

# FOTOKATALITIČKO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA NA POLIMERNOM NOSAČU

---

**Mežnarić, Silvestar**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:251186>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Silvestar Mežnarić

**FOTOKATALITIČKO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA  
NA POLIMERNOM NOSAČU**

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Silvestar Mežnarić

**FOTOKATALITIČKO ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE CINKOVOG OKSIDA  
NA POLIMERNOM NOSAČU**

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Ivana Gobin dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana 6.9.2019. na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof.dr.sc. Gordana Žauhar
2. Izv.prof.dr.sc. Vanja Vasiljev
3. Izv.prof.dr.sc. Ivana Gobin

Rad ima 59 stranice, 11 slika, 12 grafikona, 2 tablice, 23 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

Ovaj je diplomski rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Priprema poroznih tankoslojnih materijala za pročišćavanje vode koristeći tehniku Depozicije atomskih slojeva (ALD)“ (IP-2016-06-3568).

Od srca se zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Gobin dipl.sanit.ing. na iskazanom povjerenju te prilici da od nje učim. Sa svojim savjetima i smjernicama nesebično pomaže i olakšava, ne samo izrađivanje ovog rada, već i nošenje sa ostalim fakultetskim obavezama i na tome joj velika hvala. Također se zahvaljujem i komentorici Izv.prof.dr.sc. Gabrijeli Ambrožić na ukazanom povjerenju te cijelom timu sa Odjela za fiziku Sveučilišta u Rijeci.

## SAŽETAK

Dezinfekcija kao pojam poznata je još od starog vijeka te je ljudima služila kao prevencija i borba protiv uzročnika zaraznih bolesti. Metode oksidativnog tretiranja vode klorom i spojevima klora naišle su na prepreku zbog novih saznanja koje govore o štetnosti klora za ljude i okoliš, dok su novije metode poput korištenja ozona skupe i zahtijevaju razvoj tehnologije. Korištenje ionizirajućeg zračenja, također ostavlja negativne posljedice za okoliš. Među svim ograničenjima, potrebno je okrenuti se ka novim metodama koje zahtijevaju razvoj „zelene“ metodologije, no pokazuju svoj veliki potencijal, što u dezinfekcijskom smislu, to i u ekonomskom smislu. Jedna takva metoda je svakako korištenje ultraljubičastog zračenja, neionizirajuće zračenje koje ima antibakterijski učinak, ne ostavlja rezidue, ne šteti okolišu i ne zahtijeva veliku zaštitu radnika i skupu tehnološku prilagodbu. Takva metoda isto ima svoja ograničenja, a na trenutnoj generaciji je da prijede preko tih ograničenja kombinacijom različitih metoda te tako nastavi dobru higijensku praksu koju je čovječanstvo kroz povijest usavršavalo. U ovom radu ispitivana su antibakterijska svojstva cinkovog oksida na polimernom nosaču u kombinaciji sa UV - A zračenjem. S apsorpcijom ultraljubičastog zračenja se aktivira cinkov oksid stvarajući reaktivne oksidativne hidroksidne radikale i peroksid koji bakterijsku stanicu izlažu oksidativnom stresu i inaktiviraju je, s druge strane UV zračenje oštećuje genetski sadržaj bakterije te njene popravne mehanizme. Ispitivanje je vršeno na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci u suradnji sa Sveučilištem u Rijeci, Odjelom za fiziku u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Priprema poroznih tankoslojnih materijala za pročišćavanje vode koristeći tehniku Depozicije atomskih slojeva (ALD)“ (IP-2016-06-3568). Istraživanja su pokazala da cinkov oksid na polimernom nosaču u kombinaciji sa UV zračenjem pokazuje fotoinaktivacijska antibakterijska svojstva već nakon 15 – 30 minuta osvjetljavanja te uz daljnja istraživanja ima veliki potencijal postati učinkoviti supstrat za dezinfekciju vode.

## SUMMARY

Disinfection as a term has been known since ancient times and has served humans as a prevention and control of infectious diseases. Methods of treating water with chlorine and chlorine compounds have been hampered by new findings that talk about chlorine damage to humans and the environment, newer methods such as ozone are expensive and require technology development, the use of ionizing radiation also leaves negative environmental impacts. Due to above-mentioned limitations, it is necessary develop new „green“ methodologies having a great potential, both in disinfecting and economic terms. Such methods involve also ultraviolet irradiation, a non-ionizing radiation that has an antibacterial effect, does not leave residues, does not harm the environment and does not require great worker protection and expensive technological adaptation. Such a method shows some limitations as well, and it is up to the current generation to go beyond these constraints with new products and technologies with improved performances, thus continuing the good hygiene practices that humanity has perfected throughout history. In this thesis, the antibacterial properties of zinc oxide on a polymer support in combination with UV - A radiation were investigated. The activation of zinc oxide by photoabsorbtion of ultraviolet radiation activates zinc oxide, thus producing reactive oxidative hydroxy radicals and peroxide, which expose the bacterial cell to oxidative stress and inactivate it, while the UV radiation itself damages the genetic content of the bacterium and its repair mechanisms. The study was performed at the Faculty of Medicine, University of Rijeka in cooperation with the University of Rijeka, Department of Physics, and was financially supported by the Croatian Science Foundation under project “Preparation of Porous Thin-film Materials for Water Purification using Atomic Layer Deposition (ALD) “(IP-2016-06-3568).

Our studies showed that zinc oxide on a polymer carrier in combination with UV irradiation exhibits photoinactivation antibacterial properties after 15 - 30 minutes of illumination,

showing a great potential of this material to be used as an effective substrate in water disinfection.



## SADRŽAJ

ZAHVALA.....	III
SAŽETAK.....	IV
SUMMARY .....	V
1. UVOD .....	10
1.1 Dezinfekcija .....	10
1.1.1 Dezinfekcija vode.....	12
1.2 Ultraljubičasto zračenje.....	14
1.2.1 Izvori UV zračenja .....	16
1.2.2 Upotreba UV zračenja .....	16
1.2.3 Mehanizam djelovanja UV zračenja na organizme.....	17
1.3 UV dezinfekcija vode.....	20
1.4 Antimikrobna aktivnost cinkovog oksida .....	23
1.5 Modelni organizmi .....	24
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	24
1.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
2. CILJ RADA.....	28
3. MATERIJALI I METODE .....	29
3.1 Pribor i uređaji.....	29
3.2 Cinkov oksid na polimernom nosaču .....	29
3.3 Bakterijski sojevi.....	30
3.4 Medij i hranjiva podloga .....	30

3.4.1 Vodovodna voda iz slavine .....	30
3.4.2 Müller – Hinton hranjiva podloga .....	30
3.5 Bakterijska suspenzija .....	31
3.6 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi.....	32
3.6.1 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije .....	32
3.6.2 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije .....	34
3.6.4 Statistička obrada .....	35
3.6.4 Statistička obrada .....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1 Ispitivanje fotoinaktivacijskog učinka u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije .....	37
4.2 Ispitivanje fotoinaktivacijskog učinka u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije .....	39
4.3 Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti pomoću UV zračenja i bez UV zračenja.....	40
4.4 Broj bakterija nakon 24 h inkubacije uzoraka.....	48
5. RASPRAVA.....	51
6. ZAKLJUČCI.....	54
7. LITERATURA.....	55
8. DODACI .....	58

8.1 Tablica slika .....	58
8.2 Tablica grafikona.....	58
9. ŽIVOTOPIS .....	61

## 1. UVOD

Dezinfekcija je pojam poznat još od starog vijeka te je ljudima služila kao prevencija i borba protiv uzročnika zaraznih bolesti. Dezinfekcija vode za ljudsku upotrebu prepoznata je još kod antičkih naroda te je i dan danas pokazatelj razvoja osviještenosti, ali i tehnološkog napretka društva. Metode oksidativnog tretiranja vode klorom i spojevima klora naišle su na prepreku zbog novih saznanja koje govore o štetnosti klora za ljude i okoliš, novije metode poput korištenja ozona, skupe su i zahtijevaju razvoj tehnologije, korištenje ionizirajućeg zračenja, također ostavlja negativne posljedice za okoliš (. Među svim ograničenjima, potrebno je okrenuti se ka novim metodama koje zahtijevaju razvoj metodologije, no pokazuju svoj veliki potencijal, što u dezinfekcijskom smislu, to i u ekonomskom smislu. Jedna takva metoda je svakako korištenje ultraljubičastog zračenja, neionizirajuće zračenje koje ima antibakterijski učinak, ne ostavlja rezidue, ne šteti okolišu i ne zahtijeva veliku zaštitu radnika i skupu tehnološku prilagodbu. Takva metoda isto ima svoja ograničenja, a na trenutnoj generaciji je da prijeđe preko tih ograničenja kombinacijom različitih metoda te tako nastavi dobru higijensku praksu koju je čovječanstvo kroz povijest usavršavalo.

Cilj ovog rada je prikazati antibakterijsko djelovanje cinkovog oksida na polimernim nosačima pod utjecajem ultraljubičastog zračenja. Modelni organizmi na kojima se ispitivao antibakterijski učinak su *Escherichia coli* i *Staphiloccocus aureus*. *E. coli* indikator je fekalnog zagađenja vode dok je *S. aureus* uzročnik nozokomijalnih infekcija te alimentarnih intoksikacija

### 1.1 Dezinfekcija

Dezinfekcija je uništavanje mikroorganizama djelovanjem na njihovu građu ili metabolizam bez obzira na njihovo funkcionalno stanje radi sprječavanja njihova prijenosa,

rasta i razmnožavanja. Ovim postupkom se uništavaju, inhibiraju ili uklanjaju nepoželjni vegetativni oblici mikroorganizama, uzročnici zaraznih bolesti te ostale populacije mikroorganizama dok bakterijske spore uglavnom preživljavaju postupke dezinfekcije. Dezinfekcija se primjenjuje izvan živog organizma, u vanjskoj sredini (tlu, vodi, zraku, na predmetima opće uporabe, u zdravstvenim ustanovama, prehrambenim industrijama...). Dezinfekcija je kao dio sanitacije oduvijek operativni oblik higijene i preventivne medicine. Kroz povijest higijena se razvija zajedno s kulturnim napretkom (1). Još u starom vijeku Rimljani spoznaju važnost higijene kupanja, opskrbe vodom za piće, otpadnih vodama i skrbi o otpadu. U srednjem vijeku razina higijene naglo opada te razvoj stagnira. Epidemija kuge, kolere, boginja, malarije te širenje tuberkuloze doveli su do velikog broja žrtava. Opasnost od zaraze dovela je do potrebe izolacije oboljelih. Za širenje bolesti okrivljene su mijazme, tj. loš zrak. Zaštita od lošeg zraka uključila je nošenje kljunastih maski, paljenje vatre oko gradova te uporabu različitih mirisnih tvari. Za hrvatsku preventivnu medicinu važna je odluka Velikog vijeća Dubrovačke Republike iz 1377. o kontroliranoj izolaciji brodova kao postupku zaštite od unošenja kuge (2). Tako „Svi dolazeći moraju se izolirati kroz 40 dana“ (3). Tako je upravo Dubrovnik zaslužan za prvu karantenu u svijetu i taj pojam održao se i vrijedi i danas. Razvoj dezinfekcije povezuje se s drugom polovicom 18. stoljeća. Godine 1774. otkriva se klor koji se i dan danas koristi u poslovima dezinfekcije. Početkom 19. stoljeća, otkriva se vodikov peroksid, a kao antiseptik uvodi se hipoklorit. Voda za piće počinje se prokuhavati, jodna tinktura i klorno vapno upotrebljavaju se za dezinfekciju rana. Godine 1835. objavljen je prvi službeni dokument koncipiran kao uredba o dezinfekciji. Semmelweis (1818. – 1965.) prepoznaje važnost dezinfekcije ruku otopinom klornog vapna. Otkrivaju se kvartarne amonijeve soli i formaldehid. U stanicama za oboljele od kolere uvodi se dezinfekcija suhom toplinom. Pasteur (1822. – 1865.) spoznaje važnost autoklava, što je osnova fizikalne dezinfekcije i sterilizacije. Opisuju se bakteriostatske osobine srebra i dezinfekcijski učinak

kalijevog permanganata u vodi za ljudsku upotrebu. Godine 1872. utvrđuje se dezinfekcijski učinak etanola. Godine 1881. Gaffky, Koch i Löffler uvode uporabu strujanja vodene pare za dezinfekciju. Zatim slijedi uporaba pregrijane pare za sterilizaciju, kao i mogućnost uporabe karbolnog sapuna u dezinfekciji. Godine 1889. uveden je lizol koji pokazuje svoju važnost u dezinfekciji pri epidemiji kolere 1882. u Hamburgu. Ubrzo Traube iznosi prijedlog da se voda za ljudsku upotrebu klorira. Godine 1900. opisuje se peroctena kiselina, a 1907. kloramin. Lister (1827. – 1912.) uvodi pojam antiseptike u kiruršku praksu uz obradu kirurških rana fenolom. Flügge uvodi razliku između kirurške i higijenske dezinfekcije ruku. Godine 1916. slijedi otkrivanje baktericidnog učinka kvartarnih amonijevih soli koji Domagk 1935. uvodi kao dezinfekcijsko sredstvo. Nakon 1945. kao dezinfekcijski uvodi se peroctena kiselina, a 1963. glutaraldehid. Posljednjih godina sve je jača kritika dezinfekcijskih sredstava zbog toksikoloških i karcinogenih učinaka. To se posebno odnosi na formaldehid. Činjenicu da je znatan uspjeh protiv nozokomijalnih uzročnika infekcija (*S. aureus*, i *S. pyogenes*) postignut sulfonamidima i antibioticima zasjenio je razvoj otpornih sojeva. U upotrebu se opet vraćaju dezinfekcijska sredstva kao prvo i najvažnije sredstvo u borbi protiv uzročnika. Zato danas dezinfekcijske mjere u preventivnoj medicini imaju jednaku važnost kao i lijekovi u kurativnoj medicini (2).

### **1.1.1 Dezinfekcija vode**

Za kondicioniranje vode za ljudsku potrošnju u uređajima za pročišćavanje i dezinfekciju u posljednje je vrijeme učinjeno mnogo. Uporaba, kontrola, pročišćavanje te dezinfekcija vode iz komunalnih vodovoda namijenjena za opskrbu pučanstva svaki je dan sve teže rješivo pitanje. U Republici Hrvatskoj su uvjeti zdravstvene ispravnosti vode za javnu vodoopskrbu pučanstva propisani Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za ljudsku potrošnju (N. N. 47/08). Pravilnikom su određene vrste i opseg analiza uzoraka i frekventnost

uzimanja uzoraka za zdravstveni nadzor. Za dezinfekciju vode važni su mikrobiološka svojstva i maksimalne dopuštene koncentracije (MDK) za slobodni rezidualni klor. Priznati postupci dezinfekcije vode su tretiranje vode klorom, klornim preparatima te klorovim dioksidom, korištenje ozona, UV dezinfekcija i drugo (2). Metoda vrijedna spomena je svakako kloriranje. U toj metodi dezinfekcija vodovodne vode provodi se uvođenjem klora u vodu preko plinskog dozatora. Smjesa klora i vode uvodi se u glavni vod vodovoda u količini do  $0,5 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  vode. Za svako se izvorište odredi klorna potreba vode pokusom i ona za pitku vodu iznosi između  $0,1$  i  $0,2 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ , a nekada i više što ovisi o učestalosti padalina te utjecaju ostalih okolišnih čimbenika. Za uspješnu dezinfekciju uvjeti su da u svuda u vodovodnoj mreži sadržaj klora u suvišku bude  $0,1 \text{ mg/L}$ . Vrijeme učinka pri sadržaju klora u suvišku od  $0,1 \text{ mg/L}$  mora iznositi najmanje 30 minuta, a pri  $0,2 \text{ mg/L}$  15 do 20 minuta. Osjet mirisa i okusa na klor je niži od traženih  $0,1 \text{ mg/L}$  i iznosi oko  $0,05 \text{ mg/L}$  pa se u dezinficiranoj vodi lako osjeti. Dezinfekcijski učinak klora nastaje preko hipokloritne kiseline, što se postiže mješanjem (turbulencijom). U manjim vodovodnim sustavima kloriranje se provodi dodavanjem klornih preparata putem dozatora klornih otopina. Nakon što prođe određeno vrijeme potrebno za učinak i pošto se koncentracija klora smanji na sadržaj klora u suvišku  $0,1$  do  $0,3 \text{ mg/L}$  kao i nakon laboratorijske analize u ovlaštenom laboratoriju, dopušta se ljudska uporaba vode. Za dezinfekciju manjih količina vode za piće prikladne su trgovačke gotove tablete koje se dodaju po litri vode (2). Kao alternativa elementarnom kloru je i svakako klorov dioksid koji je toksičniji od elementarnog klora te samim time ima i veći germicidni učinak. Okus i miris klorovog dioksida slabiji su od okusa i mirisa elementarnog klora. Klorov dioksid u vodi razvija se i dozira iz 30 %-tne otopine natrijeva klorida uz dodatak klorovodične kiseline. Uspješna dezinfekcija vode postiže se u većini slučajeva s  $0,05 \text{ mg/L}$  klorovog dioksida. U novije vrijeme se sve više spominju karcinogena svojstva klornih rezidua te se aktivno traži bolja, brža i ekološki prihvatljivija metoda kao što je ozonizacija. To je s ekotoksikološkog gledišta idealan način

dezinfekcije jer ne ostavlja ostatke i razgrađuje se u kratkom vremenu u kisik. Priprema visoko koncentriranih otopina ozona uvelike je olakšala ovaj postupak dezinfekcije. Doza iznosi 0,3 – 2,0 g/m<sup>3</sup> uz vrijeme učinka oko 10 minuta (2). Ozon je vrlo jako oksidirajuće sredstvo zbog čega ima dobar germicidni učinak, nema rezidualno djelovanje i nije ekotoksičan. Ova svojstva svakako pokazuju ozon kao dobro dezinfekcijsko sredstvo, no nedostaci su nestabilnost i visoka cijena ozona. Ozon se ne može transportirati pa ga treba sintetizirati na licu mjesta u generatorima ozona što čini ovu metodu iako svojstveno vrlo dobrom, u isto vrijeme tehnološki zahtjevnom i skupom. Postoje i razni drugi postupci dezinfekcije vode kao što su primjerice katadinski postupak koji se zasniva na antibakterijskom učinku srebrnih iona, što se naziva i oligodinamičnim učinkom apsorpcije na bakterijsku ovojnicu. Poznata je ograničena uporaba srebrnih pehara. Elektrokataodinski postupak s druge strane uključuje odavanje srebra u protočnu vodu s posebnih elektroda pod naponom istosmjerne struje. Doziranje se provodi namještanjem odavanja srebra u dozi od 0,05 do 0,5 mg Ag/L. Jedna od metoda je svakako i upotreba kovina za dezinfekciju vode. Ova metoda ima prednost zbog produljenog dezinfekcijskog učinka koji sprječava i naknadne kontaminacije. Nedostatak je što se oligodinamički učinak pojavljuje tek nakon nekoliko sati pa je vodu potrebno pripremljenu držati u spremištima, te zasad u širokoj praksi nema značenja (2).

## 1.2 Ultraljubičasto zračenje

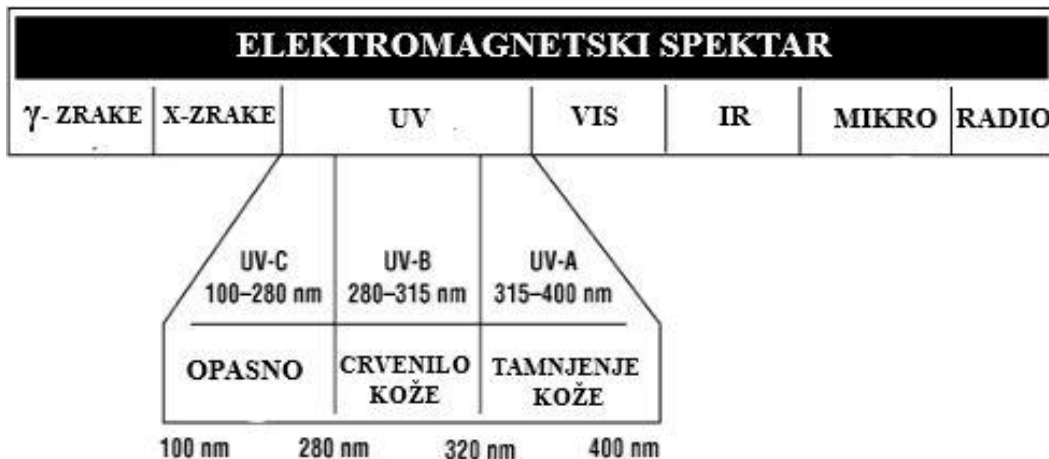
Ultraljubičasto ili UV<sup>1</sup> zračenje karakterizira elektromagnetske valove valnih duljina u rasponu od 200 nm do 380 nm te se energetski na spektru elektromagnetskog zračenja smješta između vidljive svjetlosti i x – zraka. Prirodni izvor ovog zračenja je sunce. Ultraljubičasto zračenje dijeli se s obzirom na valnu duljinu: UV – C koje sadrži valne duljine od 200 nm do

---

<sup>1</sup> engl. Ultraviolet



280 nm, UV – B u koje ulaze valne duljine od 280 nm do 315 nm te UV – A zračenje koje obuhvaća raspon valnih duljina od 315 nm do 400 nm. Ta podjela ne govori samo o valnim duljinama zračenja već i o utjecaju na organizam te prirodi zračenja, tako je UV – A dio UV zračenja koje u najvećem djelu dopire do zemljine površine od sunca jer ga ozonski omotač ne apsorbira te je zaslužno za tamnjenje kože, UV – B primjerice dolazi od sunca uz UV – A zračenje no znatno je štetnije, izaziva crvenilo kože te je prilikom dugog izlaganja odgovorno za razvijanje karcinoma kože. Treći dio ovog spektra je UV – C zračenje koje ima dokazani germicidni učinak te se koristi u dezinfekcijskim sustavima, vrlo mali postotak prolazi kroz ozonski omotač te ovo zračenje ne predstavlja opasnost iz prirodnog izvora (sunce) no budući da je upotreba sve učestalija potrebno je zaštititi oči prilikom upotrebe zbog povezanosti UV – C zračenja sa upalom bjeloočnice. Širi spektar UV zračenja dijeli se na bliski, srednji, daleki, vodik Lyman  $\alpha$ , vakuum te ekstremni UV (4). To su zapravo dijelovi spomenutih raspona valnih duljina no dobiveni iz umjetnih izvora u kontroliranim uvjetima.



Slika 1. Spektar elektromagnetskog zračenja. (izvor: <https://www.ccohs.ca>)

### 1.2.1 Izvori UV zračenja

Najveći prirodni izvor UV zračenja je svakako sunce, no budući da je UV sve više u upotrebi potrebno je bilo stvoriti umjetne izvore ultraljubičastog svjetla. Neki od umjetnih izvora su UV kvarcne lampe, elektrolučno zavarivanje, lampe sa različitim plinovima i metalnim parama te UV LED lampe.

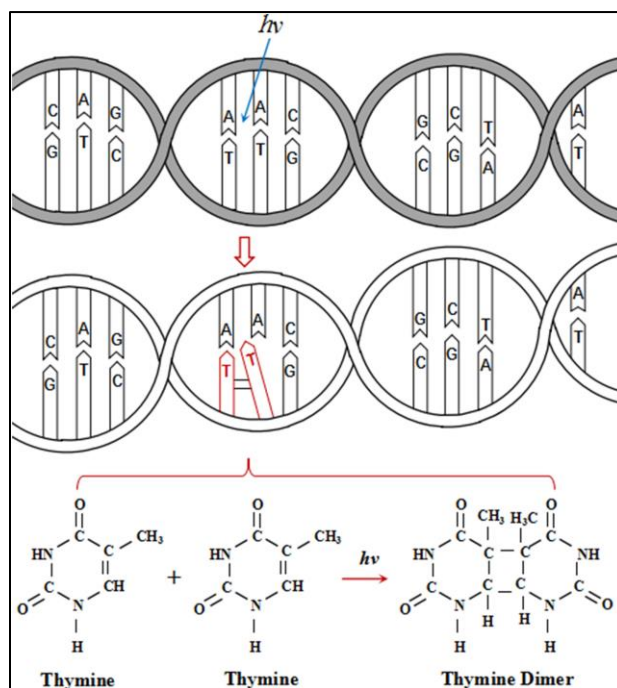
### 1.2.2 Upotreba UV zračenja

Danas je upotreba UV značajna. U prehrambenoj industriji koristi se za konzerviranje hrane te sterilizaciju ambalaže. Za određivanje koncentracija UV apsorbera u otopini se koristi UV/VIS spektroskopija koja se primjenjuje u prehrambenoj industriji, biološkoj i kemijskoj industriji te naftnoj industriji, često se koristi i za određivanje čistoće vode. Ultraljubičasto zračenje ima svoju korist i u liječenju karcinoma. Pacijenti prime lijek pod nazivom i *Psoralens* koji reagira sa terapijskim UV - A zračenjem te tako usporava rast stanica limfoma kože, pomaže kod ekcema, psorijaze i vitiliga. Ukoliko pacijent ima tanku kožu može se koristiti i UV - B zračenje bez dodatka lijeka kao alternativa (5). Vrlo često se UV zračenja koristi u estetske svrhe. Točnije UV - B svjetlost koju emitiraju lampe u kojima se prolazom struje ionizira plin ili metalne pare (najčešće živine pare) te prijelazom elektrona iz atomske strukture oslobađa foton UV - B valnih duljina. Ove su komore poznate pod nazivom solarij. Budući da je UV - B zračenje povezano sa razvojem raka kože bitno je da izlaganje toj vrsti zračenja bude u kontroliranim uvjetima i pod isto tako kontroliranim izvorom. U upotrebi su i UV kamere koje u visokoj rezoluciji snimaju predmete koji emitiraju tu vrstu zračenja. Takve kamere primjerice koristi NASA u istraživanju svemira.. Ultraljubičaste svjetiljke koriste se za otkrivanje taloga gdje higijena nije dobro obavljena, minerali, ugljikovodici, urin, fosfati, fiziološke izlučevine i ostali kemijski agensi često drukčije svjetle pod UV svjetlom te se na

taj način vrlo lako mogu otkriti. Ultraljubičasto zračenje ima i veliku dezinfekcijsku i sterilizacijsku ulogu. Kako je dokazano da UV - C ima germicidni učinak, vrlo često se koristi u sterilizaciji medicinskog pribora, kirurškog instrumentarija te ostalih predmeta opće upotrebe koji se koriste u javnim razmjerima. Komore sa UV lampama počele su se koristiti u 20. stoljeću i još su i danas u upotrebi. Inhibiranje bakterija uzrokuje UV - B zračenje također te se zbog toga preporuča odjeću sušiti na Suncu kako bi se inhibirale patogene bakterije. UV zračenje ima ulogu i u dezinfekciji vode za ljudsku upotrebu.

### **1.2.3 Mehanizam djelovanja UV zračenja na organizme**

Ljudi su u povijesti otkrili da je DNK ili RNK ključna meta u borbi protiv različitih organizama; UV dezinfekcija uzrokuje smrt organizama kada njihova DNK ili RNK apsorbira UV svjetlost (6). Brojne studije pozabavile su se mutagenim utjecajem UV zračenja na DNK lezije. Prema mikrobiološkim ispitivanjima djelovanje UV zračenja na DNK može se podijeliti na dvije glavne značajke. Prva značajka je stvaranje dimera ciklobutan timin pirimidina i 6 – 4 fotoproducta. Budući da je manji udio 6 – 4 fotoproduct izomera, glavni mehanizam djelovanja (čak 75 %) spada na stvaranje dimera ciklobutan timin pirimidina (7). Maksimum apsorpcije UV svjetlosti za DNK je postignuta na valnim duljinama od oko 260 nm, no u većini slučajeva apsorpcijski pik u spektru valnih duljina varira s obzirom na ciljani organizam (7). Različiti ciljani organizmi pokazuju različitu osjetljivost na UV zračenje (8).



Slika 2. Prikaz narušavanja DNK lanca stvaranjem dimera ciklobutan timin pirimidina. Izvor: X. Li et al./Science of the total Environment 659 (2019)

Iako je genetski materijal patogena DNK ili RNK postoje i druge komponente kao što su proteini i stanična membrana, zbog toga je potrebno vršiti različita ispitivanja za kompleksnije organizme (9). Akcijski spektar primarno dolazi od fotona kojeg apsorbira DNK i poklapa se sa relativnom apsorbancijom DNK koji je izoliran iz organizma. Na primjer, akcijski spektar *S. typhimurium* odgovara relativnoj apsorbanciji molekule DNK koja je izolirana iz organizma. Međutim, fotoni koje apsorbiraju druge stanične tvorbe nisu zanemarivi i oni možda imaju ulogu u germicidnom učinku UV svijetla (10). Hijenen i suradnici su u svome radu germicidni učinak matematički opisali Crick – Watson modelom jednadžbom prvog reda:  $\log(N_0/N)=K \times \text{UV doza}^2$  (6). Konstanta inaktivacije može se promatrati kroz dvije varijable, ona može ovisiti o vremenu i o dozi, Oguma i suradnici u svojem članku navode kako su i vremenska i dozimetrijska konstanta UV – LED zračenja za *E. coli* značajno više od onih koje su izračunate

<sup>2</sup>  $N_0$  označava početni broj kolonija (CFU/mL),  $N$  označava broj nakon ozračivanja (CFU/mL), UV doza ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) i  $K$  ( $\text{cm}^2/\text{mJ}$ ) je proporcionalni koeficijens koji opisuje konstantu inaktivacije.

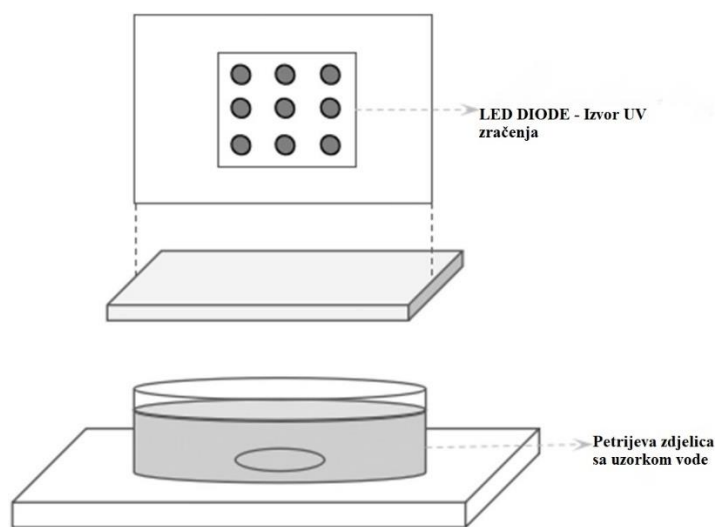
za druge vrste bakterija i različite viruse. Ova činjenica govori kako je *E. coli* najosjetljivija na UV – LED zračenje dok su Humani adenovirusi najrezistentniji (6). Ipak, osjetljivost ovisi o genetskom materijalu koji može biti jednolančana DNK (ss DNK) ili dvolančana DNK i jednolančana RNK i dvolančana RNK. Te razlike se najviše očituju kad su modelni organizmi virusi (9). Bez obzira na različitost među vrstama organizama u smislu protu – UV sposobnosti, doza UV zračenja koje mikroorganizam mora apsorbirati za inaktivaciju, odnosno kapacitet biološke inaktivacije, mora se usporediti. Istraživanje maksimuma apsorpcije za svaki organizam rezultirati će poznavanjem valne duljine zračenja za inaktivaciju organizma. UV – LED emitiraju UV - A, UV - B i UV - C zračenje dok tradicionalne lampe sa živinim parama emitiraju određenu valnu duljinu u ovim područjima. Mehanizam inaktivacije UV - C zračenja temelji se na apsorpciji UV fotona i stvaranju dimera ciklobutan pirimidin timina unutar DNK molekule čime se postiže inhibicija transkripcije i replikacije gena unutar stanice (11). Većina popravkih mehanizama koje uključuju fotoreaktivaciju i popravak u tami događaju se pod niskom dozom UV zračenja. U mehanizmu fotoreaktivacije, vrlo bitnom popravnom mehanizmu, fotoenzimi ciljano pronadu i zamjene dimere Ciklobutan pirimidin timina apsorpiranjem energije svjetlosti valnih duljina između 310 i 480 nm (UV - A i dio vidljive svjetlosti). Dok je u procesu fotoreaktivacije potrebna svjetlost, u mehanizmu popravka u tami nije potrebna svjetlost i enzimi pronadu oštećene nukleotide i zamjene ih neoštećenima te time smanje efekte zračenja na minimum (7). Iako UV - A zapravo potiče fotoreaktivaciju, novija istraživanja kazuju kako UV - A u kombinaciji sa UV - C zračenjem uzrokuje inaktivaciju mikroorganizama (12). Baktericidni efekti kombinacije UV - B i UV - C zračenja možda slično djeluju na oštećivanje genetskog materijala, no ta šteta je popravljiva. Kombinacija s UV - A inaktivira mikroorganizme uzrokujući nepopravljivu štetu u stanici (13). UV - A zračenje može uništiti staničnu membranu stvaranjem hidroksilnih i kisikovih radikala koji oštećuju proteine (12). Oštećenja da DNK molekuli mogu se popraviti popravnim mehanizmima, no nema dokaza

da se popravljaju oštećenja na staničnoj membrani uzrokovana UV - A zračenjem. Kombinacija UV - A i UV - C zračenja temelji se na germicidnom učinku UV - C i mogućnosti daljeg probijanja UV - A zračenja, štete na DNK molekuli i staničnoj membrani popravni enzimi jednostavno više ne mogu popraviti te kao rezultat dolazi do uništavanja stanice (12). Ove kombinacije moguće je postići sofisticiranijim UV LED lampama u kontroliranom okolišu, no može li se isti efekt postići i tradicionalnim lampama sa živinim parama te što bi trebalo kombinirati sa UV zračenjem? Učinak UV - C zračenja dobro je poznat i kada se postignu potrebne doze dostiže se zadovoljavajući germicidni učinak, no UV - C zračenje ima isto tako negativne posljedice na okoliš, odnosno personal koji radi na poslovima dezinfekcije te je zbog toga potrebno razviti novu metodu koja kombinira zračenje s manjim ekotoksičnim posljedicama, primjerice UV - A sa različitim kemijskim dezinfekcijskim agensima.

### **1.3 UV dezinfekcija vode**

Ultraljubičasto zračenje smatra se dezinfekcijom, a ne sterilizacijom zbog ograničena prodora kroz vodu i zrak. Antibakterijski učinak najizraženiji je u UV - C i UV - B području s valnom duljinom između 220 i 315 nm. Ultraljubičaste zrake imaju jednake refrakcijske i refleksijske osobine kao i vidljiva svjetlost, ne prodiru kroz krutine, nego samo kroz tekućine i plinove. UV dezinfekcija vode je ranije otkrivena metoda čije je korištenje u dezinfekciji vode i hrane danas široko rasprostranjeno. Novija metoda koja koristi UV-LED lampe uživa veliku pozornosti istraživanja. UV-LED pokazuje mnoge koristi s obzirom na tradicionalne UV lampe sa živinim parama i očekuje se da će u skoroj budućnosti u potpunosti zamijeniti korištenje tradicionalnih lampi (9). Postupak UV dezinfekcije, isto kao i ozonizacija, nema rezidualni učinak. Nedostatak je ograničena dubinska prodornost germicidnih UV zraka u vodi (2). Ova metoda ima visok stupanj učinkovitosti i trajnog uništavanja mikroorganizama. Sustavi se lako postavljaju i primjenjuju u bilo kojem jednostavnijem i manjem vodnom sustavu, a jednom

postavljene lampe za dezinfekciju jednostavno se zamjenjuju. Osim toga, neki sustavi imaju detektor koji signalizira smanjenu učinkovitost pročišćavanja, odnosno potrebu za izmjenom lampi. Sustavi za UV dezinfekciju vode za ljudsku upotrebu su komercionalno vrlo dostupni te se široko primjenjuju u dezinfekciji bazenske vode. Trgovci kao prednost naglašavaju nepromjenjivost okusa, boje, mirisa te pH vode. Neki sustavi su samodostatni pa nema potrebe za kemijskim agensima dok manji sustavi služe kao potpora klorinaciji, odnosno osiguranje od kasnijeg razvoja mikroorganizama. Sustavi ili reaktori za ozračivanje vode dolaze u dvije forme: statički i protočni. Različiti dizajni sustava variraju u efikasnosti mikrobne inaktivacije (13). Općenito, statički reaktori opisani u literaturi uključuju duboku ili plitku petrijevu zdjelicu, također je potrebna miješalica koja se postavlja na dno reaktora. Miješalica omogućava izvoru UV zračenja da jednoliko i u potpunosti dezinficira uzorak vode. Statički reaktor je uspješan u inaktivaciji mikroorganizama upravo zbog malih vibracija vode te je pogodno rješenje za mikroorganizme sa višom rezistencijom na UV zračenje. U ovom sustavu izvori UV zračenja, odnosno diode postavljene su na pokrov reaktora i povećanje njihovog broja izravno povećava inaktivacijsku moć reaktora. U UV-LED reaktorima koriste se 9 ili više dioda kao izvor svjetlosti (9).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz dizajna statičkog eaktora. Izvor: Oguma et al., 2016 (13)

S druge su strane protočni reaktori kompleksniji i uključuju različite izvedbe s obzirom na mjesto tretiranja vode. Würtele i suradnici su u svome istraživanju dizajnirali sustav kroz koji protječe voda iz napojnog spremnika u slivni spremnik, drugi istraživači su dizajnirali šuplje komore kroz koje voda može protjecati slobodnije te su u te komore postavili diode i pumpe koje su ubrzavale protočnost vode (8). Ovakva izvedba reaktora nailazi na mnoge probleme: nemogućnost kontroliranja tlaka i temperature te nedostatnost prodora UV zraka kad protječe više vode. Ovaj sustav je trebalo poboljšati pa je drugi tim istraživača dizajnirao sustav sa dvije povezane kvarcne cijevi u jednoj većoj kvadratnoj cijevi u kojoj su postavljene po tri diode kako bi njihove zrake tvorile trostranu prizmu (13). Ovako vezani sustav pokazao se kao bolje rješenje u dezinfekciji vode od šupljih komora. Predstavljen je i dizajn u kojem su diode postavljen uz kvarcne cijevi te sadrži i ultrazvučni modul kako bi se kombinirala UV i ultrazvučna inaktivacija, odnosno ultrazvuk bi služio da nataloži mikroorganizme na cijev, a UV bi zatim te mikroorganizme inaktivirao. Neki znanstvenici smatraju kako bi se ovaj sustav mogao koristiti u domaćinstvima (14). Ovaj sustav omogućuje postavljanje dioda uzduž cijevi i na taj način zadovoljavajuću količinu primljene energije UV zračenja.

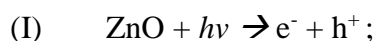
Oba sustava pokazuju veliki potencijal UV dezinfekcije, no zahtijevaju standardizaciju metode i poboljšanje samog dizajna sustava. Statički i protočni reaktori imaju još prostora za napredak te se znanstvenici koji se intenzivno bave ovim pitanjima nadaju da će se u skoroj budućnosti dovoljno usavršiti ova metoda kako bi se smanjila upotreba različitih kemijskih sredstava za dezinfekciju (9).



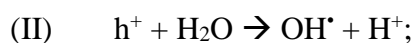
#### 1.4 Antimikrobna aktivnost cinkovog oksida

Antimikrobna aktivnost označava inhibiciju rasta mikroorganizama ili potpuno uništavanje mikroorganizama. Smatra se da je cinkov oksid potentniji antimikrobni agens među različitim metalnim oksidima. Razlog njegovog korištenja kao fotokatalizatora je velika reaktivnost aktivirana s apsorpcijom UV svjetlosti, kemijski je inertan, netoksičan je za okoliš te se jednostavno sintetizira. Germicidno svojstvo cinkovog oksida temelji se na više mehanizama. Jedan od mehanizama je stvaranje reaktivnih hidroksi radikala koji uzrokuju fatalna oštećenja na stanici mikroba. Hidroksi radikali i vodikov peroksid uzrokuju oksidativni stres koji oštećuje DNK, staničnu membranu i stanične proteine. Rupturu staničnog zida uzrokuje površinska aktivnost ZnO što izaziva curenje staničnog sadržaja te rezultira staničnom smrću (15). Cinkov oksid se u ovom slučaju ponaša kao poluvodič te su taj mehanizam predstavili Padmavathy i Vijayaraghavan (nedostaje referencija):

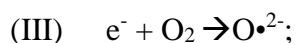
S apsorpcijom UV svjetlosti se ZnO aktivira stvarajući parove elektron – šupljina<sup>3</sup> (I):



Hidroksi radikali nastaju direktno preko reakcija šupljina valentne vrpce s vodom (II)

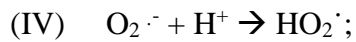


Vodikov peroksid nastaje u višestupanjskom mehanizmu s inicijalnom stvaranjem superoksidnog iona s redukcijom kisika elektronima vodljive vrpce ZnO (III), stvaranjem perhidroksi radikala s protonacijom  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (IV) koji se u slijedećem koraku protonira i veže elektron vodljive vrpce stvarajući vodikov peroksid (V).



---

<sup>3</sup> Navodi se i pojam je eksciton koji opisuje elektron i šupljinu kao zajedno vezane u kvazičesticu



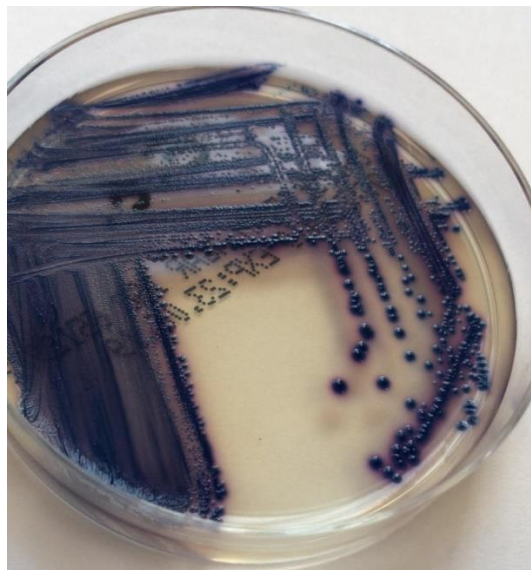
Vodikov peroksid zatim penetrira staničnu membranu i ubija bakteriju (16). Ovo je bio prikaz jednog mehanizma, drugi dio antimikrobnog učinka bazira se na otpuštanju  $\text{Zn}^+$  iona iz amfoternog ZnO u kiselom ili bazičnom mediju. Ideja je da cinkov ion ima sličan učinak kao i vodikov peroksid, odnosno da prolazi kroz staničnu membranu u unutarstanični prostor te ubija bakteriju (15).

## 1.5 Modelni organizmi

### 1.5.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pripada porodici crijevnih bakterija ili *Enterobacteriaceae*. Raširena je u prirodi, zemlji, u vodi, u probavnom sustavu ljudi i životinja, odakle u vanjsku sredinu dolazi preko fekalija. U crijevima ima značajnu ulogu u metabolizmu vršeći razlaganje ugljikohidrata i proteina. Proizvodi neke vitamine iz B skupine (B12) i K vitamin i spojeve koje antagonistički djeluju na druge bakterije (17). *E. coli* ima vrlo složenu antigensku građu, posjeduje O, H i K antigene. Na osnovu antigenske građe identificirano je preko 700 serotipova (18). Prisutstvo *E. coli* u namirnicama ili vodi za ljudsku potrošnju znak je loših higijenskih uvjeta u proizvodnji i ukazuje na mogućnost fekalnog zagađenja. *E. coli* je Gram negativan, kratak štapić koji se može pojaviti pojedinačno, u parovima ili nepravilnim grupama. Posjeduje flagele pritrhijalno raspoređene što joj omogućuje kretanje. Pojedini sojevi posjeduju kapsulu. Ne formira spore. Razmnožava se dobro na mnogim hranjivim podlogama. Izrasle kolonije na les – endo agaru posjeduju karakterističan metalni sjaj. Dobro raste i na MacConkey agaru,

krvnom agaru, na temperaturi od 20 do 40 °C. *E. coli* je fakultativno anaerobna bakterija koja proizvodi brojne enzime. Pomoću enzima intenzivno razlaže ugljikohidrate, škrob i proteine. Sposobnost ove bakterije da razlaže šećer laktozu iskorištena je u rutinskoj dijagnostici kako *E. coli*, tako i drugih enterobakterija. Ove bakterije su vrlo otporne i mogu mjesecima preživjeti u vodi, zemljištu i na površini mnogih predmeta opće uporabe. Dugo se mogu zadržati u raznim vrstama namirnica gdje se mogu razmnožavati. Povišena temperatura ih brzo uništava. Osjetljive su prema nekim bojama i kemijskim spojevima te UV zračenju. Uvjetno je patogena bakterija. Korisna je za domaćina jer djeluje antagonistički na razne patogene i proteolitičke bakterije. Ako dospije u druge organske sustave ili ako putem kontaminirane hrane i vode (fekalno – oralni put prijenosa) dospije u organizam može uzrokovati različite infekcije: sepsa, dojenački meningitis, infekcije urinarnog trakta i dr. zbog proizvodnje više vrsta toksina (19).



Slika 4. *E. coli* na kromogenoj podlozi za identifikaciju koliforma

### 1.5.2 *Staphylococcus aureus*

U rodu *Staphylococcus aureus* identificirane su 23 vrste, a samo *S. aureus* posjeduje enzim koagulazu i zbog toga se naziva koagulaza pozitivan stafilokok, dok se svi ostali

grupiraju kao koagulaza negativni stafilokok i označavaju se kao KNS (18). *S. aureus* je vrlo raširena bakterija u prirodi i može se pronaći u vodi, zraku, prašini, predmetima opće uporabe te živežnim namirnicama. Formira karakteristične kolonije na površini selektivne podloge oblika koka u grozdovima. *S. aureus* je gram pozitivna bakterija, nepokretna, asporogena te ponekad proizvodi kapsulu. Ova je bakterija fakultativni anaerob koji bolje raste u uvjetima povećanog parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> (5 – 10 %). Optimalna temperatura rasta je 35 °C, no može se inkubirati i na sobnoj temperaturi, optimalni pH rasta iznosi 7,4. Raste dobro na jednostavnim hranjivim podlogama koje sadrže 7 – 10 % NaCl (slani bujon). Ova karakteristika se koristi u diferencijaciji i izolaciji stafilokoka iz materijala koji sadrži više vrsta bakterija. Kolonije su obično neprozirne, okrugle, glatke i uzdignute. Mogu biti pigmentirane, tako da se razlikuju zlatno – žute, svijetlo – žute i bijele. Na krvnom agaru se oko kolonije može uočiti uža ili šira zona β – hemolize. Samo mali udio sojeva je nehemolitičan (18). Na slijedeće probe reagiraju pozitivno: katalaza, koagulaza, zakiseljuju manitol u aerobnim i anaerobnim uvjetima te produciraju acetoin. Može izdržati visoke temperature (60 °C/1 sat). Otporna je na sušenje i visoke koncentracije NaCl i šećera. Ukoliko je prisutna u nekoj prehrambenoj namirnici moguće je da potječe sa kože, iz usta ili nazofaringealne šupljine osobe koja je radila s hranom. Njeno prisutstvo ili prisutstvo njenih termostabilnih toksina u prehrambenoj namirnici je znak nezadovoljavajuće higijenske prakse. Neke izolirane vrste su enterotoksične i samim tim predstavljaju veliki rizik za zdravlje (19). Upravo toksin kojeg u hrani luči *S. aureus* jedan je od glavnih uzročnika alimentarnih intoksikacija.



Slika 5. *Staphylococcus aureus* na Müller - Hinton agaru

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje fotokatalitičkog antibakterijskog djelovanja cinkovog oksida na polimernim nosačima pod djelovanje UV - A zračenja na valnoj duljini 366 nm. Antibakterijsko djelovanje ispitano je na ATCC sojevima *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Promatrano je vrijeme potrebno da bi polimerni nosači s cinkovim oksidom pod djelovanjem UV - A zračenja uništili sve bakterije u laboratorijski pripremljenoj bakterijskoj suspenziji. Ispitivanje je napravljeno kako bi se dobila saznanja o potencijalu cinkovog oksida i UV zračenja u dezinfekciji vode.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Pribor i uređaji

- Plastične mikrobiološke ušice („eze“)
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Mikrotitarske pločice (96 well i 24 well, ROLL Piove di Sacco, Italija)
- Autoklavirana voda iz slavine
- Staklene epruvete (15mL) s čepom
- Spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- Inkubator (Termo-medicinski aparati, Bodalec & Havoić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska)
- UV kvarcna lampa sa živinim parama 366nm i 254 nm (CAMAG, Muttenez, Švicarska)
- Plastične kivete za spektrofotometriju
- Aluminijska folija (Alluminio Brian Roll, Italija)
- Müeller – Hinton agar
- Multkanalna pipeta 0,5 – 300  $\mu$ L (Transferpette S-8, Njemačka)
- Automatske mikropipete 2 – 20  $\mu$ L ; 200 – 1000  $\mu$ L (Gilson, SAD)
- Nastavci za pipete (Gilson, SAD)

#### 3.2 Cinkov oksid na polimernom nosaču

sSupstrati se sastoje od mikroporoznog polimera na kojem su deponirani tanki nanometarski slojevi aluminijevog oksida i cinkovog oksida koristeći tehniku Depozicije atomskih slojeva (ALD), dostupnoj u laboratoriju Centra za mikro- i nanoznanosti i tehnologije i Odjela za fiziku Sveučilišta u Rijeci . Nakon ALD depozicije diskovi su autoklavirani te

skladišteni u staklenim posudama prekriveni aluminijskom folijom kako ne bi došlo do doticaja sa svjetlosti.

### **3.3 Bakterijski sojevi**

Ispitivanje je vršeno na bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Oba bakterijska soja su nasađena na Müeller Hinton agar te se skladište u tami i na temperaturi od 4 °C. Kako bi se bakterije koristile u ispitivanju potrebno ih je pomoću plastične mikrobiološke ušice pokupiti sa hranjive podloge te prenijeti u medij kako bi se napravila bakterijska suspenzija.

### **3.4 Medij i hranjiva podloga**

#### **3.4.1 Vodovodna voda iz slavine**

Fotokatalitička antibakterijska aktivnost cinkovog oksida na polimernim nosačima ispitana je u vodovodnoj vodi u kojoj se korištene bakterije mogu pronaći kao indikatori fekalnog zagađenja. Korištena voda autoklavirana je pri 1,2 atm, 121 °C kroz 15 min kako bi se uklonili prisutni mikroorganizmi iz vode i istovremeno inaktivirao rezidualni klor.

#### **3.4.2 Müeller – Hinton hranjiva podloga**

Ova hranjiva podloga pogodna je za određivanje osjetljivosti bakterija te se koristi u brojnim mikrobiološkim ispitivanjima zbog dobre reproduktivnosti podloge, jednostavnosti formule te velike količine eksperimentalnih podataka koji su prikupljeni korištenjem ove podloge. Također se koristi za izolaciju i čUV - Anje bakterija iz roda *Neisseria* i *Moraxella*. Müeller – Hinton agar sadrži: 2 g goveđeg ekstrakta, 17,5 g kiselog hidrolizat kazeina, 1,5 g



škroba te 17 g agara<sup>4</sup>, pH je neutralan pri 25 °C. Pripremljena podloga izlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice na debljinu oko 4 mm te pohranjena u hladnjaku na 4 °C.



Slika 6. Porast kolonija *Staphylococcus aureus* na Müller - Hinton agaru

### 3.5 Bakterijska suspenzija

Broj bakterija određivan je spektroskopskom metodom pomoću spektrofotometra koji očitava apsorbanciju na 600 nm. U epruvetu od 15 mL sa plutenim čepom dodano je oko 5 mL sterilne vode iz slavine te su u nju dodane kolonije koje su prikupljene plastičnom mikrobiološkom ušicom. U plastičnu kivetu za spektrofotometriju dodano je 500  $\mu$ L sterilne vode te je ta kiveta očitana kao slijepa proba. Nakon toga u drugu plastičnu kivetu za spektrofotometriju dodano je 500  $\mu$ L pripremljene bakterijske suspenzije kako bi se izmjerila apsorbancija, odnosno optička gustoća. Optička gustoća razrjeđivanjem je namještena na OD1 (*eng.* Optica Density) što odgovara aporbanciji  $A=1,00$ , taj broj govori kako se u bakterijskoj suspenziji nalazi  $10^9$  CFU/mL (*eng.* Colony-forming unit). Serijom deseterostrukih razrjeđenja

---

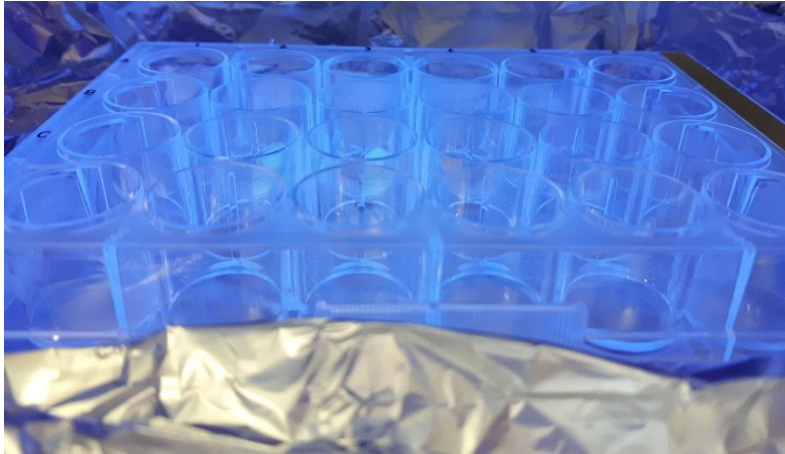
<sup>4</sup> Rastopljeno u 1 L destilirane vode

priređena je bakterijska suspenzija koncentracije  $10^6$  CFU/mL koja se nadalje koristila u ispitivanju.

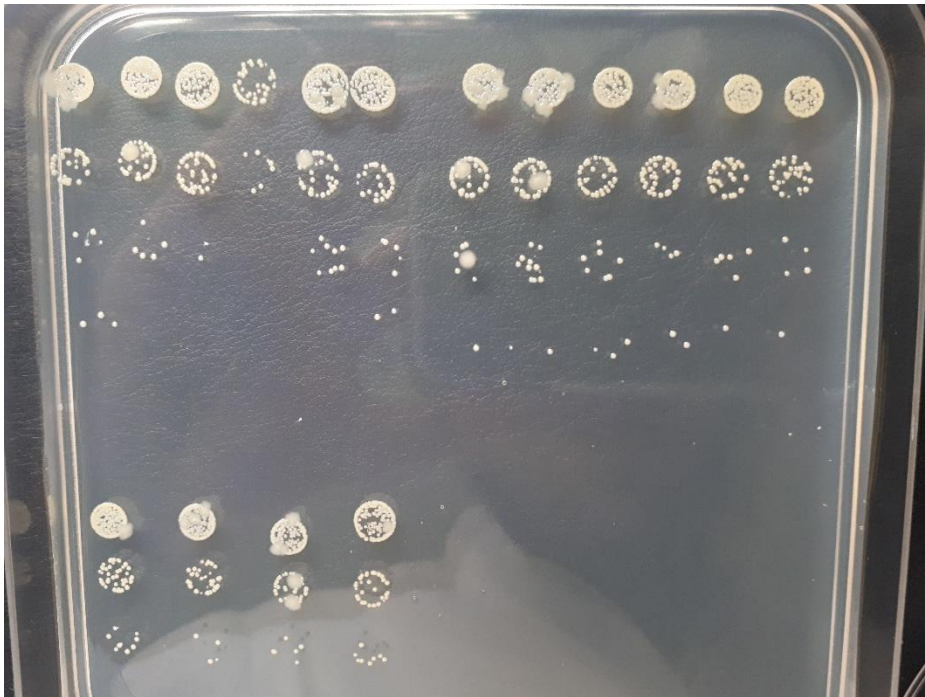
### **3.6 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi**

#### **3.6.1 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi u 500 $\mu$ L bakterijske suspenzije**

U mikrotitarsku pločicu, u tri jažice, nanoseno je 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije koncentracije  $1 \times 10^6$  CFU/mL, prva jažica je sadržavala čistu bakterijsku suspenziju te je ona u rezultatima služila kao kontrola, u drugu jažicu stavljen je uzorak neobloženog polimernog diska (oznaka **P**) i u treću jažicu stavljen je uzorak polimernog diska koji je prethodno obložen aluminijevim te cinkovim oksidom (oznaka **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO**). Mikrotitarska pločica je nadalje stavljena pod UV lampu na osvjetljivanje na valnu duljinu  $\lambda = 366$  nm te je u određenim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 30, 45 i 60 min) iz svake jažice automatskom pipetom preneseno 20  $\mu$ L bakterijske suspenzije od koje je kasnije napravljeno 4 serija deseterostrukog razrjeđenja. Nakon osvjetljavanja i razrjeđenja po 10  $\mu$ L iz svakog razrjeđenja nakapano je na Müller – Hinton agar te je hranjiva podloga stavljena na 24 – satnu inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C. Ostatak bakterijske suspenzije sa uzorcima diskova također je ostavljeno na inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C kroz 24 sata te je nakon inkubacije napravljena serija razrjeđenja. Iz svakog razrjeđenja opet je kap od 10  $\mu$ L nakapana na agar koji je zatim išao na inkubaciju. Na taj način napravljena je krivulja trenutne i odgođene fotoinaktivacije uz polimerne nosače cinkova oksida. Istovremeno je rađeno ispitivanje antimikrobnog učinka **P** te **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO** bez UV osvjetljavanja.



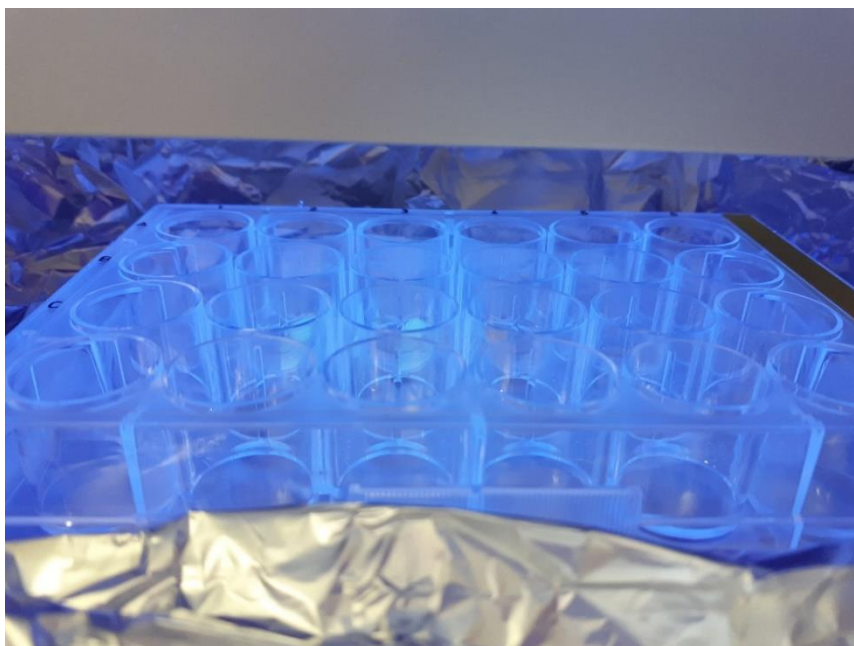
Slika 7. Osvjetljavanje 500 µl bakterijske suspenzije sa uzorcima celuloznih diskova



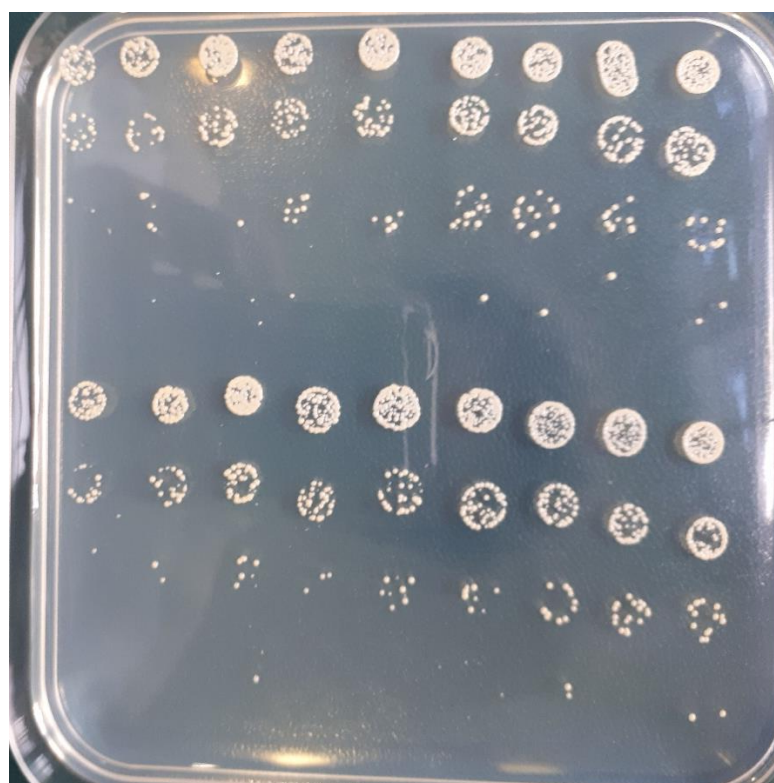
Slika 8. Hranjiva podloga nakon inkubacije na  $35 \pm 2$  °C kroz 24 h

### 3.6.2 Ispitivanje antimikrobnog učinka u vodovodnoj vodi u 1000 $\mu\text{L}$ bakterijske suspenzije

U mikrotitarsku pločicu, u tri jažice, naneseo je 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije koncentracije  $1 \times 10^6$  CFU/mL, prva jažica je sadržavala čistu bakterijsku suspenziju te je ona u rezultatima služila kao kontrola, u drugu jažicu stavljen je uzorak **P** i u treću jažicu stavljen je uzorak (**P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO**). Mikrotitarska pločica je nadalje stavljena pod UV lampu na osvjetljavanje na valnu duljinu  $\lambda = 366$  nm te je u određenim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 30, 45 i 60 min) iz svake jažice automatskom pipetom preneseno 20  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije od koje je kasnije napravljeno 4 serije deseterostrukog razrjeđenja. Nakon osvjetljavanja i razrjeđenja po 10  $\mu\text{L}$  iz svakog razrjeđenja nakapano je na Müller – Hinton agar te je hranjiva podloga stavljena na 24 – satnu inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C. Ostatak bakterijske suspenzije sa uzorcima diskova također je ostavljeno na inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C kroz 24 sata te je nakon inkubacije napravljena serija razrjeđenja. Iz svakog razrjeđenja opet je kap od 10  $\mu\text{L}$  nakapana na agar koji je zatim išao na inkubaciju. Na taj način napravljena je krivulja trenutne i odgođene fotoinaktivacije uz **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO**. Istovremeno je rađeno ispitivanje antimikrobnog učinka diskova bez osvjetljavanja te????????????(nedostaje li tu tekst?)



Slika 9. Osvjetljavanje 1000 µl bakterijske suspenzije sa uzorcima polimernih diskova (P)



Slika 10. Hranjiva podloga nakon inkubacije na  $35 \pm 2$  °C kroz 24 h

### **3.6.4 Statistička obrada**

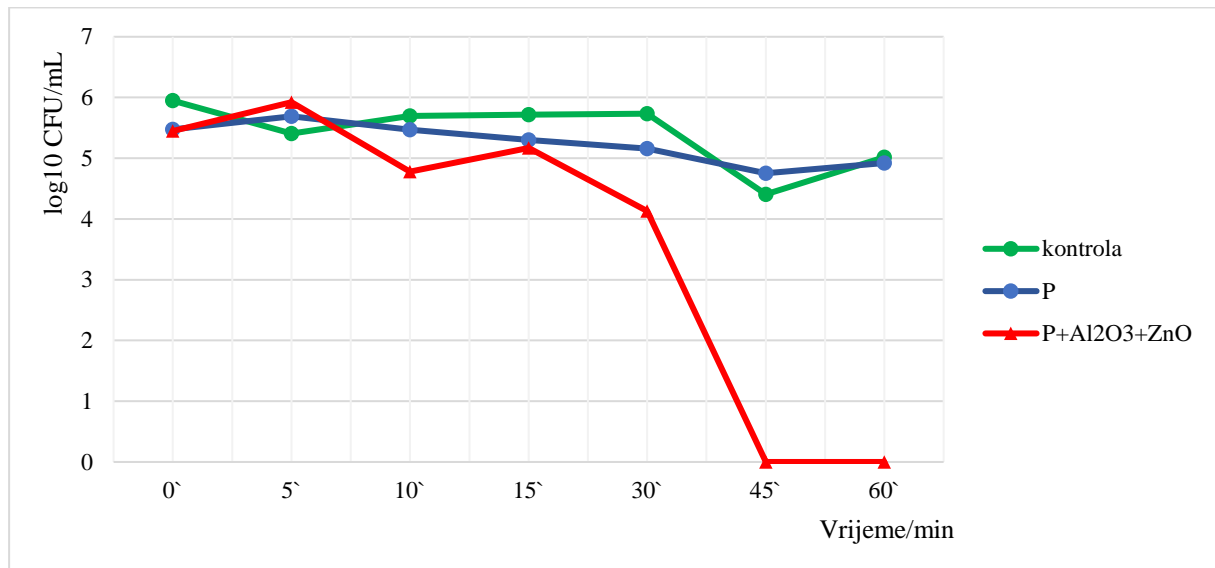
Eksperimentalno dobiveni rezultati statistički su obrađeni pomoću programske podrške *Excel* (Microsoft Office 365) kako bi se prikazali grafički. Za izradu grafičkih prikaza korištene su srednje vrijednosti te pripadajuće standardne devijacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Ispitivanje fotoinaktivacijskog učinka u vodovodnoj vodi u 500 $\mu\text{L}$

#### bakterijske suspenzije

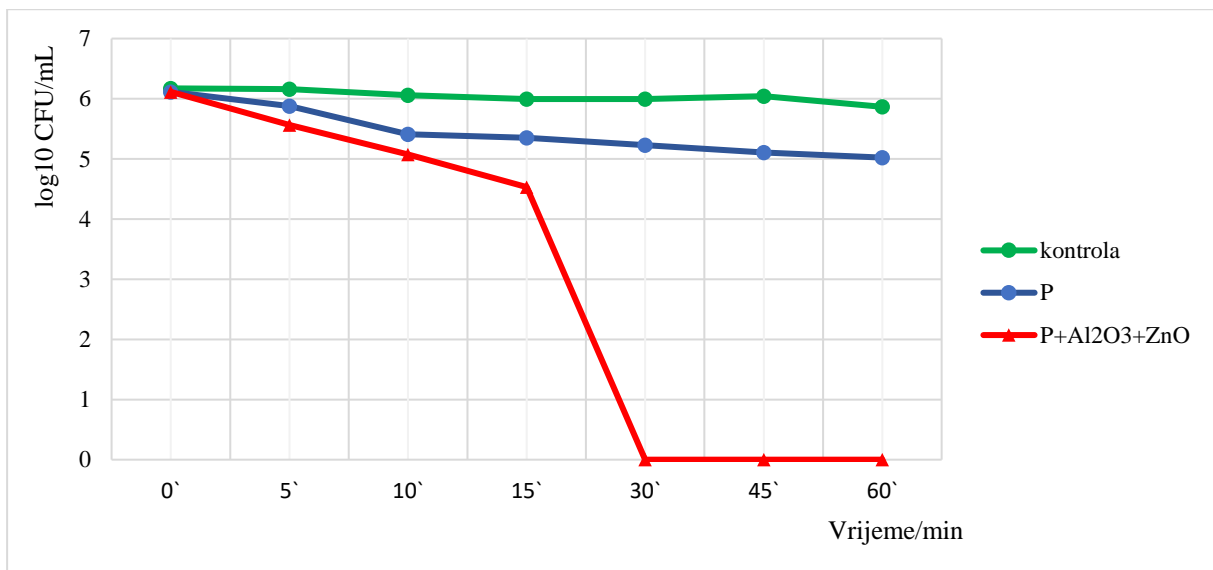
Grafikon 1. prikazuje fotoinaktivacijsku antibakterijsku aktivnost cinkovog oksida na polimernom nosaču tijekom 60 – minutnog osvjetljavanja pod UV lampom na valnoj duljini  $\lambda = 366 \text{ nm}$  u vodovodnoj vodi u 500  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije *E. coli*. Crvena krivulja prikazuje uzorak **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO**, a za komparaciju služe kontrola koja se sastoji od čiste bakterijske suspenzije te bakterijska suspenzija sa neobložnim polimernim diskom **P** i obje su izložene UV svjetlu (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove).



Grafikon 1. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 500  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije *E. coli* tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Na grafikonu vidimo da dolazi do potpune inaktivacije bakterije u uzorcima tretiranim s **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO** nakon 45 minuta osvjetljavanja. Suprotno navedenom, broj bakterija u uzorku bez diska i u uzorku sa **P** pada za jedan logaritam nakon 30 minuta i ostaje nakon 60 minuta tretmana UV zrakama.

Grafikon 2. prikazuje fotoinaktivacijsku antibakterijsku aktivnost cinkovog oksida u 500  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije *S. aureus* tijekom 60 – minutnog osvjetljavanja pod UV lampom na valnoj duljini  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . Crvena krivulja prikazuje uzorak **P +  $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{ZnO}$** , a za komparaciju služe kontrola koja se sastoji od čiste bakterijske suspenzije te bakterijska suspenzija sa neobloženim polimernim diskom **P**. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



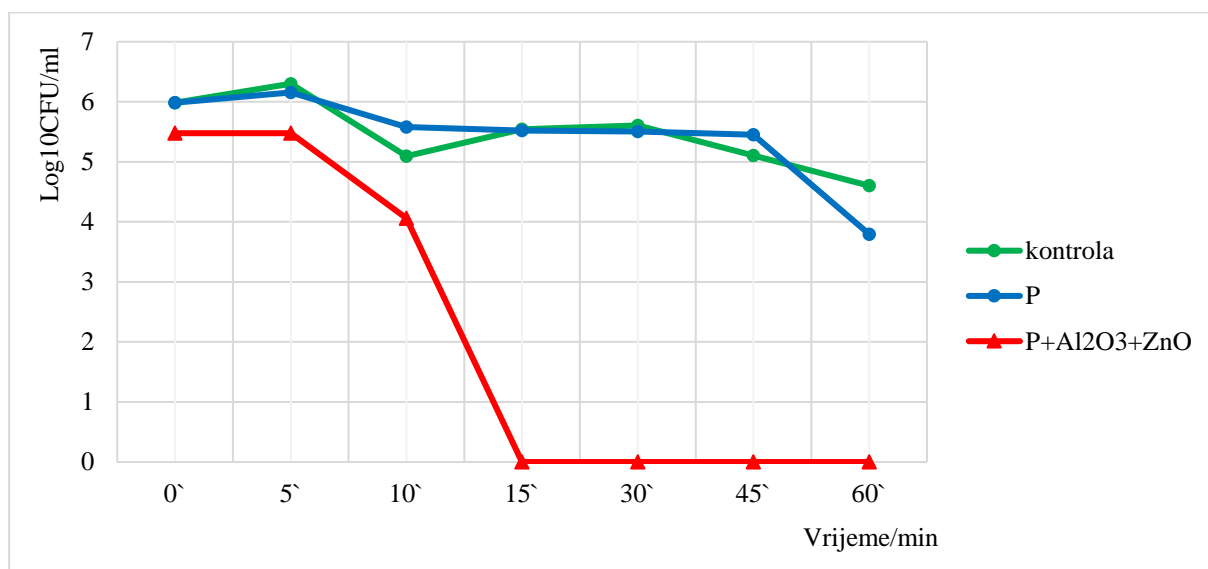
Grafikon 2. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 500  $\mu\text{l}$  bakterijske suspenzije *S. aureus* tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Na grafikonu vidimo da dolazi do potpune inaktivacije bakterije u uzorcima tretiranim s **P +  $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{ZnO}$**  nakon 30 minuta osvjetljavanja. Suprotno navedenom, broj bakterija u uzorku bez diska uopće ne pada dok u uzorku **P** pada za jedan logaritam nakon 30 minuta i ostaje nakon 60 minuta tretmana UV zrakama.



## 4.2 Ispitivanje fotoinaktivacijskog učinka u vodovodnoj vodi u 1000 $\mu\text{L}$ bakterijske suspenzije

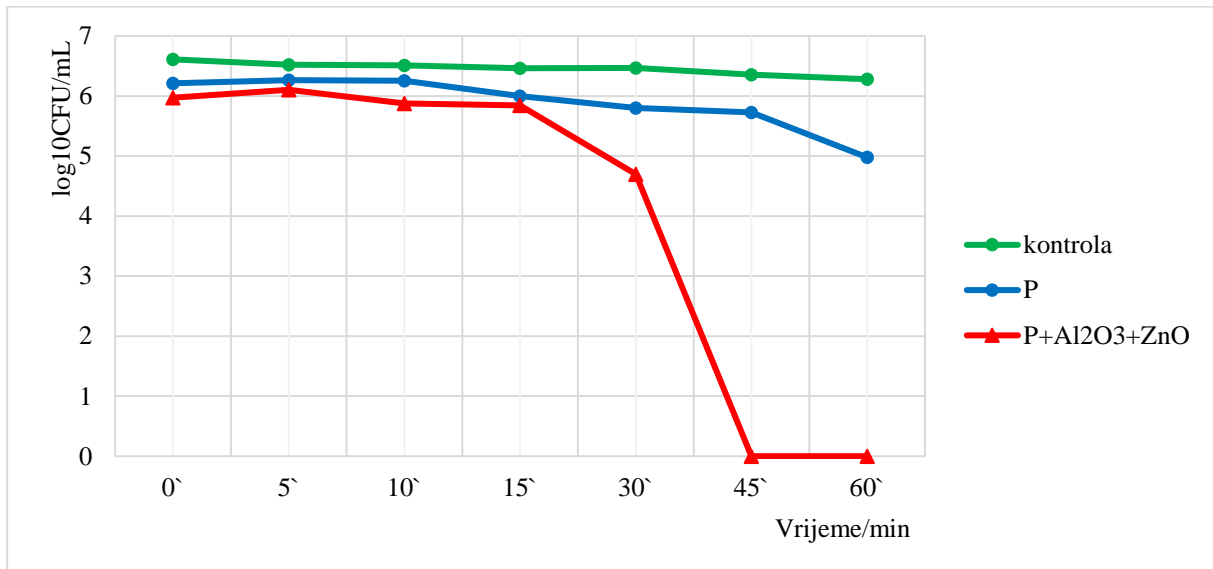
Grafikon 3. prikazuje fotoinaktivacijsku antibakterijsku aktivnost cinkovog oksida na polimernom nosaču tijekom 60 – minutnog osvjetljavanja pod UV lampom na valnoj duljini  $\lambda=366\text{ nm}$  u vodovodnoj vodi u 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije *E. coli*. Crvena krivulja prikazuje uzorak **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO** , a za komparaciju služe kontrola koja se sastoji od čiste bakterijske suspenzije te bakterijska suspenzija sa neobloženim polimernim diskom **P**. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 3. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 1000  $\mu\text{l}$  bakterijske suspenzije *E. coli* tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Na grafikonu vidimo da dolazi do potpune inaktivacije bakterije u uzorcima tretiranim s **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO** već nakon 15 minuta. Suprotno navedenom, broj bakterija u uzorku bez diska i u uzorku **P** pada za jedan, odnosno, dva logaritama nakon 30 minuta i ostaje nakon 60 minuta tretmana UV zrakama.

Grafikon 4. prikazuje fotokatalitičku antibakterijsku aktivnost cinkovog oksida u 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije *S. aureus* tijekom 60 – minutnog osvjetljavanja pod UV lampom na valnoj duljini  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . Crvena krivulja prikazuje uzorak **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO**, a za komparaciju služe kontrola koja se sastoji od čiste bakterijske suspenzije te bakterijska suspenzija sa neobloženim polimernim diskom **P**. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



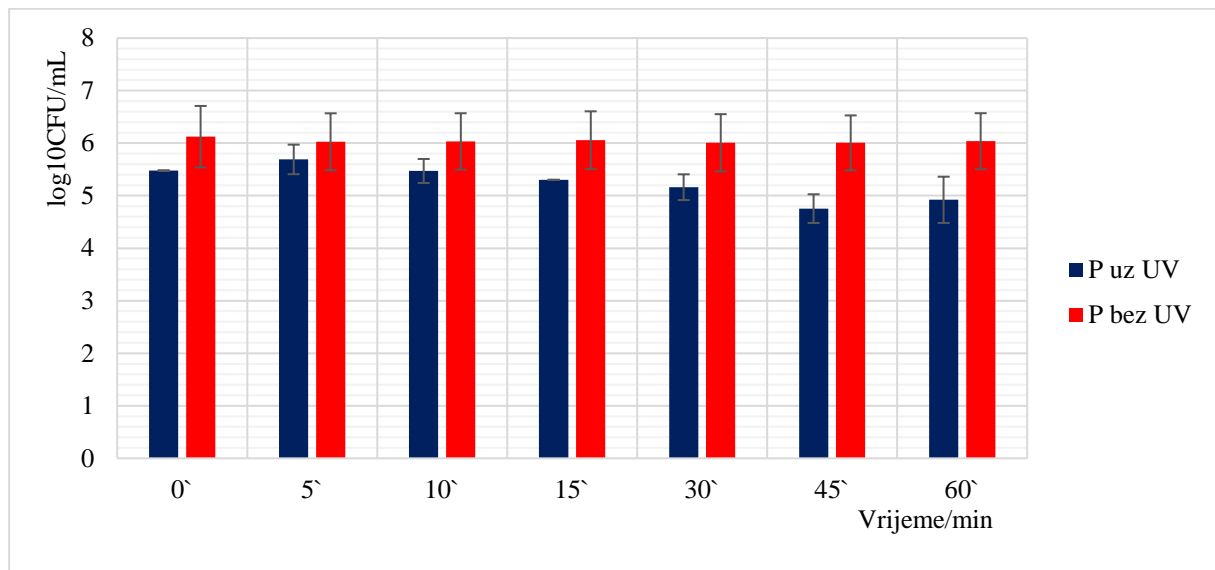
Grafikon 4. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 1000  $\mu\text{l}$  bakterijske suspenzije *S. aureus* tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

Na grafikonu vidimo da dolazi do potpune inaktivacije bakterije u uzorcima tretiranim **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ZnO** već nakon 15 minuta. Suprotno navedenom, broj bakterija u uzorku bez diska ostaje jednak tijekom 60 minuta te u uzorku sa **P** za jedan logaritam nakon 45 minuta i ostaje nakon 60 minuta tretmana UV zrakama.

#### 4.3 Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti pomoću UV zračenja i bez UV zračenja

Grafikon 5. prikazuje usporedbu fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan neobloženi polimerni

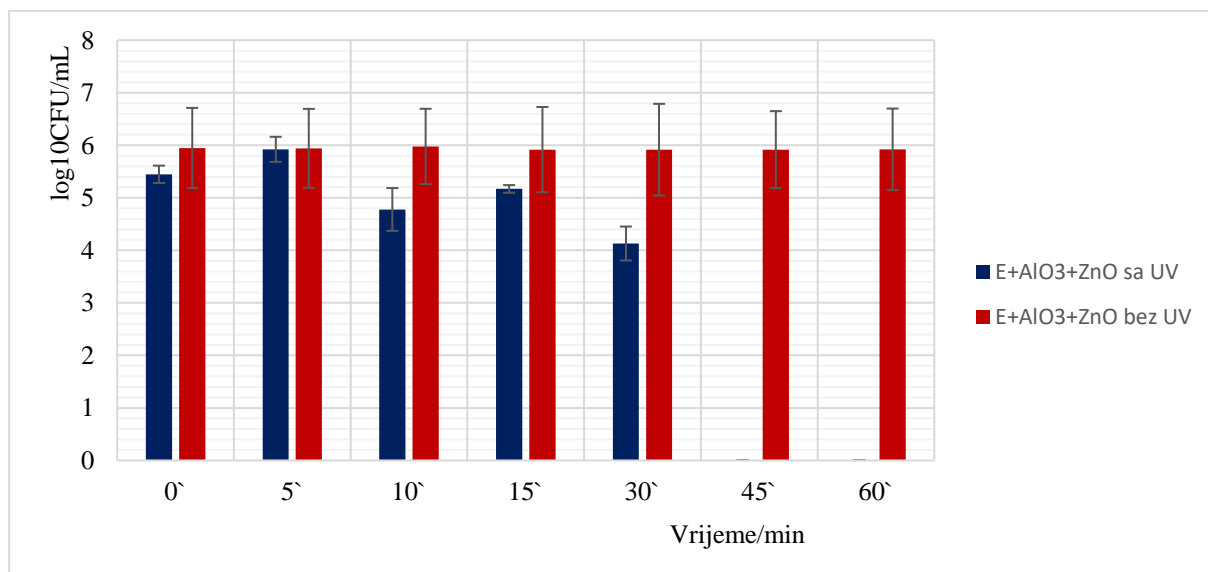
(oznaka **P uz UV** i **P bez UV**) u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *E. coli*.  
(molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 5. Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan **P** u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *E. coli*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu vidimo kako se broj bakterija u osvjetljenom uzorku sa **P** smanjuje za jedan logaritam nakon 30 minuta dok u neosvijetljenom uzorku broj ostaje podjednak tijekom 60 minuta

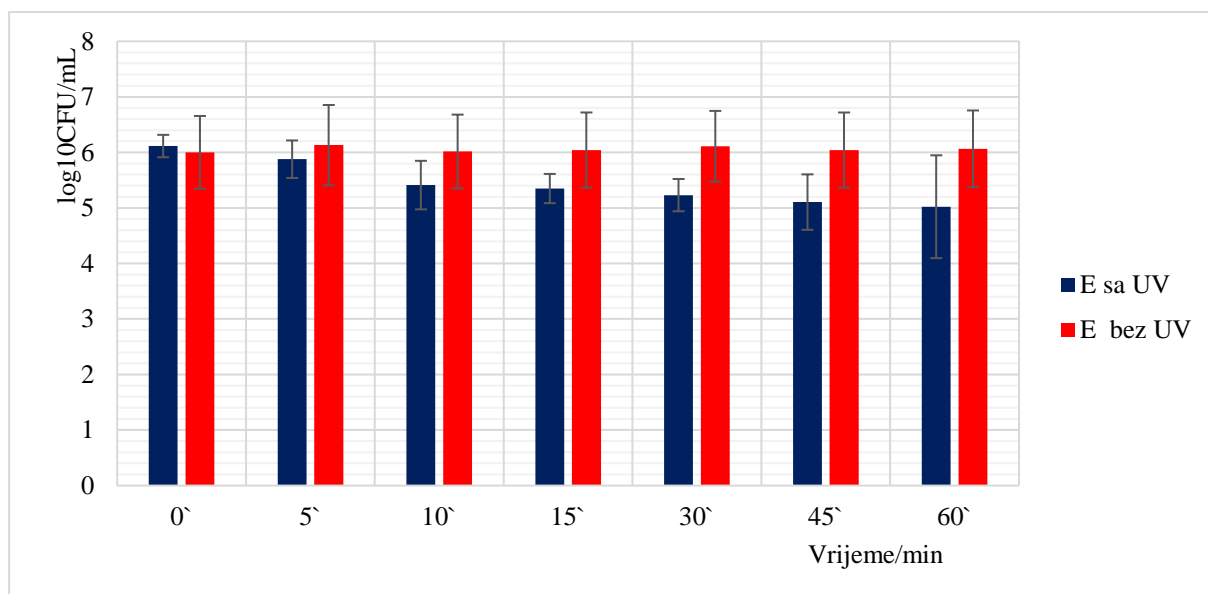
Grafikon 6. prikazuje usporedbu fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** (oznaka **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO uz UV** i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO bez UV**) u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije *E. coli*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 6. Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije *E. coli*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu vidimo kako se broj bakterija u osvijetljenom uzorku sa diskom **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** smanjuje za dva logaritma nakon 15 minuta te nakon 30 minuta bakterije više nisu kultivabilne dok u neosvijetljenom uzorku sa **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** broj bakterija tijekom 60 minuta ostaje podjednak.

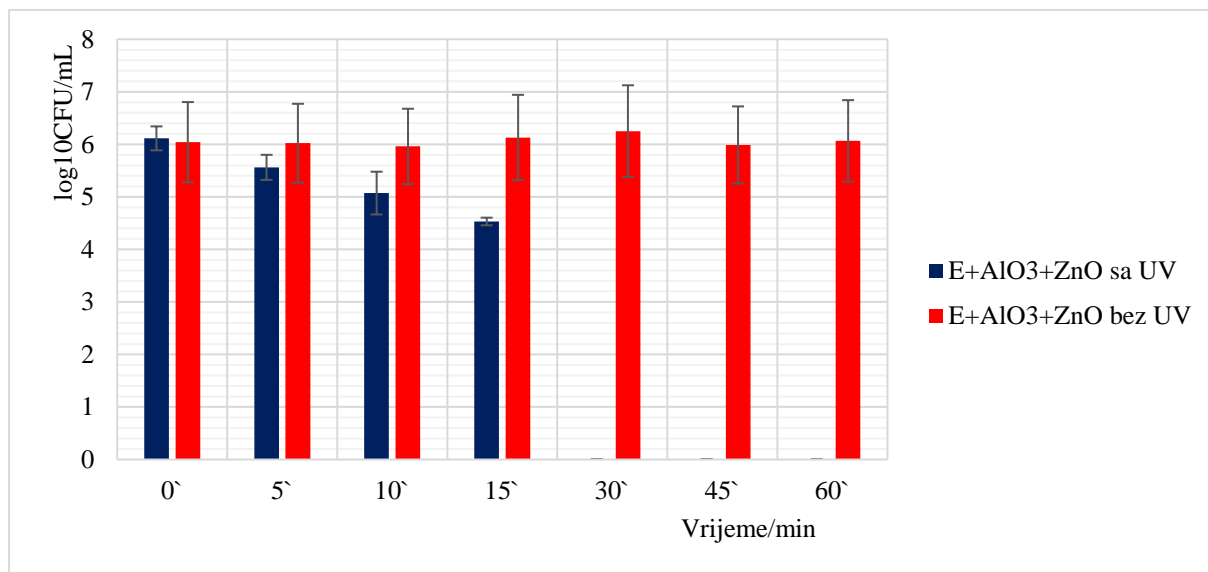
Grafikon 7. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan neobloženi polimerni nosač **P** (oznaka **P uz UV** i **P bez UV**) u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *S. aureus*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 7. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan P u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *S. aureus*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu vidimo kako se broj bakterija u osvjetljenom uzorku sa P smanjuje za jedan logaritam nakon 30 minuta dok u neosvjetljenom uzorku broj bakterija ostaje podjednak tijekom 60 minuta.

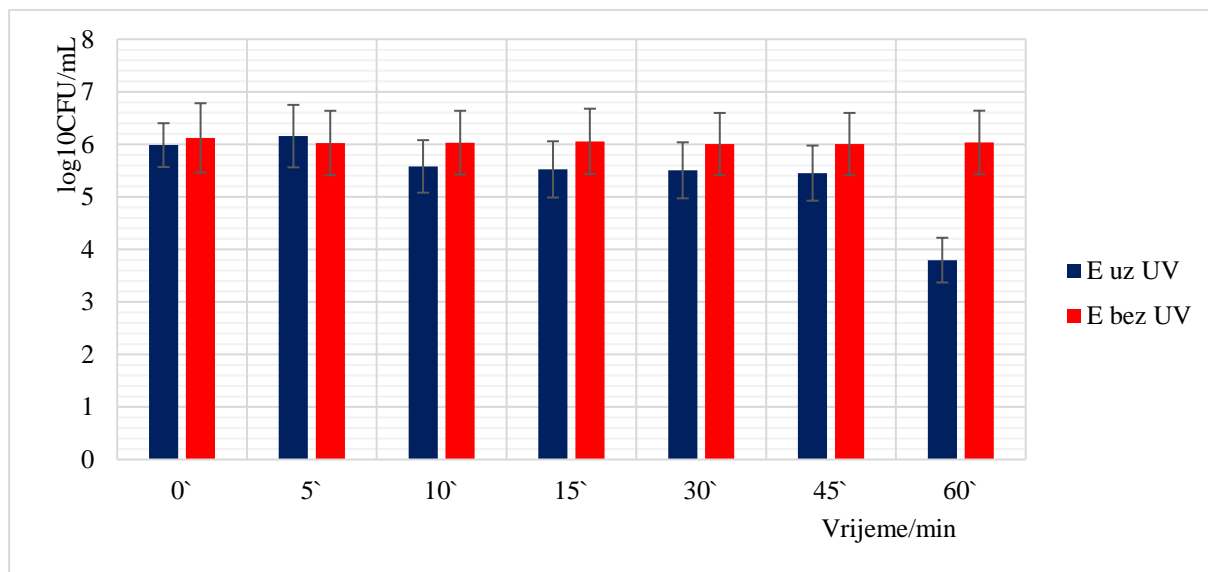
Grafikon 8. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** (oznaka **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO uz UV** i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO bez UV**) u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 8. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu vidimo kako se broj bakterija u osvijetljenom uzorku sa diskom **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** smanjuje za dva logaritma nakon 10 minuta te nakon 15 minuta bakterije više nisu kultivabilne dok u neosvijetljenom uzorku sa **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** broj bakterija tijekom 60 minuta ostaje podjednak.

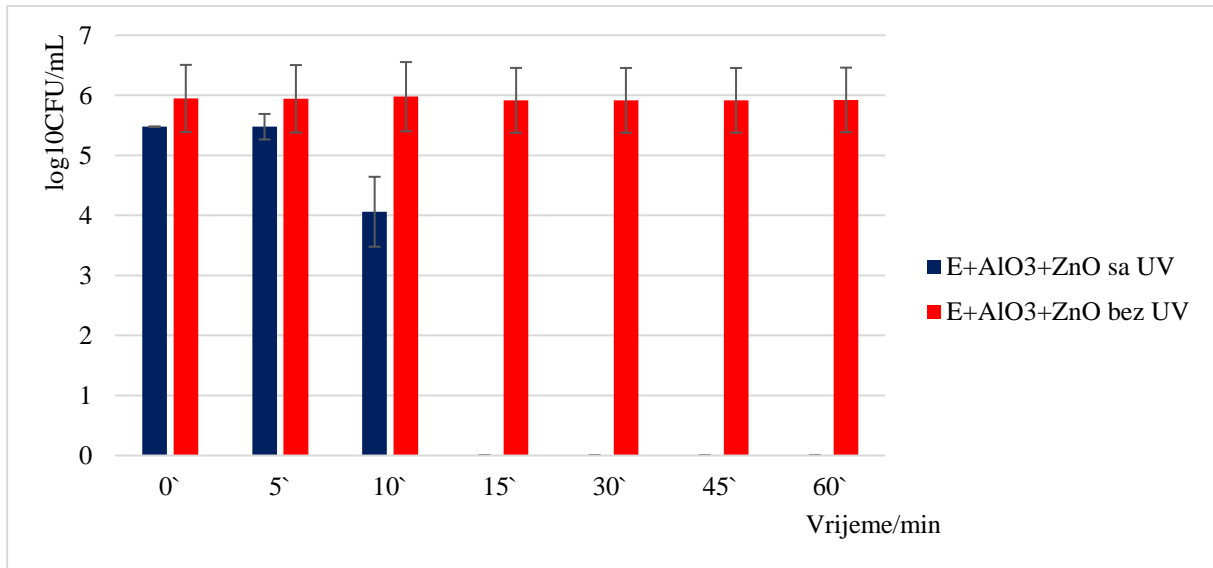
Grafikon 9. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan **P** (oznaka **P uz UV** i **P bez UV**) u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *E.coli.* . (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 9. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan **P** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *E. coli.* Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu vidimo kako se broj bakterija u osvijetljenom uzorku sa diskom neobloženog polimera **P** smanjuje za dva logaritma nakon 45 minuta dok u neosvijetljenom uzorku broj ostaje isti tijekom 60 minuta

Grafikon 10. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** (oznaka **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO uz UV** i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO bez UV**) u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *E. coli*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)

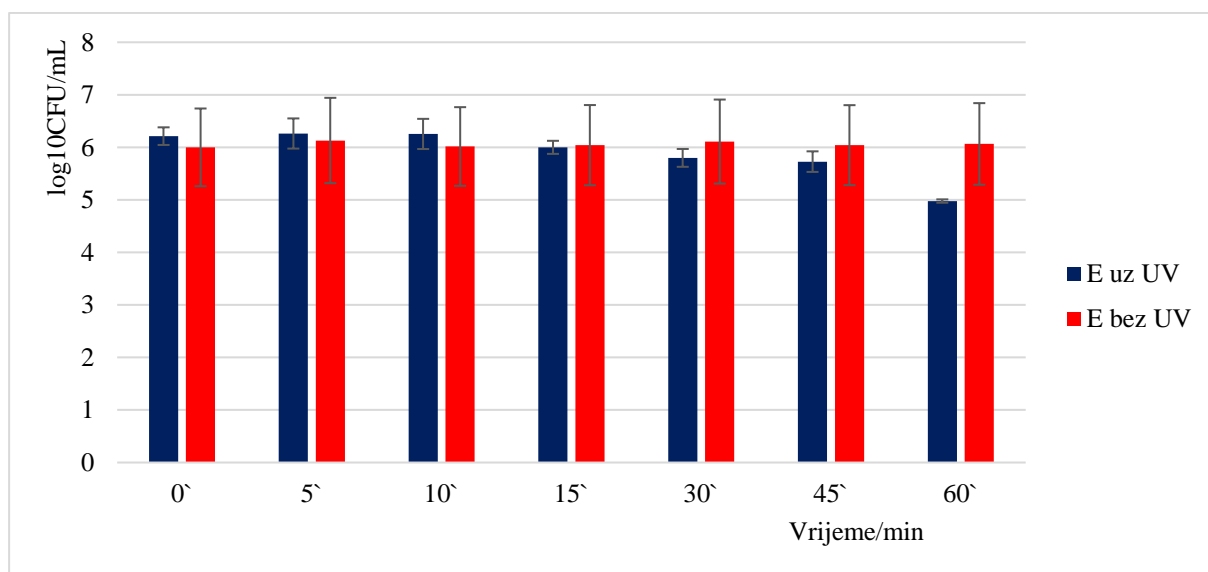


Grafikon 10. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *E. coli*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu možemo vidjeti kako se broj bakterija u osvjetljenom uzorku s **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** nakon 10 minuta smanjuje za jedan logaritam te bakterije više nisu kultivabilne nakon 15 minuta. Suprotno tome, u neosvijetljenom uzorku sa polimernim nosačem naslojenim s aluminijevim i cinkovim oksidom broj bakterija ostaje podjednak tijekom 60 minuta.



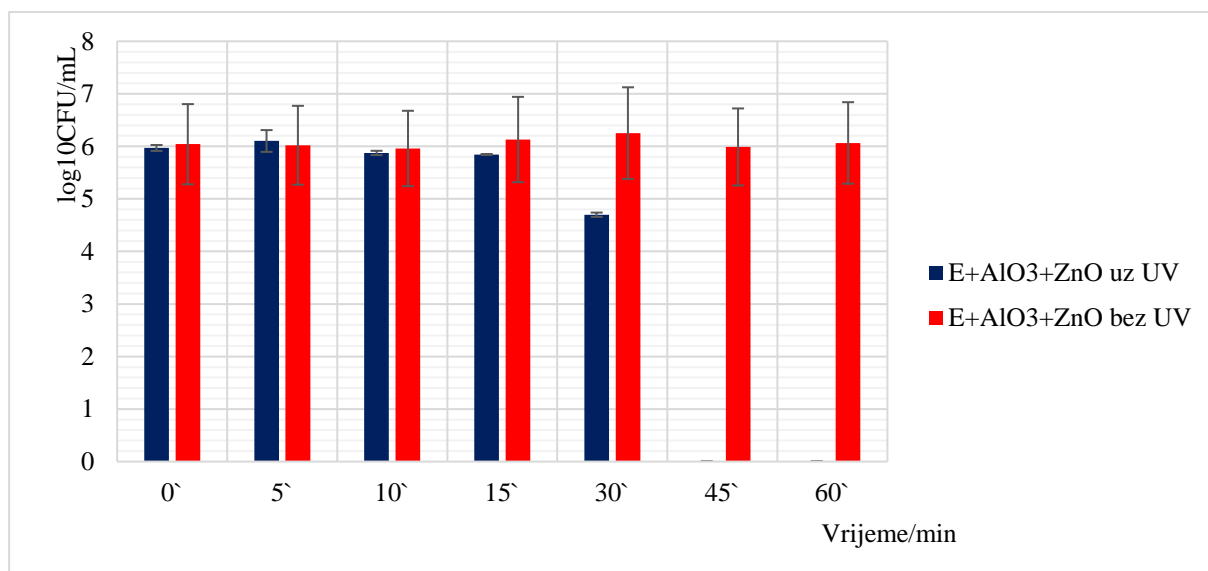
Grafikon 11. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan neobloženi polimerni nosač **P** (oznaka **P uz UV** i **P bez UV**) u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 11. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan **P** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu možemo vidjeti kako se broj bakterija u uzorku sa **P** smanjuje za jedan logaritam nakon 60 minuta osvjetljavanja dok u neosvijetljenom uzorku sa celuloznim diskom ostaje podjednak tijekom 60 minuta.

Grafikon 12. prikazuje usporedbu fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** (oznaka **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO uz UV** i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO bez UV**) u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. (molim unesti popravke naziva uzoraka u grafove)



Grafikon 12. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija

Na grafikonu možemo vidjeti kako se broj bakterija u osvjetljenom uzorku sa **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** smanjuje za jedan logaritam nakon 30 minuta te bakterije nisu kultivabilne nakon 45 minuta. Suprotno tome, u neosvijetljenom uzorku sa polimernim nosačem naslojenim s alumijevim i cinkovim oksidom broj bakterija ostaje podjednak tijekom 60 minuta.

#### 4.4 Broj bakterija nakon 24 h inkubacije uzoraka

Tablica 1. prikazuje broj bakterija nakon 24 h inkubacije uzoraka na  $35 \pm 2$  °C. Uzorci su kontrola – čista bakterijska suspenzija, **P** i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO**. Uzorci su u vodovodnoj vodi

u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *E. coli*. Jedna grupa uzoraka je podvrgnuta 60 – minutnom osvjetljenju UV zračenjem i nakon osvjetljenja stavljena na inkubaciju dok je druga grupa uzoraka stavljena na inkubaciju u mraku, odnosno, nije osvjetljena UV zračenjem.

Tablica 1. Broj bakterija 24 h nakon 60 - minutnog osvjetljenja i bez osvjetljenja u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ l bakterijske suspenzije *E. coli*

	kontrola	<b>P</b>	<b>P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO</b>
Nakon 60 – minutnog osvjetljenja	0	0	0
U mraku	8,10 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL	8,25 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL	0

U tablici možemo vidjeti kako nakon 60 – minutnog osvjetljenja više nema bakterija u uzorcima dok u mraku ima određeni broj bakterija u uzorku bez diska te u uzorku sa **P**. Suprotno tome, u uzorku sa **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** bakterije su inaktivirane i nakon 60 – minutnog osvjetljenja i u mraku.

Tablica 2. prikazuje broj bakterija nakon 24 h inkubacije uzoraka na 35  $\pm$  2 °C. Uzorci su kontrola – čista bakterijska suspenzija, **P**, i **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO**). Uzorci su u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ L bakterijske suspenzije *S. aureus*. Jedna grupa uzoraka je podvrgnuta 60 – minutnom osvjetljenju UV zračenjem i nakon osvjetljenja stavljena na inkubaciju dok je druga grupa uzoraka stavljena na inkubaciju u mraku, odnosno, nije osvjetljena UV zračenjem.

Tablica 2. Broj bakterija 24 h nakon 60 - minutnog osvjetljenja i bez osvjetljenja u vodovodnoj vodi u 500  $\mu$ l bakterijske suspenzije *S. aureus*

	kontrola	<b>P</b>	<b>P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO</b>
Nakon 60 – minutnog osvjetljenja	0	0	0
U mraku	1,16 x 10 <sup>6</sup> CFU/mL	1,11 x 10 <sup>6</sup> CFU/mL	2,15 x 10 <sup>4</sup>

U tablici možemo vidjeti kako nakon 60 – minutnog osvjetljenja više nema bakterija u uzorcima dok u mraku ima određeni broj bakterija u uzorku bez diska te u uzorku sa **P**. Suprotno tome, u uzorku sa **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** broj bakterija je smanjen sa početnih 10<sup>6</sup> bakterija u mraku.

## 5. RASPRAVA

Rezultati prikazani na grafikonima 1 – 4 prikazuju fotolitičku antibakterijsku aktivnost **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO**, kao kontrola poslužila je čista bakterijska suspenzija te bakterijska suspenzija sa **P**. Krivulja inaktivacije jasno prikazuje kako površinski sloj cinkovog oksida u **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** uništava sve bakterije već nakon 15 minuta osvjetljenja UV zračenjem u 1000 µL, odnosno, nakon 30 minuta u 500 µL bakterijske suspenzije *E. coli*, te nakon 30 minuta osvjetljenja u 500 i 1000 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. Kontrola te uzorak neobloženog polimernog diska **P** i nakon 60 – minutnog osvjetljenja sadrže bakterije te ne pokazuju značajnu inaktivaciju. Nakon 24 h inkubacije uzoraka u suspenziji više nema bakterija što znači da je UV zračenje potaklo odgođenu inaktivaciju. Bakterijama u suspenziji oštećen je genetski sadržaj te se one dalje ne mogu razmnožavati, a u isto vrijeme u sterilnoj vodi nemaju organskih tvari od kojih bi preživjele. Površinski sloj cinkovog oksida u **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** uz UV zračenje značajno ubrzava postupak uništavanja bakterija u sterilnoj vodi u 500 i 1000 µL bakterijske suspenzije *E. coli* i *S. aureus*. Grafikoni 5 – 12 prikazuju usporedbu antibakterijske aktivnosti cinkovog oksida uz UV zračenje i bez UV zračenja te je iz rezultata vidljivo da je UV zračenje potrebno kako bi se cinkov oksid aktivirao. Istraživanja koja koriste UV zračenje za uništavanje bakterija koriste valnu duljinu  $\lambda = 254$  nm iz UV - C područja te je ta valna duljina potvrđena kao germicidna valna duljina te zbog toga nije moguće usporediti rezultate sa dostupnom literaturom budući da smo u našim eksperimentima koristili valnu duljinu  $\lambda = 365$  nm u UV - A području. Dodatno, naš pristup temelji na primjeni cinkovog oksida na polimernom nosaču, dok su dosadašnje studije temeljile na istraživanju antibakterijskih svojstava cinkovog oksid u obliku nanočestica. Gilani i suradnici u svojem radu ispituju antibakterijska svojstva tankih filmova cinka u lužnatom i kiselom mediju na bakterijama *E. coli* i *S. aureus* putem difuzijske metode i u rezultatima pokazuju jasne inhibicijske halo zone na agarima. (20) U ovakvom istraživanju kiselina i lužina korištene su kao mediji za ionizaciju cinka te stvaranje cinkovog

oksida koji zatim razara bakterije i stvara inhibicijsku zonu. Kadiyal i suradnici u svom radu neočekivano dokazuju da nanočestice cinkovog oksida pokazuju jednaku antibakterijsku aktivnost kao i nanočestice vodikovog peroksida u inhibiciji meticilin rezistentnog stafilokoka (21). S druge strane kada se govori o UV zračenju nema puno dostupnih radova u kojima se kombinira UV - A svjetlo sa nekim kemijskim agensom. Jedan takav rad je svakako studija koju su proveli Wang i suradnici kombinirajući UV - A svijetlost i galnu kiselinu. (22) Mehanizam kojim ova kombinacija inhibira *E. coli* O157:H7 sastoji se od koncentriranja galne kiseline oko bakterija te njenog oštećivanja stanične membrane. Naime, UV - A i galna kiselina uzrokuju oksidativni stres bakterija i u isto vrijeme inaktiviraju superoksid dizmutazu – enzim koji bakteriji omogućava preživljavanje oksidativnog stresa. Na taj način oštećuje se genetski sadržaj i stanični zid bakterije te se inaktiviraju njeni popravni mehanizmi. Valna duljina svijetlosti korištene u ovom radu iznosi  $\lambda = 400$  nm što je zapravo maksimalna valna duljina, odnosno, minimalna energija UV - A zračenja te se iz toga može zaključiti kako UV - A u kombinacijama uistinu pokazuje veliki potencijal u dezinfekciji. Dokazano valjana kombinacija je svakako i UV - A + UV - C koju su iznjeli Li i suradnici. (9). Oni ukazuju kako UV - A zračenje prodire do genetskog sadržaja organizma te ga oštećuje stvaranjem dimera timina i inaktivira njegove popravne mehanizme dok UV - C zračenje, koje nema toliku dubinu prodora, oštećuje stanični zid i staničnu stjenku organizma te njegove membranske proteine

Nanočestice cinkovog oksida pokazuju dobra antibakterijska svojstva no koncentracija koja je potrebna za uništavanje pojedinog mikroorganizma varira s obzirom na vrstu mikroorganizma. Istraživanje u kojem su nanočestice naslojene kiselinom pokazuje kako je za značajnu inaktivaciju *E. coli* potrebno 48 sati dok je kombinacija koju predstavlja ovo istraživanje inaktivirala *E. coli* već nakon 15 minuta u drugačijim uvjetima (23). Razlike u konkluzijama među istraživanjima samo dokazuju kako je korištenje cinkovog oksida ali i UV zračenja potrebno još više ispitati te standardizirati metodologiju kako bi se dobio najbolji efekt od oba

antibakterijska sredstva. UV - A zračenje korišteno kao aktivator cinkovog oksida ujedno je i dio UV spektra koji od Sunca u najvećem udjelu pada na zemljinu površinu. Brojna istraživanja koriste i samo UV zračenje kao antibakterijsko sredstvo te nekolicina istraživača zaključuje kako je potreban tehnološki napredak sistema za UV ozračivanje vode. Primjerice, znanstvenici koji se bave UV – LED dezinfekcijom vode zaključuju kako je moguće i bolje iskoristiti UV zračenje no ispitivanja koja valja vršiti u nastavku zahtijevaju suradnju sa inženjerima koji bi smislili nove sisteme za UV dezinfekciju vode. Kako bi se poboljšali rezultati ispituju se različite kombinacije dezinficijensa bilo da se kombiniraju dva djela spektra UV zračenja ili dva različita kemijska agensa zaključak je uvijek da antibakterijska svojstva postoje no metodologiju treba usavršavati.

Ovo istraživanje predstavlja kombinaciju fizikalnih i kemijskih metoda dezinfekcije. Naravno, ovi rezultati su samo prvi korak u istraživanju kombinacija UV - A + ZnO, treba ispitati utječe li na inaktivaciju bakterija udaljenost izvora, te može li se skratiti vrijeme korištenjem kraćih valnih duljina unutar UV - A zračenja, odnosno koliko bi skratilo vrijeme inaktivacije korištenje UV - C zračenja. Sve veći spomeni negativnih posljedica kloriranja vode iziskuju traženje novih metoda dezinfekcije vode stoga je potrebno otkrivati potencijale različitih interdisciplinarnih kombinacija koje nude antibakterijska svojstva te zaštitu okoliša i pučanstva.

## 6. ZAKLJUČCI

Iz spomenutih radova, kao i iz ovog istraživanja, može se zaključiti:

1. Cinkov oksid je moćan agens kemijske dezinfekcije,
2. Cinkov oksid vrlo je efektivan u uništavanju različitih mikroorganizama te brojna istraživanja na tu temu to i dokazuju,
3. Spoj koji je nestabilan i može ga se koristiti jedino kao nanočestice stavljen je na polimerni nosač te se tako dobila njegova stabilnost i mogućnost korištenja,
4. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da je *E. coli* osjetljivija na kombinaciju UV zračenja i cinkovog oksida u odnosu na *S. aureus* te je za njenu inaktivaciju u 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije potrebno 15 minuta osvjetljavanja,
5. Za fotoinaktivaciju *E.coli* u 500  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije potrebno je 45 minuta osvjetljavanja,
6. *S. aureus* je rezistentniji te je za inaktivaciju ove bakterije u 1000  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije potrebno 45 minuta osvjetljavanja, odnosno, 30 minuta u 500  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije,
7. Kombinacija UV - A + ZnO na polimernim nosačima daje obećavajuće rezultate te bi se uz daljnja istraživanja i razvijanja metodologije mogla koristiti u dezinfekciji vode.



## 7. LITERATURA

1. **Bodenshatz, W.** *Handbuch fur den Desinfektor*. Stuttgart : G Fischer Verlag, 1989.
2. **Asaj, Antun.** *Dezinfekcija*. Zagreb : Medicinska naklada, 2000.
3. **Vodopija, J., Baklaić, Ž. i Ljubičić, M.** *Mala knjiga o velikom nasljeđu hrvatske preventivne medicine*. Zagreb : Imunološki zavod, 1993.
4. *Ultraviolet Radiation Guide*. **Navy Environmental Health Center**. Norfolk, Virginia : Navy Environmental Health Center, 1992.
5. **Claire Gillespie**. Sciencing.com. [Mrežno] 26.. Travanj 2018. <https://sciencing.com/uses-ultraviolet-light-5016552.html>.
6. **Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. i Medema, G. J.** Inactivation credit od UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water. *Water res.* 3, 2006., 3.
7. **Bolton, J. R. i Cotton, C. A.** *The Ultraviolet Disinfection Handbook*. Denever, CO, USA : American Water Works Association, 2008.
8. **Aoyagi, Y., i dr.** Inactivation of bacterial viruses in water using deep ultraviolet semiconductor light-emitting diode. *Journal Environment.* 137, 2011.
9. **Xiaoling, Li, i dr.** Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. *Science of ihe Total Environment.* 659, 20019., 659.
10. **Chen, R. Z., Craik, S. A. i Bolton, J. R.** Comparison of the action spectra pf microorganisms: information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water. *Water Res.* 43, 2009.
11. **Bolton, J. R. i Linden, K. G.** Standardization of method for fluence (UV dose) determination in bench - scale UV experiments. *Journal Environment.* 129, 2003.

12. **Chevremont, A. C., i dr.** Effect of the coupled UV - A and UV - C LED on the both microbiological and chemical pollution of urban water. *Science of the Total Environment*. 426, 2012.
13. **Oguma, K, i dr.** Application od UV light emitting diodes to batch and flow-trought water disinfection system. *Desalination*. 328, 2013.
14. **Andrej, G., i dr.** Improved drinking water disinfection with UV - C-LEDs for Escherichia coli and Bacillus subtilis utilizing quartz tubes as light guide. *Water* 7. 9, 2015.
15. **Dimaphilis, Emelita Asuncion, Hsu, Ching Shan i Mendoza, Rose Marie.** Zinc oxide nanoparticle for water disifection. *Sustainble Environment Research*. 28, 2018.
16. **Padmavathy, N. i Vijayaraghavan, R.** Napredna bioaktivnost ZnO nanočestica: antimikrobna studija. *Science and tehnology advanced materials*. 9, 2008.
17. **Marković, B. S.** *Mikrobiologija II, bakterije, kvasci i plijesni*. Beograd : Univezitet u Beogradu, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1983.
18. **Hukić, M.** *Bakteriologija*. Sarajevo : Jež, 2005.
19. **Imišović, Emir, i dr.** Djelovanje Kantarionovog Ulja na Bakterije Staphylococcus aureus i Escherichia coli. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2, 2013.
20. **Gilani, Shalaleh, Ghorbanpour, Mohammad i Jadid, Aiyoub Parchehbaf.** Antibacterial activity of ZnO films prepared by anodizing. *Journal Nanostruct Chem*. 10, 2016.
21. **Kadiyala, Usha, i dr.** Unexpected insights into anzibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant Staphylococcus aureus. *Nanoscale*. 10, 2018.

22. **Wang, Qingyang, i dr.** Open on mechanism behind UV-A light enhanced antibacterial activity of gallic acid and prop'yl gallate against Escherichia coli O157:H7. *Nature*. 7, 2017.
23. **Silvestre, Klara, i dr.** Development of Antibacterial Composite Films Based on Isotactic Polypropylene and Coated ZnO Particles for Active Food Packaging. *Coatings*. 6, 2016.

## 8. DODACI

### 8.1 Tablica slika

Slika 1. Spektar elektromagnetskog zračenja. (izvor: <a href="https://www.ccohs.ca">https://www.ccohs.ca</a> ) .....	15
Slika 2. Prikaz narušavanja DNK lanca stvaranjem dimera ciklobutan timin pirimidina. Izvor: X. Li et al./Science of the total Environment 659 (2019) .....	18
Slika 3. Pojednostavljeni prikaz dizajna statičkog eaktora. Izvor: Oguma et al., 2016 (13) ...	21
Slika 4. E. coli na kromogenoj podlozi za identifikaciju koliforma .....	25
Slika 5. Staphylococcus aureus na Müeller - Hinton agaru .....	27
Slika 6. Porast kolonija Staphylococcus aureus na Müeller - Hinton agaru .....	31
Slika 7. Osvjetljavanje 500 µl bakterijske suspenzije sa uzorcima celuloznih diskova.....	33
Slika 8. Hranjiva podloga nakon inkubacije na 35 ± 2 °C kroz 24 h.....	33
Slika 9. Osvjetljavanje 1000 µl bakterijske suspenzije sa uzorcima polimernih diskova (P) .	35
Slika 10. Hranjiva podloga nakon inkubacije na 35 ± 2 °C kroz 24 h.....	35

### 8.2 Tablica grafikona

Grafikon 1. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 500 µl bakterijske suspenzije E. coli tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.....	37
Grafikon 2. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 500 µl bakterijske suspenzije S. aureus tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.....	38
Grafikon 3. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 1000 µl bakterijske suspenzije E. coli tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.....	39

Grafikon 4. Fotoinaktivacijska antibakterijska aktivnost cinkovog oksida u 1000 µl bakterijske suspenzije <i>S. aureus</i> tijekom 60 - minutnog osvjetljavanja. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.....	40
Grafikon 5. Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan <b>P</b> u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije <i>E. coli</i> . Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija.....	41
Grafikon 6. Usporedba fotokatalitičke antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke <b>P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO</b> u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije <i>E. coli</i> . Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija.....	42
Grafikon 7. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan <b>P</b> u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije <i>S. aureus</i> . Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija.....	43
Grafikon 8. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke <b>P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO</b> u vodovodnoj vodi u 500 µL bakterijske suspenzije <i>S. aureus</i> . Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija.....	44
Grafikon 9. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan <b>P</b> u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije <i>E. coli</i> . Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija.....	45
Grafikon 10. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke <b>P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO</b> u vodovodnoj vodi u 1000 µL	

bakterijske suspenzije E coli. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija..... 46

Grafikon 11. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke kojima je dodan **P** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije S. aureus. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija..... 47

Grafikon 12. Usporedba fotoinaktivacijske antibakterijske aktivnosti tijekom 60 – minutnog UV zračenja i bez UV zračenja za uzorke **P + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ZnO** u vodovodnoj vodi u 1000 µL bakterijske suspenzije S. aureus. Pokusi su ponovljeni dva puta u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost te su prikazane i trake standardne devijacija..... 48

## 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime / Prezime  
Adresa(e)  
Telefonski broj(evi)

E-mail

Državljanstvo

Datum rođenja

Spol

### Radno iskustvo

Datumi  
Zanimanje ili radno mjesto  
Glavni poslovi i odgovornosti  
Naziv i adresa poslodavca  
Vrsta djelatnosti ili sektor

### Silvestar Mežnarić

Krajevac 31, 51215 Kastav

Broj mobilnog telefona:  
099/2498998

meznaric.silve@gmail.com

Hrvatsko

5. 6.1995.

Muški

Jadransko osiguranje d.d.

15. 7. 2016.-20. 9.2016.

Pomoćnik pri poslovima autoosiguranja

Tehnički pregled, registracija i osiguranje vozila

Jadransko osiguranje d.d. Riva 8, 51000 Rijeka

Osiguranje vozila

DBoki d.d.

6. 2014.-10. 2015.

Tehničar za rasvjetu i razglas

Najam i montaža rasvjete, razglasa i pozornica

51218 Cernik

Glazbeno-scenska oprema

Podravka d.d.

6.2010.-9.2010.; 6.2011.-9.2011.; 6.2012.-9.2012.; 6.2013.-9.2013.

Punjač polica

Poslovi punjenja polica proizvodima u trgovačkim centrima

Ante Starčevića 32. 48000 Koprivnica

Sektor unapređivanja prodaje

### Obrazovanje i osposobljavanje

Datumi  
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje  
Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine

2010.-2014.

Administrator, gimnazija

Klasična gimnazija

Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja  
Razina prema nacionalnoj ili međunarodnoj klasifikaciji

Salezijanska klasična gimnazija s pravom javnosti, Rijeka

SSS

2011.-2013.

Voditelj u liturgijskoj glazbi, orguljaš

Liturgijska muzikologija

Nadbiskupijska škola za crkvenu glazbu, Rijeka

II. stupanj

2010.-2012.

Glazbenik solo pjevač

Solo pjevanje

Glazbena škola Ivan Matetić Ronjgov, Rijeka

SSS

## Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik

Drugi jezik(ci)

Samoprocjena

Europska razina (\*)

### Engleski jezik

Društvene vještine i kompetencije

Organizacijske vještine i kompetencije

Tehničke vještine i kompetencije

Računalne vještine i kompetencije

Umjetničke vještine i kompetencije

Druge vještine i kompetencije

## Hrvatski

Razumijevanje				Govor				Pisanje	
Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija			
C 1	Samostalni korisnik	B 2	Samostalni korisnik	B 2	Samostalni korisnik	B 2	Samostalni korisnik	B 2	Samostalni korisnik

(\*) [Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikativnost .

Organizacijski odbor kongresa „Neuri“ , „Sanitas“ i Nacionalne konferencije o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda; Član fakultetskog vijeća MedRi; Studentski predstavnik studija Sanitarnog inženjerstva

Logistička i tehnička služba u organizaciji kongresa.

Napredno korištenje programa MS Office-a, napredno korištenje programa Statistica

Sviranje više instrumentata

Radišnost i želja za učenjem



Vozačka dozvola

B

**Dodatne informacije**

Trenutno obrazovanje Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, smjer Sanitarni inženjer  
Student demonstrator na Zavodu za Medicinsku fiziku i biofiziku, kolegiji Biofizika;  
Biostatistika  
Aktivno sviranje u bandu „Koktelsi“  
Sudjelovanje na projektu Hrvatskog društva mikrobiologa : „U društvu mikroba“.

**Datum popunjavanja ili  
zadnjeg ažuriranja  
životopisa**

22.8.2019.

**Potpis**

