
Ilija Anđelković

Poređenje fotokatalizatora Fe/TiO₂ i BiOBr kao potencijalnih prečišćivača vode od bakterija i njihov uticaj na razviće embriona *D. rerio*

Fotokatalizatori su materijali koji u vodenoj sredini, apsorpcijom elektromagnetnog zračenja, proizvode slobodne radikale. Slobodni radikali su visoko reaktivne čestice, za koje je poznato da pokazuju efikasno antimikrobno dejstvo. Zahvaljujući ovim hemijskim osobinama, moguća je primena fotokatalizatora kao potencijalnih sredstava u tehnologiji prečišćavanja vode. Cilj ovog rada je poređenje efikasnosti Fe/TiO₂ i BiOBr, kao antimikrobnih agenasa uz pomoć vidljivog dela spektra, na kulturama E. coli. Takođe, ispitan je efekat ovih materijala na preživljavanje i funkcionalno razviće embriona Danio rerio. Scavenger testom je utvrđeno prisustvo slobodnih radikala unutar suspenzije fotokatalizatora i ribljeg medijuma. BiOBr se pokazao kao efikasniji antimikrobni agens, pri čemu se najefikasnijom pokazala najviša testirana koncentracija – 0.125 g/dm³. Pokazana je veća toksičnost za Fe/TiO₂ nego za BiOBr, pa se na osnovu toga čini da bi dalja istraživanja trebalo usmeriti na BiOBr kao potencijalni agens u tehnologiji prečišćavanja voda.

Uvod

Jedan od značajnijih problema današnjice jesu bolesti prouzrokovane konzumiranjem neprečišćene ili nedovoljno prečišćene vode. Studija Svetske zdravstvene organizacije je pokazala da troje od desetoro ljudi nema pristup vodi bezbednoj za konzumiranje, što znači da je 2.1 mili-

jarda ljudi izložena ovom riziku (WHO 2017). Bakterije koje se prenose konzumiranjem neprečišćene vode izazivaju razne bolesti, poput kolere, bacilarne dizenterije i druge hidrične toksiinfekcije (Costerton *et al.* 1999). Patogeni sojevi *E. coli* mogu negativno uticati na digestivni trakt, a prenose se upravo putem konzumiranja nedovoljno prečišćene vode (*ibid.*).

Fotokatalizatori su jedinjenja koja ubrzavaju foto reakcije prilikom kojih nastaju razni nusproizvodi. Jedan od takvih nusproizvoda ovih reakcija su i slobodni radikali, čiji se značaj ogleda u sposobosti interakcije sa biomolekulima, pri čemu dolazi do poremećaja homeostaze ćelija. Konkretno, mehanizam delovanja slobodnih radikala se može koristiti protiv različitih organizama i kontaminanata. Jedna od primena jeste u tehnologiji prečišćavanja voda (Jiang *et al.* 2012).

Jedan od problema primene fotokatalizatora van laboratorije vezuje se za spektar sunčevog zračenja koje stiže do površine. Titanijum dioksid (TiO₂) je jedan od komercijalnih fotokatalizatora koji apsorbuju u ultraljubičastom delu spektra. Budući da je tehnološki jedonostavnije koristiti vidljivi deo spektra, otkrivene su modifikacije fotokatalizatora koje mogu da apsorbuju na vidljivom delu spektra EM zračenja. Jedna od takvih je modifikacija TiO₂ gvoždem (Daghrir *et al.* 2013). Kao ekonomičniji fotokatalizator pokazao se bizmut oksid bromid (BiOBr), koji poput gvoždem modifikovanog titanijum dioksida (Fe/TiO₂) takođe apsorbuje vidljivi deo

Ilija Anđelković (2001), Požarevac, učenik 3. razreda Požarevačke gimnazije

MENTORSTVO:

Tamara Lujčić, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ivona Biočanin, studentkinja Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Mihajlo Stašuk, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

EM spektra (Yuan *et al.* 2017). Tehnološki potencijal ovih oksida pokazuju rezultati testova: testovi fotokatalitičke aktivnosti Fe/TiO₂ su pokazali inaktivaciju bakterijskih kultura na vidljivom delu spektra EM zračenja (Castro-López *et al.* 2010), dok je za BiOBr pokazana fotokatalitička razgradnja organskih boja (*ibid.*).

S obzirom na kratko embrionalno razviće, koje se odvija u spoljašnjoj sredini i lako se može pratiti, riba *Danio rerio* je najčešće korišćen model za ispitivanje toksičnosti na kičmenjake različitih hemikalija i preparata koji se mogu naći u akvatičnoj životnoj sredini, pa je i u ovom istraživanju korišćen standardni test akutne toksičnosti na ovoj vrsti (Goldsmith 2004).

Cilj istraživanja je bio da se uporedi primenljivosti komercijalnih fotokatalizatora BiOBr i Fe/TiO₂, odnosno da se ispita njihovo baktericidno dejstvo na vidljivom delu spektra EM zračenja, kao i toksičnost po slatkovodne ribe.

Materijal i metode

Sintetisani su gvožđem modifikovani titanijum dioksid (Fe/TiO₂) i bizmut oksid bromid (BiOBr), a prisustvo oba jedinjenja je potvrđeno infracrvenom spektroskopijom (FTIR). Utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije ovih jedinjenja za laboratorijski soj bakterije *Escherichia coli* K12. Toksičnost fotokatalizatora je ispitana pomoću eseja toksičnosti na zebričama (*Danio rerio*). Radi provere povećanja koncentracije slobodnih radikala u ribljem medijumu nakon tretmana fotokatalizatorima, korišćen je skavenger test.

Sinteza oksida

Sinteza i modifikacija Fe/TiO₂ je rađena po protokolu (Castro-López *et al.* 2010). Napravljeni su rastvori titanijum izopropoksida, etanola i vode. Rastvoru sa titanijum izopropoksidom u kapima je dodavan u rastvor etanola i vode. Nakon dodavanja rastvora titanijum izopropoksida, rastvor je inkubiran 1 minut, uz stalno mešanje. Dodato je 0.6 mL koncentrovane azotne kiseline. Dobijena smeša je ostavljena da odstoji 24 h uz konstantno mešanje. Nastali talog je od supernatanta odvojen centrifugiranjem

(8000 × g, 10 min), a nakon toga dobijeni talog je raspoređen u Petrijevoj šolji, zaštićen od svetlosti i ostavljen da se suši 24 h na 120°C.

Sinteza BiOBr je rađena po protokolu (Yuan *et al.* 2017). 2 mmol Bi(NO₃)₃·5H₂O je rastvoreno u 40 mL etilen glikola. 2 mmol KBr rastvoren u destilovanoj vodi. Vodeni rastvor je u kapima dodavan u rastvor etilen glikola, i ostavljen je 1 h u digestoru. Potom je centrifugiran (8000 × g, 10 minuta) i nakon toga ispiran destilovanim vodom. Ovaj postupak je ponovljen 5 puta centrifugiranjem (8000 × g, 10 minuta). Dobijeno jedinjenje je ostavljeno da se osuši preko noći na 120°C, i do upotrebe čuvano u posudi koja je bila zaštićena od uticaja svetlosti.

Za potvrdu sinteze ovih oksida korišćena je infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. Fourier transformation infrared spectroscopy, FTIR).

Određivanje slobodnih radikala

Nivo slobodnih radikala određen je DPPH (skavenger) testom. Napravljen je štok rastvor DPPH i metanola (0.2 mM rastvor DPPH je rastvoren u metanolu). Potom je napravljen rastvor ćelijskog ekstrakta i rastvora DPPH (1 mL ćelijskog ekstrakta i 1 mL DPPH rastvora). Dobijeni rastvor je inkubiran 30 minuta u mraku. Kao kontrola je korišćen rastvor DPPH i PBS-a (pH = 7.2). Nakon centrifugiranja (7000 × g, 10 minuta), izmerena je absorbanca na 517 nm (Zhai *et al.* 2015).

Ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) BiOBr i Fe/TiO₂ određena je metodom serijskih razblaženja. Testiran je opseg koncentracija od 0.125 g/dm³ do 0.004 g/dm³ fotokatalizatora. Kao negativna kontrola korišćen je sterilni bakterijski medijum Luria Broth (LB). Pozitivnu kontrolu predstavljao je medijum sa bakterijskom suspenzijom soja *E. coli* bez tretmana fotokatalizatorima. Optička gustina prekonocne kulture na početku eksperimenata je podešavana na 0.05 na 600 nm. Za detekciju bakterijskog rasta dodat je rezazurin i uzorci su dodatno inkubirani 3 h na 37°C. Bakterijski rast dovodi do redukcije

resazurina u rezorufin, što rezultuje promenom boje iz plave u ružičastu (Castro-López *et al.* 2010). Odrađena su dva MIK testa: jedan u mraku, kako bi se dokazalo da je svetlost neophodna za otpočinjanje procesa fotokatalize, dok je drugi tretman ostavljen na svetlosti, na stolu, dobro obavijen parafilmom, kako ne bi došlo do kontaminacije.

Testovi toksičnosti na embionima *Danio rerio*

Napravljeno je 100 mL rastvora ribljeg medijuma (Puerto Galvis i Kouznetsov 2013) sa finalnom koncentracijom fotokatalizatora 2 mg/mL i 100 mL čistog ribljeg medijuma koji je činio kontrolnu grupu. Svakog dana je medijum menjan novom suspenzijom medijuma i fotokatalizatora. Po 20 embriona zebrica (*Danio rerio*) je prebačeno u svaku Petrijevu šolju sa medijumom. Četvrtog dana, kada je bila moguća vizualizacija srca, napravljeni su snimci embriona ujutru i uveče. U cilju ispitivanja uticaja fotokatalizatora na funkcionalno razviće embriona zebrica, analizirani su otkucaji srca. Analiza snimaka je izvedena u programu Heart rate.

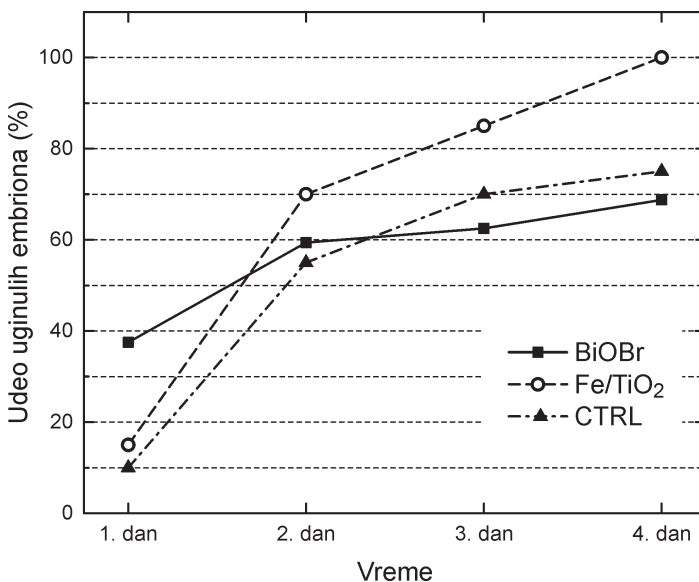
Rezultati

Antimikrobno dejstvo. Test minimalne inhibitorne koncentracije na svetlosti je pokazao inhibiciju rasta bakterijskih kultura *E. coli* kod tretmana fotokatalizatorom BiOBr na koncentracijama od 0.125 g/dm³ do 0.031 g/dm³, dok kod tretmana Fe/TiO₂ inhibicija bakterijskih kultura nije uočena. Antimikrobna aktivnost ispitivanih fotokatalizatora u postavci eksperimenta u mraku, kao što je i očekivano, nije zabeležena.

Skavenger test. Ovim testom ustanovljeno je da BiOBr proizvodi najviše slobodnih radikala koji se vezuju za DPPH molekul.

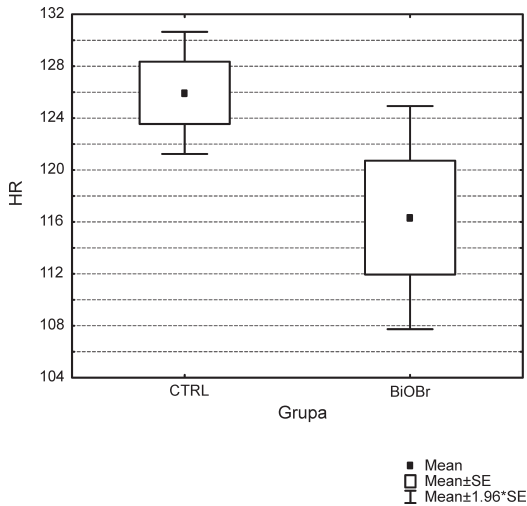
Eseji toksičnosti. Nakon četiri dana tretmana, uočeno je da je Fe/TiO₂ toksičniji u odnosu na BiOBr (slika 1). Tokom drugog dana primećen je skok smrtnosti kod obe grupe koji najverovatnije nije vezan za same tretmane, budući da je zabeležen i u kontrolnoj grupi.

Nakon četiri dana tretmana Fe/TiO₂, došlo je do uginuća svih embriona u ovoj eksperimentalnoj grupi. U ostalim grupama, otkucaji srca su izmereni pojedinačno kod svakog embriona. Uočen je manji broj otkucaja srca u minuti u odnosu na kontrolu (slika 2), mada nije dobijena statistička značajnost ($t(22) = 1.98, p = 0.06$).



Slika 1. Stopa mortaliteta embriona *D. rerio* u akutnom testu toksičnosti

Figure 1. Mortality rate of *D. rerio* embryos



Slika 2. Broj otkucaja srca u minuti (HR) kod embriona *D. rerio*, četvrtog dana tretmana BiOBr i u kontrolnoj grupi

Figure 2. Heart rate (expressed as number of beats per minute) of *D. rerio* embryos after 4 days of treatment with BiOBr compared to control

Normalan broj otkucaja u minuti kod vrste *D. rerio* kreće se od 120 do 180 otkucaja u minuti.

Diskusija

Nakon MIC testa ustanovljeno je da BiOBr pokazuje inhibitorno dejstvo, dok Fe/TiO₂ takvo dejstvo ne ispoljava. Efikasnost BiOBr kao antimikrobnog agensa na vrsti *E. coli* je objašnjena skavenger testom: BiOBr je u reakciji u prisustvu svetlosti proizveo najveću količinu slobodnih radikala koji su se vezali za DPPH molekul, a koji su verovatno odgovorni za prethodno pokazano baktericidno dejstvo.

Esejem toksičnosti je ustanovljeno da je BiOBr manje toksičan u odnosu na Fe/TiO₂. Stopa smrtnosti zebrića (*Danio rerio*) tretiranih Fe/TiO₂ iznosila je 100%, dok je u prethodnim radovima iznosila 37% (Park *et al.* 2014). Istraživanja sa Fe/TiO₂ su pokazala nisku toksičnost ovog fotokatalizatora, što ne pokazuju rezultati našeg rada. Udeo uginulih embriona zebrića

tretiranih BiOBr u našem eksperimentu iznosio je 70%. Nizak procenat preživelih embriona u kontrolnoj grupi najverovatnije je posledica grešaka prilikom menjanja ribljeg medijuma. Koncentracija fotokatalizatora kojom su tretirani embrioni u našem radu iznosila je 4 mg/mL. U referentnom radu (Park *et al.* 2014), koncentracija fotokatalizatora je iznosila 2 mg/mL, i tu je ispoljila jako malu stopu smrtnosti embriona.

Broj otkucaja srca embriona koji su tretirani sa BiOBr iznosi 116 otkucaja u minuti, dok je broj otkucaja zebrića u kontrolnoj grupi iznosio 126. Iako nije veliko odstupanje od proseka, mora se navesti da BiOBr ima negativan uticaj na funkcionalno razviće embriona zebrića (slika 2). Važno je istaći da rastvor ribljeg medijuma i fotokatalizatora nije bio homogen, što upućuje na to da nisu sve zebriće tretirane istim koncentracijama fotokatalizatora. Takođe, praćen je samo razvoj embriona zebrića, te je potrebno spomenuti da bi fotokatalizatori možda drugačije uticali na odrasle jedinke koje bi duži vremenski period bile izložene oksidativnom stresu.

Navedene okside je potrebno dodatno okarakterisati pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) mikroskopije, s obzirom na to da još uvek ne postoje podaci o njihovoj strukturi. Ovi fotokatalizatori se u radovima pominju kao nanočestice, u čemu se ogleda njihova dalja primena.

Dalja istraživanjima bi trebalo sprovesti u cilju primene fotokatalizatora u prirodi, u svrhu potencijalno efikasnijeg prečišćavanja voda. Kao potencijalni problem primeni fotokatalizatora u životnoj sredini nameće se njihova sposobnost formiranja precipitata u vodi što otežava uklanjanje iz prirode i njihovu bezbednu primenu. Zbog svega navedenog, dalje istraživanje prvenstveno ovih, ali i drugih fotokatalizatora se smatra neophodnim i važnim u kontekstu njihove potencijalne primene u prečišćavanju voda.

Zaključak

BiOBr je pokazao efikasnije antimikrobno dejstvo na laboratorijskom soju *E. coli*, u odnosu na Fe/TiO₂ i utvrđeno je da je njegova sinteza ekonomičnija u odnosu na Fe/TiO₂. Zahvaljujući manjoj toksičnosti ovog fotokatalizatora na

embrionima vrste *Danio rerio*, pored bolje pokazane antibakterijske aktivnosti, BiOBr se čini primenljivijim i efikasnijim od Fe/TiO₂. Dodatno, trebalo bi odraditi studiju i na drugim model organizmima i videti koje su posledice dugoročnog izlaganja ovim fotokatalizatorima i oksidativnom stresu koji oni prouzrokuju. Kao dodatan cilj nameće se i dalje ispitivanje hemije i detaljne strukture ova dva jedinjenja kako bi se oni u budućnosti oni učinili bezbednim za primenu u tehnologiji prečišćavanja voda.

Zahvalnost. Zahvaljujem se dr Sanjinu Kovačeviću, asistentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći oko naručivanja titanijum-izopropokisda. Zahvaljujem se Požarevačkoj gimnaziji na obezbeđenim sredstvima.

Literatura

- Castro-López, C. A., Centeno A., Giraldo S. A. 2010. Fe-modified TiO₂ photocatalysts for the oxidative degradation of recalcitrant water contaminants. *Catalysis Today*, **157** (1-4): 119.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284** (5418): 1318.
- Daghrir R., Drogui P., Robert D. 2013. Modified TiO₂ for environmental photocatalytic applications: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52** (10): 3581.
- Goldsmith P. 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current opinion in pharmacology*, **4** (5): 504.
- Jiang L., Wang Y., Feng C. 2012. Application of photocatalytic technology in environmental safety. *Procedia Engineering*, **45**: 993.
- Park H-G., Kim J. I., Kang M., Yeo M. K. 2014. The effect of metal-doped TiO₂ nanoparticles on zebrafish embryogenesis. *Molecular & Cellular Toxicology*, **10** (3): 293.
- Puerto Galvis C. E., Kouznetsov V. V. 2013. Regio- and stereoselective synthesis of spirooxindole 1'-nitro pyrrolizidines with five concurrent stereocenters under aqueous medium and their bioprospection using the zebrafish (*Danio rerio*)

embryo model. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **11** (42): 7372.

WHO (World Health Organization) 2017. *Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines*. Geneva: World Health Organization

Yuan M., Tian F., Li G., Zhao H., Liu Y., Chen R. 2017. Fe (III)-modified BiOBr hierarchitectures for improved photocatalytic benzyl alcohol oxidation and organic pollutants degradation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **56** (20): 5935.

Zhai Q., Yin R., Yu L., Wang G., Tian F., et al. 2015. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*, **54**: 23-30.

Ilija Anđelković

Catalysts Fe/TiO₂ and BiOBr as Potential Antimicrobial Agents in Water Treatment Technology

Photocatalysts are materials that produce free radicals in the aquatic environment by absorbing electromagnetic radiation. Free radicals are highly reactive particles that exhibit effective antimicrobial activity. Thanks to these chemical properties, photocatalysts have been applied in water treatment technology. Specifically, TiO₂ is the photocatalyst already used for water purification from microorganisms and organic contaminants. TiO₂ absorbs electromagnetic radiation from the ultraviolet part of the spectrum, but modification of TiO₂ with iron results in the absorption of the visible part of the electromagnetic spectrum. The purpose of this paper is to compare Fe/TiO₂ and another photocatalyst, BiOBr, as antimicrobial agents for *E. coli*. The toxicity of these materials has been studied on *Danio rerio* embryos. BiOBr was shown to be more effective, with the most effective concentration being 0.125 g/dm³. Toxicity tests have indicated that BiOBr is less toxic than Fe/TiO₂. From these results, it can be deduced that BiOBr has potential in water treatment technology, however, further toxicity studies are needed. ☞