada otpadnih voda

Razvojem naselja i povećanjem standarda življenja za posljedicu ima sve veće zagađivanja okoliša, jedan od značajnih elemenata je zagađenje vode. Povećanom potrošnjom vode raste i količina otpadnih voda.

Otpadne vode mogu biti podrijetlom iz kućanstva, industrije te oborinske i procjedne vode (Tušar 2009). Kućanstva stvaraju netoksične otpadne vode, dok industrije poput prerade ugljena (fenolni spojevi, amonijak, cijanid), petrokemijska industrija (nafta, surfaktanti, petrokemikalije), pesticidna, farmaceutska i metaloprerađivačka industrija (toksični metali: Cd, Cu, Ni, Zn) pridonose stvaranju toksičnih otpadnih voda (Bitton 2005, Barakat 2011).

Glavne onečišćujuće tvari u otpadnim vodama su biološki razgradive organske tvari, nerazgradive ili teško razgradive organske tvari, ksenobiotici, teški metali, suspendirane čestice, hranjive tvari (dušik, fosfor) te mikrobni patogeni i paraziti (Bitton 2005). Onečišćenja koja su prisutna u otpadnim vodama mogu ozbiljno narušiti ravnotežu u biljnom i životinjskom svijetu, bilo direktno toksičnim djelovanje ili posredno smanjenjem koncentarcije kisika u vodi (Slika 1, Štrkalj 2014). Naravno imaju negative posljedice i na ljudsko zdravlje.

Otpadne vode bilo kućanske, industrijske, oborinske i procjedne potrebno je prikupiti i podvrgnuti fizikalnim, kemijskim i/ili biološkim procesima prije nego što se vrate u okoliš (Šperac i sur. 2013). Odvodnja i ispuštanje otpadnih voda, u većini slučajeva nedovoljno i neadekvatno riješeno. Danas sve više raste svijest o nužnosti skrbi za očuvanje okoliša te je uzrokovalo razvoj tehnologije obrade otpadnih voda u skladu s zakonima o zaštiti okoliša.

Glavni ciljevi obrade otpadnih voda su: smanjenje sadržaja organskih tvari (BPK_5), uklanjanje teško razgradivih organskih tvari koje mogu biti toksične, uklanjanje teških metala, hranjiva, uklanjanje ili inaktivacija patogenih mikroorganizama i parazita (Bitton 2005). Za određivanje koncentracije razgradivih organskih tvari u otpadnim vodama koriste se metode biokemijske potrošnje kisika (BPK_5) te kemijska potrošnja (KPK) (Bitton 2005).

VRSTA ONEČIŠĆENJA OTPADNIH VODA	ŠTETNE POSLJEDICE	OSTVARENA DRUŠTVENA KORIST OD PROČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA
KRUPNI KRUTI MATERIJAL: papir, tkanine, plastika	Neuredan krajolik; uslijed dodira mogu nastati opasnosti po zdravlje ljudi i životinja	Obale rijeka, jezera, mora i njihova okolica postaju sigurni za radne aktivnosti i rekreaciju
ORGANSKE TVARI: otpaci hrane, fekalne tvari i neke industrijske otpadne vode	Zbog prisutnosti bakterija i drugih viših vrsta vodenog svijeta, smanjuje se količina otopljenog kisika u vodi, pa se javljaju pomori riba i drugih organizama	Zaštita ribarstva i sportskog ribolova; ugodniji okoliš za život, rad i rekreaciju;
ULJA I MASTI	Na površini vode formira se opasan tanak nepropusni sloj, koji smanjuje mogućnost apsorpcije kisika iz atmosfere	Poboljšano otapanje atmosferskog kisika u vodi pomaže održavanju vodene flore i faune
NUTRIENTI: dušik, fosfor i tragovi štetnih tvari	Djeluju kao gnojiva koja stimuliraju rast algi, morskih trava i ostalog vodenog bilja	Poboljšani i sigurniji uvjeti za uzgoj riba i školjaka; ugodniji okoliš za život, rad i rekreaciju
BAKTERIJE I VIRUSI	Onečišćenje voda koje se koriste za vodoopskrbu ili natapanje poljoprivrednih površina na kojima se uzgajaju kulture za prehranu	Sigurniji opći zdravstveni uvjeti za uzgoj školjaka, riba i drugih organizama;
TOKSIČNE TVARI IZ INDUSTRIJSKIH OTPADNIH VODA	Pojava uništenja ili oštećenja vodene flore i faune; akumulacije štetnih tvari u mesu riba i školjaka, mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi	Poboljšani uvjeti za život vodene flore i faune; poboljšani opći zdravstveni uvjeti

Slika 1. Neke vrste onečišćenja otpadnih voda i štetne posljedice (preuzeto iz Štrkalj 2014).

Ukupna biokemijska potrošnja kisika (BPK_5) predstavlja količinu otopljenog kisika koju mikroorganizmi troše za biokemijsku oksidaciju organske tvari u uzorku vode na temperaturi od 20°C kroz vremenski period od pet dana. Izražava se u miligramima kisika na jednu litru vode u uzorku tijekom pet dana. Iznos BPK ukazuje na koncentraciju hranjivih tvari u otpadnim vodama. Glavni cilj pročišćavanja otpadnih voda je upravo smanjenje BPK_5. Metoda određivanja kemijske potrošnje kisika (KPK) zasniva se na određivanju udjela kisika koji će se potrošiti za oksidaciju ukupne (biološki razgradive i nerazgradive) organske tvari u uzorku (izraženo u mg O_2/L uzorka). KPK je vrijednost kojom se procjenjuje ukupno onečišćenje vode i ima veće vrijednosti od BPK_5 (manje tvari je podložno biološkoj razgradnji

nego oksidaciji). KPK i BPK_5 su vrijednosti na osnovu kojih možemo razlikovati: nisko onečišćenje, srednje onečišćenje i visoko onečišćene otpadne vode.

Pročišćavanje otpadnih voda temelji se primjenom fizikalno – kemijskim i bioloških postupaka. S obzirom na primijenjeni postupak (Slika 2) razlikujemo sljedeće stupnjeve pročišćavanja otpadnih voda (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda NN br.153/09):

- Preliminarno pročišćavanje (prethodna obrada) – cilj je odvajanje krutih i tekućih čestica na posebnim uređajima, rešetkama i sitima te taloženje mineralnih (pijesak, šljunak) i drugih suspendiranih tvari u taložnicima, uklanjanje masti i ulja (isplivavanjem uz aeraciju - upuhivanjem komprimiranog zraka u sitnim mjehurićima koji se lijepe na čestice gustoće veće od gustoće vode i koje zatim isplivavaju na površinu). Ovaj stupanj čišćenja osigurava pripremu otpadnih voda za biološko čišćenje te sprječava mogućnost začepljenja i oštećenja cijevi i drugih dijelova uređaja.

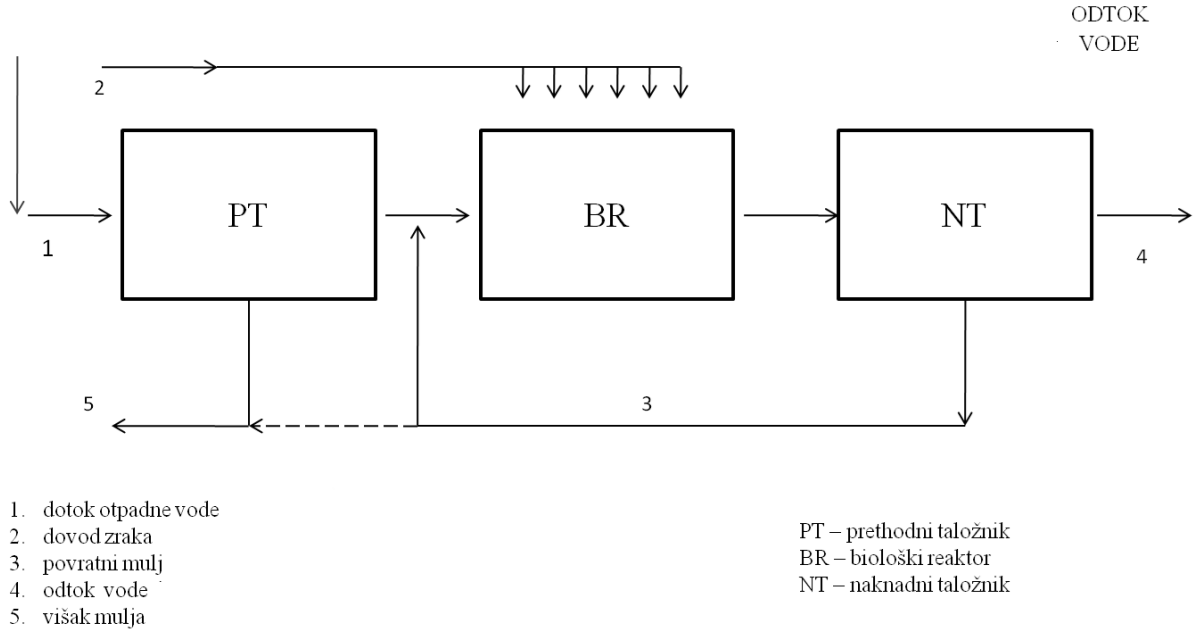
- Prvi stupanj obrade - temelji se na fizikalno – kemijskim procesima koji obuhvaćaju koaguaciju, taloženje i isplivavanje, kako bih se uklonile suspendirane čestice.

- Drugi stupanj obrade - je obrada komunalnih otpadnih voda postupkom koji općenito obuhvaća biološku obradu sa sekundarnim taloženjem i/ili druge postupke

- Treći stupanj obrade - je obrada komunalnih otpadnih voda postupkom kojim se uz drugi stupanj pročišćavanja još dodatno uklanja fosfor za 80% i/ili dušik za 70 – 80%. Treći stupanj obrade ujedno je i napredna obrada otpadnih voda, visoka cijena ovog postupka ograničava njihovu primjenu, te se danas većinom koriste prirodni materijali koji su jeftiniji, prihvatljiviji.

Pokazalo se da prilikom napredne obrade otpadnih voda, koji se temelje na fizikalno – kemijskim procesima: neutralizaciji, koagulaciji, flokulaciji, oksidaciji i redukciji, dezinfekciji, ionskoj izmjeni, membranskim procesima (Tušar 2009), ima mnogo nedostataka. Neka od nedostataka su: visoka cijena kemikalija, kemijski nastali talog (mulj) po svom sastavu (velika koncentracija teškim metala), količini, obradi i konačnom odlaganju veliki je ekonomski i tehnološki problem (Hrenović i sur. 2001). Metoda biološke obrade otpadnih voda, našla je prihvatljivu primjenu u obradi otpadnih voda. Biološka obrada temelje se na prirodnoj ulozi aerobnih bakterija. Bakterije razgrađuju ili adsorbiraju organske i hranjive tvari iz vode koje koriste za rast i tvorbu bioloških flokula ili biofilma (Perušina 2010). Proces se odvija tako što

otpadna voda ulazi u biološki reaktor s aktivnim muljem (Slika 2). U reaktorima mikroorganizmi mogu biti suspendirani u otpadnoj vodi unutar reaktora ili pričvršćeni na podlogu. Aktivni mulj sastoji se od bakterija, protozoa, algi, kvasaca i metazoa povezanih sa suspendiranim česticama u nakupine koje se zovu pahuljice ili flokule (Perušina 2010). Biorazgradiva tvar se oksidira u aeracijskom spremniku uz miješanje (radi sprečavanja taloženja i postizanja boljeg kontakta mikroorganizama i otpadne vode), a otopljena organska tvar pretvara u biomasu stanice (bakterije i praživotinje). Novonastala biomasa ili pahulje (flokule) talože se pod utjecajem gravitacije u sekundarnom (naknadnom) taložniku, te se na taj način taložni aktivni mulj odvaja od pročišćene vode. Dio aktivnog mulja vraća se natrag u aeracijski spremnik, pri čemu se povećava biomasa bakterija, te se postižu bolji rezultati pročišćavanja, a višak mulja se izdvaja i odvodi na daljnju obradu (Bitton 2005).



Slika 2. Shema glavnih dijelova uređaja za biološko pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem (prilagođeno iz Tušar 2009).

1.2. Bakar u otpadnim vodama

U prirodnom kružnom ciklusu tvari tlo – voda – okoliš, teški metali su prisutni iz prirodnih i antropogenih izvora. Zbog svoje toksičnosti, stabilnosti i sklonosti akumuliranja u ekosustave vrlo su opasni u okolišu (Barakat 2011). Teški metali se dijele na esencijalne mikroelemente u koje se ubrajaju Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni i potencijalno toksične ili neesencijalne elemente u koje se ubrajaju metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično (Cd, Cr, Pb, Hg, As).

Teški metali u vidu finih čestica prašine mogu dospjeti u atmosferu, odakle se talože u vodi i tlu. U vodama se kao teško topivi karbonati, sulfidi ili sulfati talože na dnu vodenih površina. Topljivost bakra u vodi ovisi o pH vrijednosti, prisutnosti otopljenog kisika i dr. iona. Bakar se u vodi nalazi u obliku Cu^{2+}, $Cu(OH)_2$, $CuHCO_3$. Pri pH 6 u vodi prevladava Cu^{2+} oblik, pri pH 6 – 9,3, vodeni oblik $CuCO_3$, a pri pH 9,3 – 10,7, vodeni oblik $[Cu(CO_3)_2]$ (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf)

U tlu, vodi podrijetlo iz primarnih minerala gdje se nalazi u jednovalentnom obliku, a nakon njihovog raspadanja oksidira se do Cu^{2+} iona (Rensing i sur. 2003). Prosječna količina Cu u zemljinoj kori je 65 ppm, u tlu od 9 – 33 ppm. Rijeke sadržavaju od 4 – 12 μg/L, a podzemne vode < 0,1 mg/L. Maksimalna dopuštena koncentracija koju je uspostavila U.S. EPA iznosi 1,3 mg/L, što odgovara 1,3 ppm. U komunalnim otpadnim vodama koje imaju mali dotok iz industrije koncentracije bakra su u rasponu od 0,03 do 0,1 mg/L (Henze i Comeau 2008).

Teški metali naširoko se koriste u raznim industrijama. U vodu dospijevaju, najviše nedovoljnom obradom otpadnih voda ali iz drugih izvora što za posljedicu ima ozbiljno onečišćenje okoliša. Neophodno je otpadne vode opterećene metalima adekvatno pročistiti prije nego se vrate u okoliš.

1.2.1. Bakar i njegovi spojevi

Bakar ubrajamo u metal koji su čovjeku poznati od davnine. U dugoj povijesti čovječanstava upotrebljavao se više od 10 000 godina. Primjena ovog metala za izradu primitivnog oruđa i oružja označava čitavo razdoblje čovječanstva - bakreno doba. Latinsko ime cuprum dolazi od „ Metal of Cyprus“, metal s otoka Cipra, gdje se intenzivno iskapao u doba Rimljana (Jerman 2009). Iako poznat i upotrebljavan tisućama godina, bakar je metal modernog doba. Najrecikliraniji metal u svijetu. Bakar je prijelazni metal, element 11. skupine Periodnog Sustava Elemenata. U prirodi se nalazi u malim količinama samorodan, pretežno se

javlja u obliku sulfidnih ruda. Najčešće rude bakra su halkopirit, ($CuFeS_2$), halkozin, (Cu_2S) i kovelin (CuS). Osim sulfidnih ruda bakar se nalazi i u obliku oksida, Cu_2O (kuprit) te $CuHCO_3$ (hidroksikarbonat) (Filipović i sur. 1995). U spojevima je bakar uglavnom jednovalentan i dvovalentan, dok su spojevi s trovalentnim bakrom rijetki i bez važnosti.

Bakar je jedan od esencijalni mikroelement u organizmu čovjeka, životinja i biljaka. Njegova koncentracija je najveća u jetri, mozgu, bubrezima i srcu. Za ljude su topljivi bakreni spojevi u nižim koncentracijama, slabo otrovni, ali su vrlo otrovni za niže organizme, posebno za bakterije, gljivice, alge, kukce i druge biljne štetočine. Intenzivno nakupljanje većine metala, bilo esencijalni ili neesencijalni, predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje i ima negativan utjecaj na okoliš (Barakat 2011). Enzimi koji su važni za rast kostiju i čvrstoću, održavanje imuno – sustava, razvoj mozga, zdravog srca, krvnih tjelašaca, ovise upravo o bakru. Bakar utječe na aktivnost enzima i kao kofaktor i kao sastojak alosterički nekoliko metalo - enzima. Pretpostavlja se da je potencijalno vezivno mjesto za ione metala, tiolna (– SH) skupina u enzimima i proteinima. Nedostatak bakra dovodi do povišenog kolesterola, srčanih oboljenja. Namirnica kao što su čokolada, riba, govedina, avokado, orasi i drugo povrće i voće sadrže bakar. Hemocijanin (hemo- + grč. κύανος: crnkastomodar, modrikastocrn), dišni pigment, bjelančevina slična hemoglobinu, koji umjesto željeza sadržava bakar. U krvnoj tekućini mekušaca, viših rakova i nekih pauka služi prijenosu kisika. Zasićen kisikom (oksihemocijanin) modre je boje, inače je bezbojan.

Od mnogobrojnih bakrenih spojeva veću tehničku važnost ima bakrov (II) acetat, $Cu(CH_3COO)_2$ H_2O, služi kao pigment, adstringens, slabo sredstvo za jetkanje te za elektroplatiranje bakrom.

Bakreni bazični karbonat, $CuCO_3$ $Cu(OH)_2$, u prirodi se pojavljuje kao mineral - malahit, u čistom stanju služi i kao pigment i insekticid.

Bakrov (I) klorid, CuCl, stvara s amonijakom kompleksni spoj koji apsorbira ugljični monoksid, što nalazi primjenu u čišćenju i analizi plinova.

Bakrov (II) klorid, $CuCl_2$, dobar je katalizator za organske sinteze, a upotrebljava se i u pirotehnici i fotografiji.

Bakrov (I) cijanid, CuCN, stvara kompleksne spojeve važne za elektroplatiranje bakrom.

Bakrov (II) hidroksid, $Cu(OH)_2$, upotrebljava se kao pesticid, pigment i katalizator.

Bakrov (I) oksid, Cu_2O, služi u elektroplatiranju, kao fungicid i kao pigment u bojenju stakla, emajla, keramike i podvodnih dijelova plovila.

Bakrov (II) oksid, CuO, crni prah, rabi se kao pigment za staklo i emajl u kemijskoj analizi, naftnoj industriji i proizvodnji optičkih stakala.

Bakrov (II) sulfat pentahidrat, $CuSO_4$ $5H_2O$, poznat kao modra galica, jedna je od najvažnijih bakrenih soli (Filipović i sur. 1995). Upotrebljava se u poljodjelstvu kao sredstvo za zaštitu bilja, posebno u vinogradarstvu, zatim kao dodatak umjetnim gnojivima, za zaštitu drveta, u galvanotehnici, flotaciji, proizvodnji lakova i boja, u tekstilnoj industriji, kožarstvu i dr. (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf).

Bakar, njegove legure i slitine (mjed, bronca), mogu se taliti i ponovno upotrebljavati nebrojno puta, danas su moderni i u svakodnevno životu. Zahvaljujući svojim svojstvima, toplinske i elektrovodljivosti po raznovrsnosti upotrebe zauzima jedno od prvih mjesta u nizu tehničkih metala. U industriji i svakodnevnoj potrošnji, bakar se upotrebljava za izradu kablova, uređaja u elektrotehnici, za cjevovode, žljebove, pokrivala za krovove. Toplinska provodnost osigurava mu široku primjenu u izradi izmjenjivača topline – grijača i hladnjaka. Zbog crvenkaste boje, lijepog sjaja, kao i otpornosti prema koroziji, rabi se za izradu ukrasa i raznih predmeta u kućanstvu. Bakar se legira s cinkom, kositrom, aluminijem i niklom. Njegove slitine su bronca i mjed. Mjedi su slitine bakra i cinka, crvene, žute ili bijele boje, ovisno o masenom udjelu cinka. Mjed s oko 30% cinka je žute boje, lako se obrađuje i otporan je na koroziju. Rabi se za izradu različitih držača, kvaka na vratima, glazbenih instrumenata. Mjed je biostatski tj. patogene bakterije ne mogu živjeti na njima. Bronce su slitine bakra i kositra uz dodatak fosfora, silicija ili aluminija. Velike su tvrdoće, čvrstoće, otporne na koroziju, dobro se lijevaju pa se rabe za izradu, ventila, zupčanika, novca, skulptura (http://metalionline.com/vise_o_bakru.html).

1.3. Bakterije u otpadnim vodama

Koliformne bakterije fakultativno su anaerobne, Gram – negativne, štapićaste, nesporogene bakterije koje fermentiraju laktozu stvarajući kiselinu i plin. Pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Uključuju vrstu *Escherichia coli* i srodne vrste koje normalno obitavaju u debelom crijevu, kao što su vrste rodova, *Citrobacter, Enterobacter* i *Klebsiella* (Holt i sur. 1994). Prema otpornosti na temperaturu dijele se na ukupne i fekalne koliformne bakterije. Ukupne koliformne bakterije razgrađuju laktozu na 35 ± 0,5°C/48 h, a fekalne koliformne bakterije na 44,5 ± 0,2°C/24 h (Hrenović i Stilinović 2009).

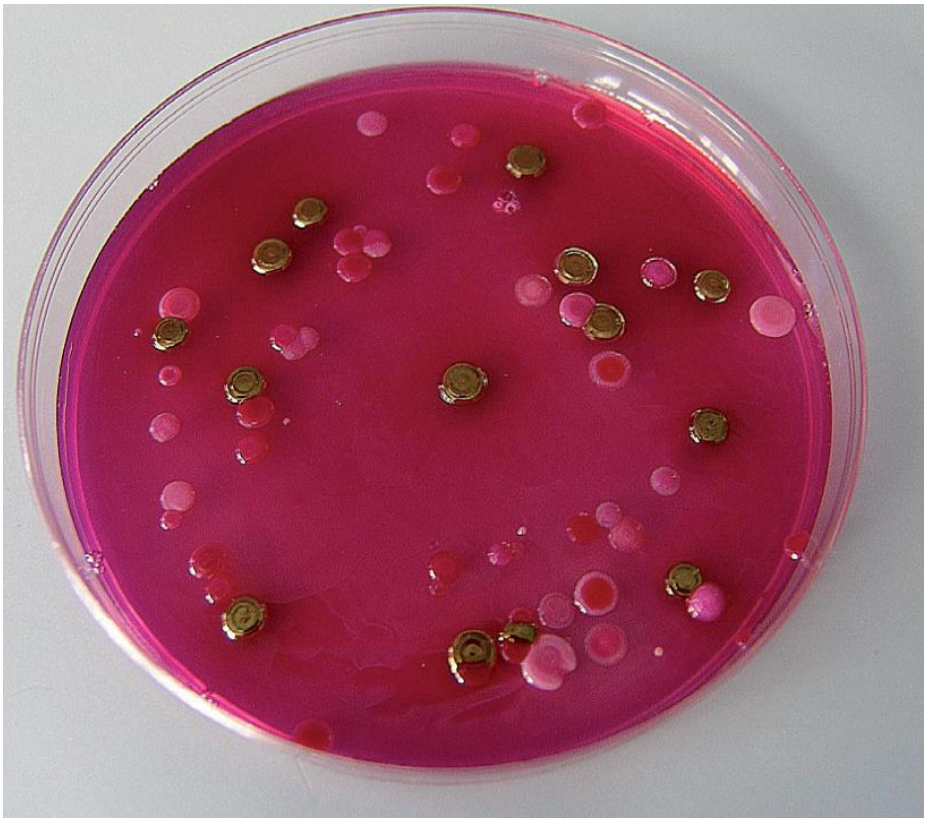
Koliformne bakterije su primarno nepatogene i normalno obitavaju u debelom crijevu čovjeka i toplokrvnih životinja. Štite crijevo od infekcija patogenim bakterijama te osiguravaju pravilnu probavu hrane i sintezu vitamina grupe B (Bitton 2005). Koliformne bakterije se

izlučuju fekalijama te dospijevaju u otpadne vode, a preko njih u prirodne vode. Ukoliko fekalije potječu iz oboljelog čovjeka ili životinje, u njima će biti prisutne i patogene bakterije, oni će također dospjeti zajedno s koliformnim bakterijama u otpadne i prirodne vode. Patogene bakterije uzrokuju crijevne infekcije i teška oboljenja – hidričke infekcije (infekcije koje se prenose vodom), te predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi (Hrenović i Šimunović 2010).

Koliformne bakterije su uglavnom oportunistički patogeni. Infekcija uzrokovana koliformnim bakterijama javit će se u slučaju oslabljenog imuniteta. Od patogenih bakterija mogu biti prisutni uzročnici, kolere (*Vibrio cholerae*), tifusa (*Salmonella typhi*), slamoneloze (*Salmonella*), dizenterije (*Shigella*), gastroenteritisa (*Campylobacter jejuni*). Bakterije poput *Legionella, Aeromonas, Mycobacterium, Vibrio cholerae* mogu biti autohtone u vodama, druge potječu iz fekalija.

Mnoge patogene bakterije prisutne su u okolišu u niskim koncentracijama, te je njihova detekcija teška (Henze i sur. 2008). Stoga se koriste tzv. indikatorske bakterije za detekciju patogenih bakterija. Koliformne bakterije i crijevni enterokoki su najpodobnija grupa indikatorskih bakterija za vrednovanje higijenske kvalitete vode. U sanitarnoj analizi vode od 1912. godine koriste se upravo koliformne bakterije kao indikatori fekalnog zagađenja i moguće prisutnosti patogenih crijevnih bakterija. U jednom gramu ljudskog fecesa nalazi se od 10^6 do 10^9 koliformnih bakterija. Koncentracija koliformnih bakterija u kućanskim otpadnim vodama kreće se od 10^{11} do 10^{13} u 100 mL otpadne vode (Henze i sur. 2008).

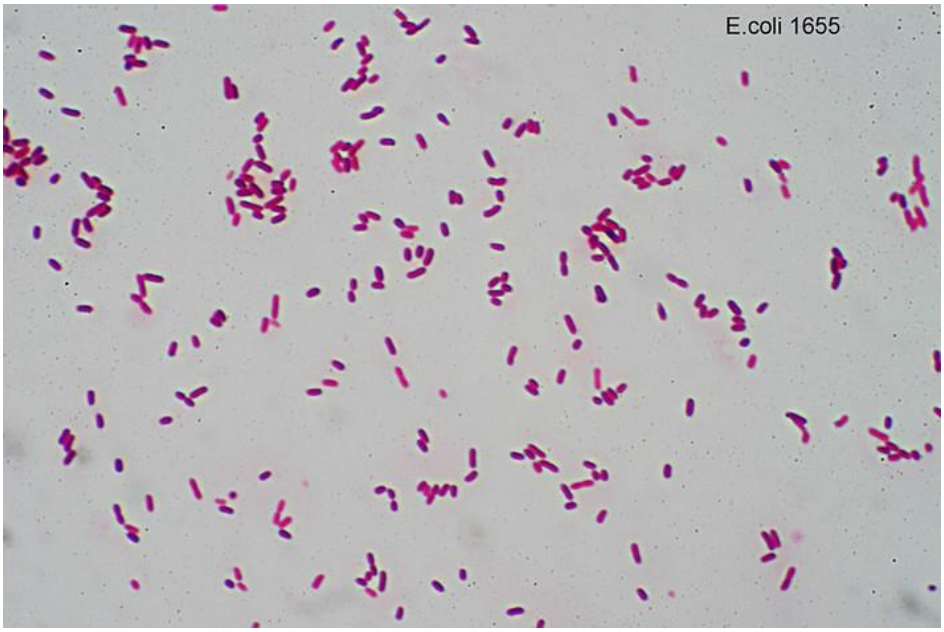
Ukupni koliformi, boraveći u vanjskoj sredini, izgubili su sposobnost termotolerancije i znak su starijih fekalnih zagađenja (Hrenović i Stilinović 2009). Termotolerantni fekalni koliformi ukazuju na svježa fekalna zagađenja okoliša. Kultivacijom koliformnih bakterija, uzgojem na krutim ili tekućim selektivnim hranjivim podlogama, omogućava relativno brzo i lako dokazivanje koliformnih bakterija. Uzgoj na krutim hranjivim podlogama ima prednost nad uzgojem u tekućim podlogama jer je moguće točnije odrediti broj varijabilnih bakterija kao broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. colony forming units, CFU) , te brže odrediti udio *Escherichia coli* u uzorku (Hrenović i Šimunović 2010). Endo agar je selektivna i diferencijalna podloga za uzgoj koliformnih bakterija. Na-sulfit i bazični fuksin u podlozi inhibiraju rast Gram - pozitivnih bakterija. Bakterije koje fermentiraju laktozu kao međuprodukt stvaraju acetaldehid koji se fiksira pomoću Na-sulfita, a reakcija s bazičnim fuksinom daje metalni sjaj zbog reduciranog fuksina. Stoga na Endo agaru kolonije *Escherichia coli* budu zlatnog metalnog sjaja, a kolonije drugih koliformnih bakterija različite nijanse roza boje (Slika 3, Hrenović i Stilinović 2009).



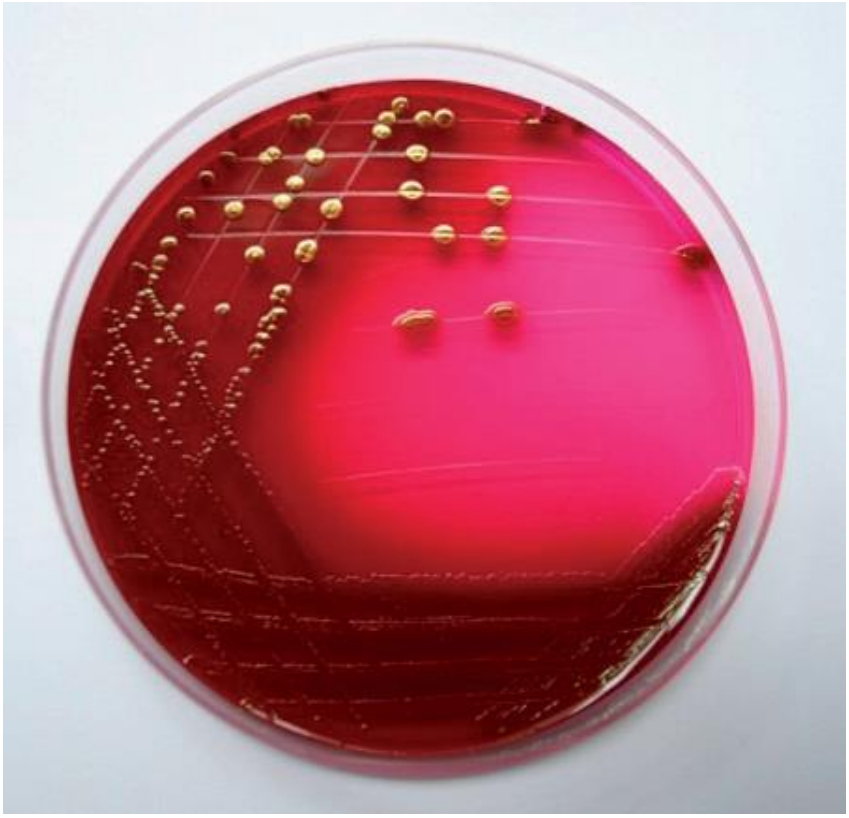
Slika 3. Kolonije *Escherichia coli* zlatnog metalnog sjaja i roza kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na Endo agaru (preuzeto iz Hrenović i Stilinović 2009).

1.3.1. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* pripada porodici *Enterobacteriaceae*, Gram - negativna je, fakultativno anaerobna, štapićasta, javlja se pojedinačna, u parovima ili nepravilnim grupama (Slika 4). Ima flagele, što joj omogućava intenzivno kretanje, ne formira spore, zaobljenih ili ravnih krajeva koje fermentiraju laktozu uz stvaranje plinskog produkta. Pojedini sojevi imaju kapsule, a mnogi imaju i fimbrije - ravne i čvrste tvorbe koje se nalaze na površini Gram - negativnih bakterija i povezuju međusobno dvije bakterije omogućavajući konjugaciju. *Escherichia coli* je 1885. god. otkrio Theodor Esherich, pedijatar i bakteriolog (Croxen 2013). Raširena je u prirodi, zemlji, vodi, probavnom traku ljudi i toplokrvnih životinja. U crijevima imaju značajnu ulogu u probavi, vršeći razlaganje ugljikohidrata, bjelančevina i škroba. Proizvodi vitamine iz grupe B (B_{12}) i K_2 i antagonistički djeluju na razvoj patogenih bakterija (Imširović i sur. 2013). Uvjetno je patogena bakterija, korisna je za domaćina je djeluje antagonistički na razne patogene bakterije. *Escherichia coli* rase dobro na svim hranjivim podlogama. Izrasle kolonije na Endo agaru imaju karakterističan metalni sjaj (Slika 5). Bakterije su vrlo otporne i mogu živjeti mjesecima u vodi, zemlji, na površini mnogih predmeta, u raznim vrstama namirnica. Osjetljive su na visoke temperature. Njihovo prisustvo u namirnicama ili u vodi za piće koristi se kao indikator zagađenosti vode fekalijama i kao znak loših higijenskih uvjeta. Prema patogenosti razlikujemo sojeve koji izlučuju enterotoksine i sojeve koji ne izlučuju enterotoksine već oštećuju crijevnu mukozu i izazivaju gastroenteritis - enteropatogeni, enteroinvazivni i enterohemoragični sojevi. Osim toksina, izlučuju hemolizine koji nisu patogeni, endotoksine, adhezivni i kolonizacijski faktor koji stimulira adheziju i kolonizaciju *Escherichia coli* na površini crijevne mukoze. *Escherichia coli*,, oportunistički patogeni, ako dospije u druge organe izvan probavnog trakta preko fekalno – oralnog puta (kontaminirana hrana ili voda) mogu prouzročiti različite infekcije, sepsa, meningitis kod beba, infekcija urinarnog trakta i dr. Neki patogeni sojevi izazivaju entrokolitis: diearejno oboljenje koji može biti smrtonosan kod male djece i mladih životinja (Croxen 2013). *Escherichia coli* zajedno s fekalnim koliformima pokazatelj je fekalnog onečišćenja (Stilinović i Hrenović 2009).



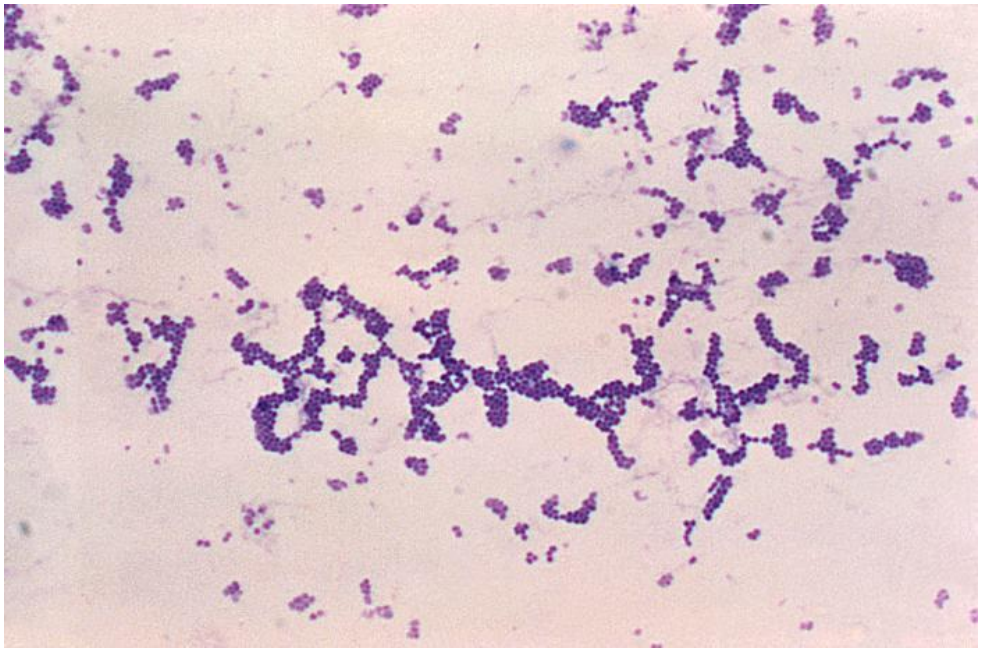
Slika 4. Bakterije *Escherichia coli* pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja po Gramu.



Slika 5. Kolonije *Escherichia coli* metalnog sjaja porasle na Endo agaru (preuzeto iz Hrenović i Stilinović 2009).

1.3.2. Bakterija *Staphylococcus aureus*

Bakterija *Stapylococcus aureus* je iz roda *Staphylococcus*, Gram-pozitivna je, kuglasta, promjera 0,5 – 1,5 µm, fakultativno anaerobna okrugla bakterija (Harris i sur. 2002). U preparatu iz kulture tvori karakteristične kolonije oblika koka u nepravilnim grozdovima (Slika 6). Stafilokoki dobro rastu na svim hranjivim podlogama. Na agaru obično formiraju glatke, ispupčene, okrugle kolonije. Nepokretni su (nemaju flagele), ne formiraju spore. Neki sojevi imaju kapsulu, a većina je bez nje. Kolonije mogu biti obojene zlatno - žuto (*Staphylococcus aureus*, Slika 7), bijelo (*Staphylococcus albus*, Slika 7) i limun - žuto (*Staphylococcus citreus*). Optimalna temperatura uzgoja je 32°C, a pH 7,4 (Imširović i sur. 2013). Predstavlja jednog od najzastupljenih mikroorganizama u čovjeka. Prirodno se nalazi u respiratornom traktu (sluznici nosne šupljine), na površini kože, te u usnoj šupljini i probavnom traktu. U rodu *Staphylococcus* ima patogenih i nepatogenih sojeva. *Staphylococcus epidermidis* je nepatogena vrsta i nalazi se kao dio normalne flore kože, infekcije se događaju u slučaju oslabljenog imuniteta. Sojevi vrste *Staphylococcus aureus* su najčešće patogeni. *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu, nazivaju se koagulaza pozitivni *Staphylococcus*, dok svi ostali nazivaju se grupno koagulaza negativni *Staphylococcus* (Borjesson 2009). Važna osobina stafilokoka je otpornost prema visokim koncentracijama NaCl i šećera (Harris i sur. 2002). Zbog toga patogeni stafilokoki se vrlo brzo razmnožavaju u slanim i slatkim namirnicama, produciraju znatne količine svojih toksina. Biokemijske osobine po kojima se patogeni stafilokoki razlikuju od nepatogenih su: formiranje β-hemolize na krvnom agaru, fermentacija manitola, pozitivni Cadness-Gravesov ogled, produkcija koagulaze, fosfataze. Patogeni stafilokoki su piogeni agensi, što znači da mogu napasti sve organe i tkiva. Najčešće infekcije uzrokovane stafilokokima su kožne (kao što su furunkuli, karbunkuli, akne, folikulitisi i razne piodermije), zatim oboljenja sluznica (kao što su rinitisi, faringitisi, infeksije usne šupljine), a česte su i pneumonije. Patogeni stafilokoki izazivaju i metastaze od kojih su najčešće osteomijelitis, artritis, apscesi i meningitis. Prodor stafilokoka u krv izaziva tešku stafilokoknu sepsu. Česte su toksikoinfekcije uzrokovane stafilokoknim enterotoksinom. Uglavnom se liječi penicilinom i srodnim antibioticima (npr. meticilin), iako danas najveći problem predstavljaju sojevi bakterije *Staphylococcus aureus* rezistentni na meticilin, tzv. MRSA (methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*) (Borjesson 2010).



Slika 6. Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* u vidnom polju svjetlosnog mikroskopa (preuzeto s http://phil.cdc.gov/phil/details.asp).

Slika 7. Kolonije *Staphylococcus aureus* obojene zlatno - žute i *Staphylococcus epidermis* obojene bijelo na krvom agaru (preuzeto s http://phil.cdc.gov/phil/details.asp).

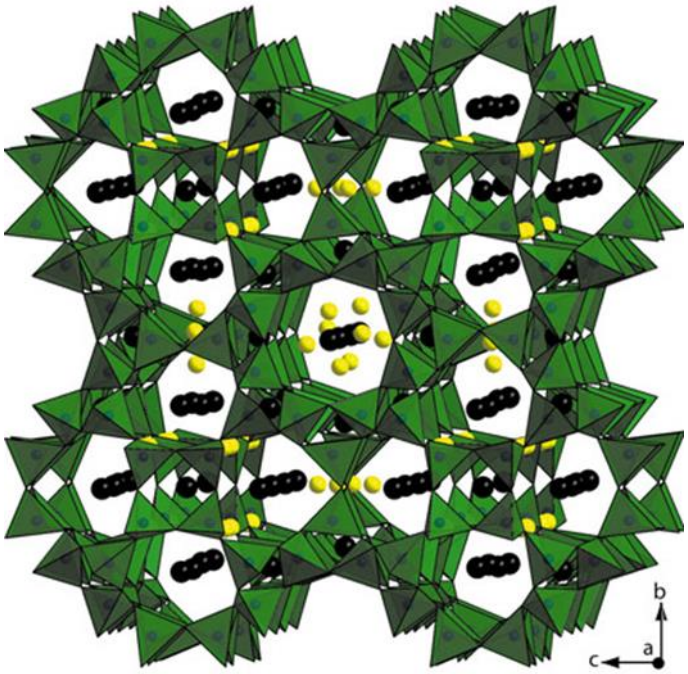
1.4. Zeoliti

Prvi prirodni zeolitni mineral stilbit otkrio je švedski minerolog Frei Axel Fredrick Cronstedt, 1756. godine. Budući da je mineral bubrio kada se grijao u plamenu puhaljke, nazvao ga je zeolit, što dolaze od grčkih riječi *zeo* i *lithos*, koje znače kipjeti i kamen (Flanigen i sur. 2010).

Zeoliti su alumosilikatni minerali koji se pojavljuju u bazičnim magmatskim stijenama i tufovima. Zeolitni minerali nastaju procesima alteracije i dijageneze vulkanskog stakla. U svijetu je poznato oko 50 vrsta prirodnih zeolita, a sintetizirano je više od 150 vrsta. Glavna ležišta prirodnog zeolita protežu se po cijelom svijetu; Sjeverna Amerika, Kuba, Japan, Sjeverna Koreja, Kina, Italija, Turska, Grčka, Danska, Češka, Bugarska, Mađarska, Srbija, Rusija, Armenija, Azerbajđan. U nalazištima zeolita kraj Donjeg Jesenja, u Hrvatskoj, upravo je klinoptilolit najzastupljeniji zeolitni mineral (Tibljaš i Šćavničar 2007). Najučestalije vrste prirodnog zeolita koje se uglavnom nalazi u sedimentnim stijenama vulkanskog podrijetla su: analcim, kabazit, klinoptilolit, erionit, mordenit, filipsit i stilbit. Prirodni zeolit se često koristi u istraživanjima pročišćavanja otpadnih voda jer je široko rasprostranjen u prirodi, jednostavno se dolazi do njega i jeftin je, te je otporan na različite fizikalno - kemijske čimbenike (pH, temperatura, radijacija) (Hrenović i sur. 2011). Vrlo raširena je i upotreba sintetskih zeolita koji imaju ista svojstva kao i prirodni zeoliti (adsorbensi, ionski izmjenjivači, molekulsko sito), a koriste se najviše u industriji deterdženata (Ivanković 2012).

Struktura zeolita sastoji se od trodimenzionalne mreže (aluminosilikatni kostur) $[SiO_4]^{4-}$ i $[AlO_4]^{5-}$ tetraedara, spojenih kisikovim atomima (Slika 8). Mikroporozna struktura karakteristična za zeolite sadrži mnogobrojne kanale molekularnih dimenzija koji variraju u veličini, takve strukture dopuštaju molekulama ili ionima da prolaze kroz šupljine ili budu zadržane u njima. Adsorpcijska voda koja je raspoređena po šupljinama i kanalima kristalne rešetke zeolita, zagrijavanjem lako izlazi iz rešetke bez narušavanja strukture, također se lako prima natrag. Radi neutralizacije negativnog naboja u $[AlO_4]^{5-}$ tetraedru zbog izomorfne izmjene četverovalentnog silicija s trovalentnim aluminijem ugrađuju se u strukturnu rešetku hidratizirani alkalijski i zemnoalkalijski kationi (Na^+, K^+, Ca^{2+} i Mg^{2+}). Strukturni atomi aluminija i silicija međusobno su povezani kovalentnim vezama preko zajedničkog atoma kisika, za razliku od strukturnih atoma, kationi su s alumosilikatnom strukturom vezani slabim elektrostatskim vezama, što uvjetuje njihovu pokretljivost i mogućnost zamjene s kationima iz otopine, te ih nazivamo kationskim izmjenjivačima (Vojnović i sur. 2013). Zeoliti imaju svojstva selektivnog katalizatora, ionskog izmjenjivača, adsorbenta i molekulskog sita (Baker

i sur. 2009). Zbog svoje specifične strukture zeoliti imaju vanjsku i unutarnju površinu i do nekoliko stotina kvadratnih metara po gramu materijala (Baker i sur. 2009).



Slika 8. Alumosilikatna mreža klinoptilolita. Zeleni tetraedri predstavljaju SiO_4 i AlO_4 tetraedre, a kuglice u šupljinama izmjenjive katione (prilagođeno iz Sedimaler i sur. 2011).

Empirijska formula zeolita u oksidnom obliku je (Cerjan Stefanović 2007):

$M_{2/n} \cdot Al_2O_3 \cdot XSiO_2 \cdot YH_2O$

gdje je: n – nabojni broj kationa M

X – broj od 2 do 10 (ovisno o tipu zeolita)

Y – broj od 2 do 8 (ovisno o tipu zeolita)

Empirijska formula klinoptilolita, koji je najrasprostranjeniji prirodni zeolit je (Coombs i sur. 1997):

$(Na, K, Ca_{0,5}, Sr_{0,5}, Ba_{0,5}, Mg_{0,5})_6 \cdot [Al_6Si_{30}O_{72}] \cdot \sim 20\ H_2O$

Prednost prirodnih zeolita pred ostalim materijalima je ta što se radi o prirodnim materijalima, velike rasprostranjenosti, koji imaju isplativu eksploataciju i primjenu. Zbog svoje strukture zeoliti su našli široku primjenu u brojnim područjima ljudskog djelovanja: agrikulturi, industriji, okolišu i dr. Najviše se koriste u poljoprivredi (za kalcifikaciju tla,

kontrolu sadržaja vlage i mirisa kod životinjskih otpada, u prehrani životinja i dr. (Filipan i sur. 2007). Koriste se i kao adsorbensi u proizvodnji naftnih derivata, na odlagalištima radioaktivnog otpada, za uklanjanje ulja s vodenih površina i za obradu otpadnih voda (Armbruster 2001, Ivanković 2012).

Prirodni zeolitni tufovi su se pokazali kao obećavajući materijali za imobilizaciju bakterija (Hrenović i sur. 2005). Zbog svoje poroznosti i velike površine, koja pruža mogućnost za kolonizaciju velikog broja bakterija i zaštitu od vanjskih utjecaja.

Stupanj bakterijske kolonizacije ovisi o kemijskim svojstvima pojedinog zeolita i o veličini čestica tufa (Hrenović i sur. 2005). Istraživanja su pokazala da je imobilizacija fosfat - akumulirajućih bakterija na zeolitni tuf moguća i da povoljno utječe na uklanjanje fosfata iz otpadnih voda (Hrenović i sur. 2005, Hrenović i sur. 2011).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi antibakterijsku aktivnost bakrom modificiranog zeolitnog tufa u odnosu na Gram - pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus* i Gram - negativnu bakteriju *Escherichia coli*. Odredio se utjecaj dodatka prirodnog zeolita obogaćenog natrijem i bakrom modificiranog zeolitnog tufa, na umnažanje i metabolizam patogenih bakterija u tri vodena medija: hranjivom mediju Luria Bertani (LB), sintetskoj otpadnoj vodi i realnoj otpadnoj vodi. Odredio se utjecaj dodatka bakrovog (II) klorida ($CuCl_2$) u realnoj otpadnoj vodi kako bih se ispitala toksičnost iona Cu^{2+} na bakterije. Određeno je ispiranje iona Cu^{2+} s čestica CuNZ nakon 24 h kontakta u pokusu s realnom otpadnom vodom kako bih se utvrdilo jesu li Cu^{2+} ioni odgovorni za antibakterijsku aktivnost. Pretpostavka je da bih bakrom modificirani zeolitni tuf bio obećavajući izbor u svrhu uspješnog uklanjanja patogenih bakterija iz otpadnih voda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema zeolita

Prirodni zeolitni tuf porijeklom iz ležišta sedimentnih naslaga Zlatokop (Vranjska Banja, Srbija), korišten je u pokusima (Slika 9). Prethodnom analizom, metodom rendgenske difrakcijske analize praškastog uzorka, utvrđeno je da većinsku fazu tog tufa čini klinoptilolit (72,6 težinskih %), a prateći minerali su plagioklas (14,6 težinskih %) i kvarc (12,8 težinskih %) (Rajić i sur. 2010). Ispitivanje je provedeno na uzorku zeolita veličine čestica od 0,1 – 0,063 mm (Slika 10).

Slika 9. Ležište zeolita u Vranjskoj Banji, Srbija.

Slika 10. Uzorak mljevenog prirodnog zeolita.

Suhi prirodni zeolitni tuf (eng. natural zeolite, NZ u daljnjem tekstu) je tretiran natrijevim kloridom kako bih se obogatio Na^+ ionima i povećao kapacitet ionske izmjene. Tako dobiveni oblik prirodnog zeolita obogaćen natrijem (NaNZ u daljnem tekstu) korišten je za pripremu zeolita modificiranog bakrom (CuNZ, u daljnjem tekstu).

Bakrom modificirani zeolit (CuNZ) je pripremljen tako što je 1,0 g NZ dodan u 100 mL otopine 6 mM $CuCl_2$ (p.a. Aldrich), zatim inkubiran 24 sata u vodenoj kupelji s miješalicom (Memmert WNB22) na 30,0 ± 0,5 °C uz miješanje brzinom 150 rpm. Iz otopine CuNZ je odvojen filtracijom. S obzirom da ioni klora imaju antibakterijski učinak, CuNZ je ispiran destiliranom vodom dok nije postignuta negativna reakcija na kloridne ione. NaNZ i CuNZ su sušeni na zraku pri 105°C dva sata i sterilizirani autoklaviranjem 20 minuta na 121°C prije istraživanja antibakterijske aktivnosti.

Elementarna analiza prirodnog i modificiranih zeolita je dobivena upotrebom energetsko disperzivnom rendgenskom spektroskopijom EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) na skenirajućem elektronskom mikroskopu (Jeol, JSM-6610LV) u Beogradu na Tehnološkom metalurskom fakultetu.

3.2. Bakterijski sojevi

Gram - negativna bakterija *Escherichia coli* (soj DSM br. 498) te Gram - pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* (soj DSM br. 799) kupljena je iz banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (Hrenović i sur. 2003).

3.3. Priprema hranjivih medija

Istraživanje je provedeno u 3 različita tekuća medija: hranjivi medij Luria Bertani (LB), sintetska otpadna voda, realna izlazna otpadna voda (efluent) iz sekundarne faze obrade postrojenja za obradu otpadnih voda u Zagrebu.

Luria Bertani (LB) medij, pripremljen je (u mg/L destilirane vode): tripton 10,000 (Bio-life 412292); ekstrakt kvasca 5000 (Biolife 412220); NaCl 10,000 (Kemika 1417506). Kemijska potrošnja kisika (KPK) medija Luria Bertani (LB) je izmjerena spektrofotometrijski (Hach, DR 2500) kako bih se odredila količina organske tvari, koristeći —„reactor digesting" metodu (Hach metoda 8000) te iznosi 14,000 mg O_2/L.

Sintetska otpadna voda je kemijski definirana vodena otopina sastava (u mg/L destilirane vode): Na-propionat 1000 (Fluka 81992); pepton 100 (Biolife 412259); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 (Kemika 1325006); $CaCl_2$ 6 (Lach-Ner 30974); KCl 30 (Kemika 1120907); ekstrakt kvasca 10 (Biolife 412220); KH_2PO_4 20 (Kemika 1112408); KPK 1,206.

Realna otpadna voda (realan efluent) iz sekundarne faze obrade postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu. Svježi uzorak efluenta je filtriran kroz Büchnerov lijevak s filtar papirom plave vrpce i Sartorius nitrocelulozni filtar promjera pora 0,45µm unutar 2 sata od uzorkovanja. Kemijski sastav efluenta (u mg/L) je: ukupni dušik 28,3; ukupni fosfor 2,27; KPK 31,4. Ukupni dušik i fosfor su izmjereni pomoću Hach spektrofotometra, koristeći metodu „persulfate digestion" (metoda 10072) te metodu „ascorbic acid" with „acid persulfate digestion" (metoda 10127).

3.4. Mjerenje pH vrijednosti

pH vrijednost svih medija je namještena na 7,0 ± 0,2 uz 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja kako bih se spriječio mogući utjecaj različitih pH na bakterije i radi lakše uporedbe rezultata. pH vrijednost je izmjerena s WTW 330 pH-metrom. Svi mediji su stavljeni u Schott boce i sterilizirani autoklaviranjem na 121 °C, 20 min.

3.5. Izvedba rada

Bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* su uzgajane na LB agaru 16 sati na 37,0 ± 0,1 °C kako bih kulture bile u log fazi rasta. Bakterijska biomasa je suspendirana u sterilnoj 0,05 M otopini natrijevog klorida (NaCl). Pokusa je proveden u sterilnim uvjetima između 2 plamenika. Bakterije su suspendirane na homogenizatoru 3 min/45 Hz. Uzeto je po 1 mL suspenzije bakterija pipetom nacijepljen prvo u dva puta po 3 Schottove boce koje sadrže po 100 mL Luria Bertani (LB) mediji, sintetske otpadne vode i realnog efluenta, te u dvije dodatne boce s realnim efluentom.

U svaku bocu s različitim medijima dodan je 1,0 g NaNZ, CuNZ ili $CuCl_2$. U tri boce s različitim medijima dodan je 1,0 g CuNZ kako bih smo ispitali antibakterijsku aktivnost modificiranog zeolita, te u tri boce dodan je 1,0 g NaNZ kako bih smo provjerili antibakterijsku aktivnost samog prirodnog zeolita, kontrola. U jednu bocu s realnim efluentom dodan je bakrov (II) klorid ($CuCl_2$) kako bi ispitali toksičnost iona Cu^{2+} na bakterije, druga boca s realnim efluentom

ostavljena je bez dodavanja $CuCl_2$ kao pozitivnu kontrolu. Boce su začepljene i inkubirane 24 sata u vodenoj kupelji (Memmert WNB22) na 37,0 ± 0,5 °C uz miješanje na 70 rpm.

3.6. Analitičke metode

3.6.1. Mjerenje broja bakterija

Na samom početku rada napravljeno je brojanje bakterijskih kolonija, nakon kratkog izlaganja od 1 h, što odgovara lag fazi rasta te nakon dugotrajnog izlaganja od 24 h, što odgovara stacionarnoj fazi rasta. Broj bakterijskih kolonija preračunat je kao broj jedinica koje tvore kolonije CFU (engl. colony forming units). Ovom metodom se određuje samo broj vijabilnih bakterijskih stanica, uz pretpostavku da jedna bakterijska stanica binarnom diobom na hranjivoj podlozi tvori jednu makroskopski vidljivu koloniju. Ukupan broj vijabilnih stanica u bocama, određen je uz broj slobodnih bakterija i broj imobiliziranih bakterija na česticama NaNZ. Imobilizacija je potvrđena pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (Jeol, JSM 5300). Za SEM mikroskopiju su čestice NaNZ istaložene, a uzoraka osušen u seriji etanola.

Nakon 24 h inkubacije, određen je broj slobodnih i imobiliziranih bakterija. Prije samog određivanja broja bakerija, za svaki uzorak napravljen je mikroskopski preparat obojan po Gramu.

Postupak bojanja po Gramu je sljedeći: 3 min u 0,3 % boji kristal violet, ispiranje pod tekućom vodom, 2 min u 1 % Lugolovoj jodnoj otopini, te ispiranje 96 % etanolom, 30 sec u bazičnom karbol fuksinu, te ispiranje pod tekućom vodom i sušenje. Preparati su proučeni pod mikroskopom s imerzijom na uvećanju 1000 X (Olympus CX21). Na temelju dobivene slike određena su potrebna decimalna razrjeđenja te su bakterije nacijepljene na hranjivi agar.

Postupak nacjepljivanja je bio sljedeći, za određivanje broja slobodnih bakterija: 1 mL supernatanta prebačen je u staklenu epruvetu s 9 mL sterilne 0,3 % otopine NaCl te je napravljena serijska razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-9}. Volumen od 0,1 mL nanesen je na hranjivu podlogu LB agar metodom širenja razmaza. Obje bakterije su inkubirane pri 37 ± 0,1 °C. Nakon 24 h inkubacije kolonije su prebrojane te je broj preračunat u CFU/mL. Za određivanje broja imobiliziranih bakterija: nakon inkubacije boce su odložene na 5 min da bih se NaNZ u njima istaložio. Uzeto je 1 mL otopine iz supernatanta te je napravljena serija decimalnih razrjeđenja da bih se odredio broj slobodnih bakterija u otopini, kako je gore opisano. Određivanje broja imobiliziranih bakterija, mokri NaNZ je dodan u sterilnu epruvetu s navojem koja sadrži 9 mL sterilne 0,3 % otopine NaCl. Epruveta je miješana u mehaničkoj mješalici, homogenizatoru

(Tecno Kartell TK 3S) 5 minuta/ 40 Hz. Ovim postupkom imobilizirane bakterije se odvajaju od zeolita u supernatantu. Od dobivene suspenzije napravljena su serijska razrijeđen od 10^{-1} do 10^{-9} Metodom širenja razmaza inokulirali smo 1 mL na hranjivi agar kako bih se odredio broj vijabilnih stanica po 1 g mokrih biočestica, tj. CFU/g. Dijeljenjem vrijednosti CFU/g sa 100 dobivena je vrijednost CFU/mL.

3.6.2. Postupak ispiranja Cu^{2+} iona iz CuNZ

Nakon 24 h u pokusu s realnom otpadnom vodom (efluentom) određeno je ispiranje iona Cu^{2+} s čestica CuNZ. Metoda je korištena kako bih se utvrdilo jesu li Cu^{2+} ioni odgovorni za antibakterijsku aktivnost. Suspenzija je nakon pokusa filtrirana preko Sartoriusovih nitroceluloznih filtera s porama 0,20 μm. Efluent je analiziran atomskom apsorpcijskomom spektrofotometrijom (AAS Varian, SpectrAA 55b).

3.7. Obrada podataka

Antibakterijska aktivnost je izražena kao postotak redukcije u broju bakterija nakon 1 h i 24 h, u odnosu na odgovarajuće pozitivne kontrole. Pozitivna kontrola je bio natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ) u pokusu s CuNZ,a u pokusima s $CuCl_2$ pozitivna kontrola je bila suspenzija bakterija. Formula za izračunavanje postotka redukcije broja bakterija je:

$$\%\ \text{redukcije} = \frac{(\text{broj bakterija u kontroli - broj bakterija u pokusu})}{\text{broj bakterija u kontroli}} \cdot 100$$

Koristeći program Statistica Software 10,0 (StatSoft, Tulsa, USA) napravljena je statistička analiza. Radi lakše analize i izrade izračuna, apsolutni brojevi bakterija su logaritmirani. Log_{10} CFU korišten je za usporedbe, metodom ANOVA (one-way analysis of variance) pomoću post-hoc Duncan testa. Značajno različite vrijednosti su izražene kao:

Apredstavlja različite bakterijske brojeve u uzorku u odnosu na odgovarajuću kontrolu,

B predstavlja različite bakterijske brojeve u uzorku u odnosu na LB medij s CuNZ,

[C] predstavlja različite bakterijske brojeve u uzorku u odnosu na sintentsku otpadnu vodu sa CuNZ,

[D]predstavlja različite bakterijske brojeve u uzorku u odnosu na realni efluent sa CuNZ. Post-hoc Duncan test izveden je za usporedbu finalnih pH vrijednosti medija. Korelacija između KPK medija i postotka redukcije bakterija izračunan je koristeći Spearman korelacijsku analizu. Kao statistički značajni podaci uzeti su oni za koje je $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Kemijski sastav zeolita

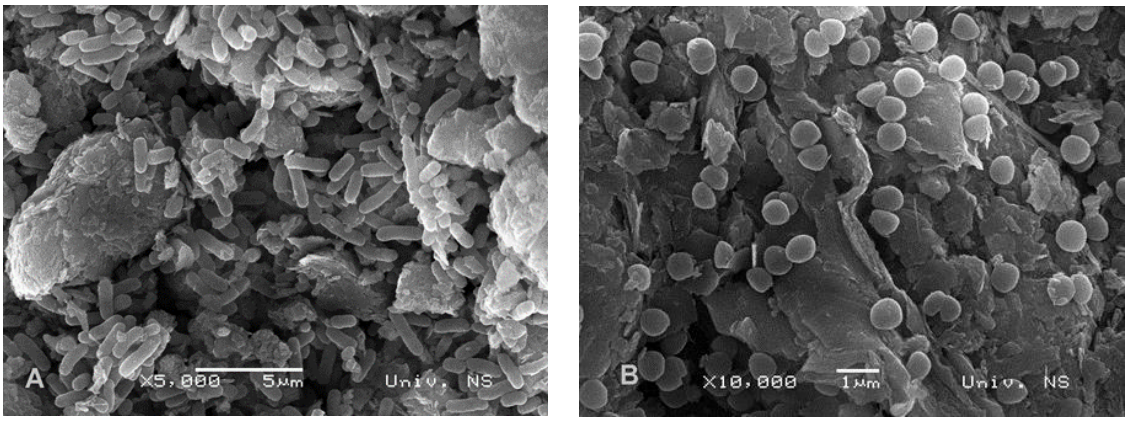
Kemijski sastav NZ, NaNZ i CuNZ prikazan je u Tablici 1. Nakon tretiranja NZ s NaCl, vidljive su promjene u sastavu između NZ i NaNZ. Molekule SiO_2 i Al_2O_3 koje čine kristalnu rešetku zeolita, ne pokazuju vidljive promjene, no došlo je do povećanja udjela Na u NaNZ, dok udjeli K, Ca i Mg su se smanjili. To nam pokazuje da su Na^+ ioni u zeolitu zamijenjen drugim ionima iz otopine. U slučaju CuNZ smanjio udio Na^+ iona u prisutnosti Cu^{2+} iona. Prijašnje EDS analize zeolita modificiranih teškim metalima pokazale su da Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}ioni zamjenjuju samo Na^+ ione u klinoptilolitnoj fazi (Rajić i sur. 2011). Istraživani CuNZ sadržavao 2,60 wt. % CuO (Tablica 1).

Tablica 1. Kemijski sastav NZ, NaNZ i CuNZ izražene kao vrijednost masenog udjela (eng. percentage by weight, wt.%). Standardna devijacija je u zagradama. Kemijski sastav odgovara prosječnoj vrijednosti dobivenoj iz 10 mjerenja površine 1 - 2 mm^2.

Sastavni dio	NZ	NaNZ	CuNZ
SiO_2	65,7 (2)	66,6 (3)	65,7 (2)
Al_2O_3	13,0 (1,5)	12,9 (1,3)	12,4 (1,6)
Fe_2O_3	1,48 (0,6)	1,04 (0,5)	1,12 (0,6)
Na_2O	0,95 (0,1)	5,34 (0,2)	3,31 (0,1)
K_2O	1,33 (0,4)	0,14 (0,2)	0,12 (0,3)
CaO	3,08 (0,2)	1,40 (0,1)	1,28 (0,1)
MgO	1,41 (0,2)	1,21 (0,1)	1,08 (0,1)
CuO	-	-	2,60 (0,3)
Gubitak žarenjem na 1000 °C	12,9	11,5	12,3

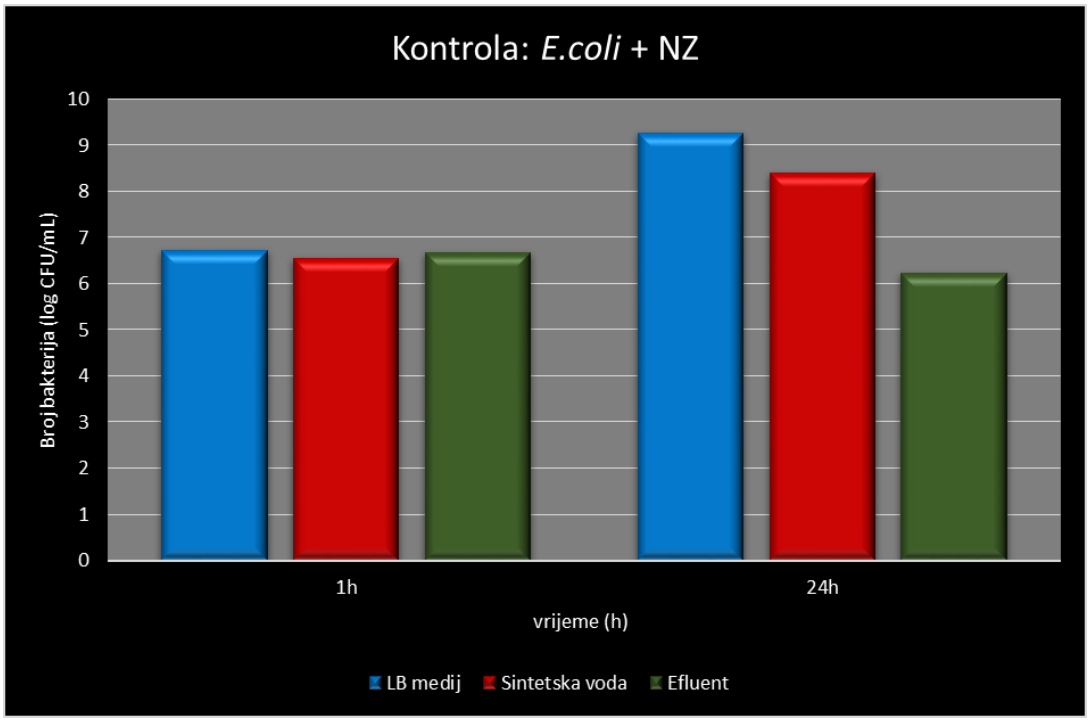
4.2. Djelovanje NaNZ na bakterije

Nakon 24 h inkubacije većina bakterijskih stanica bila je imobilizirana na čestice natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ), što je pokazala i elektronska mikroskopija (Slika 11). Manji broj slobodnih (planktonskih) bakterijskih stanica nalazio se u supernatantu.

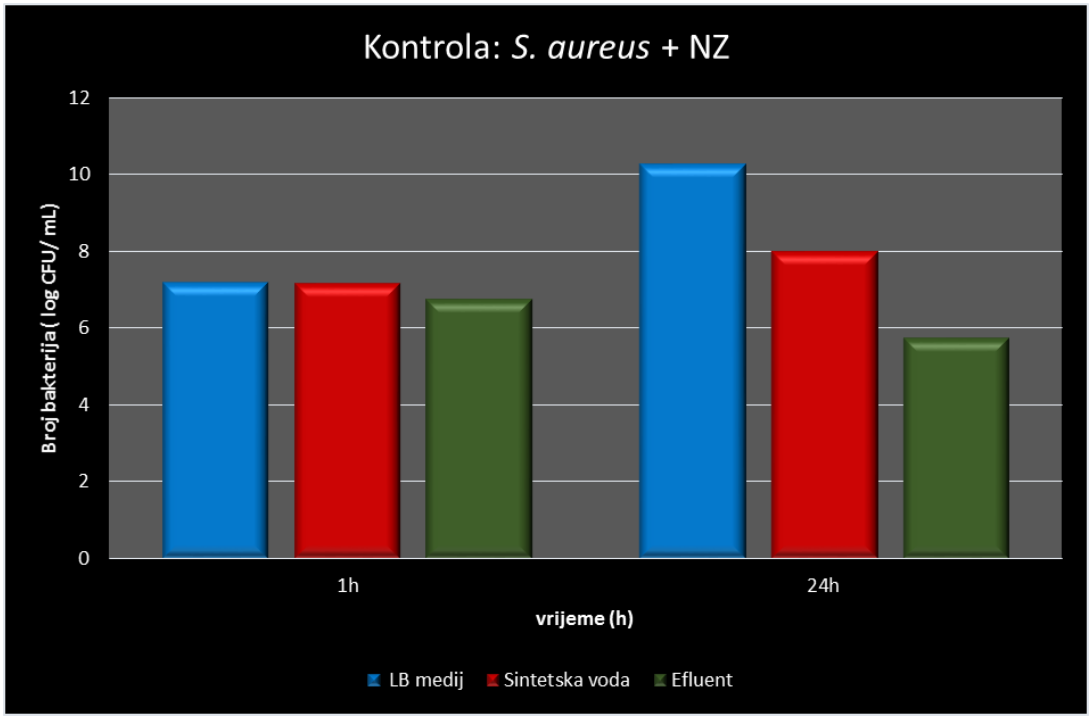


Slika 11. Imobilizirane stanice *Escherichia coli i Staphylococcus aureus* na česticama natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ) u Luria Bertani (LB) mediju nakon 24 h inkubacije.

U kontrolnim bocama s NaNZ nakon 1 h inkubacije, ni u jednom od medija nije bilo značajne promjene u vrijednosti broja bakterija u odnosu na početne vrijednosti. Nakon 24 h inkubacije medija broj *Escherichia coli i Staphylococcus aureus* se znatno povećao (Slika 12 i 13). U LB mediju za *Escherichia coli* iznosio je 2,60 log CFU mL^{-1}, za *Staphylococcus aureus* 3,10 log CFU mL^{-1}. Nešto niži porast broja bakterija nalazimo u sintetskoj vodi, za *Escherichia coli* iznosio je 1,94 log CFU mL^{-1}, za *Staphylococcus aureus* 1,21 log CFU mL^{-1}. Mali pad broja bakterija zabilježeno u realnom efluentu, za *Escherichia coli* (0,02 log CFU mL^{-1}), te značajno veći pad broja bakterija za *Staphylococcus aureus* (0,9 log CFU mL^{-1}). Ovi podaci ukazuju da zbog velike količine hranjivih tvari prisutnih u LB mediju dolazi do porast broja bakterijskih stanica, dok pad broja bakterija *Staphylococcus aureus* u sintetskoj otpadnoj vodi i realnom efluentu, objašnjavamo nedostatkom dostupne organske tvari.



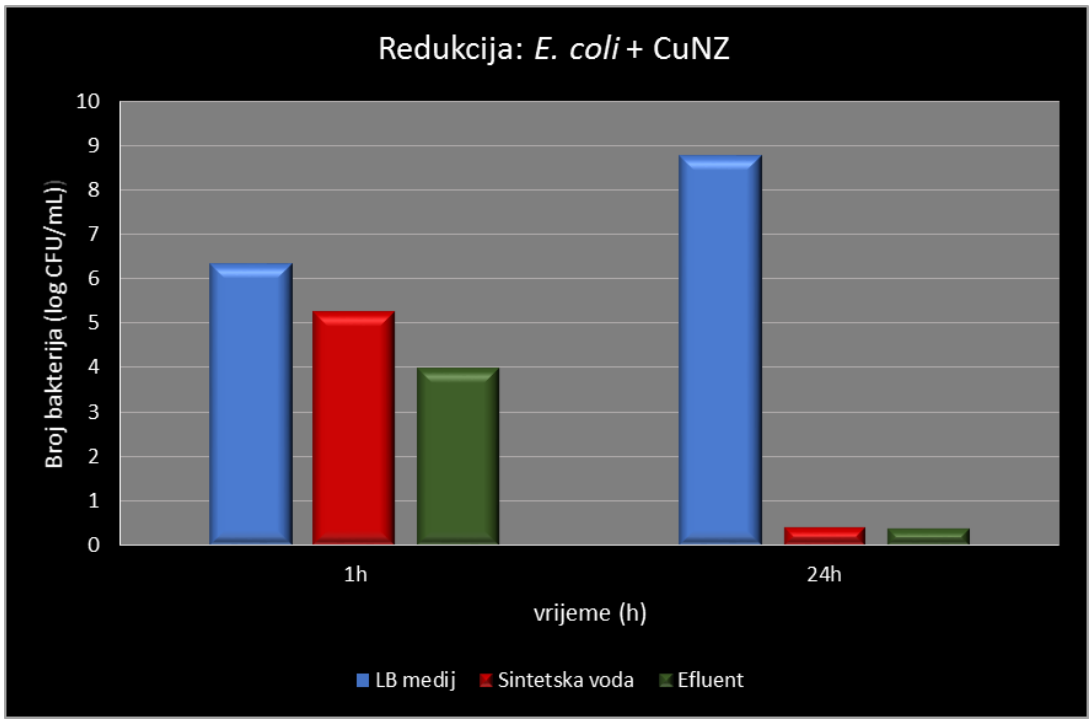
Slika 12. Promjena ukupnog broja (planktonskih i imobiliziranih) vijabilnih stanica *Escherichia coli* nakon 1 h i 24 h od dodavanja natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ).



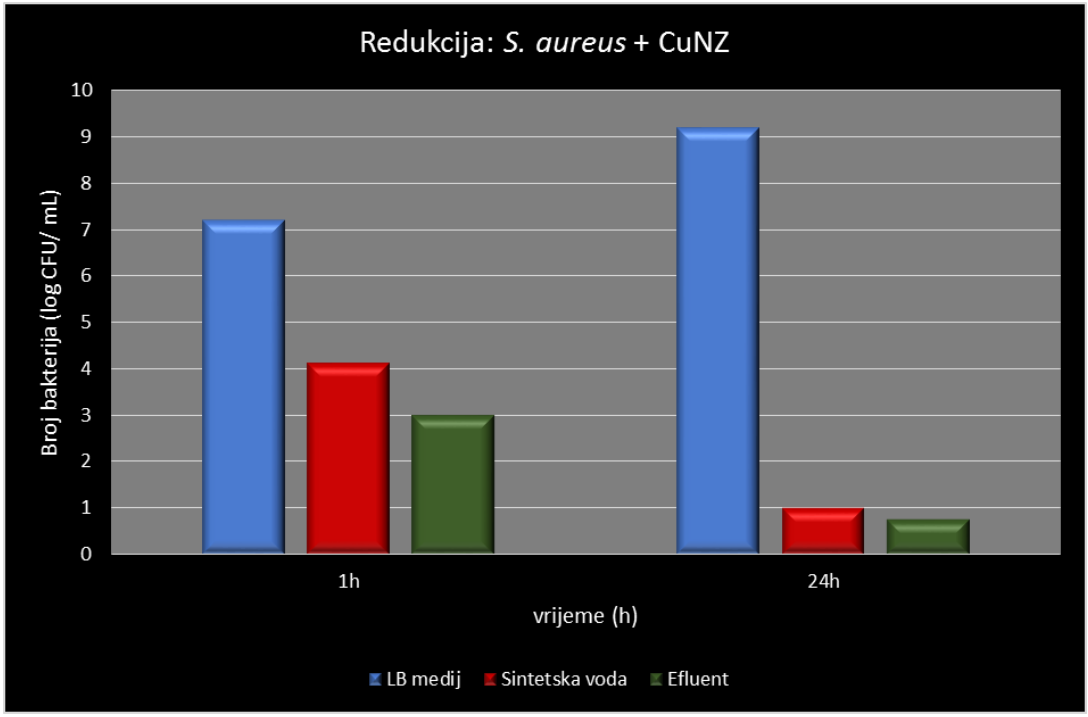
Slika 13. Promjena ukupnog broja (planktonskih i imobiliziranih) vijabilnih stanica *Staphylococcus aureus* nakon 1 h i 24 h od dodavanja natrijem obogaćenog oblika prirodnog zeolita (NaNZ).

4.3. Antibakterijska aktivnost CuNZ

Bakrom modificirani zeolit (CuNZ) pokazao je toksičnost prema bakterijama i nemogućnost imobilizacije, zbog Cu^{2+} iona. Nakon 1 h inkubacije nije bilo značajnih promjena u broju vijabilnih bakterija, dok nakon 24 h inkubacije vidljiva je promjena broja bakterija za sva tri medija (Slike 14 i 15). U LB mediju, vidljiv je porasta broja *Escherichia coli* od 2,09 log CFU mL^{-1}, te *Staphylococcus aureus* od 2,00 log CFU mL^{-1}, porast broja bakterija možemo objasniti visokom vrijednošću KPK medija. U sintetskoj otpadnoj vodi je došlo do značajne redukcije broja bakterija od 6,03 log CFU za *Escherichia. coli*, te 6,19 log CFU za *Staphylococcus aureus*, a u efluentu redukcija od 6,18 log CFU za *Escherichia coli*, te 6,29 log CFU za *Staphylococcus aureus*. Antibakterijska aktivnost CuNZ prikazana je kao postotak redukcije broja vijabilnih bakterija (Tablica 2), nakon usporedbe s brojem bakterija u odgovarajućim kontrolama s NaNZ.



Slika 14. Promjena ukupnog broja vijabilnih stanica *Escherichia coli* nakon 1 i 24 h od dodavanja bakrom modificiranog zeolita (CuNZ). Broj imobiliziranih bakterija bio je beznačajan.



Slika 15. Promjena ukupnog broja vijabilnih stanica *Staphylococcus aureus* nakon 1 h i 24 h od dodavanja bakrom modificiranog zeolita (CuNZ). Broj imobiliziranih bakterija bio je beznačajan.

4.4. Antibakterijska aktivnost Cu^{2+} iz $CuCl_2$

Usporedbom podataka između CuNZ u realnoj vodi i Cu^{2+} iona u realnoj vodi za *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, vidljivo je da nakon 1 h postignuta redukcija od 75,31 ± 1,52 % za *Escherichia coli* i 72,64 ± 0,26 za *Staphylococcus aureus* (Tablica 2), dok nakon 24 h postignuta je potpuna redukcija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* od 100 %. Na temelju ovog podatka možemo zaključiti da je Cu^{2+} ion odgovoran za toksičnost, odnosno antibakterijsku aktivnost u CuNZ.

4.5. Ispiranje Cu^{2+} iona s CuNZ

Nakon 24 h inkubacije u efluentu nije bilo detektirano ispiranje Cu^{2+} iona (0,00 percentage by weight, wt.%) s čestica CuNZ, što pokazuje da ispiranje Cu^{2+} iona u efluentu nije

odgovorno za antibakterijsku aktivnost CuNZ, te ukazuje na mogućnost korištenja istog materijala više puta u svrhu dezinfekcije otpadnih voda.

Tablica 2. Postotak redukcije broja stanica *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* nakon 1 h i 24 h kontakta s CuNZ i Cu^{2+} ionima u različitim medijima, u odnosu na kontrolu.

Medij	***E. coli***		
	Redukcija 1 h (%)	**Redukcija 24 h (%)**	**pH**
LB medij + CuNZ	5,51 ± 1,47 ^{A}	5,54 ± 0,65 ^{A}	6,74 ± 0,02
Sintetska voda + CuNZ	19,43 ± 0,57^{A,B}	94,90 ± 0,80^{A,B}	5,89 ± 0,02^{A,B}
Efluent + CuNZ	40,08 ± 0,29^{A,B,C}	93,54 ± 2,29^{A,B}	7,14 ± 0,02^{A,B,C}
Efluent + Cu	75,31 ± 1,52^{A,B,C,D}	100,00 ± 0,00^{A,B,C,D}	7,87 ± 0,02^{A,B,C,D}
Medij	***S. aureus***		
	Redukcija 1 h (%)	**Redukcija 24 h (%)**	**pH**
LB medij + CuNZ	0,40 ± 0,07	10,69 ± 0,08^{A}	6,76 ± 0,02
Sintetska voda + CuNZ	42,76 ± 2,12^{A,B}	87,35 ± 0,42^{A,B}	5,95 ± 0,02^{A,B}
Efluent + CuNZ	55,67 ± 0,10^{A,B,C}	86,79 ± 1,33^{A,B}	6,85 ± 0,02^{A,B,C}
Efluent + Cu	72,64 ± 0,26^{A,B,C,D}	100,00 ± 0,00^{A,B,C,D}	7,46 ± 0,02^{A,B,C,D}

Podaci su statistički značajno različiti u odnosu na ^{A} - odgovarajuću kontrolu, ^{B} - LB medij + CuNZ, ^{C} - sintensku vodu + CuNZ, ^{D} - realni efluent + CuNZ. t_0 (broj jedinica koje tvore kolonije u početnom trenutku) *Escherichia coli* (10^6 CFU mL^{-1}) = 3.49 ± 1.02; t_0 (broj jedinica koje tvore kolonije u početnom trenutku) *Staphylococcus aureus* (10^7 CFU mL^{-1}) = 1.51 ± 0.26.

4.6. Utjecaj pH vrijednosti na antibakterijsku aktivnost

Konačna pH vrijednost nije se puno razlikovala od kontrolnih i eksperimentalnih boca. U LB mediju nije bila viša od 0,19, 1,52 za sintetsku otpadnu vodu, 1,59 za efluent s CuNZ i 0,79 pH jedinica za efluent sa Cu^{2+} ionima iz $CuCl_2$ (Tablica 2). pH vrijednost svih medija je namještena na 7,0 ± 0,2 uz 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja kako bih se spriječio mogući utjecaj različitih pH na bakterije. Na temelju ovog podatka pH vrijednosti nije utjecala na redukciju broja bakterija.

5. RASPRAVA

Prirodni zeolitni tuf je smjesa različitih minerala, u našem slučaju većinsku fazu tufa činio je klinoptilolit. Prirodni zeolitni tufovi su se u više studija pokazali kao obećavajući nosači bakterija (Hrenović i sur. 2008, Hrenović i sur. 2005, Hrenović i sur. 2011, Ivanković et al. 2012). U istraživanju Hrenović i sur. (2005) proučavana je imobilizacija fosfat – akumulirajućih bakterija roda *Acinetobacter* na tri različita nosača s različitim veličinama čestica: prirodni zeolit (NZ), prirodni zeolit obogaćen Mg (MgNZ) i kvarcni pjesak. Pokazalo se da su prirodni zeolit (NZ) i kvarcni pijesak dobri nosači za adsorpciju fosfat – akumulirajućih bakterija, dok prirodni zeolit obogaćen Mg (MgNZ) pokazao se kao daleko najbolji nosač bakterija. Svojstvo nosača koje je prepoznato kao bitno također je i veličina čestica, što su čestice manje bakterijama je omogućena veća površina za imobilizaciju i uspostavu biofilma (od adsorbiranih stanica formira se biofilm) (Hrenović i sur. 2005, Hrenović i sur. 2009).

U više studija pokazalo se da su bakterije u biofilmu otpornije na štetne vanjske utjecaje, antibiotike i dezinficijanse u odnosu na bakterije koje žive planktonski (Teitzel i sur. 2003, Milanov i sur. 2008, Milanov i sur. 2010). Usporedbom ovog podatka sasvim razumno je bilo pretpostaviti da bi sličnu otpornost bakterijski biofilmovi pokazali i u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda. Teitzel i sur. (2003) i Kim i sur. (2008) istraživali su otpornost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u biofilmu i u planktonu na teške metale. Pokazalo se da bakterije u biofilmu od 2 – 600 puta otpornije na teške metale nego li planktonske. To je objašnjeno tako da se na površini biofilma stvara sloj mrtvih stanica bakterija koji ima zaštitnu ulogu prema dubljim slojevima biofilma. Milanov i sur. (2010) ističu da u provedenom istraživanju bakterije u biofilmu pokazuju za 10 – 1000 puta veću rezistenciju na antibiotike. Duraković i sur. (2009) i Vraneš i sur. (2009) ističu da debljina biofilma raste vrlo brzo u tijeku perioda kada je dostupna velika količina nutrijenata koja favorizira aktivan rast stanica u unutrašnjim slojevima biofilma. S porastom debljine slojeva stanica u biofilmu, mijenjaju se i uvjeti mikrookoliša poput dostupnosti hranjivih tvari, prisutnosti kisika ili kiselih otpadnih metaboličkih tvari, sve to utječe na brzinu razmnožavanja bakterijskih stanica koje u takvim uvjetima prelaze u stacionarnu fazu u kojoj su manje osjetljive na baktericidno djelovanje antimikrobnih lijekova (Vraneš i sur. 2009). Ove podatke možemo uzeti u obzir i u ovom istraživanju, bez obzira na veliki postotak redukcije broja bakterija. Većina Gram - pozitivnih i Gram - negativnih bakterija bile su imobilizirane na čestice zeolita (nosač), manji broj slobodnih (planktonskih) bakterijskih stanica nalazio se u supernatantu.

Prirodni zeolit obogaćen ionima Na (NaNZ) nije pokazao antibakterijsku aktivnost, te je došlo do porasta broja bakterije *E. coli* i *S. aureus* u LB mediju i sintetskoj otpadnoj vodi. To je bilo

očekivano jer su se prirodni zeolitni tufovi u više studija pokazali kao obećavajući nosači bakterija (Hrenović i sur. 2005, Hrenović i sur. 2008, Hrenović i sur. 2011, Ivanković et al. 2012). Pad broja bakterija *E. coli* i *S. aureus* u realnom efluentu objašnjavamo nedostatkom dostupne organske tvari. Bakrom modificirani zeolit (CuNZ) pokazao je antibakterijsku aktivnost. Antibakterijska aktivnost je izražena kao postotak redukcije u broju bakterija nakon 1 h i 24 h, u odnosu na odgovarajuće pozitivne kontrole. Nakon 24h kontakta došlo do redukcije broja bakterija u sintetskoj otpadnoj vodi (87,35 – 95,67%) i realnoj otpadnoj vodi (86,79 – 93,54%), dok u LB mediju (5,54 – 10,69%) redukcija nije bila učinkovita. U istraživanju Hrenović i sur. (2011) proučavan je Zn - klinoptilolit (Zn - CLI) i ZnO - klinoptilolit (ZnO - CLI) kao prirodni zeolit (nosač) za *A. junii*. Pokazalo se da Zn - CLI i ZnO - CLI imaju snažno antibakterijsko djelovanje s vrlo visokim postotkom inhibicije *A. junii* od 99% unatoč vrlo niskom broju imobiliziranih bakterija. Ovaj podatak možemo uzeti u obzir i u ovom istraživanju. Nakon 24 h postignuta je potpuna redukcija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* od 100 %, unatoč niskom broju imobiliziranih bakterija.

Uspoređujući konačne pH vrijednosti, u oba slučaja nisu se puno razlikovala od kontrolnih i eksperimentalnih, te je na temelju toga je zaključeno da promjena vrijednosti pH nema utjecaj na redukciju broja bakterija.

Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da postotak redukcije broja bakterijskih stanica nakon 24 h kontakta s CuNZ ovisi o mediju u kojem su bakterije uzgajane. te je pokazao značajnu negativnu korelaciju u odnosu na KPK medija (R = - 0,993). Veliki broj hranjivih tvari u LB mediju objašnjava manju redukciju broja bakterija nego u sintetskoj otpadnoj vodi i CuNZ u efluentu, koji su siromašniji hranjivim tvarima. To je pokazano i u studiji Menkissoglu i sur. (1991.) gdje se toksičnost Cu^{2+} iona na bakteriju *Pseudomonas syringae* smanjivala kad su u mediju bili prisutni citrati, glukoza i fruktoza, Cu^{2+} ioni lako čine komplekse s karboksilat - ionima što smanjuje njihovu toksičnost. S toga rezultate testova u medijima bogatim hranjivim tvarima trebali bih uzeti sa rezervom ako ih želimo primijeniti u realnim medijima.

Usporedbom podataka između CuNZ u realnoj vodi i Cu^{2+} iona u realnoj vodi za *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, vidljiva je veća redukcija broja bakterija kod Cu^{2+} iona u realnoj vodi (Tablica 2). To je u više studija objašnjeno većom antibakterijskom aktivnošću slobodnih metal iona u otopini u odnosu na metal ione u rešetci zeolita (Matsumura i sur. 2003, Malachova i sur. 2011). Pretpostavlja se da bakterijske stanice moraju doći u

kontakt s metal modificiranim zeolitom kako bih aktivno uzele metalni ion, koji inaktivira enzime u citoplazmi vežući se na tiolnu grupu (-SH), te na posljetku uzrokuju oštećenje i smrt bakterijskih stanica (Feng i sur. 2000, Matsumura i sur. 2003, Kwakye-Awuah i sur. 2008, Malachova i sur. 2011). Antibakterijski učinak bih mogli imati i kloridni ioni (Cl^-) iz $CuCl_2$. Istraživanje Kim i sur. 2008 pokazalo je da Cl^- ioni reagiraju s staničnom biomasom, te da mogu proći kroz biofilm i uzrokovati oštećenje bakterijske stanice. U istraživanju Gupta i sur. (1998) toksičnost Ag+ iona na *E. coli* je bila povećana u prisutnosti 20 - 30 g/L NaCl.

Ispiranje Cu^{2+} iona s CuNZ nije bilo detektirano, što pokazuje da ispiranje Cu^{2+} iona u efluentu nije odgovorno za antibakterijsku aktivnost CuNZ. Može se pretpostaviti da bakterije dolaze u kontakt s CuNZ i aktivno uzimaju Cu^{2+} ione, te uzrokuje oštećenje bakterijskih stanica. Glavne osobine i prednost CuNZ u usporedbi sa slobodnim Cu^{2+}ionima je upravo stabilnost i sporo otpuštanje Cu^{2+} iona s CuNZ. Dobra antibakterijska aktivnost CuNZ koja je uočena na Gram - negativnoj bakteriji i Gram - pozitivnoj bakteriji pridonosi značajnosti CuNZ kao materijala koji se može naći primjenu u pročišćavanju otpadnih voda, odnosno možemo ga smatrati obećavajućim antibakterijskim materijalom za dezinfekciju otpadnih voda.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja o antibakterijskoj aktivnosti CuNZ na bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* možemo zaključiti sljedeće:

- Antibakterijska aktivnost CuNZ na Gram - pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* i Gram - negativnoj bakteriji *Escherichia coli*, ovisila je o KPK medija. KPK medija Luria Bertani (LB) imala je znatno veće vrijednosti, te je antibakterijska aktivnost u LB mediju bila značajno niža od antibakterijske aktivnosti u sintetskoj otpadnoj vodi i realnoj otpadnoj vodi (efluentu).
- Ispiranja Cu^{2+} iona s čestica CuNZ nije bilo (0,00 percentage by weight, wt.%), te bih se isti materijal mogao koristiti više puta za dezinfekciju u tercijalnoj fazi obrade otpadnih voda.
- Kako je u realnom efluentu došlo do redukcije broja bakterija za 6 redova veličine, CuNZ se pokazao kao obećavajući materijal za primjenu i uklanjanje patogenih bakterija u tercijarnoj fazi obrade otpadnih voda.

7. LITERATURA

1. Armbruster, T. (2001): Clinoptilolite - heulandite: applications and basic research. zeolites and mesoporous materials at the dawn of the 21st century. Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, Studies in Surface Science and Catalysis 135, A. Galerneau, F. Di Renzo, F. Fajula and J. Vedrine eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 13-27.
2. Baker, H., M., Massadeh, A., M., Younes, H., A. (2009): Natural Jordanian zeolite: removal of heavy metal ions from water samples using column and batch methods. Environ Monit Assess Impact Factor 157, 319 – 330.
3. Barakat, M., A., (2011): New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. Arabian Journal of Chemistry 4 (4), 361 – 377.
4. Bitton, G. (2005): Introduction to wastewater treatment. U: Bitton, G. (ur.) Wastewater microbiology. Wiley - Liss, New Jersey, 213 – 223, 487 - 488.
5. Börjesson, S. (2009): Antibiotic resistance in wastewater – methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibiotic resistance genes. Linköping University Medical Dissertations 1128, Sweden, 8 – 14.
6. Börjesson, S., Matussek, A., Melin, S., Lofgren, S., Lindgren, P., E. (2010): Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? Applied Microbiology 108, 1244 – 1251.
7. Cerjan Stefanović, Š. (2007.): Fizikalno kemijske karakteristike zeolita Donje Jesenje. U: Filipan, T., Tišma, S., Farkaš, A. (ur.) Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša. Naklada Stih, Zagreb, 25 – 52.
8. Cerjan Stefanović, Š., Zabukovec Logar, N., Margeta, K., Novak, N., Tušar, I. Arcon, K. Maver, J. Kovač, V. Kaučić (2007): Structural investigation of Zn^{2+} sorption on clinoptilolite tuff from the Vranjska Banja deposit in Serbia. Microporous and Mesoporous Materials 105 (3), 251 - 259.
9. Copcia, E., V.,Luchian, C., Dunca, S., Bilba, N., Hristodor, C., M. (2011): Antibacterial activity of silver - modified natural clinoptilolite. Journal of Materials Science 46, 7121 – 7128.
10. Coombs, D., S., Alberti, Armbruster, A., Artioli, T., Colella, G., Galli, C., Grice, E., Liebau, J., D., Minato, F., Nickel, H., Passaglia, E., H., Peacor, E., Quartieri, D., R., Rinaldi, S., Ross, R., Sheppard, M., Tillmanns, R., A., Vezzalini, E., G. (1997): Recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommitee on zeolites

of the international mineralogical association, commission on new minerals and mineral names. The Canadian Mineralogist 35, 1571 – 1606.

11. Croxen, M., A., Law, R., J., Scholz, R., Keeney, K.,M., Wlodarska, M., Brett Finlay, B. (2013): Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 26 (4), 822 – 880.
12. Dean, R., B., Lund, E. (1981): Water reuse: Problems and solutions. Academic Press, London, U.K.
13. Duraković, L., Duraković, Z., Blažinkov, M., Bošnjak, M., Sikora, S., Delaš, F., Markov, K., Skelin, A., Čvek, D. (2009): Mikrobne zajednice i biofilmovi. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 4 (3 - 4), 92 - 97.
14. Feng, Q., J., Wu, J., Chen, G., Q., Cu, F., Z., Kim, T., N., Kim, J., O., Feng, Q., L. (2000): A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research 52 (4), 662 - 668.
15. Filipan, T., Farkaš, A., Tišma, S., Butorac, A., Cerjan Stefanović,S. (2007): Proizvodnja, svojstva i primjena zeolitnog tufa (Cp)* te pripravaka “SPS” iz Donjeg Jesenja. U: Filipan, T., Tišma, S., Farkaš, A. (ur.) Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša. Naklada Stih, Zagreb, 53 – 81.
16. Filipović, I., Lipanović, S. (1995), Opća i anorganska kemija, II. Dio - Kemijski elementi, njihove elementarne tvari i spojevi, IX. Izdanje. Školska knjiga, Zagreb, 1067 - 1079.
17. Flanigen, E., M., Broach, W.,R., Wilson, S.,T. (2010): Zeolites in industrial separation and catalysis. (ed S. Kulprathipanja). Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 27 – 59.
18. Gupta, A., Maynes, M., Silver, S. (1998): Effects of halides on plasmid - mediatedsilver resistance in *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology 64, 5042 – 5045.
19. Harris, L., G., Foster, S., J., Richards, R., G L.G.(2002): An introduction to *Staphylococcu aureus* and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. European Cells and Materials 4, 39 - 60.
20. Henze, M., Comeau, Y. (2008): Wastewater Characterization. U: Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., Brdjanovic, D. (ur.) Biological wastewater treatment: Principles Modelling and Design. IWA Publishing, London, 33 - 52.
21. Holt, J., G., Krieg, N., R., Sneath, P. H. A., Staley, J., T., Williams, S., T. (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 175 – 289.
22. Hrenović, J., Ivanković, T., Tibljaš, D. (2009): The effect of mineral carrier composition on phosphate - accumulating bacteria immobilization. Journal of Hazardous Materials 166,

1377 - 1382.

23. Hrenović, J., Stilinović, B., (2009): Praktikum iz bakteriologije. Naklada stih, Zagreb, 97 - 103, 107 – 120.
24. Hrenović, J., Stojaković, D., Mazaj, M., Rajić, N. (2011): On the zinc sorption by the Serbian natural clinoptilolite and the disinfecting ability and phosphate affinity of the exhausted sorbent. Journal of Hazardous Materials 185, 409 - 414.
25. Hrenović, J., Šimunović, S., (2010): Pogodnosti komercijalnih kulturnih krutih hranjivih podloga. Hrvatske vode 18 (71), 35 – 40.
26. Hrenović, J., Tibljaš, D., Sekovanić, L., Ivanković, T., Rožić, M. (2008): Effect of natural and sybthetic zeolites on bacteria. Proceedings of the 1. Croatian symposium on zeolites, Split, 33 – 37.
27. Hrenović, J., Tibljaš, D., Orhan, Y., Büyükgüngör, H. (2005): Immobilisation of *Acinetobacter calcoaceticus* using natural carriers. Water SA 31, 261 - 266.
28. Hrenović, J., Željezić, D., Kopjar, N., Sarpola, A., Bronić, J., Sekovanić, L. (2010b): Antimicrobial activity of commercial zeolite A on *Acinetobacter junii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Hazardous Materials 183, 655 - 663.
29. http://jb.asm.org/
30. https://www.ysi.com/parameters/biochemical-oxygen-demand-bod?Biochemical-Oxygen-Demand---BOD-5
31. http://library.iyte.edu.tr/tezler/doktora/kimyamuh/T000899.pdf
32. http://metalionline.com/vise_o_bakru.html
33. http://phil.cdc.gov/phil/details.asp
34. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf
35. Imširović, E., Brčina, A., Dautbašić, A., Aličić, D. (2013): Djelovanje kantarionovog ulja na bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Hrana u zdravlju i bolesti. Znanstveno - stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku 2, 17 - 23.
36. Ivanković, T. (2012): Alumosilikatni materijali kao nosači fosfat – uklanjajućih bakterija u obradi otpadnih voda. Doktorska disertacija. Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
37. Jerman, M., B., (ur.) (2009): Pregled tehničke literature i dokumentacije. Kemija u industriji 58 (9), 427 – 432.
38. Kardum, M., (2008): Pročišćavanje otpadnih voda na bazi aktivnog mulja. Urbanistički institut Hrvatske d.d., Zagreb. Građevinar 60 (5), 421 – 428.
39. Kim, J., Pitts, B., Stewart, P.,S., Camper, A., Yoon, J. (2008): Comparison of the

antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. Antimicrobial Agents Chemotherapy 52 (4), 1446 – 1453.

40. Kwakye-Awuah, B., Williams, C., Kenward, M., A., Radecka, I. (2008): Antimicrobial action and efficiency of silver - loaded zeolite X. Journal of Applied Microbiology 104, 1516 – 1524
41. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T. (2003): Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Applied and Environmental Microbiology 69, 4278 – 4281.
42. Menkissoglu, O., Lindow S., E. (1991): Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. Disease Control and Pest Management 81, 1258 - 1263.
43. Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J. (2008): Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Arhiv veterinarske medicine 1 (2), 5 - 15
44. Milanov, D., Čubrak, N., Petrović, J., Lazić, S. (2010): Mehanizmi povećane otpornosti bakterija u biofilmu na antibiotike. Arhiv veterinarske medicine 3 (2), 3 – 11.
45. Milenković, J.; Hrenović, J.; Stojaković, Đ.; Rajić, N. (2011): Copper removal from aqueous solution using natural zeolite and antibacterial activity of the copper - loaded zeolite. Proceedings of the 4. Slovenian - Croatian symposium on zeolites, Antonić Jelić, T. (ur.) 91, 89 – 92.
46. Perušina, M. (2010): Značenje i obrada industrijskih otpadnih voda. Završni rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
47. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda NN br.153/09
48. Rajić, N., Stojaković, D., Daneu, N., Recnik, A. (2011): The formation of oxide nanoparticles on the surface of natural clinoptilolite. Journal of Physics and Chemistry of Solids 72, 800 – 803.
49. Rajić, N., Stojaković, D., Jovanović, M., Zabukovec, N., Logar, M., Mazaj, V., Kaučić (2010): Removal of nickel (II) ions from aqueous solutions using the natural clinoptilolite and preparation of nano - NiO on the exhausted clinoptilolite. Applied Surface Science 257, 1524 – 1532.
50. Rensing, C., Grass, G. (2003): *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiology Reviews 27, 197 – 213.
51. Schröder, R., Wolf, T., Scharte, G., Joormann, D. (2001): Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Građevinar 53 (4), 211 - 232.
52. Sedimaler, S., J., Döblinger, M., Oeckler, O., Weber, J. (2011): Unprecedented zeolite –

like framework topology constructed from cages with 3 - rings in a barium oxonitridophosphate. Journal of the American Chemical Society 133, 12069 - 12078.

53. Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić - Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M, Dimitrov, N., Klapec, T., (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. HAH Osijek 58, 83- 102, 154.
54. Šperac, M., Kaluđer, J., Šreng Ž., (2013): Biljni uređaji za pročišćavanje otpadnih voda. Elektronički časopis građevinarskog fakulteta Osijek 3 (7), 76 – 86.
55. Štrkalj, A. (2014): Onečišćenje i zaštita voda. Metalurški fakultet Sisak, 40 - 59.
56. Tadić, Z., Tomičić, D, Despot, Z. (2002): Uređaj za pročišćavanje tehnoloških otpadnih voda u Osijeku. Građevinar 54 (4), 213, 212 – 218.
57. Teitzel, G., M., Parsek, M., R. (2003): Heavy metal resistance of biofilm and planctonic *P. aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 69, 2313 – 2320.
58. Tibljaš, D., Šćavnićar, S. (2007): Nalazišta zeolitnog tufa na području Krapine. U: Filipan, T., Tišma, S., Farkaš, A. (ur.) Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša. Naklada Stih, Zagreb, 13 – 23.
59. Trgo, M., Perić, J.,Vukojević-Medvidović, V., Nuić, I. (2007): Primjena zeolita u trećem stupnju obrade otpadne vode. Znanstveno – stručni skup Tehnologije obrade voda, Zadar. Akademija tehničkih znanosti Hrvatske, Zagreb.
60. Tušar, B. (2009): Pročišćavanje otpadnih voda. Kigen d.o.o., Zagreb, 51 - 69, 73 - 121.
61. Vraneš, J., Leskovar, V., (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilm u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. Medicinski glasnik 6(2), 147 - 164.
62. Vujević, D., Mikić, A., Lenček,S., Dogančić, D., Zavrtnik, S., Premur, V., Anić, Vučinić, A. (2014): Integralni pristup rješavanju problematike industrijskih otpadnih voda. Inženjerstvo okoliša 1 (1), 25.
63. Vukojević Medvidović, N., Trgo, M., Perić, J. (2007): Primjena prirodnih zeolita u postupcima smanjenja onečišćenje okoliša teškim metalima. U: Filipan, T., Tišma, S. Farkaš, A. (ur.) Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša. Naklada Stih, Zagreb, 107 – 121.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24.1.1985. godine u Livnu, Bosna i Hercegovina. Odrasla sam u Livnu sa svojom roditeljima - ocem Ivicom dipl. ekonomistom, majkom Adelom dipl. ing. kemije, bratom Markom dipl. ing. elektrotehnike i sestrom Ivom ing. medicinske radiologije. Po završetku osnovne škole „Ivan Goran Kovačić" i „Opće gimnazije" u Livnu. Godine 2003. upisala sam Prirodoslovno – matematički fakultet u Splitu, smjer prof. biologije i kemije, 2005 godine nakon zatraženog zahtjeva za prijelaz i stjecanja prava prijelaza na Prirodoslovno – matematički fakultet u Zagrebu, smjer prof. biologije i kemije nastavila sam studirati u Zagrebu.