ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA (Satureja montana)

Šutalo, Mara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:914118

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA (Satureja montana)

ZAVRŠNI RAD

MARA ŠUTALO
Matični broj: 1363

Split, lipanj 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA (Satureja montana)

ZAVRŠNI RAD

MARA ŠUTALO
Matični broj: 1363

Split, lipanj 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
STUDY ORIENTATION: CHEMICAL ENGINEERING

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COLLOIDAL SILVER SYNTHESIZED USING MOUNTAIN SAVORY (Satureja montana) HONEY

BACHELOR THESIS

MARA ŠUTALO
Parent number: 1363

Split, June 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij kemijske tehnologije
Smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Tehničke znanosti
Znanstveno polje: Kemijsko inženjerstvo
Mentor: Prof. dr. sc. Pero Dabić
Komentor: Doc. dr. sc. Anita Rakić

ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA (Satureja montana)

Mara Šutalo, 1363

Sažetak:

U ovom radu proučavana je sinteza nanočestica koloidnog srebra dobivenih pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja, te određena antibakterijska vrijednost dobivenog koloidnog srebra. Kao izvor srebra korišten je srebrov nitrat, a pH vrijednost otopine meda je podešena s 3,53 na 6 s otopinom natrijeva karbonata. Sinteza je provedena pri 20 °C uz miješanje. Prvi dokaz nastanka koloidnog srebra bilo je određivanje intenziteta Tyndallova efekta uslijed propuštanja laserske zrake kroz koloide. UV–Vis spektrofotometrom u području valnih duljina 330-500 nm, SEM (Scanning Electron Microscope) analizom i DLS metodom izvršena je karakterizacija uzoraka nastalog koloidnog srebra. Antibakterijska efikasnost koloidnog srebra testirana je uz pomoć bakterija Escherichia coli NCTC 13216 i Staphylococcus aureus ATCC 25923. Dokazano je antibakterijsko djelovanje koloidnog srebra dobivenog pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) za ove dvije bakterije do određenih koncentracija.

Ključne riječi: koloidno srebro, med od primorskog vriska (Satureja montana), zelena sinteza, Escherichia coli, Staphylococcus aureus.

Rad sadrži: 49 stranice, 35 sliku, 1 tablicu, 6 priloga, 43 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Damir Barbir	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Anita Rakić	član/komentor
3. Prof. dr. sc. Pero Dabić	mentor

Datum obrane: (datum upisuje Studentska služba nakon uspješne obrane rada)
Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate study of Chemical Technology
Study Orientation: Chemical Engineering

Scientific area: Technical Sciences
Scientific field: Chemical Engieering
Supervisor: PhD, Pero Dabić, full prof.
Co-supervisor: PhD, Anita Rakić, assist. prof.

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COLLOIDAL SILVER SYNTHESIZED USING MOUNTAIN SAVORY (Satureja montana) HONEY

Mara Šutalo, 1363

Abstract:

In this work, the synthesis of colloidal silver nanoparticles using mountain savory (Satureja montana) honey from the Dalmatian region was studied, and the antibacterial activity of the resulting colloidal silver was determined. Silver nitrate was used as a source of silver, and the pH value of honey solution was adjusted from 3.53 to 6 with a solution of sodium carbonate. The synthesis was carried out at 20 °C with mixing. The first evidence of colloidal silver was the determination of the intensity of the Tyndall effect by passing a laser beam through the colloids. UV-Vis spectrophotometer in the area of wavelengths 330-500 nm, SEM (scanning electron microscopes) analysis and DLS method was performed characterization of samples of colloidal silver. The antibacterial efficiency of colloidal silver was tested with the help of Escherichia coli NCTC 13216 and Staphylococcus aureus ATCC 25923. It was demonstrated the antimicrobial activity of colloidal silver obtained by using mountain savory (Satureja montana) honey for these two bacteria up to certain concentrations.

Keywords: colloidal silver, mountain savory (Satureja montana) honey, green synthesis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus.
Thesis contains: 49 pages, 35 figures, 1 tables, 6 supplements, 43 references
Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

1. Damir Barbir, associate professor, PhD - chair person
2. Anita Rakić, assistant professor, PhD - member/co-supervisor
3. Pero Dabić, full professor, PhD - supervisor

Defence date: (Employee of Student office fulfill the date after successfully defended thesis)

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Dio završnog rada je izrađen u Zavodu za anorgansku tehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Pere Dabića, a drugi dio izrađen je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije na Odjelu za mikrobiološke podloge i sterilizaciju pod komentorstvom doc. dr. sc. Anite Rakić.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Peri Dabiću i komentorici doc. dr. sc. Aniti Rakić na svom prenesenom znanju, savjetima i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Neizmjerno sam zahvalna svojim roditeljima i sestri na iznimnoj podršci i razumijevanju koju su mi pružali tijekom mog prijediplomskog studija.

Veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama s fakulteta koji su me ohrabrivali i motivirali na ovom putu. Bez vas bi bilo mnogo teže!

I za kraj, ovaj rad posvećujem roditeljima i onima koji me ponosno gledaju s neba.

„U Njega se srce moje pouzdalo, On mi pomognu; stoga kliče srce moje, pjesmom mu svojom zahvaljujem.“

(Ps 28,7)

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Pripremiti 100 mL suspenzije koloidnog srebra pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja.
- Odrediti koncentraciju i veličinu koloidnih čestica srebra.
- Kvantitativno odrediti antibakterijsku aktivnost sintetiziranog koloidnog srebra na Escherichia coli i Staphylococcus aureus odnosno minimalnu inhibicijsku koncentraciju primijenjenog koloidnog srebra.
- Na osnovi dobivenih rezultata usporediti dobivene vrijednosti antibakterijske aktivnosti s podacima iz literature te napisati valjane zaključke.

SAŽETAK

U ovom radu proučavana je sinteza nanočestica koloidnog srebra dobivenih pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja, te određena antibakterijska vrijednost dobivenog koloidnog srebra. Kao izvor srebra korišten je srebrov nitrat, a pH vrijednost otopine meda je podešena s 3,53 na 6 s otopinom natrijeva karbonata. Sinteza je provedena pri 20 °C uz miješanje. Prvi dokaz nastanka koloidnog srebra bilo je određivanje intenziteta Tyndallova efekta uslijed propuštanja laserske zrake kroz koloide. UV–Vis spektrofotometrom u području valnih duljina 330-500 nm, SEM (Scanning Electron Microscope) analizom i DLS metodom izvršena je karakterizacija uzoraka nastalog koloidnog srebra. Antibakterijska efikasnost koloidnog srebra testirana je uz pomoć bakterija Escherichia coli NCTC 13216 i Staphylococcus aureus ATCC 25923. Dokazali smo antibakterijsko djelovanje koloidnog srebra dobivenog pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) za ove dvije bakterije do određenih koncentracija.

Ključne riječi : koloidno srebro, med od primorskog vriska (Satureja montana), zelena sinteza, Escherichia coli, Staphylococcus aureus.

SUMMARY

In this work, the synthesis of colloidal silver nanoparticles using mountain savory (Satureja montana) honey from the Dalmatian region was studied, and the antibacterial activity of the resulting colloidal silver was determined. Silver nitrate was used as a source of silver, and the pH value of honey solution was adjusted from 3.53 to 6 with a solution of sodium carbonate. The synthesis was carried out at 20 °C with mixing. The first evidence of colloidal silver was the determination of the intensity of the Tyndall effect by passing a laser beam through the colloids. UV-Vis spectrophotometer in the area of wavelengths 330-500 nm, SEM (scanning electron microscopes) analysis and DLS method was performed characterization of samples of colloidal silver. The antibacterial efficiency of colloidal silver was tested with the help of Escherichia coli NCTC 13216 and Staphylococcus aureus ATCC 25923. It was demonstrated the antimicrobial activity of colloidal silver obtained by using mountain savory (Satureja montana) honey for these two bacteria up to certain concentrations.

Keywords: colloidal silver, mountain savory (Satureja montana) honey, green synthesis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus.

SADRŽAJ

UVOD **1**

1. OPĆI DIO **2**

1.1. SREBRO 2

1.1.1. Dobivanje srebra 3

1.1.2. Primjena srebra 3

1.2. DISPERZNI I KOLOIDNI SUSTAVI 4

1.2.1. Disperzni sustavi 4

1.2.2. Koloidni sustavi 5

1.2.3. Svojstva koloidnih sustava 6

1.2.3.1. Tyndallov efekt 6

1.2.3.2. Brownovo gibanje 7

1.3. KOLOIDNO SREBRO 8

1.4. METODE DOBIVANJA KOLOIDNOG SREBRA 9

1.4.1. Elektrokemijske metode 9

1.4.2. Fizikalne metode 9

1.4.3. Kemijske metode 10

1.5. ZELENA SINTEZA 10

1.5.1. Biološke metode 11

1.5.1.1. Sinteza pomoću bakterija 12

1.5.1.2. Sinteza pomoću gljivica 13

1.5.1.3. Sinteza pomoću biljaka 14

1.5.1.4. Sinteza pomoću kvasca 15

1.5.1.5. Sinteza pomoću meda 15

1.6. KARAKTERIZACIJA SREBRA 16

1.7. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA 17

1.7.1. Escherichia Coli 17
1.7.2. Staphylococcus aureus 19
2. EKSPERIMENTALNI RAD 20
2.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE I APARATURA 20
2.2. PRIPRAVA OTOPINE SREBRA POTREBNE ZA ZELENU SINTEZU KOLOIDNOG SREBRA 21
2.3. ZELENA SINTEZA KOLOIDNOG SREBRA 24
2.3.1. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA 25
2.4. INSTRUMENTI ZA ANALIZU KOLOIDNOG SREBRA 31
2.4.1. UV–Vis spektrofotometar 31
2.4.2. SEM (SCANNING ELECTRON MIKROSCOPE) 31
2.4.3. DLS (Dynamic Light Scattering) 32
3. REZULTATI 33
3.1. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA 33
3.2. DLS (Dynamic Light Scattering) ANALIZA 33
3.3. SEM (Scanning Electron Microscope) ANALIZA 34
3.4. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA .. 35
4. RASPRAVA 36
4.1. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA 36
4.2. DLS (Dynamic Light Scattering) ANALIZA 36
4.3. SEM (Scanning Electron Microscope) ANALIZA 37
4.4. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA .. 38
5. ZAKLJUČAK 39
6. LITERATURA 40
7. PRILOZI 44

7.1. Certifikat o analizi mikroorganizma - Staphylococcus aureus 44
7.2. Certifikat o analizi mikroorganizma - Escherichia coli 46
7.3. Certifikat razrjeđivača Mueller Hinton Brotha 48
7.4. Certifikat indikatora 2, 3, 5-trifeniltetrazolij klorida (TTC-a) 49

UVOD

Mnogi narodi poput Grka, Rimljana, Egipćana i Perzijanaca koristili su srebro za skladištenje prehrambenih proizvoda unazad pet tisuća godina. Od 8. stoljeća srebro se koristi u medicinske svrhe. Najviše se upotrebljavalo za izradu nakita, posuđa, ukrasnih predmeta, kovanog novca te za izradu ogledala. [1]

Nazivali su ga mjesečevim metalom, a za vrijeme egipatskog i rimskog carstva koristio se za očuvanje pitke vode (ponajviše od mikroba). Tijekom 20. stoljeća njegova uporaba se smanjuje, ali se ponovno povećao interes za proučavanjem srebra i njegovog antibiotičkog djelovanja.

Koloidno srebro je tekuća suspenzija mikroskopskih čestica srebra, koja je dovoljno mala da prođe kroz membrane stanica i lako se apsorbira u tijelu pa se koristi kao alternativni lijek, koji je popularnost stekao sredinom devedesetih godina 20. stoljeća. Koloidno srebro je vrlo alkalno i smatra se da jača imunološki sustav i djeluje kao prirodni antibiotik.[2]

Suspenzija može ubiti mnoge bakterije, viruse i mikroorganizme te je stoga učinkovita kod liječenja mnogih medicinskih stanja, uključujući lišajeve, akne, dijabetes i cistitis.

Postoji par metoda koje se koriste za dobivanje koloidnog srebra, a najčešće se koristi redukcija srebrovih iona u otopini pomoću nekog reducensa uz prisustvo stabilizatora. Od drugih metoda izdvajaju se kemijska, elektrokemijska i fizikalna metoda. [3]

Posljednjih godina sve se više koristi tehnika „zelena kemija“ koja je ekološki prihvatljivija jer ne koristi toksične kemikalije i ne zahtjeva visoke temperature, tlakove i veliki utrošak energije. Zadatak joj je ukloniti i smanjiti štetne učinke tijekom proizvodnje. U zamjenu za fizikalnu i kemijsku sintezu koriste se metode koje uključuju sintezu pomoću meda, gljivica, biljaka i mikroorganizama.

U ovom radu proučavat će se zelena sinteza koloidnog srebra pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja te njegovo antibakterijsko djelovanje na bakterije Escherichiu coli i Staphylococcus aureus.

1. OPĆI DIO

1.1. SREBRO

Srebro, simbol Ag (lat. Argentum), kemijski je element s protonskim ili atomskim brojem 47 i približnom relativnom atomskom masom od 107,8682. Smješten je u 11. skupini periodnog sustava elemenata, odnosno klasificiran kao dio skupine bakra. Elektronska konfiguracija srebra je [Kr] $4d^{10}$ $5s^{1}$. [4]

Iako je stabilan metal, podložan je otapanju u vrućoj koncentriranoj sulfatnoj i dušičnoj kiselini dok spojevi sumpora utječu na njega formirajući crno obojeni sulfidni sloj. Upravo zbog toga srebrne predmete je potrebno povremeno čistiti. Elementarno srebro je mekani plemeniti metal bijele boje, visokog sjaja i visoke plastičnosti. Ima gustoću od 10,5 g/cm³, talište od 961,8 °C i vrelište približno 2162 °C. Srebro se ističe kao najbolji vodič elektriciteta i topline među svim metalima. U kemijskim spojevima pretežito ima stupanj oksidacije +1, dok spojevi srebra sa stupnjem oksidacije +2 i +3 su rijetki zbog teškoća u dobivanju te stoga nemaju značajnu praktičnu vrijednost. Slika 1. prikazuje srebro u elementarnom obliku. [5]

Slika 1. Elementarno srebro [6]

1.1.1. Dobivanje srebra

Danas se većina srebra (oko 80%) dobiva nakon preradbe olovnih i bakrenih ruda, dok se preostali dio dobiva iz samorodnog srebra ili njegovih ruda, te iz sekundarnih sirovina.

Sirovo olovo koje sadrži čestice srebra dobiveno je preradom olovne rude, a naknadno se prerađuje Parkesovim postupkom gdje se rastaljenom sirovom olovu dodaje cink i zagrijava pri temperaturi većoj od temperature taljenja uz miješanje. Srebro iz olova se ekstrahira, a cink se ukloni destilacijom. Olovo, kao najmanje plemenit metal, najprije se oksidira i s površine taline konstantno se uklanja olovo(II) oksid. Tako dobiveno srebro potrebno je pročistiti elektrolitskim putem, a kao elektrolit koristi se otopina srebrova(I) nitrata.

Iz bakrene se rude srebro izdvaja elektrolitskim pročišćavanjem anodnog mulja koji je zaostao nakon procesa rafinacije.

Za dobivanje srebra iz njegovih ruda koristi se cijanidni postupak. Najprije je potrebno rudu fino usitniti, a potom kroz deset dana propuhivati zrak kroz suspenziju usitnjene rude u razrijeđenoj vodenoj otopini natrijevog cijanida (NaCN). Ovaj proces rezultira stvaranjem cijanidnog kompleksa $Ag(CN)_2^-$. Da bi se dobilo srebro iz otopine cijanidnog kompleksa nužno je provesti redukciju s cinkom ili aluminijem u lužnatom mediju.

$$2Ag(CN)_2^- + Zn(s) + 3OH^- \rightarrow 2Ag(s) + Zn(OH)_3^- + 4CN^- \qquad (1)$$

Za dobivanje srebra mogu se koristiti i sekundarne sirovine kao što su: stari nakit, ostatak fotografskog materijala, ukrasni predmeti i posuđe, otopine od galvanizacije srebrom i dr.[7]

1.1.2. Primjena srebra

Srebro se najčešće koristi u obliku slitina, a najvažnije su one s cinkom, niklom i bakrom. Te slitine su otpornije na trošenje, jeftinije su i čvršće u odnosu na čisto srebro. Najveća količina srebra koristi se za izradu kovanog novca, nakita, posuđa, pribora za jelo, ogledala i ukrasnih predmeta. Zbog visoke električne i toplinske vodljivosti velika mu je uporaba u elektronici gdje se kao kontakt koristi mala količina srebra. Zanimljiva je upotreba srebra u proizvodnji slatkiša, gdje se listovi čistog srebra debljine nekoliko mikrometara koriste kao premazi za slatkiše. Što se tiče kemijske industrije, srebro je izvrstan katalizator koji se koristi za proizvodnju važnih kemikalija kao što je etilen oksid

i formaldehid. Obje su kemikalije važne za izradu različitih vrsta plastike. Od srebra se mogu izraditi i razne sprave i posude za rad s kemijskim elementima. Velika je važnost srebra u medicini gdje se koristi za izradu raznih lijekova te liječenje rana zbog svojih antibakterijskih svojstava. Kako bi se osigurala potpuna sterilnost, u nekim bolnicama su mnogi predmeti posrebreni, pa čak i ograde kreveta i druge stvari koje pacijent dodirne. Zbog sposobnosti halogenida srebra da se reduciraju do metala, uz prisustvo svijetlosti, primjenu srebra i njegovih legura može se pronaći i u fotografskoj industriji. Najveći proizvođači srebra danas su: Australija, Peru, Kanada, SAD, Meksiko, Čile, Kina, i Poljska. [8]

1.2. DISPERZNI I KOLOIDNI SUSTAVI

1.2.1. Disperzni sustavi

Heterogeni sustavi s jednom fazom (heterogenom ili homogenom) raspoređenom u mediju (tekućem, plinovitom ili čvrstom) na način da su raspršene čestice međusobno odvojene nazivaju se disperzni sustavi. Fino razdijeljena faza zove se disperzna faza, a faza u kojoj su čestice disperzne faze raspršene naziva se disperzno sredstvo. [9]

Disperzni sustavi se dijele prema:

- Veličini dispergiranih čestica i
- Obliku dispergiranih čestica

Prema veličini dispergiranih čestica, disperzni sustavi se dijele na:

- Grubo disperzne sustave – sustavi gdje je veličina čestica disperzne faze reda veličine preko 200 nm. Primjer takvog sustava je pijesak + voda.
- Koloidno disperzne sustave – sustavi u kojima je veličina disperzne faze veličine koloida, odnosno dimenzija od 1 – 200 nm. Primjer koloidnog sustava je deterdžent + voda.
- Prave otopine – sustavi gdje je veličina čestice manja od 1 nm. Otopina NaCl i vode je primjer prave otopine.

S obzirom na oblik, disperzni sustavu mogu se podijeliti na:

- Laminarno disperzni sustav - čestice oblika tankih listića.
- Fibrilarno disperzni sustav – čestice štapićastog oblika i oblika vlakna.

- Korpuskularno disperzni sustav – čestice potpuno okruglog oblika.

Suma površine čestica disperzne faze u odnosu na sumu njihovog volumena definira se kao stupanj disperzije, koji se može izračunati koristeći sljedeću formulu:

$$\text{Stupanj disperzije} = \frac{\sum\text{površina}}{\sum\text{volumen}} \qquad (2)$$

Iz prethodne jednadžbe može se zaključiti da je stupanj disperzije u odnosu na dimenziju čestica obrnuto proporcionalan, odnosno manje čestice imaju veći stupanj disperzije. [10]

1.2.2. Koloidni sustavi

Disperzni sustavi se mogu nazvati koloidnim ako barem jedna faza sadrži čestice dimenzija između 1 – 200 nm. Iako im gustoća može biti i nekoliko puta veća od gustoće vode, ove koloidne čestice nemaju mogućnost odijeljivanja iz vode procesima sedimentacije i filtriranja. Zbog malih dimenzija nisu vidljive optičkim mikroskopom, te ne dolazi do taloženja već one lebde u otopini praveći koloidnu otopinu.

Uzimajući u obzir agregatno stanje disperznog sredstva i faze, koloidne sustave može se podijeliti na emulzije, pjene, gelove, koloidne otopine ili solove te tekuće ili krute aerosole.

- Emulzija – kapljevina fino dispergirana u drugoj kapljevini.
- Gel – tekućina raspršena u krutini.
- Solovi – krutina raspršena u tekućini.
- Pjena – plin dispergiran u kapljevini.
- Kruti aerosoli – krutina dispergirana u plinu.
- Tekući aerosoli – tekućina raspršena u plinu.

Koloidne čestice s obzirom na ponašanje koloidno raspršene faze i disperznog sredstva u sustavu, može se podijeliti na liofobne i liofilne. Liofobne čestice ne pokazuju afinitet prema disperznom sredstvu, dok liofilne čestice pokazuju afinitet prema disperznom sredstvu.

Koloidni sustavi koriste se u različitim industrijama, uključujući proizvodnju lijekova, prehrambenih i poljoprivrednih proizvoda, kozmetike, boje, a sve veću primjenu pronalaze u građevinarstvu, farmaciji, medicini, kemijskoj industriji i dr. [11]

1.2.3. Svojstva koloidnih sustava

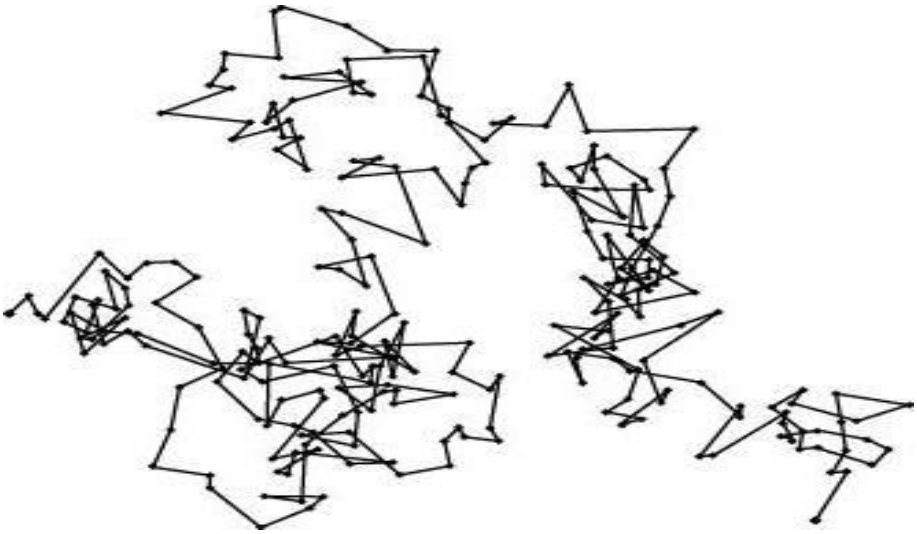
1.2.3.1. Tyndallov efekt

Tyndallov efekt predstavlja optičko svojstvo koloida. Kada snop svjetlosnih zraka prolazi kroz koloidnu otopinu, stvara se svjetlosni stožac čiji se vrh nalazi na mjestu ulaska zrake svijetlosti, a širi se duž putanje zrake kroz nehomogeni medij. Ovo raspršivanje svijetlosti koje je u obliku osvijetljenog stošca poznato je kao Tyndallov fenomen. Pri pojavi Tyndallovog efekta, otopina koloida izgleda mutno kada se promatra okomito na zraku. Gustoća dispergiranih čestica i frekvencija svijetlosti utječu na količinu raspršenja. Za razliku od koloidnih sustava u kojima je vidljiv Tyndallov efekt, prave otopine ne pokazuju tu pojavu, pa se nazivaju "optički prazne otopine". Primjer pojave Tyndallovog efekta je prodiranje zraka sunca kroz otvor u zamračenu sobu, što rezultira raspršivanjem svijetlosti na površini koloidnih čestica. [12] Na slici 2. prikazana je pojava Tyndallova efekta pri prolazu laserske zrake kroz koloidnu suspenziju.

Slika 2. Prikaz pojave Tyndallovog efekta pri prolazu laserske zrake kroz koloidnu suspenziju. [13]

1.2.3.2. Brownovo gibanje

Brown je prvi primijetio da se čestice u disperznom sustavu brzo gibaju i mijenjaju smjer. Brownovo gibanje karakteristično je za koloidne sustave. Čestice koloida često prave male pravocrtne pomake prilikom svog gibanja. Uzrok gibanja je disperzija čestica koloida u disperznom sredstvu uz pomoć slučajnih kolizija s ostalim molekulama i atomima. Na brzinu gibanja znatno utječu: temperatura, viskoznost uzorka i veličina čestice, oblik čestice i svojstva fluida. Smanjenjem veličine čestice i povećavanjem temperature dolazi do povećavanja Brownovog gibanja. [14] Prikaz Brownova gibanja koloidnih čestica u disperznom sustavu prikazan je na slici 3.



Slika 3. Prikaz Brownova gibanja koloidnih čestica u disperznom sustavu. [15]

Koloidne čestice pokazuju i električna svojstva radi pojave površinskog naboja. Zbog neravnomjerne raspodjele naboja unutar čestice i na njihovoj površini, koloidne čestice u vodi se ponašaju kao istovrsno električno nabijene što uzrokuje njihovo međusobno odbijanje i nemogućnost flokulacije. [14]

1.3. KOLOIDNO SREBRO

Jedno od najaktivnijih područja suvremenih istraživanja koja se bave sintezom, dizajnom i rukovanjem novim materijalima, posebice metalnih nanočestica je nanotehnologija. Riječ nano ima više implikacija u mnogim područjima istraživanja zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika kao što je visok omjer površine i volumena. Sinteza nanočestica različitih oblika, kemijskog sastava i veličina čini temeljno istraživanje u području nanokemije, gdje razlika u veličini i obliku nastoji promijeniti svojstva same čestice. Zbog svojih specifičnih svojstava došlo je do velike primjene metalnih nanočestica u području obrade tekstilnog otpada, poljoprivrede, obrade i pročišćavanja voda, medicine i kozmetike. Uz sve pozitivne karakteristike, nanočestice srebra vrlo lako dospijevaju u okoliš tijekom transporta, proizvodnje, pranja i odlaganja proizvoda koji sadrže čestice srebra. Iako se vjeruje da je srebro netoksično za stanice sisavaca, sve je više dokaza da nanočestice srebra mogu uzrokovati štetne učinke na vodene i kopnene životinje. [16]

Koloidno srebro je tekuća suspenzija mikroskopskih čestica srebra koja je dovoljno mala da prođe kroz membrane stanice i lako se apsorbira u tijelu. Suspenzija sadrži dva oblika srebra: ione srebra (75-99%) i čestice srebra (1-25%). Da bi otopina bila idealno koloidna mora sadržavati samo čestice srebra. Sredinom devedesetih godina 20. stoljeća steklo je popularnost i od tada se koristi kao alternativni lijek u liječenju akni, lišajeva, gljivičnih infekcija, dijabetesa i cistitisa, a može ubiti mnoge bakterije, mikroorganizme i viruse. Prevelika konzumacija srebra može dovesti do pojave argirije, odnosno pojave plavičaste nijanse, što je rezultat viška srebra u organizmu (slika 4). Ukoliko dođe do te pojave, potrebno je smanjiti ili potpuno zaustaviti unos koloidnog srebra. [2]

Slika 4. Pojava argirije zbog prekomjernog uzimanja koloidnog srebra [17]

1.4. METODE DOBIVANJA KOLOIDNOG SREBRA

1.4.1. Elektrokemijske metode

Dva osnovna načina dobivanja koloidnog srebra elektrokemijskim putem su LVDC (engl. Low Voltage Direct Current – niski napon istosmjerne struje) i HVAC (engl. High Voltage Alternate Current - visoki napon izmjenične struje). Metoda visokog napona izmjenične struje (HVAC – engl. High Voltage Alternate Current) često se koristi za proizvodnju velikih količina koloidnog srebra, dok se LVDC (engl . Low Voltage Direct Current – niski napon istosmjerne struje) metoda primjenjuju u laboratorijskim uvjetima.[2]

Kod metode niskog napona istosmjerne struje (LVDC - engl . Low Voltage Direct Current) koristi se istosmjerni napon u rasponu od 20 do 30 V, dvije srebrene elektrode, žice čistoće srebra 99,99%, plastična ili staklena čaša, spojni vodovi od izvora istosmjerne struje do elektroda i destilirana voda. Postupak se vodi do pojave žute maglice između elektroda (što obično traje od trideset do šezdeset minuta) i nakon još deset minuta proces se prekida. Elektrode se potom ostave deset minuta u otopini na mračnom mjestu. Na ovaj način se dobiva koloidno srebro odgovarajuće kvalitete. Kvaliteta proizvoda ovisi o čistoći i kvaliteti materijala i vode te o faktorima kao što su kvaliteta zraka u prostoriji i intenzitet svijetlosti. Cilj je dobiti koncentraciju srebra od 3 do 5 ppm, okruženu samo česticama vode. Za dobivanje čestica veličine od 1 do 40 nm, važno je regulirati gustoću struje koja se kontrolira mjerenjem jakosti struje. Mjerenje jakosti struje i napona kontrolira se digitalnim multimetrom. Prevelika gustoća struje može rezultirati izbacivanjem cijelih komadića elektrode u otopinu, a poželjno je da u otopinu dolaze što sitnije čestice. [2,18]

1.4.2. Fizikalne metode

Najvažniji postupci dobivanja koloidnog srebra fizikalnom metodom su isparavanje-kondenzacija i laserska ablacija, a od drugih značajnih spominju se električna radijacija, gama iradijacija i litografija.[19,20] Ove metode najčešće ne koriste redukcijsko sredstvo ili stabilizator, a mogu se koristiti i primjenjivati uz još neku dodatnu metodu. Fizikalne metode imaju neke prednosti, ali i mane u odnosu na druge metode dobivanja koloidnog srebra. Prednost fizikalnih metoda u odnosu na kemijske je ravnomjerna raspodjela nanočestica i odsutnost onečišćenja otapala, a nedostatak im je što cijevne peći koje se koriste pri atmosferskom tlaku zauzimaju dosta prostora. Također, za zagrijavanje se

koristi velika količina električne energije i tako se povećava temperatura oko samog materijala te je potrebno dosta vremena da dođe do toplinske stabilnosti. Da bi se izbjegli navedeni problemi poželjno je koristiti manji keramički grijač za isparavanje materijala, a paru koja isparava može se hladiti prikladnom brzinom zbog temperaturnog gradijenta koji je strmiji u blizini površine koja se zagrijava u odnosu na gradijent u peći.[19,21]

Metoda laserske ablacije koristi se pri sintetiziranju metalnih materijala većih dimenzija u otopini. Prednost ove metode u odnosu na druge fizikalne metode je odsutnost potrebe za kemijskim reagensima u otopini, što rezultira dobivanjem čistog metalnog koloida pogodnog za daljnje primjene. Parametri koji utječu na učinkovitost laserske ablacije i karakteristiku dobivenih nanočestica srebra su valna duljina lasera, trajanje laserskih impulsa i trajanje ablacije. [22]

1.4.3. Kemijske metode

Koloidno srebro većinom se dobiva kemijskom redukcijom pomoću organskih i anorganskih redukcijskih sredstava. Najčešće korišteni reducensi su elementarni vodik, natrijev borohidrid ($NaBH_4$), natrijev askorbat, Tollensov reagens, poli(etilen-glikol), natrijev citrat, N,N-dimetilformamid (DMF) i dr. Ovi reducensi reduciraju srebrove ione Ag^+ u elementarno srebro Ag. [19]

$$Ag^+ + 1e^- \rightarrow Ag \qquad E^o = + 0{,}799\ V \qquad (3)$$

Sitne čestice elementarnog srebra aglomeriraju u oligomere, što na kraju rezultira formiranjem čestica koloidnog srebra.

Vrlo je važna uporaba stabilizatora koji ograničavaju rast čestica, sprječavanju taloženje i aglomeraciju te gubitak površinskih svojstava.

Od drugih kemijskih metoda za proizvodnju nanočestica srebra u upotrebi su i metoda gama zračenja, sintetska biološka metoda, metoda elektronskog zračenja i dr. [20]

1.5. ZELENA SINTEZA

Nova pouzdana i ekološki prihvatljiva tehnika pod nazivom „zelena kemija“ pojavila se posljednjih godina, a zadatak joj je uklanjanje i smanjenje štetnih učinaka koji se javljaju tijekom proizvodnje. Ova tehnika je vrlo pouzdana i brza jer ne koristi toksične kemikalije

i ne zahtjeva upotrebu visokih temperatura, visokih tlakova i energije, te je pogodna za sintezu velikih razmjera.

Biosinteza nanočestica sve je više privlačna zbog potrebe za razvojem ekološki učinkovitijih tehnologija pri sintezi materijala, te zbog toga se češće istražuju metode zelene sinteze koje koriste prirodne spojeve kao redukcijske agense poput meda, bijelog šećera, ekstrakta mirisne metvice, šećera dobivenog iz kukuruza, sericina dudovog svilca i dr. Dijelovi biljke kao što je korijen, stabljika, cvijet i lišće koriste se za sintezu različitih oblika metalnih nanočestica. [23]

Metalne nanočestice kao što su zlato, srebro, nikal, titanov oksid, bakar, magnetit i platina sintetizirane su i istraživane pomoću prirodnih resursa. Na slici 5. prikazana je primjena zelene sinteze. [22]

Slika 5. Značajke primjene zelene sinteze

1.5.1. Biološke metode

Brojni literaturni izvori ukazuju na ekološku neprihvatljivost sinteze nanočestica kemijskim i fizikalnim putem zbog korištenja opasnih i toksičnih kemikalija koje uništavaju okoliš. Već dugi niz godina istražuje se potencijal biljaka kao izvor lijekova, a zaključeno je da imaju jaku biološku aktivnost. Shodno tome, krenula je potraga za biološkim metodama dobivanja koloidnog srebra. [19]

Istraživanja pokazuju da organizmi poput gljiva, biljaka, bakterija i biomase imaju velik utjecaj pri proizvodnji nanočestica metala, te su ključan čimbenik u današnjim

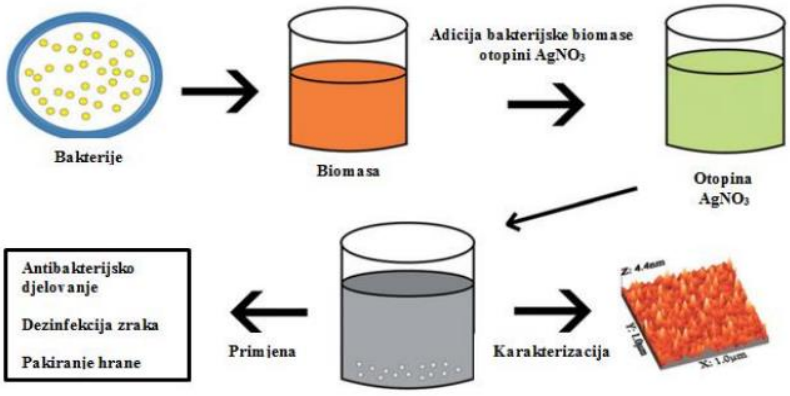
suvremenim istraživanjima nanotehnologije. Molekule nastale od živih organizama djeluju kao stabilizirajući i redukcijski agensi, što dodatno potvrđuje njihovu važnost.

Biljke imaju veliku prednost u primjeni nad pojedinim sojevima bakterija zbog svoje lake dostupnosti. Uz to, velik spektar aktivnih funkcionalnih skupina koje biljke sadrže potiče da se srebrovi ioni reduciraju. [24]

1.5.1.1. Sinteza pomoću bakterija

Prva sinteza metalnih nanočestica pomoću bakterija (slika 6) provedena je pomoću bakterijskih sojeva otpornih na srebro, a koje su uzgajane u visokim koncentracijama srebrova nitrata. Bakterijski soj koji je korišten bio je Pseudomonas stutzeri AG259, a izoliran je iz rudnika srebra. Dokazano je da srebrove nanočestice sintetizirane ovim putem imaju veličinu od 5-200 nm. [25]

Nanočestice je moguće sintetizirati iz suspenzije stanične kulture ili iz biomase, a bakteriogena sinteza može biti unutarstanična ili izvanstanična. Pojedini mikroorganizmi mogu opstati uz visoke koncentracije metalnih iona i u takvim uvjetima rasti, a to je rezultat njihove otpornosti prema tom metalu. Mehanizmi koji stvaraju otpor su, bioakumulacija, nedostatak sustava za transport metala, stvaranje izvanstaničnog kompleksa, biosorpcija, promjena topljivosti i toksičnosti redukcijom ili oksidacijom itd. Nedostatak bakteriogene sinteze je velika raspodjela nanočestica i spora sinteza, te su zbog toga istražene sinteze metalnih nanočestica pomoću gljivica. [26]



Slika 6. Sinteza nanočestica pomoću bakterija [27]

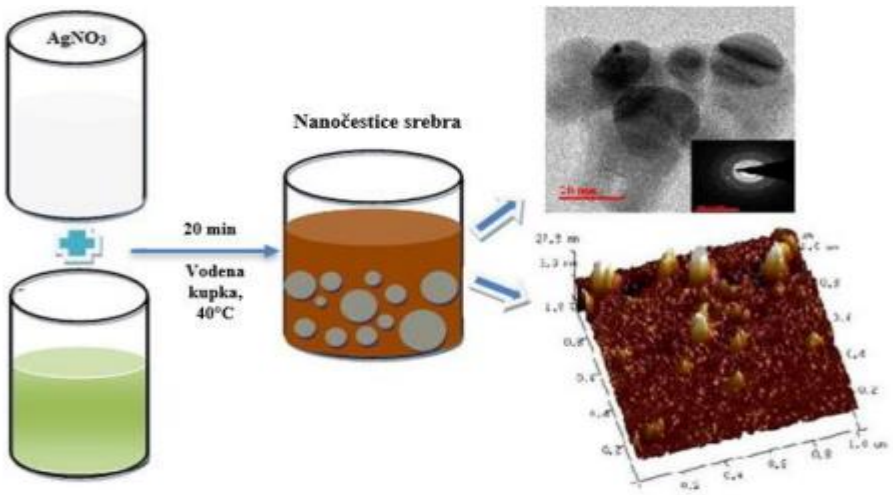
1.5.1.2. Sinteza pomoću gljivica

Zbog sposobnosti bioakumulacije metala, velikog kapaciteta vezanja i unutarstaničnog unosa, gljivice su bile zanimljive za biološku proizvodnju metalnih nanočestica. One su nešto jednostavnije za rukovanje u laboratorijskom procesu u odnosu na bakterije. Gljivice izlučuju veliku količinu enzima koji se koristi za smanjenje iona srebra, a potiču stvaranje stabilnih nanočestica. Stabilnost nanočestica proizlazi iz otpuštanja proteina tijekom blokade čestica, a veću stabilnost u otopini imaju čestice pri višim pH vrijednostima.

Biosinteza nanočestica srebra sa staničnim ekstraktima uočena je kod Fusarium acuminatum Ell. I Ev. (USM-3793). Dobivene nanočestice sferičnog su oblika s promjerom od 13 nm, a dobivene su u razdoblju od 15-20 min.

Phanerochaete chrysosporium, poznata kao gljivica bijele truleži, također može formirati nanočestice i reducirati ione srebra. Nanočestice dobivene pomoću gljivice bijele truleži najčešće su piramidalnog oblika i različitih veličina, a uočena je i heksagonalna struktura.

Uz već spomenute, Aspergillus flavus, Penilcillium fellutanum, Penicillium sp. J3, Coriolus versicolor samo su neke od gljivica koje mogu proizvesti nanočestice srebra.[19,26] Slika 7. prikazuje sintezu nanočestica pomoću gljivica.



Slika 7. Sinteza nanočestica pomoću gljivica [27]

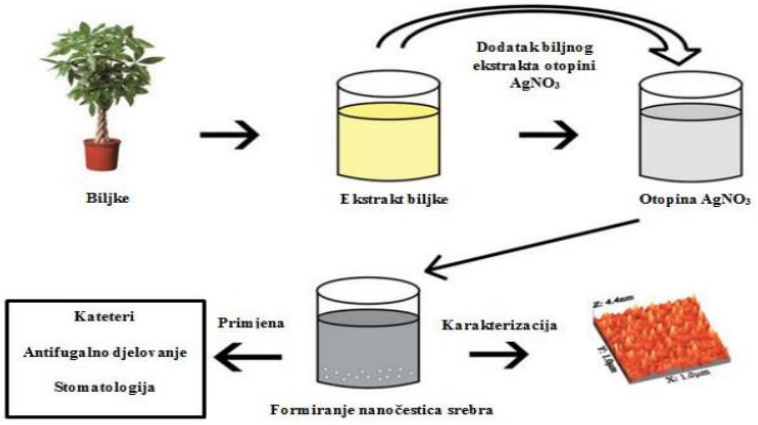
1.5.1.3. Sinteza pomoću biljaka

Za sintezu nanočestica srebra pomoću biljaka koriste se razni dijelovi biljaka poput plodova, korijena, lišća, cvijeća i podanaka. Prednost korištenja ove metode je što su biljke lako dostupne, sigurne za rukovanje i imaju velik izbor aktivnih sredstava.

Biljke se skupljaju s različitih područja, ispiru se s običnom, a potom destiliranom vodom kako bi se uklonile nečistoće. Nakon toga suhi dijelovi biljaka se melju u prah ili se mogu koristiti neobrađeni za proizvodnju ekstrakta. Za proizvodnju ekstrakta, prah ili usitnjeni dijelovi biljaka miješaju se s alkoholom ili deioniziranom vodom i zagrijavaju pri 60 °C nekoliko sati. Do sinteze nanočestica dolazi dodavanjem biljnog ekstrakta u otopine s različitim pH vrijednostima pri različitim temperaturama. Kada je sinteza uspješno provedena, smjesa se centrifugira da se nanočestice odvoje, ispire otapalima i suši pri niskim temperaturama.

Sinteza nanočestica srebra pomoću biljaka (slika 8) predstavlja ekonomski opravdanu i vrijednu opciju za proizvodnju većih količina nanočestica. Također, često se za biosintezu nanočestica koristi ekstrakt Camellie sinesis (zelenog čaja) i ekstrakti lista crnog čaja. Ekstrakt zelenog čaja koristi se kao reducens i stabilizator, a biomolekule fenolne kiseline prisutne u ekstraktu zelenog čaja odgovorne su za formiranje nanočestica. Nanočestice nastale iz ekstrakta crnog čaja su stabilne i različitih oblika, poput kugle, štapića i prizme.

Vrste biljaka koje se koriste za sintezu nanočestica su: Aloe vera, Eclipta albe, Skimmia laureole itd.[26,28]



Slika 8. Sinteza nanočestica srebra pomoću biljaka[27]

1.5.1.4. Sinteza pomoću kvasca

U prirodi se često nailazi na kvasac Saccharomyces cerevisiae, poznatiji kao „pekarski kvasac“. Koristi se u tradicionalnoj ili industrijskoj fermentaciji vina, piva i kruha. Danas je kvasac važno sredstvo za liječenje dijareje uzrokovane antibioticima, a neizostavan je dodatak prehrani. Ako se ioni srebra dodaju kulturi kvasca, tijekom inkubacije, može se primijetiti promjena boje uzorka iz bezbojne u crveno smeđu. Do intenzivne crveno-smeđe boje došlo je nakon 72 sata inkubacije. Promjena boje dokazuje stvaranje nanočestica srebra, gdje se zaključuje da je kvasac Saccharomyces cerevisiae pokazao potencijal za izvanstaničnu sintezu nanočestica srebra. [29]

1.5.1.5. Sinteza pomoću meda

Med je dobar kandidat za sintezu koloidnog srebra te je predmet istraživanja znanstvenika širom svijeta. Prirodni med sadrži mnogo vitamina i minerala, a pokazuje izvanredna ljekovita svojstva (analgetska, antibakterijska te protuupalna). Zbog svojih antioksidativnih svojstava, med sadrži sastojke koji mogu spriječiti nastajanje raka. Koristi se kao lijek za opekline i čireve, a pomaže i u zacjeljivanju rana jer djeluje umirujuće kada se primjenjuje na otvorene rane.

Zaključuje se, da se uz upotrebu prirodnog meda, jeftinog redukcijskog sredstva, može proizvoditi nanočestice koloidnog srebra zelenom sintezom bez prisutnosti opasnih i toksičnih otapala. [30,31]

Posebnu pažnju privlači manuka med, dobiven iz stabla manuke (Leptospermum scoparium), porodice mirtovki. Porijeklo manuke dolaze iz Novog Zelanda i Australije, a danas se smatra najkvalitetnijim i najskupljim medom. Koristi se u tradicionalnoj medicini kao sedativ i kao lijek za zacjeljivanje rana, a zbog svog kemijskog sastava dobar je i za čišćenje infekcija, opeklina i traumatskih rana. Trenutno se proučavaju glavni bioaktivni spojevi u medu manuke koji su odgovorni za njegovu biološku aktivnost.

Nova otkrića mogla bi podržati povećanu upotrebu manukinog meda u medicini kože, a predstavljali bi dodatnu ekonomsku vrijednost koja bi pogodovala pčelarima u njihovoj proizvodnji. [32] Cvijet manuke prikazan je na slici 9.

Slika 9. Cvijet manuke [33]

1.6. KARAKTERIZACIJA SREBRA

Koncentracija srebra u otopini jedno je od važnijih svojstava koloidnog srebra, a označava sumu koncentracija koloidnih čestica srebra i iona srebra. Izražava se obično u ppm (parts per milion), a odgovara koncentraciji izraženoj kao miligram srebra po kubičnom decimetru (mg/dm^3).

Kod mjerenja koncentracije srebra bitno je znati koliki dio od ukupnog srebra se sastoji od iona srebra, a koliki dio od čestica srebra. U većini procesa oko 75 do 99% ukupnog srebra prisutno je u obliku iona, a jako mali dio čine čestice srebra. [34]

Osnovne karakteristike koloidnog srebra su: zeta potencijal, Tyndallov efekt, prisutnost onečišćenja, električna vodljivost, veličina čestice, pH koloidne otopine i dr.

Koncentraciju koloidnog srebra dobivenog elektrolitičkim putem moguće je procijeniti pomoću Faradayevog zakona. Mjeri se količina naboja koja je potrošena kroz elektrolit za vrijeme trajanja procesa elektrolize. Za preciznije određivanje koncentracije koloidnog srebra u upotrebi su uređaji poput PWT (engl. Pure Water Tester; tester čiste vode) i TDS (engl. Total Dissolved Solids; ukupno otopljene krutine). [2]

Osim koncentracije srebra u otopini, karakterizacija koloidnog srebra provodi se uz pomoć mikroskopije s atomskom silom (AFM), ultraljubičaste i vidljive (UV–Vis) spektroskopije, pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), rendgenske difrakcije X-zraka (XRD), dinamičkog raspršenja svijetlosti (DLS), transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) itd.

Ultraljubičasta i vidljiva (UV-Vis) spektroskopija koristi se za određivanje veličine nanočestica koloidnog srebra. Širi pik označava veću raspodjelu i veličinu čestica.

DLS tehnika koristi se pretežito za mjerenje veličine nanočestica srebra jer može izmjeriti svega nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara. Ova metoda mjeri frekvencije svijetlosti tijekom interakcije s česticama srebra različitih veličina. Manja čestica označava veći pomak u frekvenciji svijetlosti.

Metoda za istraživanje agregacije i disperzije nanočestica materijala, uz njihov oblik, strukturu i veličinu je AFM tehnika. Kontaktni način, povremeni kontaktni način i beskontaktni način su tri različita načina skeniranja.

XRD analizom se provjerava čistoća dobivenih čestica, a transmisijskom elektronskom metodom (TEM) određuje oblik i veličina čestica. [2,35,3]

1.7. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA

U svrhu određivanja bakterioloških ispitivanja, bakterije je potrebno uzgajati van njihove prirodne sredine. Taj postupak naziva se kultivacija, a provodi se na mikrobiološkim podlogama. One predstavljaju kompleks u kojem su prisutni svi elementi potrebni za razmnožavanje, rast, razvoj te odvijanje svih fizioloških procesa neke bakterije.

Danas se za pripremu koriste dehidrirane podloge u prahu ili granulama, a pripremaju se jako brzo i jednostavno. Sintetičke hranjive podloge sadrže kemijske sastojke čije su količine točno određene i uravnotežene za normalan razvoj određene mikrobiološke vrste. Hranjive podloge se pripremaju prema uputama proizvođača dehidriranih podloga.[36]

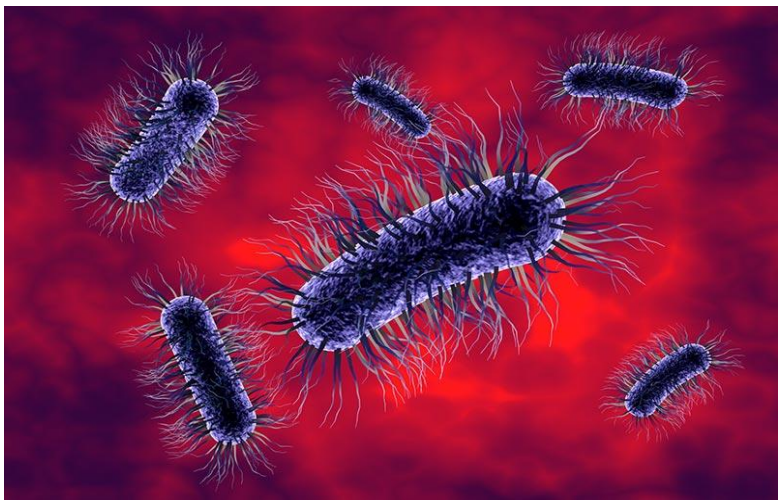
1.7.1. Escherichia Coli

Štapićasta bakterija Escherichia coli (slika 10) je gram – negativni kokobacil, što znači da bojenjem po gramu dobiva crvenu boju. Ova bakterijska vrsta pripada porodici enterobakterija. Prvi ju je opisao znanstvenik Theodor Escherich 1885. godine kada ju je izolirao iz stolice novorođenčeta. Duljina ove bakterije je od 2–6 μm, a širina 1-3 μm. Kreće se pomoću specifične rotacije trepetljika i za njezin rast nije potreban kisik, ali ga

može koristiti ako je prisutan. Bakterija sadrži i dobro razvijenu kapsulu oblika sluzave opne koja je štiti od nepovoljnih uvjeta.

Pretežito raste na selektivnim i običnim hranjivim podlogama gdje nakon osamnaest sati inkubacije pri 37 °C dolazi do nastajanja velikih, okruglih i sjajnih kolonija.

Može preživjeti u vodi, na zemlji i na različitim predmetima. Ova bakterija je dio normalne crijevne flore, a njezino pretjerano razmnožavanje može dovesti do infekcije. Infekcija može biti povezana s cijelim tijelom. Escherichia coli je mikroorganizam koji je najčešći uzročnik infekcije kod čovjeka, te mu se zbog toga posvetilo mnogo pažnje.



Slika 10. Escherichia coli [37]

Kao ljudski patogen najčešće se prenosi putem kontaminirane vode, nedovoljno opranog povrća, mliječnih proizvoda itd. Obično koncentracija Escherichia coli po gramu fekalija u ljudskom organizmu doseže 10^7-10^9, a kod životinja 10^4-10^6. [38]

Teške infekcije najčešće zahvaćaju djecu. Tijekom 2011. godine, u srednjoj Europi, zarazilo se više od 4 000 ljudi. U Hrvatskoj, točnije u Splitu, zabilježen je slučaj febrilnog kolitisa, pri čemu je Escherichia coli identificirana kao uzročnik infekcije, a izolirana je iz zagađene lubenice.[39]

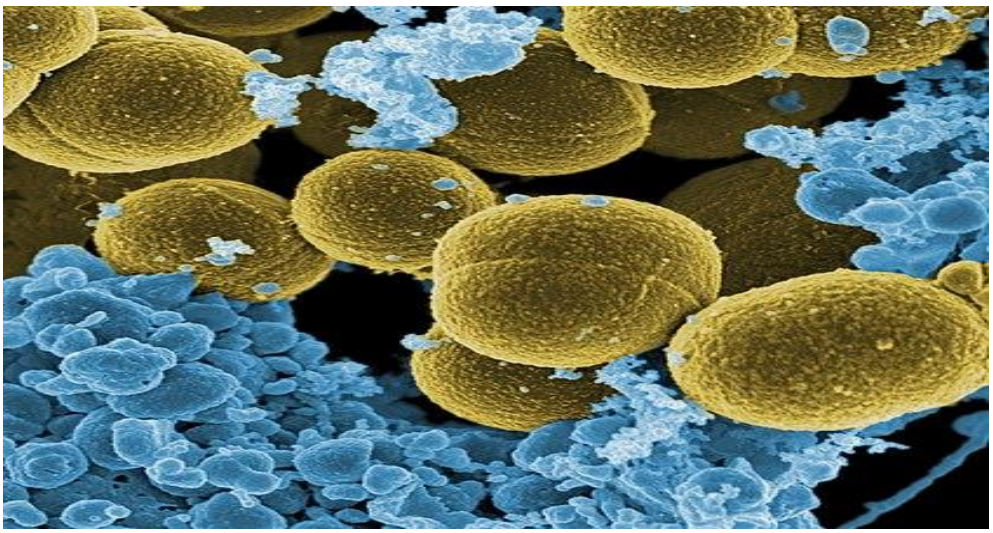
1.7.2. Staphylococcus aureus

Bakterija Staphylococcus aureus (slika 11) najvažniji je ljudski patogen iz roda Staphylococcus. To je gram – pozitivna kuglasta bakterija, širine oko 1 μm, široko je rasprostranjena u prirodi, a najviše na koži, kožnim žlijezdama i sluznicama ljudi, ptica i sisavaca. [40]

Mogu rasti uz prisustvo i bez prisustva kisika, pri temperaturama između 18 °C i 40 °C. Nakon dijeljenja, stanice ostaju povezane, te nastaju nakupine slične grozdovima. U tekućim podlogama mogu se naći u parovima, pojedinačnim stanicama ili u obliku kratkih lanaca. Mlade kulture bakterija su striktno gram – pozitivni, dok stari koki postaju gram – negativni.

Stafilokoki su otporni na loše uvjete okoliša. Otporni su na visoke temperature, ekstremne pH vrijednosti, sušenje, visoke koncentracije soli i šećera te na djelovanje mnogih antibiotika i dezinfekcijskih sredstava. Mogu se pronaći u zraku zatvorenog prostora, prašini i namirnicama.

Najčešće se prenose zrakom i dodirom, a izvor infekcija pretežito je medicinsko osoblje i osobe koje se bave proizvodnjom i distribucijom hrane. [34]



Slika 11. Staphylococcus aureus [41]

2. EKSPERIMENTALNI RAD

2.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE I APARATURA

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije i aparatura:

- med od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja, proizvođača OPG Milković (Zagreb, Hrvatska)
- srebrov nitrat, RECTAPUR, 99,5% proizvođača BDH Prolabo (UK)
- destilirana voda, specifične električne provodnosti 5 μS/cm
- natrijev karbonat bezvodni, Na_2CO_3, proizvođača Kemika d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- podloga Mueller Hinton Broth, proizvođača Biolife (Milano, Italija)
- 0,002% otopina 2,3,5-trifeniltetrazolij klorid, proizvođača Merck KGaA (Darmstadt, Njemačka)
- pufer pH 4,00
- pufer pH 7,00
- reaktor (staklena čaša od 250 mL)
- Erlenmeyerova tikvica od 1000 mL
- epruvete od 130 mm
- menzura
- nastavci na klipne pipete
- magnetna miješalica, IKA, RCT basic (Njemačka)
- kapaljka za dokapavanje
- analitička vaga, Mettler -Toledo Balance, model ME104E (Švicarska)
- konduktometar, proizvođača Schott (Mainz, Njemačka)
- digitalni pH metar, handylab pH/LF 12, proizvođača Schott (Mainz, Njemačka)
- pH metar, model SevenDirectSD20, proizvođača Mettler -Toledo (Švicarska)
- konduktometar, model HI5522, proizvođača Hanna (UK)
- pumpa za razlijevanje, model Integra dose it P910 (Švicarska)
- klipna pipeta od 100 μL
- denzimat, model bioMerieux, (Francuska)
- autoklav, Tuttnauer-3870ELVD (Francuska)
- bireta za dokapavanje srebrova nitrata

- izvor laserske zrake za provjeru prisutnosti koloida u otopini
- DLS (Dynamic Light Scattering) uređaj, Litesizer DLS 500, proizvođača Anton Paar (Austrija)
- UV-Vis spektrofotometar, Cary 60 UV-Vis, Agilent (SAD)
- SEM (Scanning Electron Microscope) uređaj, JSM-7610FPlus Schottky Field Emission, Jeol (Japan)

Na slici 12. prikazan je med od primorskog vriska (Satureja montana) s dalmatinskog područja proizvođača OPG Milković.

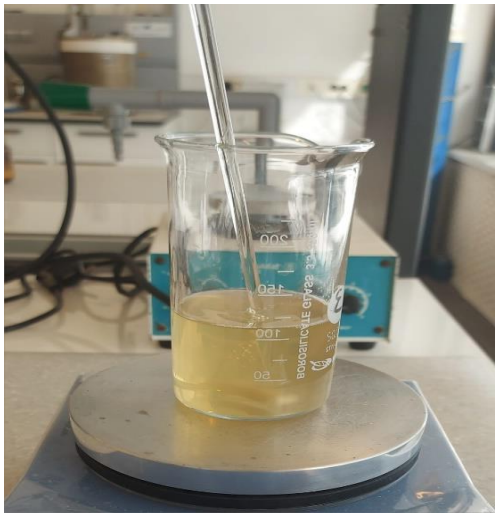
Slika 12. Med od primorskog vriska (Satureja montana)

2.2. PRIPRAVA OTOPINE SREBRA POTREBNE ZA ZELENU SINTEZU KOLOIDNOG SREBRA

Za sintezu koloidnog srebra pripremljene su otopine srebrova nitrata, otopina meda od primorskog vriska s dalmatinskog područja i otopina natrijeva karbonata za naknadno podešavanje pH vrijednosti otopine. Otopina meda od vriska pripremljena je miješanjem 30,0501 g meda od vriska s 80 mL destilirane vode (slika 13) do ujednačenog sastava pri temperaturi od 20 °C. Miješanje je provedeno na magnetnoj miješalici uz 600 okretaja/min.

Peludnu analizu izvršio je Stanko Montana, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju, gdje je utvrđeno više od

20% peludi vriska (Satureja montana). Specifična električna provodnost otopine iznosila je 272 µS/cm, a pH vrijednost 3,53. Za pripravu otopina natrijeva karbonata i srebrova nitrata određenih koncentracija izračunata je masa natrijeva karbonata i srebrova nitrata.



Slika 13. Priprava otopine meda miješanjem meda od vriska i destilirane vode

Proračun:

Budući da su vrijednosti molarne mase, koncentracije i volumena srebrova nitrata zadane, moguće je izračunati množinu i masu potrebnog srebrova nitrata i natrijevog karbonata za pripravu otopine zadane koncentracije pomoću formula (4) i (5).

Potrebna masa natrijevog karbonata:

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \times V \qquad (4)$$

$$n = \frac{m}{M} \rightarrow m = n \times M \qquad (5)$$

$c(Na_2CO_3) = 0{,}1\ mol/dm^3$

$V(Na_2CO_3) = 0{,}1\ dm^3$

$M(Na_2CO_3) = 105{,}00\ g/mol$

$n(Na_2CO_3) = c(Na_2CO_3) \cdot V(Na_2CO_3)$

$n(Na_2CO_3) = 0{,}1\ mol/dm^3 \cdot 0{,}1\ dm^3$

$n(Na_2CO_3) = 0,01$ mol

$m(Na_2CO_3) = n(Na_2CO_3) \cdot M(Na_2CO_3)$

$m(Na_2CO_3) = 0,01 \text{ mol} \cdot 150,00 \text{ g/mol}$

$m(Na_2CO_3) = 1,0599 \text{ g} \approx 1,06 \text{ g}$

Potrebna masa natrijevog karbonata je 1,06 grama.

Potrebna masa srebrova nitrata:

$c(AgNO_3) = 0,001 \text{ mol/dm}^3$

$V(AgNO_3) = 0,1\text{dm}^3$

$M(AgNO_3) = 169,87$ g/mol

$n(AgNO_3) = c(AgNO_3) \cdot V(AgNO_3)$

$n(AgNO_3) = 0,001 \text{ mol/dm}^3 \cdot 0,1 \text{ dm}^3$

$n(AgNO_3) = 0,0001$ mol

$m(AgNO_3) = n(AgNO_3) \cdot M(AgNO_3)$

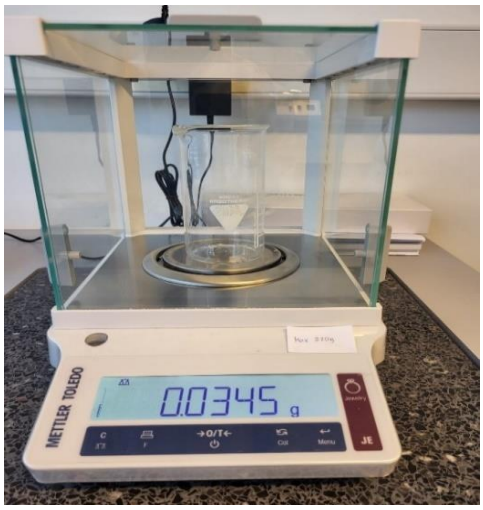
$m(AgNO_3) = 0,0001 \text{ mol} \cdot 169,87 \text{ g/mol}$

$m(AgNO_3) = 0,016987$ g

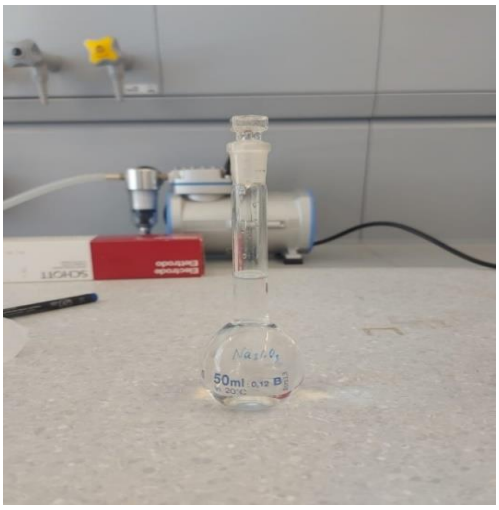
Potrebna masa srebrova nitrata je 0,016987 g

Nakon što se izračuna mase natrijeva karbonata i srebrova nitrata, uspješno su priređene i njihove otopine.

Vaganje srebrova nitrata, kao i pripremljena otopina srebrova nitrata prikazani su na slici 14. i 15.)



Slika 14. Vaganje srebrova nitrata

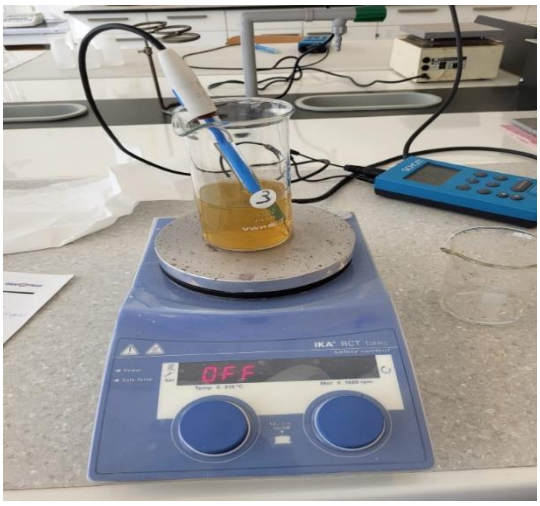


Slika 15. Pripremljena otopina srebrova nitrata

2.3. ZELENA SINTEZA KOLOIDNOG SREBRA

Sinteza uzorka započela je s dodavanjem 80 mL otopine meda u staklenu čašu u kojoj se nalazi magnetno miješalo i dokapavanjem 20 mL otopine srebrova nitrata. pH vrijednost iznosila je 3,53, te je željena pH vrijednost (pH = 6) postignuta dodavanjem kap po kap prethodno pripremljene otopine natrijeva karbonata.

Dokapavanje natrijeva karbonata u otopinu koloidnog srebra (slika 16) izvršeno je vrlo oprezno zbog mogućeg naglog porasta pH vrijednosti otopine koloidnog srebra pri jako malim količinama otopine natrijeva karbonata. Na dobivenom uzorku ispitano je postajanje koloidnih čestica srebra Tyndallovim efektom (slika 17), nakon čega je uzorak pohranjen na tamno mjesto.



Slika 16. Podešavanje pH vrijednosti u otopini koloidnog srebra dokapavanjem natrijeva karbonata

Slika 17. Dokaz postojanja koloidnih čestica srebra prolazom laserske zrake kroz koloidnu suspenziju

2.3.1. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA

Nakon sinteze koloidnog srebra pomoću meda od primorskog vriska, određena je antibakterijska učinkovitost na bakterijama Escherichia coli i Staphylococcus aureus.

Najprije je pripremljena dvostruka koncentracija Mueller Hinton Brotha u Erlenmayerovoj tikvici, otapanjem 42 g uzorka u 1 L demineralizirane vode. (Slika 19) Korišteni Mueller Hinton Broth prikazan je na slici 18.

Slika 18. Mueller Hinton Broth

Slika 19. Otopina Mueller Hinton Brotha

Potom je bilo potrebno pripremiti kulture testnih mikroorganizama. (Slike 20 i 21)

Za pripremu kulture testnih mikroorganizama Escherichia coli NCTC 13216 i Staphylococcus aureus ATCC 25923 te za razrjeđivanje početne suspenzije mikroorganizama koristio se Mueller Hinton bujon proizvođača Biolife (Milano, Italija).

Prema konzistenciji radi se o tekućoj hranjivoj podlozi čiji je osnovni sastojak bujon ili mesna voda.

Sastav dehidrirane podloge:

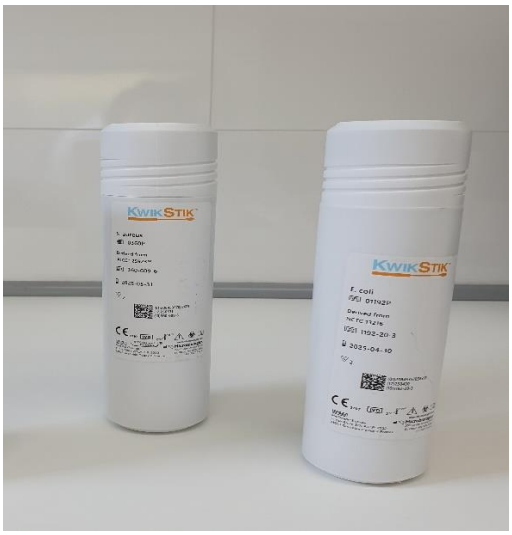
- goveđi ekstrakt 2,0 g/L
- kiseli digest kazeina 17,5 g/L
- škrob 1,50 g/L

Izrada započinje vaganjem, potom slijedi otapanje u demineraliziranoj vodi, sterilizacija, hlađenje i razlijevanje. Prije korištenja potrebno je kalibrirati preciznu vagu s umjerenim utezima te demineraliziranoj vodi odrediti pH vrijednost i specifičnu električnu provodnost. Prije mjerenja specifične električne provodnosti i pH vrijednosti vrši se kalibracija konduktometra i pH metra u dvije točke. Izmjerene vrijednosti moraju biti u suglasju s normom HRN EN ISO 11133:2014 Mikrobiologija hrane, hrane za životinje i vode – Priprema, proizvodnja, skladištenje i ispitivanje hranjive podloge.

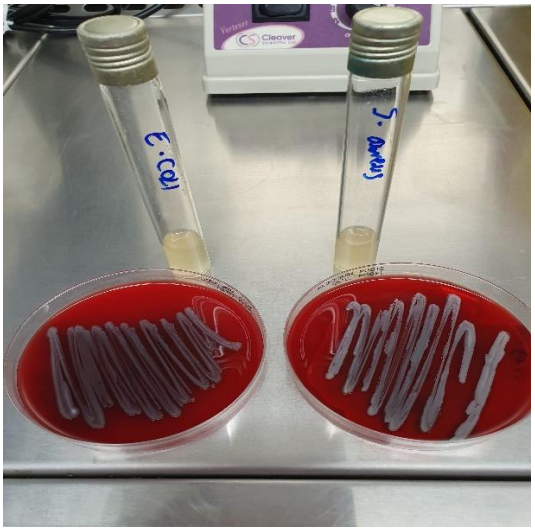
Odvaže se 22 g podloge Mueller Hinton bujon na 1000 mL demineralizirane vode u Erlenmayerovu tikvicu. Na tikvicu se stavlja Al – folija, stisne se i stavlja u autoklav na sterilizaciju. Podloga se sterilizira 10 min pri temperaturi od 121 °C.

Sterilizacija se obavlja u atmosferi zasićene vodene pare pod tlakom, a prisustvo zraka tj. zračnih jastuka unutar komore autoklava smanjuje efikasnost autoklaviranja. Prije razlijevanja mjeri se pH vrijednost podloge i prema potrebi korigira na određenu vrijednost sukladno uputama proizvođača. Korekcija se vrši sa sterilnom 1 mol/L HCl ili 1 mol/L NaOH. pH vrijednost korištene podloge izmjerene s umjerenim pH metrom iznosila je 7,21 te nije bilo potrebe za korigiranjem.

Mueller Hinton bujon se razlijeva pomoću pumpe za razlijevanje, a prije razlijevanja se vrši kalibracija pumpe za odabrani volumen s podlogom koja se razlijeva.

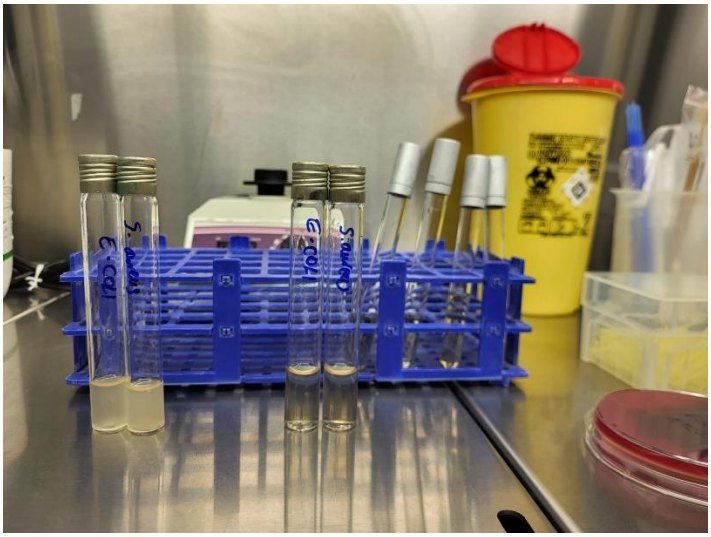


Slika 20. E. coli i S. aureus



Slika 21. Kulture testnih mikroorganizama

Potom su pripremljene suspenzije mikroorganizama (S. aureus i E. coli) 0,5 McF koja odgovara broju 10^8 cfu/mL (slika 22). Razrjeđenja testnih mikroorganizama provode se s MHB (Mueller Hinton Brothom), a njihove koncentracije se provjeravaju na denzimatu.



Slika 22. Suspenzije mikroorganizama

Najveće koncentracije mikroorganizama su u prvoj epruveti gdje je koncentracija mikroorganizama 10^8 cfu/mL (colony-forming unit /mililiter) tj. broj nastalih bakterijskih kolonija po mililitru). Razrjeđenjem se dolazi do 10^3 cfu/mL.

U nultu jažicu ide **+ kontrola** s 100 µL suspenzije 0,5 McF (McFarland), 10^8 S. aureus (provjera radi li testni soj)

- U prvu jažicu dodati 100 µL suspenzije 0,5 McF, 10^8 S. aureus.
- U drugu jažicu dodati 11,1 µL iz prve + 100 µL MHB, 10^7
- U treću jažicu dodati 11,1 µL iz druge + 100 µL MHB, 10^6
- U četvrtu jažicu dodati 11,1 µL iz treće + 100 µL MHB, 10^5
- U petu jažicu dodati 11,1 µL iz četvrte + 100 µL MHB, 10^4
- U šestu jažicu dodati 11,1 µl iz pete + 100 µL MHB, 10^3, promiješati i izbaciti 11,1 µL iz šeste.
- U sedmoj jažici je – kontrola, 100 µL MHB.

U mikropločice sa svakim razrjeđenjem dodati + 100 µL otopine Ag. Otopine srebra su pripremljene iz $AgNO_3$.

Pripremljene podloge s bakterijama idu na inkubaciju pri 37 °C 24h.

Potom su napravljene suspenzije mikroorganizama (E. coli) 0,5 McF koja odgovara broju cfu/mL 10^8.

U nultu jažicu ide + kontrola s 100 µL suspenzije 0,5 McF, 10^8 E. coli (provjera radi li testni soj).

- U prvu jažicu dodati 100 µL suspenzije 0,5 McF, 10^8 E. coli
- U drugu jažicu dodati 11,1 µL iz prve + 100 µL MHB, 10^7
- U treću jažicu dodati 11,1 µL iz druge + 100 µL MHB, 10^6
- U četvrtu jažicu dodati 11,1 µL iz treće + 100 µL MHB, 10^5
- U petu jažicu dodati 11,1 µL iz četvrte + 100 µL MHB, 10^4
- U šestu jažicu dodati 11,1 µL iz pete + 100 µL MHB, 10^3, promiješati i izbaciti 11,1 µL iz šeste jažice
- U sedmoj jažici je - kontrola, 100 µL MHB.

U mikropločice sa svakim razrjeđenjem dodati + 100 µL otopine Ag. Otopine srebra su pripremljene iz $AgNO_3$.

Slika 24. prikazuje izgled mikropločice prije inkubacije i dodatka TTC-a.

Pripremljene podloge s bakterijama idu na inkubaciju pri 37 °C 24 h.

+ kontrola, bakterijska suspenzija bez antimikrobnog agensa

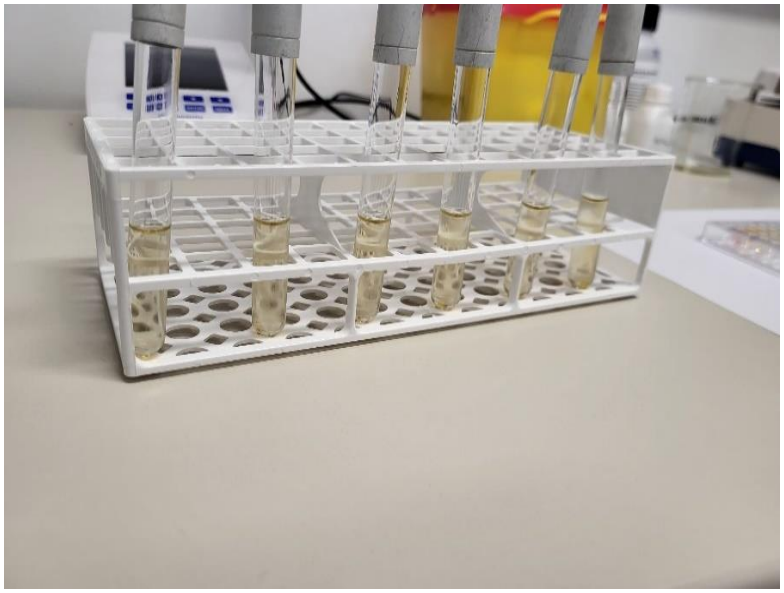
- kontrola, 100 µL Mueller Hinton bujon bez bakterijske suspenzije i bez antimikrobnog agensa.

Nakon 24 h inkubacije, u jažice je dodano 40 µL TTC (0,02 mg/mL otopine 2,3,5-trifeniltetrazolij klorid, pripremljene otapanjem 0,002 g TTC u 100 mL demineralizirane vode te autoklaviranjem). Na slici 23. prikazana je otopina TTC-a.

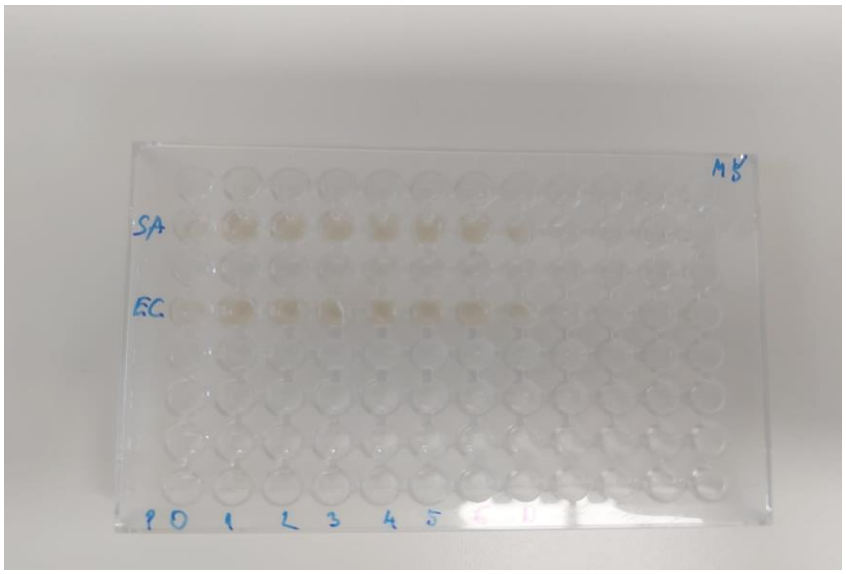
TTC se koristi se kao dodatak u mediju kulture za označavanje biološke aktivnosti mikroorganizama, jer se bezbojni oblik otopine reducira na netopljivi crveni pigment, trifenil formazan, koji je lako vidljiv.

Dodatkom te otopine nakon pola sata od dodavanja dolazi do promjene boje u mikropločici od intenzivno žute do promjene u crveno-rozu koja je pozitivna (slika 25).

Također (+) reakcija se tumači i kroz stvaranje crvenih precipitata na dnu mikropločice kao i zamućenje bujona u mikropločici.



Slika 23. Otopina TTC-a



Slika 24. Mikropločica prije inkubacije i dodatka TTC-a

Slika 25. Mikropločica nakon dodatka TTC-a

2.4. INSTRUMENTI ZA ANALIZU KOLOIDNOG SREBRA

2.4.1. UV–Vis spektrofotometar

UV–Vis spektrofotometar koristi se za određivanje apsorbancije nastalih koloida uz korištenje Agilent ksenonske lampe kao izvor svjetlosti. Mjerenja se obavljaju bez fotodegradacije uzoraka. Ovom analizom se potvrđuje nastanak nanočestica srebra. Radi se s različitim tekućim i krutim uzorcima. Softver uređaja može se prilagoditi različitim zahtjevima analize. Za preciznija mjerenja u djeliću sekunde uređaj koristi senzor na osnovi optičkih vlakana. Visoko rezolucijski rezultati garantiraju precizna mjerenja malih volumena i važnih uzoraka. Na slici 26. prikazan je korišteni Uv-Vis spektrofotometar Agilent cary 60 UV–Vis Spectrophotometer.

Slika 26. Uv-Vis spektrofotometar Agilent cary 60 UV–Vis Spectrophotometer (SAD)

2.4.2. SEM (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE)

Pretražna elektronska mikroskopija je tehnika koja se koristi za dobivanje slika visoke razlučivosti i detaljnih podataka o površini uzoraka. To je vrsta elektronske mikroskopije koja koristi fokusirani snop elektrona za skeniranje površine uzorka i generiranje slika u mnogo većoj razlučivosti u usporedbi s optičkom mikroskopijom. Razlučivost SEM instrumenata može se kretati od < 1 nanometra do nekoliko nanometara. Elektronski mikroskop projicira i skenira fokusirani tok elektrona preko površine uzorka i prikuplja signale proizvedene korištenjem detektora. Elektroni u snopu stupaju u dodir s atomima unutar uzorka, proizvodeći različite signale koji se kasnije koriste za dobivanje

informacija o topografiji i sastavu površine. JSM-7610FPlus Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope prikazan na slici 27. korišten je za dobivanje podataka o površini uzorka.

Slika 27. JSM-7610FPlus Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope

2.4.3. DLS (Dynamic Light Scattering)

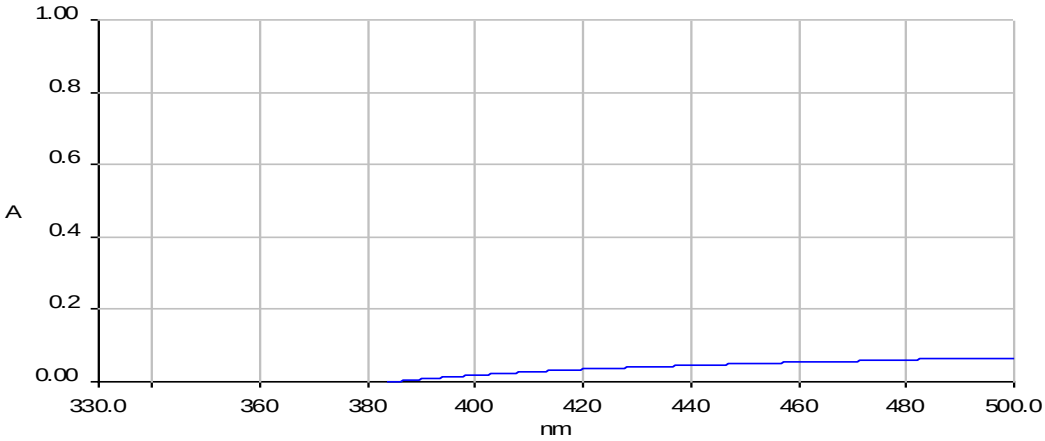
DLS tehnika koristi se pretežito za mjerenje veličine nanočestica srebra jer može izmjeriti svega nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara. Ova metoda mjeri frekvencije svijetlosti tijekom interakcije s česticama srebra različitih veličina. U dinamičkom raspršenju svijetlosti (DLS), svijetlost prolazi kroz uzorak, a raspršena svijetlost se otkriva i bilježi pod određenim kutom. Vremenska ovisnost raspršenog intenziteta otkriva koliko se čestice brzo kreću. Iz ovih informacija može se izračunati prosječna veličina čestice kao i veličine čestice. Na slici 28. prikazan je upotrebljeni DLS uređaj.

Slika 28. Dynamic Light Scattering Litesizer 500

3. REZULTATI

3.1. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

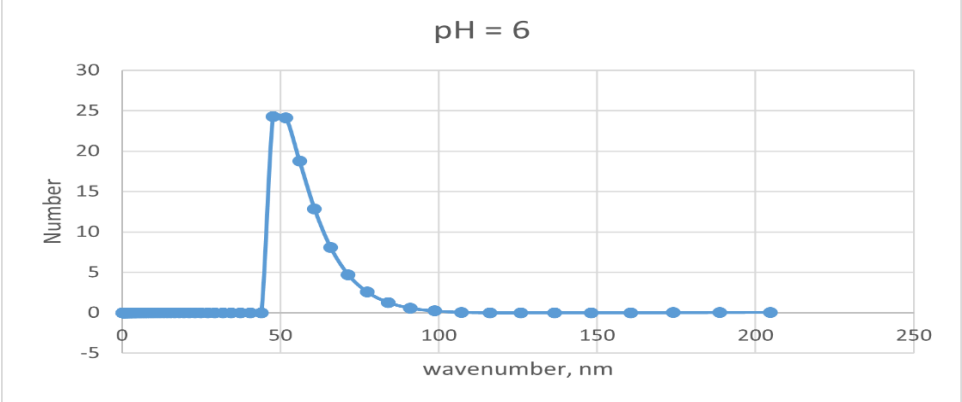
Nakon sinteze koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska izvršena je spektrofotometrijska analiza koristeći Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometar. Apsorpcija nanočestica srebra mjerena je pri valnim duljinama od 330 do 500 nm. Rezultati spektrofotometrijske analize prikazani su grafički na slici 29.



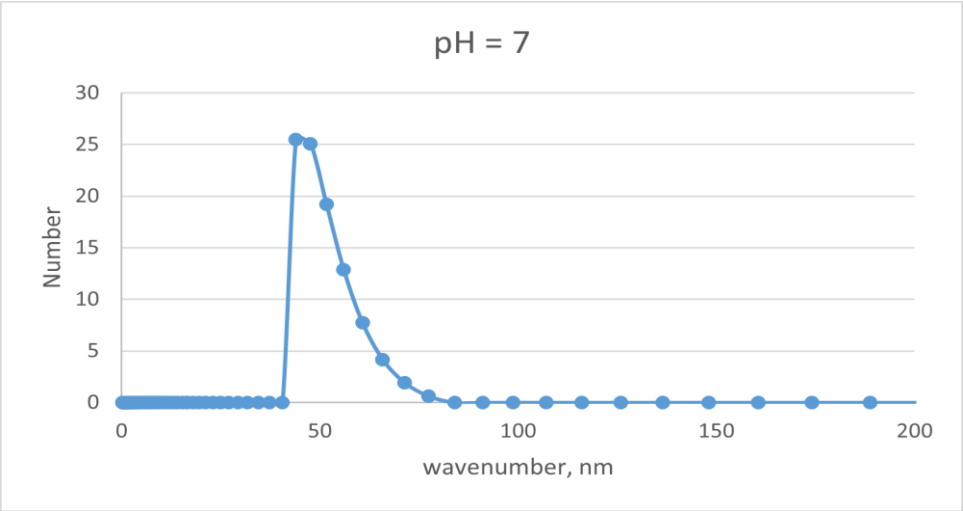
Slika 29. Apsorpcijski spektar koloidnog srebra dobiven pri pH = 6

3.2. DLS (Dynamic Light Scattering) ANALIZA

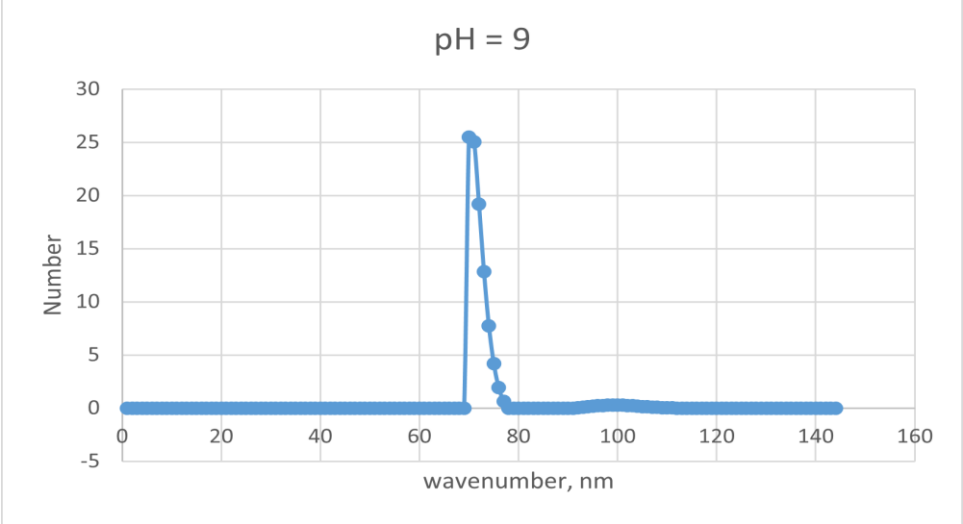
DLS metoda je korištena za određivanje raspodjele veličine nanočestica u uzorku. Na slikama 30, 31 i 32 prikazane su veličine čestica pri različitim pH vrijednostima.



Slika 30. DLS analiza koloidnog srebra sintetiziranog pri pH = 6



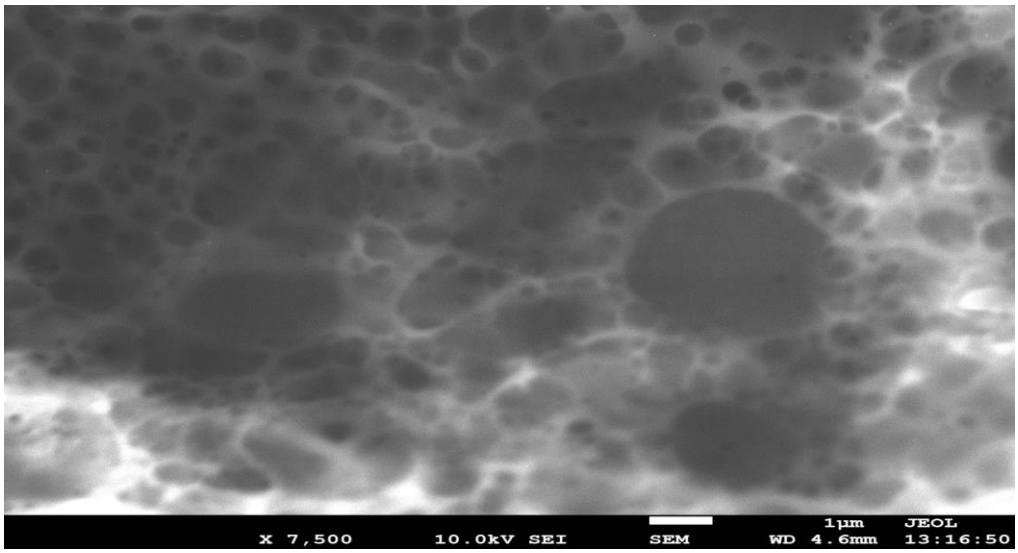
Slika 31. DLS analiza koloidnog srebra sintetiziranog pri pH = 7



Slika 32. DLS analiza koloidnog srebra sintetiziranog pri pH = 9

3.3. SEM (Scanning Electron Microscope) ANALIZA

Za dobivanje podataka o veličini i obliku nanočestica srebra korištena je SEM (Scanning Electron Microscopy) metoda. Na slici 33. prikazana je SEM analiza koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska, dok je na slici 35. prikazana SEM analiza koloidnog srebra sintetiziranog pomoću zelenog čaja.



Slika 33. SEM analiza koloidnog srebra dobivenog pomoću meda od primorskog vriska

3.4. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA

Nakon sinteze koloidnog srebra određena je njegova antibakterijska učinkovitost na bakterije Escherichia coli NCTC 13216 i Staphylococcus aureus ATCC 25923. U tablici 1. prikazani su rezultati antibakterijskog djelovanja koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska na ove dvije bakterije pri različitim koncentracijama.

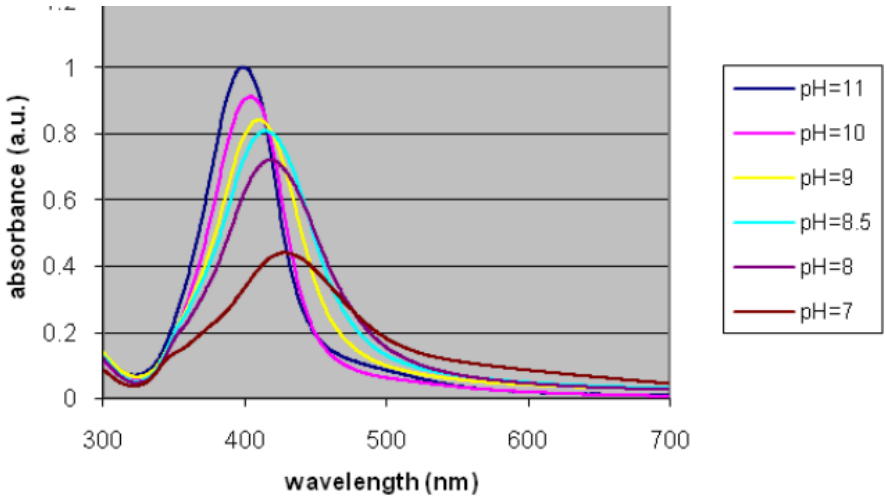
Tablica 1. Očitovanje rezultata antibakterijske učinkovitosti koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska

SUSPENZIJE MIKROORGANIZAMA	MHB								
	+ kontrola	10^8 1	10^7 2	10^6 3	10^5 4	10^4 5	10^3 6	- Kontrola	
OTOPINA Ag	+	+	+	+	-	-	-	-	S. aureus ATCC 25922
	+	+	+	-	-	-	-	-	E. coli NCTC 13216

4. RASPRAVA

4.1. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

Rezultati UV–Vis spektroskopije pokazuju na slici 29. kako pojava apsorpcijskog spektra nije uočljiva. Razlog tome je pH vrijednost otopine meda koja je bila 3,53, a dodatkom natrijeva karbonata podešena je na 6. Međutim, ni to nije bilo dovoljno da bi spektrometrija prikazala jasno uočljiv spektar. Iz dostupne literature potvrđeno je da pri pH vrijednosti 7 i više spektar je jasno vidljiv zajedno s apsorpcijskim maksimumima. Na slici 34. jasno su prikazani spektri pri različitim pH vrijednostima.[42]



Slika 34. UV-Vis spektroskopija pri različitim pH vrijednostima[43]

Iz ovog se može zaključiti da lužnata sredina više pogoduje većoj koncentraciji koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana).

4.2. DLS (Dynamic Light Scattering) ANALIZA

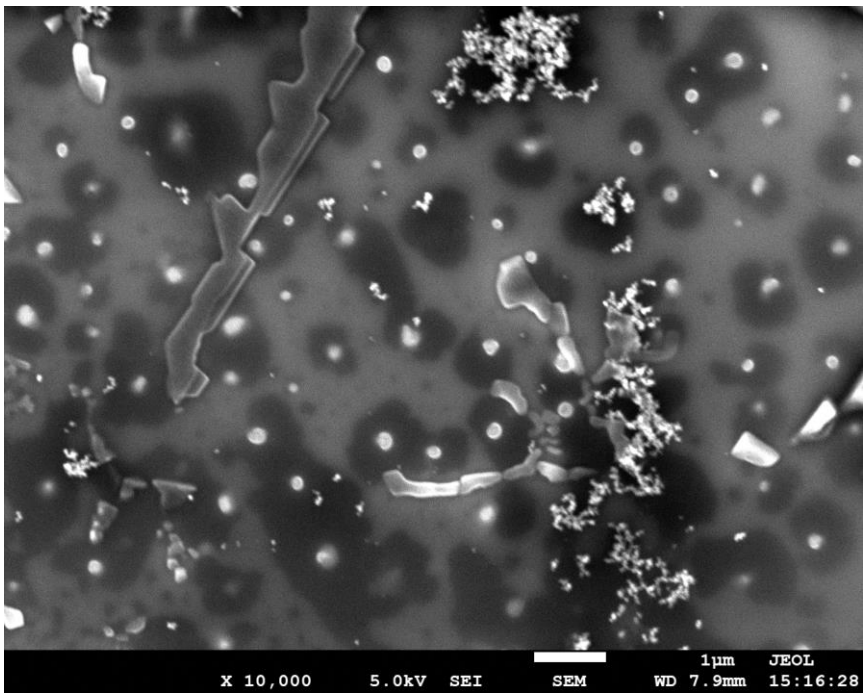
U ovom radu određen je indeks polidisperznosti (PDI) i promjer čestica. PDI vrijednost koristi se za opisivanje širine raspodjele veličine čestice i daje informacije o polidisperznosti uzorka. Sustav je polidisperzan ako je PDI vrijednost veća od 0,400. U analiziranoj otopini PDI vrijednost iznosi 0,2181, što ukazuje na to da su čestice relativno ujednačene, odnosno smatraju se monodisperznim sustavom jer je PDI vrijednost manja od 0,4. Na slikama 30, 31 i 32 uočavaju se oštri pikovi što je potvrda monodisperznog

sustava. Pri pH = 6 vidi se da je promjer čestica oko 50-60 nm, dok je pri pH = 9 promjer oko 70 nm. Zaključuje se da se promjer čestice povećava pri povišenju pH vrijednosti.

4.3. SEM (Scanning Electron Microscope) ANALIZA

Rezultati SEM analize pri karakterizaciji koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska teško su uočljivi. Problem zbog kojeg se nije uspjelo doći do jasnijih slika površine uzorka je bio u medu koji se osušio i koji je prekrivao čestice srebra, ali i zbog njegove viskoznosti. Na slici 33. teško je uočiti čestice koloidnog srebra.

Za razliku od meda koji se osuši pa prekriva čestice srebra, slika 35. pri približno istom povećanju jasno prikazuje čestice koloidnog srebra dobivene redukcijom pomoću zelenog čaja. Na toj slici jasno se vide bijele točkice koje prikazuju čestice koloidnog srebra, ali su vidljivi i kristali koji su zapravo onečišćenja zelenog čaja. Čestice srebra su pravilnog oblika i odgovarajućih veličina što je potvrđeno DLS analizom, odnosno PDI vrijednosti.



Slika 35. SEM analiza koloidnog srebra dobivenog pomoću zelenog čaja[43]

4.4. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI KOLOIDNOG SREBRA SINTETIZIRANOG POMOĆU MEDA OD PRIMORSKOG VRISKA

U tablici 1. prikazan je utjecaj koloidnog srebra na bakterije pri različitim koncentracijama. Koncentracija koloidnog srebra je uvijek bila ista, dok su se koncentracije bakterija mijenjale. Minus (-) prikazuje da nema više prisutnosti bakterija, odnosno da je koloidno srebro dobiveno pomoću meda od primorskog vriska uništilo bakterije u tim koncentracijama. Iz tablice 1. vidi se da je otopina koloidnog srebra uspješnija za soj gram - negativne bakterije tj. Escherichiu coli jer je uništila bakterije do koncentracije 10^7 cfu/mL, dok ima nešto slabije djelovanje na soj gram - pozitivne bakterije tj. Staphylococcus aureus gdje ne postoji prisutnost bakterija do koncentracije od 10^6 cfu/mL. Sve koncentracije iznad toga imale su prisustvo bakterija što se uočava promjenom boje te vidljivom točkicom na dnu same jažice.

Ovime se dokazuje antibakterijsko djelovanje koloidnog srebra sintetiziranog pomoću meda od primorskog vriska.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata i rasprave mogu se izvući sljedeći zaključci:

- Upotrebom meda od primorskog vriska (Satureja montana), kao redukcijskog sredstva, mogu se proizvesti nanočestice srebra zelenom metodom čime se izbjegava prisutnost opasnih i otrovnih otapala i nastajanje štetnog otpada.
- Primjenom DLS metode procijenjena je veličina nanočestica srebra i kreće se u rasponu od 50-70 nm.
- Primjenom UV-Vis metode na spektrogramu nije dobiven uočljiv pik zbog niske pH vrijednosti otopine koloidnog srebra.
- Zbog viskoznosti meda i njegove suhoće, sloj osušenog meda je prekrivao čestice koloidnog srebra i stoga je SEM tehnikom teško dobiti jasnu sliku veličine i oblika koloidnih čestica srebra.
- Koloidno srebro sintetizirano pomoću meda od primorskog vriska (Satureja montana) ima antibakterijsko djelovanje tj. ubija bakterije Escherichiu coli do koncentracije 10^7 cfu/mL i Staphylococcus aureus do koncentracije 10^6 cfu/mL.

6. LITERATURA

1. S. K. Srikar, D. D. Giri, D. B. Pal, P. K. Mishra, S. N. Upadhyay, Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review, Green and Sustainable Chemistry 6 (2016) 34-56.

2. P. Dabić, D. Barbir, Novi anorganski materijali, Laboratorijske vježbe, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2010, 12-14

3. A. Šileikaite, J. Puišo, I. Prosyčevas, S. Tamulevičius, Investigation of Silver Nanoparticles Formations Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Soduim Citrate, Material science (Medžiagotyra), 15 (2009), 21-27.

4. URL: https://www.enciklopedija.hr/clanak/srebro (15.3.2024.)

5. URL: http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ag/spojevi.html (15.3.2024)

6. URL: https://belgradeantiques.rs/srebro/ (15.3.2024.)

7. I. Filipović, S. Lipanović, Opća i anorganska kemija, II dio - Kemijski elementi i njihovi spojevi, Školska knjiga, Zagreb, 1995, 1079-1085.

8. URL: https://hr.a-gems.com/31826792-silver-history-properties-applications (16.3.224.)

9. P. Krolo, P. Dabić, D. Barbir, Praktikum iz tehnoloških procesa anorganske industrije, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.

10. A. Habuš, D. Stričević, S. Liber, Opća kemija 2, Profil, Zagreb, 2019.

11. R. Zsigmondy, The chemistry of the colloids, 1. izd., John Wiley & Sons Inc., New York, 1917.

12. R. Brdička, Osnove fizikalne kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1969., 740-783.

13. URL: https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/2251138/od-koloidnih-sustava-do-nanocestica.html (23.3.2024.)

14. L. Jakobek, Predavanja-fizikalna kemija, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

15. URL: https://hr.puntomarinero.com/physical-phenomena-brownian-motion/ (23.3.2024.)

16. T. Gupta, B. Dangi, N. Jain, G. Sharma , K. Khan, Green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial activity, International Journal of Creative Research Thoughts 6 (2018), 825-834.

17. URL: https://povijest.hr/jesteliznali/najbizarniji-medicinski-sindromi-koji-su-ikad-opisani/ (24.3.2024.)

18. N. L. Kildeby, O. Z. Andersen, R. E. Roge, T. Larsen, R. Petersen, J. F. Riis, Silver Nanoparticles, Aalborg university, Faculty of Physics and Nanotehnology, Aalborg, (2005), 13.

19. S. Iravani, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari, Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods, Research in Pharmaceutical Sciences 9 (2014) 385-406.

20. K. Maaz, Synthesis of Silver Nanoparticles - Fabrication, characterization and applications, IntechOpen, London (2018).

21. H. Oh, H. Noh, J. Ji, S. Kim, J. Jung, Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area, Journal of Aerosol Science 37 (2006), 1662-1670.

22. M. A. E. Aziz, M. A. Mahmoud, Y. Badr, M.I. Husseiny, Biosynthesis of gold nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa, Spectrochimica Acta Part A 67 (2006), 1003-1006.

22. G. Erdal, R. Güzel, Synthesis of silver nanoparticles, Intech Open, Rijeka, (2018).

23. J. Y. Song, and B. S. Kim, Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. Bioprocess and Biosystems Engineering, (2009) 32(1), 79-84.

24. Z. A. Ratan, M. F. Haidere, M. Nurunnabi, S. M. Shahriar, A. J. S. Ahmmad, Y. Y. Shim, J. Y. Cho, Green Chemistry Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Potential Anticancer Effects, Cancers 14 (2020) 855.

25. S. Gurunathan, K. Kalishwaralal, V. Deepak, S. R. Pandian, Gopalram, R. Vaidyanathan, Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 75 (2010), 335-341.

26. P. Rauwel, S. Küünal, S. Ferdov, E. Rauwe, A Review on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Morphologies Studied via TEM, https://doi.org/10.1155/2015/682749 (2014).

27. M. Rafique, I. Sadaf, M. S. Rafique, M. B, Tahir, A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 45 (2016) 1272-1291.

28. S. L. Rochum, A. Biswas, M. Selvaraj, B. Changmai, S. Lallianrawna, C. Vanlalveni, Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature, RSC Advances 11 (2021), 2804-2837.

29. S. Kaabipour, S. Hemmati, A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one -dimensional silver nanostructures, Beilstein J. of Nanotechnology, 2021, 12, str. 102-136.

30. C. Vanlalveni, S. Lallianrawna, A. Biswas, M. Selvaraj, B. Changmai, S. L. Rokhum, (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. RSC Advances, 11(2804-2837). https://doi.org/10.1039/D0RA09941D

31. J. M. Alvarez-Suarez, M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernández, L. Mazzoni, and F. Giampieri, The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey

32. C. J., Manley-Harris, M., & Molan, P. C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydrate Research, 344(8), 1050-1053.

33. URL: https://www.desertcart.uy/products/143944185-leptospermum-scoparium-winter-cheer-new-zealand-tea-tree-common-manuka-plant-in-9-cm-pot (10.4.2024.)

34. URL: https://www.silver-colloids.com/Papers/CSProperties.PDF (22.4.2024.)

35. G. M. Kontogeorgis, K. Søren, Introduction to applied colloid and surface chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 2016.

36. S. Duraković, Mikrobiologija hrane, hrane za životinje i vode – Priprema, proizvodnja, skladištenje i ispitivanje hranjive podloge, Prehrambena mikrobiologija, 1. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb (1991).

37. URL: https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html (25.4.2024.)

38. URL: https://kadulja.com/zdravlje/escherichia-coli/ (25.4.2024.)

39. S. Valenić, M. Abram, I. Mareković, T. Rukavina, J. Vraneš, Lj. Žmak, Medicinska mikrobiologija, Zagreb: Medicinska naklada, 2013. str. 259-361.

40. URL: https://www.zzjzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/964 (2.5.2024.)

41. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus (3.5.2024.)

42. M.K. Alqadi, O.A. abo noqtah, F.Y. Alzoubi, J. Alzouby, K. Aljarrah, pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction, Materials Science-Poland, 32(1), 2014, str. 107-111

43. M. Hrkać, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2024.

7. PRILOZI

7.1. Certifikat o analizi mikroorganizma - Staphylococcus aureus

Microbiologics

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus	**Quality Control Technologist:** Madison C Springer
Catalog Number: 0360	**Release Date:** 2023/06/26
Lot Number: 360-609**	
Reference Number: ATCC® 25923™*	
Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2025/05/31	

Performance

Macroscopic Features:	**Medium:**
Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)

See attached ID System results document.

Other Features/ Challenges: Results

(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive
(1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive
(1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
(1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm
(1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm
(1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm

Amanda Kuperus
Director of Quality Control
AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

A2LA ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

A2LA ACCREDITED
REFERENCE MATERIAL PRODUCER
CERT #2655.02

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	**High consistency:** The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a highconfidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	**Low consistency:** The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	**No consistency:** The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2023-06-13T10:50:50.888 MCS

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A8 (+++) (A)	360-609	Staphylococcus aureus	2.35

Comments:

N/A

7.2. Certifikat o analizi mikroorganizma - Escherichia coli

Microbiologics

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: Escherichia coli	**Quality Control Technologist:** Kalina E George
Catalog Number: 01192	**Release Date:** 2023/06/01
Lot Number: 1192-20**	
Reference Number: NCTC 13216	
Passage from Reference: 2	
Expiration Date: 2025/04/30	

Performance	
Macroscopic Features:	**Medium:**
Small, circular, entire edges, grey, glossy	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram negative rods	Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results	
(1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (weak)	Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

ACCREDITED
REFERENCE MATERIAL PRODUCER
CERT #2655.02

NCTC

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

BRUKER

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	**High consistency:** The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a highconfidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	**Low consistency:** The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	**No consistency:** The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2023-05-31T16:54:05.683 KEG

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B1 (+++) (A)	1192-20	Escherichia coli	2.48

Comments:

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

7.3. Certifikat razrjeđivača Mueller Hinton Brotha

Biolife Italiana S.r.l.

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

DEHYDRATED CULTURE MEDIA / TERRENI DI COLTURA IN POLVERE

PRODUCT/ PRODOTTO **MUELLER HINTON BROTH**

100 g	REF	401741 1
500 g	REF	401741 2
5000 g	REF	401741 4

Batch n° /Lotto n° PB4602
Expiry date / Data di scadenza 2026-02-28

MICROBIOLOGICAL PERFORMANCES / CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

INOCULATION METHOD: MIC: INOCULATION OF MICROPLATES WELLS FILLED WITH GENTAMICIN DILUTIONS MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION READING (MIC)

METODO DI SEMINA : MIC: INOCULO DEI POZZETTI DI UNA MICROPIASTRA IN CUI SONO INSERITE LE DIUIZIONI DI GENTAMICINA LETTURA DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

SUPPLEMENTATION / AGGIUNTE -

CONTROL STRAINS-INOCULATION METHOD CEPPI DI CONTROLLO- METODO DI SEMINA			INCUB. T°/ t / ATM	SPECIFICATIONS SPECIFICHE	RESULTS RISULTATI	
E. coli	ATCC 25922	MIC	37°C - 24 h -A			
Gentamicin	0,065 - 64 µg/ml			MIC 0,25 - 1,0 µg/ml	0,5	µg/ml
S.aureus	ATCC 25923	MIC	37°C - 24 h -A			
Gentamicin	0,065 - 64 µg/ml			MIC 0,12 - 1,0 µg/ml	0,18	µg/ml
P.aeruginosa	ATCC 27853	MIC	37°C - 24 h -A			
Gentamicin	0,065 - 64 µg/ml			MIC 0,5 - 2,0 µg/ml	2	µg/ml

PHYSICAL CHARACTERISTICS CARATTERISTICHE FISICHE	SPECIFICATIONS SPECIFICHE	RESULTS RISULTATI
CALCIUM /CALCIO	20 - 25 mg/L	22,7
MAGNESIUM / MAGNESIO	10 - 12,5 mg/L	11,2
ZINC / ZINCO	< 3 mg/L	1,4
GEL STRENGHT / FORZA DEL GEL g/cm^2	NA	
POWDER APPEARANCE / ASPETTO DELLA POLVERE	BEIGE, HOMOGENEOUS, FINE, FREE-FLOWING POWDER / FINE GRANULOMETRIA OMOGENEA, BEIGE	CONFORME
SOLUTION APPEARANCE / ASPETTO DELLA SOLUZIONE	PALE YELLOW, LIMPID / PAGLIERINO, LIMPIDO	CONFORME
MEDIUM APPEARANCE / ASPETTO DEL TERRENO PRONTO	PALE YELLOW, LIMPID / PAGLIERINO, LIMPIDO	CONFORME
pH (20-25°C)	7,3 ± 0,2	7,17
WEIGHT / PESO	100 g- 102 g / 500 g - 510 g / 5000 g - 5050 g	CONFORME
IN PROCESS CONTROLS / CONTROLLI DI PROCESSO	PROCESS SPECIFICATIONS / SPECIFICHE DI PROCESSO	CONFORME
LABELLING, PACKAGING / ETICHETTATURA, CONFEZIONE	PROCESS SPECIFICATIONS / SPECIFICHE DI PROCESSO	CONFORME

LEGENDA

A: AEROBIC INCUBATION / INCUBAZIONE IN AEROBIOSI

Doc. n° M 401741 Rev. 2A
Control N°/ N° del controllo 77863

Approved by Quality Control Manager / Approvato da Responsabile Controllo Qualità

Stefania Manzoni

Stefania Manzoni Date / Data 2022-02-24

This document has been released electronically (end of document) / Questo documento è stato rilasciato elettronicamente (fine del documento)

Biolife Italiana Srl, Viale Monza 272, 20128 Milano, Italia.

7.4. Certifikat indikatora 2, 3, 5-trifeniltetrazolij klorida (TTC-a)

Certificate of Analysis

1.08380.0000 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride for microbiology
Batch K54343180

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (perchloric acid titration, calculated on dried substance)	≥ 98	%	100	%
Identity (UV/VIS-Spectrum)	passes test		passes test	
Absorption maximum $\lambda_{max.}$ (water)	245 - 248	nm	245 - 248	nm
Spec. Absorptivity A 1%/1cm (λ_{max}; 0,01 g/l; water; calculated on dried substance)	≥ 770		797	
TLC-Test	passes test		passes test	
Loss on drying (70 °C; ≤ 1 hPa)	≤ 0.5	%	0.1	%
Suitability for testing the germinability of seeds	passes test		passes test	
Suitability for microbiology	passes test		passes test	

Date of release (DD.MM.YYYY) 13.05.2022
Expiry date (DD.MM.YYYY) 31.05.2025

Dr. Michael Memmel
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA The life science business of Merck KGaA, Darmstadt Page 1 of 1