

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela LAVRINC

**ANTIMIKROBNO DELOVANJE IZBRANIH NANODELCEV NA
BAKTERIJE IN GLIVE**

DIPLOMSKA NALOGA
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED NANOPARTICLES
ON BACTERIA AND FUNGI**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne, 09.06.2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne, prof. dr. Nino Gunde Cimerman za somentorico in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš.

Mentorica: prof. dr. Damjana Drobne
Somentorica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: prof. dr. Damjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Špela Lavrinc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24: 549.514.6: 549.516: 620.3 (043)=163.6
KG	fiziologija mikroorganizmov/ rast mikroorganizmov/glive/bakterije antimikrobno delovanje/ /nanodelci/ TiO_2 / CuO / ZnO / koncentracija nanodelcev / <i>Escherichia coli</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Bacillus subtilis</i> / <i>Staphylococcus epidermis</i> / <i>Candida albicans</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Hortaea werneckii</i> / <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
AV	LAVRINC, Špela
SA	DROBNE, Damjana (mentorica) / GUNDE-CIMERMAN, Nina (somentorica) / PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	ANTIMIKROBNO DELOVANJE IZBRANIH NANODELCEV NA BAKTERIJE IN GLIVE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 67 str., 1 pregl., 28 sl., 2 pril., 65 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V nalogi smo ugotavljali vpliv izbranih nanodelcev različne kemijske zgradbe in različnih velikosti na bakterije in glive. Proučevane bakterijske vrste so bile: <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Staphylococcus</i> <i>epidermis</i> . Proučevane vrste gliv pa: <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Hortaea werneckii</i> in <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . Uporabljeni nanodelci so bili: nano TiO_2 , nano CuO in nano ZnO . Celice bakterij so bile izpostavljene nanodelcem koncentracije 1000 $\mu\text{g/ml}$ za 1 in 2 h, celice gliv pa za 2 in 4 h. Vpliv nanodelcev na bakterije oz. glive smo ugotavljali s štetjem kolonij na agarnih ploščah, na katere smo predhodno nacepili 0,1 ml (10^{-4} in 10^{-5}) razredčene bakterijske/glivne celične kulture izpostavljene nanodelcem. Rezultati so pokazali, da imajo nekateri nanodelci izrazito antimikrobno delovanje. Kot najbolj učinkoviti so se izkazali nanodelci CuO in ZnO . Brez antimikrobnega delovanja pa so bili nanodelci TiO_2 . Najbolj občutljive na vpliv nanodelcev so bile bakterije, najmanj pa glive. Razlog za to so lahko temeljne razlike v zgradbi med bakterijskimi in glivnimi celicami. <i>R. mucilaginosa</i> je bila najmanj občutljiva na vpliv nanodelcev. Nanodelci CuO pa so inhibitorno delovali na rast vseh proučevanih gliv in bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 579.24: 549.514.6: 549.516: 620.3 (043)=163.6
CX microbial physiology/ microbial growth/ antimicrobial activity/bacteria/fungi/
nanoparticles/ TiO₂ / CuO / ZnO / concentration of nanoparticles /*Escherichia coli*/ *Staphylococcus aureus*/ *Bacillus subtilis*/ *Staphylococcus epidermis*/
Candida albicans/ *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hortaea werneckii*/ *Rhodotorula mucilaginosa*
AU LAVRINC, Špela
AA DROBNE, Damjana (supervisor) / GUNDE-CIMERMAN, Nina (co-advisor) /
PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP Si-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana , Biotechnical Faculty , Interdepartmental Programme
in Microbiology
PY 2010
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SELECTED NANOPARTICLES ON
BACTERIA AND FUNGI

DT Graduation Thesis (Univesity studies)
NO XI, 67 p., 1 tab., 28 fig., 2 ann., 65 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this work we investigated antimicrobial activity of selected nanoparticles on
bacteria and fungi. Investigated bacteria were: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus aureus*. Investigated
fungi were: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hortaea werneckii*
and *Rhodotorula mucilaginosa*. Nanoparticles used in this study were: nano
TiO₂, nano ZnO and nano CuO. Bacterial cells were exposed to 1000 µg/ml
nanoparticles for 1 and 2 h, fungi cells were exposed to 1000 µg/ml
nanoparticles for 2 and 4 h. We investigated the effect of nanoparticles on
bacteria and fungi by counting colonies on plates on which we inoculated 0,1
ml diluted (10⁻⁴ and 10⁻⁵) culture of cells. Cells were exposed to
nanoparticles. The results confirmed that some nanoparticles have significant
antimicrobial activity. The most effective were nanoparticles CuO and
nanoparticles ZnO. TiO₂ were without antimicrobial activity. Bacteria were
more sensitive to nanoparticles effect than fungi. The main reason is probably
the difference in cell structure between bacteria and fungi. *R. mucilaginosa* was
the least sensitive on nanoparticles effect. Nanoparticles CuO inhibited growth
of both-bacteria and fungi that we investigated.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SKUPNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH BAKTERIJSKIH VRST	3
2.1.1 Bakterijska celična stena	3
2.1.2 Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij.....	3
2.1.3 Po Gramu pozitivne bakterije	3
2.1.4 Po Gramu negativne bakterije	4
2.1.5 Zgradba peptidoglikana.....	5
2.2 SKUPNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH VRST GLIV	5
2.2.1 Zgradba evkariontske celične stene	5
2.2.1.1 Zgradba in organizacija celične stene pri kvasovkah	8
2.2.1.2 Vloga celične stene.....	8
2.3 CELIČNA STENA PRI BAKTERIJAH IN GLIVAH	8
2.3.1 Bistvene razlike med evkariontskimi in prokariontskimi celicami.....	9
2.4 KRATEK OPIS PROUČEVANIH BAKTERIJ IN GLIV	9
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	9
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4.4 <i>Staphylococcus epidermis</i>	10
2.4.5 <i>Candida albicans</i>	10
2.4.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.4.7 <i>Hortaea werneckii</i>	11
2.4.8 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12
2.5 NANOTEHNOLOGIJA	12
2.5.1 Nanodelci	13
2.5.1.1 Delovanje antimikrobnih učinkovin.....	14
2.5.1.2 Antimikrobno delovanje nanodelcev.....	14
2.5.1.3 Prezem nanodelcev v celico	15

2.5.1.4 Interakcije med nanodelci in celicami	16
2.5.2 Srebro	19
2.5.2.1 Srebrovi ioni	19
2.5.2.2 Srebrovi nanodelci.....	20
2.5.2.3 Nanodelci TiO ₂	20
2.5.2.4 Nanodelci Zn in ZnO.....	22
2.5.2.5 Nanodelci Cu in CuO	24
2.5.2.6 Antimikrobno delovanje bakrovih in cinkovih ionov.....	25
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 MATERIALI	26
3.1.1 Kemikalije in reagenti.....	26
3.1.2 Karakerizacija uporabljenih nanodelcev	26
3.1.3 Gojišča in raztopine.....	27
3.1.4 Proučevani bakterijski sevi.....	28
3.1.5 Proučevani sevi gliv	28
3.1.6 Steklovina in potrošni material	28
3.2. METODE	28
3.2.1.1 Priprava proučevanih kultur bakterij in gliv:.....	28
3.2.1.2 Določanje optične gostote proučevanih kultur:	29
3.2.1.3 Priprava nanodelcev	29
3.2.1.4 Ugotavljanje antimikrobnega delovanja nanodelcev.....	30
4 REZULTATI.....	31
4.1 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV TiO ₂ NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE	31
4.2 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV ZnO, MAKRODELCEV ZnO IN Zn IONOV NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE.....	36
4.3 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV CuO NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE.....	45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.1.1 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev ZnO in TiO ₂	48
5.1.2 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev CuO	50
5.1.3 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev Ag	52
5.2 SKLEPI.....	56
6 POVZETEK.....	57
7 VIRI	60

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Karakterizacija izbranih nanodelcev (Sigma-Aldrich, 2009)	27

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Muskopf, 2010)	5
Slika 2: Shematski prikaz celične stene gliv (Grün, 2003:11)	7
Slika 3: Model aktivnosti nanodelcev (Neal, 2008:366)	18
Slika 4: Površina manjših NP TiO ₂ , SEM (foto: Bele, 2010)	22
Slika 5: Površina večjih NP TiO ₂ , SEM (foto: Bele, 2010)	22
Slika 6: Površina NP ZnO, SEM (foto: Bele, 2010)	24
Slika 7: Površina NP CuO, SEM (foto: Bele, 2010)	25
Slika 8: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 25 nm različnih vrst bakterij	31
Slika 9: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 25 nm različnih vrst bakterij	32
Slika 10: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 75 nm različnih vrst bakterij	32
Slika 11: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 75 nm različnih vrst gliv	33
Slika 12: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 75 nm različnih vrst gliv	34
Slika 13: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 25 nm različnih vrst gliv	34
Slika 14: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO ₂ velikosti 25 nm različnih vrst gliv	35
Slika 15: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 100 nm različnih vrst gliv	36
Slika 16: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 100 nm različnih vrst gliv	36
Slika 17: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 100 nm različnih vrst bakterij	38
Slika 18: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 100 nm različnih vrst bakterij	38

Slika 19: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 1µm različnih vrst bakterij in glive <i>C. albicans</i>	37
Slika 20: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO velikosti 1µm različnih vrst bakterij in glive <i>C. albicans</i>	39
Slika 21: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl različnih vrst bakterij in glive <i>C. albicans</i>	40
Slika 22: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl različnih vrst bakterij	40
Slika 23: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl različnih vrst gliv	41
Slika 24: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl različnih vrst gliv	41
Slika 25: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO velikosti 50 nm različnih vrst bakterij	42
Slika 26: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO velikosti 50 nm različnih vrst bakterij in glive <i>C. albicans</i>	43
Slika 27: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO velikosti 50 nm različnih vrst gliv	44
Slika 28: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10 ⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO velikosti 50 nm različnih vrst gliv	44

KAZALO PRILOG

Priloga A

Priloga A1: Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga A2: Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga A3: Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga A4: Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga A5: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga A6: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga A7: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga A8: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga A9: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga A10: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga A11: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga A12: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga A13: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga A14: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga A15: Število kolonij bakterijske kulture *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

Priloga A16: Število kolonij bakterijske kulture *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga A17: Število kolonij bakterijske kulture *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga A18: Število kolonij bakterijske kulture *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga A19: Število kolonij bakterijske kulture *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga A20: Število kolonij bakterijske kulture *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

Priloga B

Priloga B1: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

Priloga B2: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga B3: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga B4: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga B5: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga B6: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga B7: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

Priloga B8: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga B9: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga B10: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga B11: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga B12: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga B13: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga B14: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga B15: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga B16: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

Priloga B17: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm.

Priloga B18: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga B19: Število kolonij *C. albicans*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 25 nm.

Priloga B20: Število kolonij *C. albicans*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm.

Priloga B21: Število prešteti kolonij *C. albicans*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm.

Priloga B22: Število kolonij *C. albicans*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl.

Priloga B23: Število kolonij *C. albicans*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 75 nm.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	angl. colony forming units
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDAX	angl. Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EPS	ekstracelularni polimeri (extracellular polymeric substances)
G +	po Gramu pozitivne bakterije
G -	po Gramu negativne bakterije
LB	angl. Lauria-Bertani
LPS	lipopolisaharidni sloj
µg	mikrogram (10 ⁻⁶ grama)
µl	mikroliter (10 ⁻⁶ litra)
M	molarna koncentracija
nm	nanometer (10 ⁻⁹ metra)
NP	nanodelci (nanoparticles)
OD	optična gostota
OS	oksidativni stres
ROS	reaktivne kisikove spojine (reactive oxygen species)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (scanning electron microscopy)
TEM	presevna elektronska mikroskopija (transmission electron microscopy)
ZVCN	ničvalentni bakrovi nanodelci (zero valent copper nanoparticles)

1 UVOD

Delci, ki se nahajajo v nano-velikostnem redu, so na Zemlji prisotni že milijone let, človek pa jih uporablja že tisoče let (Nowack in Bucheli, 2007). Nanodelce srebra in zlata so uporabljali že v Perziji v 10. stoletju pr. n. št. za izdelavo keramičnih glazur, da so dosegli mavričen, svetlikajoč učinek.

V današnjem času prihaja do povečane proizvodnje nanodelcev, saj se jih zaradi njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti uporablja za razvoj novih materialov v kemijski, farmacevtski, tekstilni industriji in gradbeništvu ter medicini.

Uporaba nanodelcev kovinskih oksidov narašča v različnih potrošniških produktih. Prisotni so v kozmetiki, sončnih kremah, zobnih plombah in tekstilu. Poklicna in javna izpostavljenost nanomaterialom bo v naslednjih letih narasla, zato je informiranost o toksičnosti in varnosti uporabe industrijsko proizvedenih nanodelcev nujna (Nel in sod., 2006).

Odpornost bakterij na baktericide in antibiotike v zadnjih letih narašča zaradi njihovega razvoja odpornih sevov.

Nekatera antimikrobna sredstva so zelo dražljiva in toksična, zato se večja interes za iznajdbo načinov, s katerimi bi izdelovali nove oblike varnih in učinkovitih biocidnih materialov. Raziskave so pokazale, da so visoko reaktivni nanodelci kovinskih oksidov izvrstno antimikrobno sredstvo. Tako se je s pripravo, karakterizacijo, površinsko modifikacijo in funkcionalizacijo nanodelcev pojavila možnost oblikovanja nove generacije baktericidnih materialov (Sondi in Salopek-Sondi, 2004).

Nanodelci imajo antimikroben učinek, zato se uporabljajo za različne namene. Njihovo delovanje pa je nespecifično.

Nanodelci iz kovinskih oksidov in keramičnih oksidov se uporabljajo v najrazličnejše namene. Uporabljajo se v različnih panogah od elektronike do kozmetike. V velikih količinah se trenutno največ uporabljajo delci iz ogljika, kremena in titanovega dioksida, ki so manjši od 100 nm. Ti materiali v nanovelikosti imajo povsem druge lastnosti kakor večji delci iz istih materialov, saj postanejo tudi močno biološko reaktivni. Njihovo antimikrobno delovanje pa je že dolgo znano (Nel in sod., 2006).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V nalogi pričakujemo nespecifično delovanje nanodelcev na mikroorganizme, kar bomo zaznali z znižano vrednostjo (colony forming units) CFU. Vrednost CFU nam pove število oz. delež bakterijskih/glivnih celic, ki so na gojišču sposobne narediti kolonije.

1.2 CILJI NALOGE

Želeli smo ugotoviti razlike v občutljivosti različnih vrst mikroorganizmov na nanodelce in spoznati, kakšne so razlike med antimikrobnim delovanjem nanodelcev na bakterije in glive ter ugotoviti razlike o vplivu nanodelcev glede na čas trajanja izpostavitve le-tem.

1.3 HIPOTEZE

Predpostavljali smo:

- da so različne vrste mikroorganizmov različno občutljive na nanodelce,
- da so razlike v učinku nanodelcev odvisne tudi od trajanja izpostavitve le-tem,

Antimikrobno delovanje smo proučevali na naslednjih vrstah bakterij: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* in glivah *Saccharomyces cerevisiae*, *Hortaea werneckii*, *Rhodotorula mucilaginosa* in *Candida albicans*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SKUPNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH BAKTERIJSKIH VRST

V poskusu smo proučevali naslednje bakterijske vrste: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermis* in *S. aureus*. Vsem bakterijam pa je skupno, da so zelo majhni ter relativno enostavni enocelični organizmi. Njihov dedni material ni ovit v jedrno membrano. Po obliki so okrogle, paličaste, spiralne, lahko pa so tudi zvezdaste ali pravokotne oblike. Bakterije so ovite s celično steno, ki je kompleksno zgrajena, njena temeljna sestavina je peptidoglikan. Razmnožujejo se z delitvijo na dve enaki hčerinski celici. Za hranilne snovi večina bakterij uporablja organske spojine, ki jih dobijo v naravi od mrtvih organizmov (saprofiti) ali od živega gostitelja. Nekatere bakterije uporabljajo svetlobo kot vir energije in neorganske snovi kot vir hranilnih snovi. Veliko bakterij je gibljivih, ker imajo flagele.

2.1.1 Bakterijska celična stena

Glavni značilnosti bakterijske celične stene sta njena togost in izjemna mehanska trdnost. Celična stena daje bakterijam obliko, preprečuje gostiteljevim encimom razgradnjo bakterij in vzdržuje notranji osmotski tlak ter predstavlja semipermeabilno bariero in tako omogoča prehod le zaželenim snovem. Poleg tega štiti bakterijo pred vplivi okolja ter sodeluje pri rasti in delitvi celice. Njen najpomembnejši sestavni del je heteropolimer peptidoglikan, ki je zgrajen iz mreže linearnih polisaharidnih verig, prečno povezanih s kratkimi peptidnimi verigami. Od strukture celične stene je odvisna tudi dovzetnost bakterij za barvanje po Gramu, ki je najpogosteje uporabljena metoda za hitro karakterizacijo bakterij.

2.1.2 Celična stena po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij

Osnovni gradnik celične stene G + in G – bakterij je makromolekula peptidoglikan. Pri obeh tipih bakterij se peptidoglikan nahaja na zunanji strani citoplazemske membrane. Peptidoglikan je zgrajen iz ponavljajočih se disaharidnih enot N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline, ki so med seboj premrežene s kratkimi peptidnimi verigami.

2.1.3 Po Gramu pozitivne bakterije

Celična stena G + bakterij je v primerjavi z G – bakterijami (slika1) bolj preprosta. Zaradi višjega osmotskega pritiska v notranjosti imajo debelejšo mureinsko ovojnico. Sestavlja jo do 40 plasti peptidoglikana in je debela od 15 nm do 50 nm. Celično steno prebadajo številni anionski polimeri (tehojske kisline, lipotehojske in teihuronske kisline), ki s

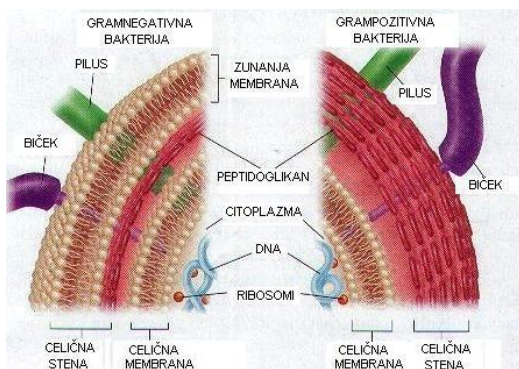
pomočjo fosfatnih, hidroksilnih in aaminskih skupin tvorijo ionsko-izmenjevalni sistem. Le-ta uravnava koncentracijo magnezijevih ionov, ki so bistveni za delovanje številnih encimov v sintezi peptidoglikana. V plast peptidoglikana so zasidrani številni proteini, lipidi pa navadno niso prisotni. Stena G + bakterij dobro prepušča snovi z molsko maso 70000 ali več, pri G – bakterijah pa zunanje membrane ne morejo prehajati ionizirane, hidrofilne molekule z molekulsko maso od 600 do 900 in zelo lipofilne spojine (Gobec in sod., 1999).

2.1.4 Po Gramu negativne bakterije

Pri njih je zgradba celične stene mnogo bolj kompleksna. Od citoplazemske membrane navzven jo sestavlja:

- periplazemski prostor, ki vsebuje številne proteine in encime,
- enojna ali dvojna plast peptidoglikana, debela približno 2 nm, ki predstavlja 5 % mase celične stene in je na zunanji strani povezana z lipoproteinskimi molekulami, ki so usmerjene navzven,
- zunanja membrana, zgrajena iz fosfolipidnega dvosloja, ki je podobna citoplazemski membrani in vsebuje proteine in transmembranske proteinske kanalčke (porine), na notranji strani pa je z lipoproteinskimi molekulami povezana s peptidoglikanom,
- kompleksni polisaharidi, ki so pritrjeni na zunanjo površino celice in predstavljajo glavno antigensko determinanto, ki je odgovorna za aktivacijo imunskega odgovora pri gostitelju.

Prepustnost celične stene G – bakterij je zaradi zunanje membrane, ki je sestavljena iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov, zelo zmanjšana.



Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Muskopf, 2010).

2.1.5 Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan je linearni glikanski polimer, sestavljen iz alternirajočih enot N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline, ki se med seboj povezujejo z (1,4)- β glikozidno vezjo. N-acetilmuraminska kislina je derivat N-acetilglukozamina, ki ima na C-3 atomu z etrsko vezjo pripeto mlečno kislino. Karboksilne skupine vseh ostankov N-acetilmuraminske kisline so substituirane s tetrapeptidi, ki prečno povezujejo glikanska vlakna v rigidno makromolekularno mrežo.

2.2 SKUPNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH VRST GLIV

V poskusu smo proučevali naslednje vrste gliv: *S. cerevisiae*, *H. werneckii*, *R. mucilaginosa* in *C. albicans*.

Glive so evkariontski organizmi. Njihove celice imajo jedro, ki vsebuje celični genetski material, in je ovito z jedrno membrano. Glive so lahko enocelični ali večcelični organizmi. Enocelične oblike gliv so kvasovke. Te so ovalnih oblik in so večje od bakterij. Glive se lahko razmnožujejo spolno ali nespolno. Hranilne snovi dobijo z absorpcijo raztopin organskih snovi iz svojega okolja. Rastejo v tleh, v vodi, na živalskih in rastlinskih gostiteljih.

2.2.1 Zgradba evkariontske celične stene

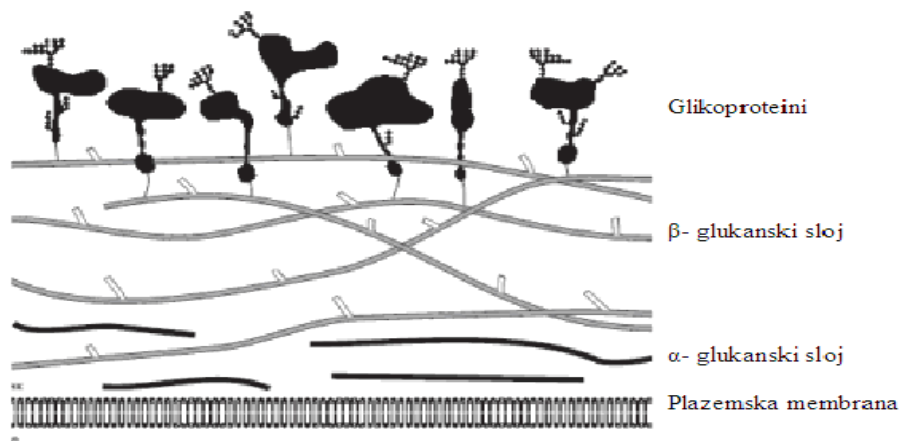
Celična stena je bistvenega pomena za preživetje gliv. Njena edinstvena sestava je tako idealna tarča za razvoj novih fungicidnih sredstev. Celična stena celico ščiti pred osmotskim tlakom, stresi iz okolja ter določa njeno obliko. Celična stena je na eni strani

opisana kot rigidna struktura glikoproteinov in polisaharidov, na drugi pa kot dinamična struktura, ki je dovolj fleksibilna, da se uspešno prilagaja rasti celice (Grün, 2003).

Komponente celične stene

- (1,3)- β -glukan (glukan je polimer glukoze)
- (1,6)- β -glukan
- (1,3)- α -glukan
- hitin
- glikoproteini

Sloj α -glukana je fibrilaren in ima strukturno vlogo. V primeru, da je prisoten, leži tesno ob plazemski membrani in tako naredi osnovni sloj celične stene tog. Po Grün, (2003), je sloj α -glukana iz α (1,3) glukanskih polimerov, α (1,4)-glikozidi pa so redkeje prisotni. α -glukanski sloj v celični steni kvasovke *S. cerevisiae* ni prisoten, njegova porazdelitev med filogenetskimi taksoni pa je nekoliko svojstvena. β -glukani so v celični steni gliv v dveh oblikah, in sicer v obliki (1,3)- β -glukanov ter v obliki (1,6)- β -glukanov. Prvi so prisotni v celičnih stenah večine gliv, izjema so celične stene hif gliv Zygomycota (Barreto-Bergter in Gorin, 1983; Wessels in Sistsma; 1982). Veriga (1,3)- β - glukana ima vzmeti podobno strukturo, ki celični steni zagotavlja elastičnost in raztežno trdnost.(1,3)- β -glukani so med seboj povezani z (1,6)- β -vezjo. Na druge komponente celične stene so vezani kovalentno, in sicer: z nereducirajočim koncem je (1,3)- β -glukan prečno vezan na reducirajoče konce verig hitina z 1-4 vezjo (Klis in sod., 2002; Kollar in sod., 1997).



Slika 2: Shematski prikaz celične stene gliv (Grün, 2003:11).

Za razliko od (1,3)- β -glukanov je (1,6)- β -glukanski polimer krajši od amorfne strukture. V celični steni ima ključno vlogo pri prečnih povezavah njenih komponent. S pomočjo (1,6)- β -glukanov so (1,3)- β -glukanski polimeri ter hitini povezani z manoproteini in tako formirajo kompaktno celično steno (Kollar in sod., 1997). Kompleksno razvejene strukture glukanov omogočajo tvorbo gelu podobnega matriksa. Med glukanskimi molekulami so različne povezave, ki so močnejše v notranjosti ter bolj sproščene v zunanjem delu celične stene. Na ta način glukani oblikujejo gelu podoben matriks, ki preide v zunanje okolje (Ross, 2001).

Najbolj zunanji del celične stene je iz glikoproteinov, kjer je na polipeptidno ogrodje pripet polisaharid, večinoma iz manoze, galaktoze in ksiloze. Tako nastali glikoproteini so manoproteini, peptidogalaktomanani in ksilomanoproteini (Ross, 2001). Glikoproteini imajo pomembno vlogo pri zadrževanju vode, adheziji in virulenci.

Hitin je linearen, nerazvejan polimer iz β (1,4)-N-acetilglukozaminskih ostankov in tvori mikrofibrile, ki so stabilizirani z vodikovimi vezmi. Delež hitina je v celičnih stenah gliv izredno variabilen. V celičnih stenah hif je njegova količina večja kot v kvasnih celicah (Wang in sod., 1999). Nalaganje hitina v celični steni je prostorsko in časovno uravnano (Bulawa, 1993).

2.2.1.1 Zgradba in organizacija celične stene pri kvasovkah

Pri kvasovkah so komponente celične stene:

- polisaharidi (predvsem β -glukani za trdnost),
- proteini (predvsem manoproteini, ki v najbolj zunanjem sloju odločajo o poroznosti celične stene),
- lipidi in anorganski fosfati.

2.2.1.2 Vloga celične stene

Najbolj očitna lastnost celične stene je definiranje oblike celic gliv. Pri filamentozni rasti togost stranskih sten hifam daje cilindrično obliko, medtem ko nalaganje materiala celične stene na konce hif omogoča apikalno rast. Podobno je pri nepolariziranem nalaganju komponent celične stene kvasovk, ki celicam zagotavlja sferično obliko. Celična stena je v tem primeru manj toga, saj celica enakomerno raste v vse smeri. Struktura celične stene vpliva na vnos nutrientov in sekrecijo na različnih mestih hife. Pomembna je za prepoznavanje in adherenco na substrat, ki ga gliva izrablja. Njena funkcija je nezanemarljiva pri prepoznavanju paritvenih tipov kvasovk in njihove fuzije.

Z melanini, polimeri fenolnih metabolitov, celična stena dobi še nekaj prednostnih lastnosti. Mehanizmi celične stene so zaščiteni pred encimsko razgradnjo in sevanjem ter so bolj odporni na mehanske poškodbe.

2.3 CELIČNA STENA PRI BAKTERIJAH IN GLIVAH

Tako bakterijske kot glivne celice imajo celično membrano, ki ločuje kaos zunaj celice in visoko organizacijo znotraj celice. Podobnosti, ki jih opazimo pri obeh tipih celic, so, da celična stena ščiti bakterijske in glivne celice pred osmotskim tlakom, stresi iz okolja in določa obliko celice. Bistvene razlike pa se kažejo predvsem v tem, da je pri bakterijah glavni sestavni del celične stene peptidoglikan, medtem ko pri glivah peptidoglikana v celični steni ni. Pri glivah kvasovkah so namreč temeljne komponente celične stene polisaharidi, proteini, lipidi in anorganski fosfati.

2.3.1 Bistvene razlike med evkariontskimi in prokariontskimi celicami

Prokarionti so majhni enocelični organizmi, ki ne tvorijo večceličnega organizma, ki bi imel diferencirano tkivo, lahko pa se združujejo v kolonije. Evkarionti pa so večinoma mnogocelični organizmi z diferenciranimi celicami.

- Prokariontske celice (1-10 µm) so manjše od evkariontskih (2-100 µm).
- V prokariontskih celicah je en krožno oblikovan kromosom, v evkariontskih pa je več kromosomov, ki so v obliki dolgih, zavitih molekul.
- Jedrce, jedrna ovojnica in histoni pri prokariontih niso prisotni..
- Elektronski transport pri prokariontih poteka samo skozi celično membrano, pri evkariontih pa skozi vse membrane (tudi membrane organelov).
- V prokariontskih celicah ne potekata fagocitoza in pinocitoza, pri evkariontskih celicah pa potekata po potrebi.
- Metabolizem pri prokariontih je aeroben ali anaeroben, pri evkariontih pa je večinoma aeroben.

2.4 KRATEK OPIS PROUČEVANIH BAKTERIJ IN GLIV

2.4.1 *Bacillus subtilis*

Je nepatogen po Gramu pozitiven bacil, aeroben oz. fakultativen anaerob, ki ga pogosto najdemo v zemlji. Večina bakterij iz rodu *Bacillus* je mezofilnih s temperaturnim optimumom med 30 in 45 °C, lahko pa so tudi termofilni s temperaturnim optimumom do 65 °C ali celo psihrofili, sposobni rasti in sporulirati pri 0 °C. So neutrofilni, vendar pa lahko rastejo na širokem območju pH vrednosti od 2 do 11. Sposobni so tvorbe trpežne endospore, katere naloga je zaščita pred negativnimi okoljskimi vplivi, kot so na primer toplota, kislost, slanost. Spore lahko preživijo v neugodnih razmerah zelo dolgo časa. Tvorijo se v obdobju stresa, ko je bakterija brez hranil. Tako je organizmu omogočen obstoj, dokler se okoljske razmere ne izboljšajo. Ob ugodnih razmerah se hitro razmnožujejo z delitvijo (Todar, 2009). *B. subtilis* je modelni organizem za raziskave G + bakterij.

2.4.2 *Escherichia coli*

Je enterobakterija in spada v družino *Enterobacteriaceae*. Gre za G - bakterijo, aerobno oz. fakultativno anaerobno in nesporulirajočo. Fermentira glukozo, reducira nitrat do nitrita in

ima encim katalazo (Douglas, 2006). Optimalna rast bakterije *E. coli* je pri 37 °C. Celice so paličaste oblike, dolžine 2 µm in premera 0,5 µm. *E. coli* je zelo razširjena bakterija v črevesju človeka. Le nekateri sevi te vrste bakterije so za človeka patogeni. Je oportunistični patogen, saj povzroča bolezni le v primeru, ko preide iz črevesja v sečne in žolčne poti in organe v abdomnu. *E. coli* je najbolj raziskan organizem nasploh. *E. coli* je bakterijska vrsta, ki se najpogosteje uporablja pri raziskavah v mikrobiologiji.

2.4.3 *Staphylococcus aureus*

Po Gramu pozitivna patogena bakterija iz rodu stafilokokov. Gre za okroglasto bakterijo (kok), ki je sicer pogosto prisotna na človeški koži. Je fakultativen anaerob in ima encim katalazo. Je koagulaza pozitivna. Na krvnem agarju raste največkrat v obliki gladkih zlatorumenih kolonij, obdanih z ozkim pasom popolne hemolize, zaradi česar jo imenujemo zlati stafilokok (Grundmann in sod., 2006). *S. aureus* kolonizira številne predele telesa, najpogosteje se nahaja v sprednjih nosnicah. Povzroča bolnišnične infekcije, zastrupitve s hrano, kožne abscese, pljučnico, meningitis, endokarditis, septikemijo. Najpogosteje se prenaša z rokami zdravstvenega osebja, redkeje pa po zraku. Zaradi pogoste odpornosti proti antibiotikom povzroča ta bakterija še vedno velike težave.

2.4.4 *Staphylococcus epidermis*

Je G + kok. Ni patogen, vendar v določenih razmerah to lahko postane. Obstajata dve vrsti epidermisa. Prvi se v največjem odstotku uvršča med koagulazo negativne stafilokoke, drugi pa v koagulazo pozitivne, ki niso patogeni za človeka. Tvorijo bele kolonije. Nahaja se v normalni flori na koži, v dihalih in prebavilih (Mack, 2004). Znan je kot odporen proti meticilinu. Navadno je nepatogen. *S. epidermis* povzroča težave ljudem s katetri ali drugimi kirurškimi vsadki zaradi tvorbe biofilmov.

2.4.5 *Candida albicans*

Spada med glive kvasovke. Pogosto se nahaja na sluznici ustne votline, prebavi, dihal in nožnice, kjer lahko kot neškodljiv komenzal prebiva v ravnotežju z ostalo mikrofloro in imunskim sistemom gostitelja. Glavni dejavnik okužbe s kandido je fiziološko stanje gostitelja. Ugotovili so, da manjše spremembe fiziološkega stanja gostitelja lahko vzpodbudijo kandido, da se iz neškodljivega spremeni v agresiven patogen organizem, ki povzroči okužbe sluznice, pri pacientih z zmanjšano imunsko sposobnostjo organizma pa

tudi življenjsko nevarno sistemsko okužbo (Fonzi in sod., 1993). Okužbo s kandido imenujemo kandidoza. Glive iz rodu *Candida* so za kolonizacijo, okužbo in za izogibanje gostiteljevemu imunskemu sistemu razvile različne mehanizme. Običajno so okrogle in enocelične oblike, lahko pa razvijejo nitaste strukture, imenovane hife in psevdohife. Kandida izloča encime proteaze in lipaze, s katerimi lahko razgrajuje gostiteljeve proteine in lipide. S pomočjo proteaz se lahko tudi izogiba imunskemu odgovoru gostitelja na okužbo. Okužba s kandido se lahko pojavi na sluznicah ust in prebavil. Izredno pogosta je genitalna okužba, še posebno pri ženskah.

2.4.6 *Saccharomyces cerevisiae*

Sodi med brsteče kvasovke in je ena izmed najintenzivneje proučevanih enoceličnih evkariontskih organizmov v molekularni in celični biologiji, saj sta njeni celična struktura in funkcijska organizacija podobni celicam višje razvitih organizmov (Gromozova in Voychuck, 2007). Kvasovke so definirane kot enocelične glive z redkimi izjemami, ki se razmnožujejo vegetativno z brstenjem. Brstenje nastopi, ko se izboklina na celični steni prične večati. Brst se od materinske celice lahko odcepi, ko je le-ta še majhen ali ko sta celici podobnih velikosti. Kvasovke *S. cerevisiae* lahko preklaplajo med haploidnim in diploidnim celičnim ciklom. Haploidne oblike dveh različnih paritvenih tipov se podvajajo z mitozo. Diploidne oblike kvasovk lahko rastejo vegetativno ali pa zaradi pomanjkanja nutrientov vstopijo v mejotičen cikel podvajanja ali sporulacijo. Tako haploidne kot diploidne celice se lahko podvajajo z brstenjem, med njimi je razlika predvsem v izbiri mest nastanka brstov.

Med številne pozitivne lastnosti kvasovke *S. cerevisiae* zaradi katerih se je uveljavila kot modelni organizem prištevamo enostavno gojenje, hitro rast, nepatogenost, ker pa je dobro poznana, omogoča tudi različne genske manipulacije. Skozi evolucijo so se osnovne biološke poti ohranile in tako potekajo številni celični procesi podobno v kvasovkah in v višjem organizmu.

2.4.7 *Hortaea werneckii*

Je askomicetna črna kvasovka, ki spada v red *Dothideales* (Zalar, 1999). Je črna kvasovka, saj producira temen pigment DHN melanin tako na zunanji kot na notranji strani celične stene. Za črne kvasovke je značilen polimorfizem, meristematska rast, endokonidacija, pogostost muriformnih celic, ki se razvijejo iz nedefiniranih hif ter debele melanizirane

celične stene (de Hoog, 1993; Zalar in sod., 1999). *H. werneckii* je meristematska gliva, saj tvori počasno rastoče kolonije zgrbančenega videza in se reproducira z izodiametričnim povečevanjem ter delitvijo celic (Sterflinger in sod., 1999). V preteklosti je bila poznana predvsem kot etiološki dejavnik neinvazivne kožne infekcije tinea nigra pri človeku. Življenjski cikel glive je sestavljen iz kvasne, filamentozne in meristematske rasti, ki jih sprožijo različne razmere v okolju. V neugodnih pogojih okolja, kot so suša, odsotnost hrane in temperaturne spremembe, ki za glivo predstavljajo stres, nastanejo hidrofobne hife. Pri optimalnih pogojih, to je ob zmerni temperaturi in zalogi hrane, se gliva razmnožuje s hidrofilnimi kvasnimi celicami.

2.4.8 *Rhodotorula mucilaginosa*

Vrste iz rodu *Rhodotorula* se pojavljajo v zraku, zemlji in na koži človeka ter so večinoma nepatogene. Gre za pigmentirane kvasovke, ki jih uvrščamo v deblo *Basidiomycota*. Z lahkoto jih identificiramo po tvorbi značilnih oranžno/rdečih kolonij. Barva je posledica pigmentov, ki jih kvasovka ustvari, da blokira svetlobo določene valovne dolžine, ki bi kvasnim celicam drugače škodovala. Pri imunsko oslabljenih ljudeh lahko povzročajo infekcije, kot so fungemije in endokarditis, med povzročitelji pa je najpogostejše *Rhodotorula mucilaginosa* (Biswas in sod., 2001). To je obligatna aerobna kvasovka, ki vsebuje visoko koncentracijo pigmentov-kartenoidov.

2.5 NANOTEHNOLOGIJA

Izraz nanotehnologija je skoval profesor Novio Taniguchi iz Tokia leta 1974 za opis preciznih, industrijsko izdelanih delcev nano velikosti.

Nanotehnologija predstavlja hitro razvijajoče in napredujoče področje, ki že ima in bo v prihodnosti imela še večji vpliv na vsa področja znanosti in tehnologije. Znanstvena odkritja in tehnološki obeti nanotehnologije so izjemni, še posebej v proizvodnji materialov, v nanoelektroniki, v medicini in varovanju zdravja, v biotehnologiji, informatiki in zagotavljanju varnosti. Izzivi, ki naj bi jih nanotehnologija uresničila, so nešteti, od zgodnje diagnostike in zdravljenja trenutno neozdravljivih bolezni do detekcije ene same rakave celice in njenega uničenja ...

Veliko zanimanje se v hitro razvijajoči nanotehnologiji kaže za kovinske nanodelce zaradi njihove večnamenske uporabnosti. Delujejo lahko kot kemični katalizatorji, biološka barvila, adsorbenti...

Obstajata dva razloga za uporabo kovinskih nanodelcev v biomedicinskih raziskavah:

- Biomolekularne komponente imajo tipično velikostno dimenzijo v območju med 5 200 nm, kar je primerljivo s skalo nanodelcev. Biosistemi tako majhne vsiljivce komaj zaznajo zato jih smatrajo kot naravne komponente.
- Ko se velikost delcev zmanjšuje in pade na 1-100 nm, se elektronske, optične, katalitične in termodinamske lastnosti takšnih delcev odklanjajo od večine lastnosti večjih delcev iste sestave (QingShan, Jian, JinHong, JiaCong, 2007).

S porastom nanotehnologije se pojavita potreba in dolžnost raziskovanja poti, po katerih lahko nanomateriali reagirajo z biološkimi sistemi.

2.5.1 Nanodelci

Nanodelci so delci, katerih premer je vsaj v eni dimenziji do nekaj 100 nm. Različne delitve upoštevajo različne meje za klasifikacijo nanodelcev. Po eni od teh delitev nanodelce razdelimo na fine (~ 200 nm) in ultrafine nanodelce (~ < 20 -100 nm) (Koehler in sod., 2008).Manjši kot je delec, večja je njegova površina glede na njegov volumen. Njihova kemijska aktivnost postane tako zelo velika, kar je ugodno za določene kemijske reakcije in neugodno, za nezaželene kemijske reakcije.

Povečana kemijska aktivnost majhnih delcev prispeva k njihovemu medsebojnemu združevanju v večje skupke, aglomerate. Kot taki hitro preveč zrastejo, njihove specifične kemijske in fizikalne lastnosti pa se pri tem izgubijo. Proizvajalci zato skušajo površino nanodelcev namensko oksidirati ter s tem preprečiti medsebojno združevanje nanodelcev. Ravno zaradi tega se namenski nanodelci razlikujejo od nenamenskih, ki nastajajo pri reakcijah kot nezaželen produkt.

Kadar so nanodelci suspendirani v vodi, je pomemben podatek o aglomeraciji oziroma agregaciji. Kadar med delci obstajajo šibke van der Waalove vezi, govorimo o aglomeraciji, kadar so vezi trdnejše, pa o agregaciji. Da bi se izognili čim več aglomeratov v poskusih, jih lahko mehansko obdelamo s sonifikacijo (Murdock in sod., 2008).

Nanodelci lahko nastanejo pri naravnih procesih zaradi erozij, vulkanskih izbruhov ali pa so rezultat človeškega delovanja. Ti delci so že na tržišču v kozmetiki, hrani, detergentih,

antibakterijskih emulzijah, zaščitnih premazih itd. Nenamensko proizvedeni nanodelci pa so tisti, ki nastanejo pri gorenju, v motorjih z notranjim izgorevanjem...

2.5.1.1 Delovanje antimikrobnih učinkovin

Antimikrobne učinkovine zavirajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov ali povzročijo njihovo smrt, hkrati pa ne prizadenejo gostiteljskih. Antimikrobne učinkovine razdelimo glede na izvor v dve skupini: antibiotike in kemoterapevtike. Antibiotiki so antimikrobne učinkovine naravnega izvora in njihovi polysintezni derivati, medtem ko spojine popolnoma sinteznega izvora (kinoloni, sulfonamidi) uvrščamo med kemoterapevtike. Antimikrobne učinkovine delujejo na bakterije na različne načine:

- bodisi zavirajo biosintezo celične stene,
- spremenijo permeabilnost celične membrane,
- vplivajo na biosintezo proteinov, ki poteka na ribosomih ali pa inhibirajo biosintezo bakterijskih nukleinskih kislin.

Zaradi infekcijskih bolezni, povzročenih s strani različnih patogenih bakterij in gliv ter razvoja rezistence na antibiotike, se farmacevtske industrije in raziskovalci trudijo najti nova antimikrobna sredstva.

2.5.1.2 Antimikrobno delovanje nanodelcev

Majhna velikost delcev, njihova velika površina in zmožnost tvorbe reaktivnih kisikovih spojin (ROS) igrajo ključno vlogo pri antimikrobnem delovanju nanodelcev (Nel in sod., 2006). Glavni mehanizem antimikrobnega delovanja nanodelcev naj bi bil oksidativni stres (OS), ki poškoduje lipide, ogljikove hidrate, proteine in DNA (Kelly in sod., 1998). To »vmešavanje« nanodelcev povzroči spremembe na več celičnih nivojih: na metabolnem, signalnem kot tudi na genetskem. Za najnevarnejšo je smatrana peroksidacija lipidov z ROS (npr. superoksidni radikali, hidroksilni radikali), saj vodi k spremenjenim lastnostim celične membrane, prekinejo se namreč vitalne celične funkcije.

Vnetje in fibroza sta posledici, vidni na organizemski stopnji, medtem ko sta OS in citotoksičnost učinka vidna na celični ravni (Oberdörster in sod., 2005).

Antimikrobna aktivnost nanodelcev naj bi bila odvisna predvsem od velikosti in oblike nanodelcev (Pal in sod., 2007), saj lahko gredo majhni nanodelci (< 10 nm) (Kloepfer in

sod., 2005; Morones in sod., 2005) skozi celično membrano, zaradi njihove akumulacije znotraj celice pa pride do celičnih motenj.

Nanodelci imajo zaradi svoje velikosti spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti. Posledica spremenjenih lastnosti pa so različni mehanizmi delovanja, ki so potencialno nevarni za biološke sisteme. Te mehanizme lahko uvrstimo v štiri skupine:

- svetloba lahko aktivira elektronski par, kar povzroči cepitev vezi in nastanek radikalov,
- s površine nanodelcev se lahko sproščajo strupene snovi,
- površina nanodelcev lahko služi kot katalitično mesto redoks reakcij,
- na površini lahko nastanejo nepravilne strukture kristalov zaradi katerih nanodelec postane donor ali akceptor elektronov (Nel in sod., 2006).

Antibakterijska aktivnost različnih kovinskih nanodelcev, kot so npr. srebrovi koloidi, je močno povezana z velikostjo nanodelcev. Manjše kot je namreč jedro srebra, večja je njegova antibakterijska aktivnost. Katalitična aktivnost teh delcev je prav tako odvisna od velikosti nanodelcev kot tudi od njihove strukture, oblike, velikostne razporeditve ter fizikalno-kemijskih pogojev v okolju. Zato so velikostne razporeditve in nadzorovanje velikosti nanodelcev tako pomembni.

2.5.1.3 Prevzem nanodelcev v celico

Nanodelci so prevzeti s strani številnih in različnih tipov sesalskih celic, sposobni so preiti celično membrano in priti v celično notranjost. Prevzem nanodelcev v celico je odvisen od njihove velikosti in oblike (Nowack in sod., 2007).

Nanodelci se na membrano lahko absorbirajo, lahko pa s formacijo lukenj, tanjšanjem membrane in lipidno peroksidacijo zmanjšajo njeno integriteto (Moore, 2006).

Rigidna celična stena kvasovk in bakterij naj bi se izognila direktnemu prevzemu nanodelcev. Prokarionti (npr. bakterije) so verjetno bolj zaščiteni proti prevzemu mnogih tipov nanodelcev, ker nimajo mehanizmov za transport koloidnih delcev skozi celične stene (Moore, 2006). To pa ne velja za vse tipe nanodelcev, saj so nekateri (ZnO, CuO) precej topni in povzročajo kvarne učinke s pomočjo topnih ionov (Kahru in sod., 2008).

Pri evkariontih (npr. protisti, metazoa) pa je drugače, saj imajo procese za celičen prevzem delcev v nano in makro velikostnem razredu (Moore, 2006). Prevzem nanodelcev se v tem primeru zgodi z endocitozo ali fagocitozo (Shukla in sod., 2005).

Ko so nanodelci kovinskih oksidov enkrat v celici, lahko njihovo raztapljanje sprosti uničujočo koncentracijo kovinskih ionov znotraj celice (Limbach in sod., 2007). Kljub rigidni celični steni lahko nanodelci povzročijo razkroj celične stene in membrane s pomočjo raztopljenih ionov ali OS, s čimer se spremeni prepustnost membrane, posledično pa se poveča možnost vstopa nanodelcev v celice.

Ena izmed možnih poti, po kateri nanodelci vstopijo v bakterijsko celico, je skozi pore v zunanji membrani. Največje pore v bakterijski membrani so verjetno tiste, katerih naloga je izločanje zrelih proteinov, bodisi na površino bakterijske membrane ali v oddaljeno okolje. Npr. pri večini G - bakterijah so proteini iz družine (GspD) povezani z zunanjo membrano in tvorijo obročasto oblikovane strukture por. Takšne pore so teoretično dovolj velike, da omogočijo prehod nanodelcev velikosti od 1-9 nm v celico. Kljub velikosti por pa so le-te verjetno zaprte, da preprečijo izgubo citoplazme. Kanal je odprt samo takrat, ko je zahtevan transport proteinov preko zunanje membrane, zato je najverjetneje nanodelcem onemogočeno, da bi prečkali tudi največje pore na zunanji bakterijski membrani.

Endocitotske poti v evkariontski celici lahko vodijo do endosomskih ali lizosomskih kompartmentov ali pa pridejo delci v celico preko domen, ki so povezane s površinskim celično-lipidnim plaščem. Tako se delci izognejo degenerativni usodi, ki doleti tisti material, ki vstopi v endosomski ali lizosomski sistem (Nel in sod., 2003).

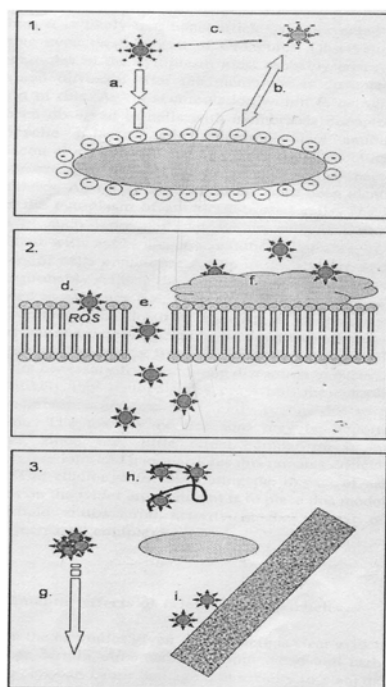
2.5.1.4 Interakcije med nanodelci in celicami

Interakcije nanodelcev s celicami so odvisne od velikosti nanodelcev (Morones in sod., 2005), poleg tega pa se zdi, da so interakcije odvisne tudi od oblike nanodelcev (Pal in sod., 2007). Večina študij domneva, da nanodelci povzročijo prekinitev bakterijske membrane, najverjetneje zaradi tvorbe ROS. Kar nekaj teorij je že bilo predlaganih, da bi pojasnile fenomen produkcije ROS, ki lahko prekinejo celične strukture in motijo delovanje normalnega metabolizma (Nel in sod., 2006; Choi in Hu, 2008), se povežejo z makromolekulami in povzročijo njihovo nefunkcionalnost (Gogoi in sod., 2006), hkrati pa delujejo kot vir za raztopljene kovinske ione in stopnjujejo njihovo biološko dostopnost (Choi in sod., 2008).

Kontakt med nanodelci in bakterijsko membrano se pokaže kot nujen zato, da postane učinek delovanja nanodelcev viden. V tem pogledu so pomembne medploskovne sile (med delcem ali bakterijsko celico ter medijem v okolju), kot so npr. elektrostatične interakcije. Premalo cenjeni pa ne smejo biti niti prosti kovinski ioni, ki izvirajo iz nanodelcev. Prehod nanodelcev skozi intaktno membrano se zdi malo verjeten, čeprav je pogosto vidna akumulacija delcev znotraj citoplazme, do le-tega pa verjetno pride po prekinitvi membrane.

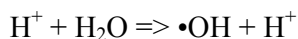
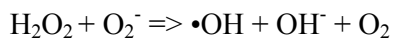
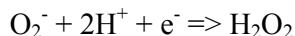
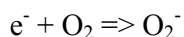
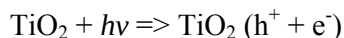
2.5.1.5 Model antibakterijske aktivnosti nanodelcev

Opisan mehanizem antibakterijske aktivnosti nanodelcev temelji na njihovi povzročitvi OS, s čimer pride do peroksidacije lipidov (Neal, 2008). Medploskovne sile, še posebej elektrostatična, nadzorujejo kontakt med nanodelci in bakterijsko membrano. Privlačne sile se ustvarijo med pozitivno nabitimi nanodelci in negativno nabito bakterijsko celico (slika 1a). Odbojna sila se ustvari med bakterijsko celico in negativno nabitimi nanodelci (slika 1b). Proces, ki spremeni površinski naboj nanodelcev (slika 1c), lahko indirektno spremeni interakcije med nanodelci in bakterijsko celico. Čim pridejo nanodelci v kontakt z bakterijsko membrano, povzročijo letalne poškodbe celice s produkcijo ROS (slika 2d), sčasoma lahko zato nanodelci vstopijo v periplazmo/citoplazmo celice (slika 2e). Izločeni ogljikovi hidrati in proteini, tako imenovani eksopolimeri, lahko preprečijo poškodbe celice. Eksopolimeri so pogosto povezani s pritrjenimi celicami in biofilmi, s čimer so celice, ki tvorijo biofilme, odpornejše na poškodbe, ki jih povzročajo nanodelci. Z izpustom nanodelcev v okolje lahko številni procesi zmanjšajo verjetnost kontakta med membrano in nanodelci. Fizikalno-kemijske spremembe v okoljskem mediju, tako kot je npr. porast ionske moči, lahko povzročijo, da se delci povežejo v skupke, odbojne sile med primarnimi delci pa so posledično zmanjšane. Skupki delcev se lahko povežejo z naravno organsko snovjo (slika 3h), kot so huminske in fulvo kisline, s čimer se antibakterijski učinek nanodelcev zmanjša. Neorganske površine, kot so mineralni delci v prsti, pa lahko prav tako preprečijo direkten kontakt med nanodelci in bakterijo z »ujetjem« nanodelcev na površine (slika 3i).



Slika 3: Model antibakterijske aktivnosti nanodelcev (Neal, 2008:366).

Pri neorganskih nanodelcih (npr. TiO_2 , ZnO) se antimikrobna aktivnost za bakterije ob prisotnosti svetlobe močno poveča (Adams in sod., 2006). Pri uporabi nanodelcev TiO_2 ter ob prisotnosti UV svetlobe in kisika pride do produkcije ROS po naslednji reakciji:



Teza, da so ROS odgovorne za vidne membranske poškodbe, do katerih pride zaradi delovanja kovinskih nanodelcev, je podkrepljena z dejstvom, da kadar sta encima superoksid dismutaza, ki katalizira dismutacijo O_2^- v kisik in H_2O_2 , ter katalaza, ki katalizira razpad H_2O_2 v vodo in kisik, dodani suspenziji z nanodelci, se poškodbe celične membrane pri bakteriji *E. coli* močno zmanjšajo (Chang in sod., 2007).

Odkar je znano, da imajo nanodelci reaktivnih kovinskih oksidov dober baktericiden učinek, se je povečalo zanimanje za odkritje drugih neorganskih nanodelcev, ki bi bili uporabni kot antibakterijski material.

2.5.2 Srebro

Antimikrobni učinki srebra so znani že stoletja. Srebro sodi med žlahtne kovine, a je vseeno veliko bolj reaktivno kot zlato ali platina. Nakit, jedilni pribor, srebrni novci v čutarah za vodo so le nekateri od številnih načinov, ki so jih ljudje uporabljali za boj z bakterijami. Zaradi močne strupenosti srebra za zelo širok spekter mikroorganizmov nanodelci srebra s še povečano kemijsko aktivnostjo v primerjavi z masivnim srebrom spadajo med trenutno najpomembnejše nanotehnološke antimikrobne snovi, ki se jim obeta raznovrstna uporaba. V medicini se nanosrebro uporablja za zdravljenje opeklin in kroničnih poškodb kože ter dermatoloških bolezni, pri katerih koža nima več naravnih obrambnih mehanizmov za boj z bakterijami. Nanosrebro je učinkovito pri zdravljenju AIDSA, ravno tako kot drugi nanodelci pa je nevarno za človeka, ker hitro preide v krvni obtok, saj je membrana med steno pljučnih mešičkov na krvnih kapilarah debela le 500 nm.

Točen mehanizem, kako deluje srebro na mikroorganizme, še vedno ni znan. Predlagani pa so bili možni mehanizmi delovanja srebra, srebrovih ionov in srebrovih nanodelcev glede na morfološke in strukturne spremembe, ki so se pojavile v bakterijski celici.

Pri srebru naj bi bil učinek delovanja povezan z interakcijo srebra s tiolskimi skupinami, ki jih najdemo pri respiratornih encimih bakterijske celice. Srebro se poveže z bakterijsko celično steno in celično membrano ter inhibira respiracijski proces (Rai in sod., 2009). V primeru bakterije *E. coli* srebro učinkuje tako, da inhibira prevzem fosfata in sprostitve fosfata, manitola, prolina in glutamata iz bakterijske celice *E.coli*.

2.5.2.1 Srebrovi ioni

Mehanizem delovanja srebrovih ionov ni povsem razumljen. Njegovi učinki so vidni preko strukturnih in morfoloških sprememb v bakterijski celici. Domnevajo, da zaradi izpostavitve srebrovim ionom DNA izgubi svojo replikacijsko sposobnost, celični proteini pa postanejo neaktivni. Dokazano je bilo, da se srebrovi ioni povežejo s funkcionalnimi skupinami proteinov, zaradi česar pride do denaturacije proteinov.

Srebrovi ioni naj bi torej deaktivirali celične encime in DNA tako, da reagirajo z elektronskimi donorji, kot so tiolske (SH) skupine in povzročijo tvorbo ROS (Choi in sod., 2008).

2.5.2.2 Srebrovi nanodelci

Zaradi učinkovitih antimikrobnih lastnosti in nizke toksičnosti za sesalske celice so srebrovi nanodelci postali eni izmed najbolj splošno uporabljenih nanomaterialov v potrošniških izdelkih. Nanosrebro je nov razred materiala z izredno drugačnimi fizikalno-kemičnimi karakteristikami, kot so povečane optične, elektromagnetične in katalitične lastnosti, kot jih ima takšen makro material (Nel in sod., 2006).

Nanodelci se pripnejo na celično membrano in prodrejo v bakterijsko celico. Bakterijska membrana vsebuje žveplo vsebujoče proteine in srebrovi nanodelci reagirajo s temi proteini, prav tako v celici ter tudi s P vsebujočimi komponentami, kot je npr. DNA. Vse to povzroči inaktivacijo DNA replikacije, kar pa vodi v inhibicijo encimskih funkcij. S tem se močno poškodujejo celične pglavlitne funkcije, kot je permeabilnost, respiracijski proces, regulacija encimske signalne aktivnosti in celična oksidacija. Ko vstopijo nanodelci v celico, »napadejo« respiratorno verigo, čemur sledi celična smrt. V celici srebrovi nanodelci sprostijo srebrove ione, ki dodatno zvišajo baktericidno aktivnost srebrovih nanodelcev (Sondi in Salopek-Sondi, 2004; Morones in sod., 2005).

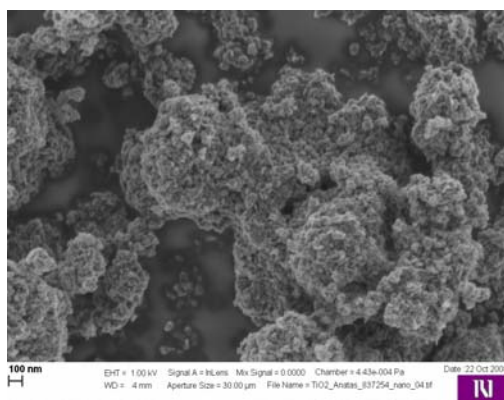
Študija, ki sta jo opravila Sondi in Salopek-Sondi (2004) je pokazala, da antimikrobna učinkovitost srebrovih nanodelcev, dodanih v tekoč medij, pade v primerjavi z njegovo učinkovitostjo, če so bili delci dodani na agarno ploščo. Razlog je po vsej verjetnosti ta, da pride v tekočem mediju do koagulacije nanodelcev, ki je spodbujena s strani mikrobov.

2.5.2.3 Nanodelci TiO₂

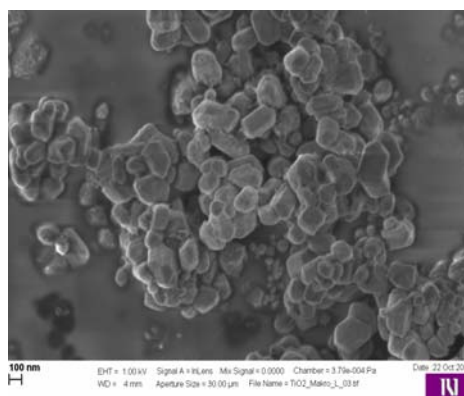
Je najbolj vsestransko uporaben nanomaterial zaradi svoje antimikrobne aktivnosti in fotokatalitične sposobnosti za zaščito pred UV sevanjem. Je dodatek hrani, kot belilno sredstvo in kot podaljševalec obstojnosti hrane zaradi svojih antibakterijskih lastnosti. Dodajajo ga v premaze bonbonov, z njimi loščijo sadje, je v fermentiranem mleku, kot zgoščevalec v zdravilih in dodatek v moki. Uporablja se v sončnih celicah, v samočistilnih oknih in za čiščenje vode. Uporabljal naj bi se celo za zmanjšanje onesnaženja v mestih, saj katalizira pretvorbo dušikovega dioksida v manj toksične nitrate. Vsestranska uporabnost je posledica njegovih lastnosti, kot so netopnost v vodnih raztopinah, je poceni,

lahko se ga pripravi v stabilnih suspenzijah (Fabian in sod., 2008). Zaradi pestre uporabe so nanodelce TiO_2 nanotoksikologi najbolj vzeli pod drobnogled, še posebej, ko so ugotovili, da so delci, ki so manjši od 200 nm, zelo aktivni pod vplivom UV svetlobe. Zaradi vzbujanja s svetlobo z valovno dolžino manjšo od 385 nm se vzbudijo elektroni zunanjih orbital na površini nanodelcev. Vzburjeni elektroni lahko reagirajo z molekulami vode ali hidroksilnimi ioni, pri tem pa nastanejo hidroksilni in superoksidni radikali (Maness in sod., 1999). Nanodelci TiO_2 se čedalje več uporabljajo v kozmetiki in farmaciji. Ker je nano TiO_2 aktiven material v sončnih kremah, se je odprla polemika, ali so sončne kreme na osnovi nanodelcev TiO_2 sploh zdrave. Razvili so jih predvsem zaradi dekorativnih namenov, saj tako majhni delci slabše sipljejo svetlobo, zato so kreme prosojne.

Že leta 1997 so kanadski znanstveniki dokazali, da so delci, ki so jih izolirali iz sončne kreme, povzročili tvorbo hidroksilnih ionov, ki lahko poškodujejo DNA in vodijo do nastanka kožnega raka. Delci prodrejo v globlje plasti kože vzdolž kanalov ob dlakah, skozi drobne ranice, pri tem pa jim tudi pomagamo z drgnjenjem, ko kremo nanašamo na kožo, saj s tem delcem damo potrebno kinetično energijo za mobilnost. V mikronski velikosti TiO_2 ni aktiven, zato je z zakonodajo EU in tudi drugod uvrščen med varne materiale za prehrano ljudi. Vendar ta zakonodaja nikjer ne omenja velikosti delcev, čeprav je vse več poročil, da nanodelci lahko vplivajo na zdravje.



Slika 4: Površina manjših nanodelcev TiO_2 , vrstični elektronski mikroskop (foto: Bele, 2010).



Slika 5: Površina večjih nanodelcev TiO_2 , vrstični elektronski mikroskop (foto: Bele, 2010).

2.5.2.4 Nanodelci Zn in ZnO

Nano Zn in nano ZnO uporabljajo v pigmentih, medicinski diagnostiki, v sončnih kremah, v kozmetiki, v katalizi in metalurgiji. Nekaj cinka je tudi nujnega v organizmu sesalcev za delovanje encimov, sintezo DNA, rast in delitev celic, razvoj možganov itd. Zato je to običajna sestavina prehrabnih dodatkov. Pomanjkanje cinka povzroča zastajanje v rasti, dovzetnost za infekcije, kožne bolezni in počasno celjenje ran. Izpostavljenost nanodelcem cinka v proizvodnji tega nanomateriala je lahko zelo tvegana.

Raziskave na miših so pokazale, da imajo miši po zaužitju nano cinka z velikostjo 40-70 nm najprej resne prebavne težave, da zaostajajo v rasti, so slabokrvne ter imajo okvare jeter, ledvic in srčne mišice.

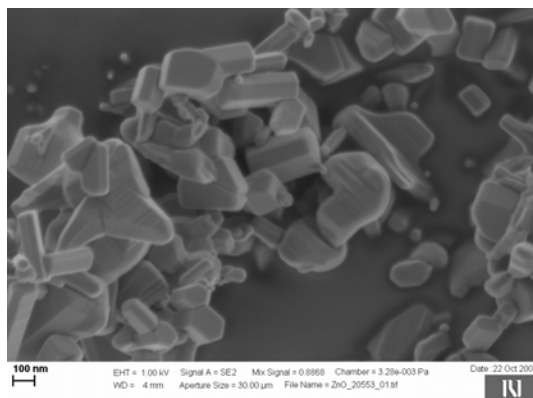
Nanodelci ZnO inhibirajo rast tako G + kot G - bakterij. Kažejo celo antibakterijsko aktivnost proti sporam, ki so odporne na visoko T in tlak (Sawai in sod., 1995a, b). Manjši nanodelci ZnO imajo boljšo antibakterijsko aktivnost (Sawai in sod., 1995a). Antibakterijska aktivnost nanodelcev ZnO je odvisna od zunanje površine delcev in njihove koncentracije, medtem ko imata kristalna struktura in oblika delca manjši vpliv na antibakterijsko aktivnost teh delcev. Večja kot je koncentracija in zunanja površina delca, boljša je antibakterijska aktivnost. Obdelava nanodelcev ZnO z visoko T ima močan vpliv na njihovo antibakterijsko aktivnost. Obdelava delcev pri višji T vodi namreč k znižani antibakterijski aktivnosti (Sawai in sod., 1995a).

Mehanizem antibakterijskega delovanja nanodelcev ZnO je slabo razumljen, kljub temu da so Sawai in sod. (1995a) predlagali, da je nastanek vodikovega peroksida glavni faktor njegove antibakterijske aktivnosti. Kemična toksičnost nanodelcev temelji na sproščanju toksičnih ionov, kar bi prav tako morali upoštevati, saj topnost nanodelcev močno vpliva

na citotoksičnost (Brunner in sod., 2006). Nanodelci ZnO inducirajo citotoksičnost z raztapljanjem cinkovih ionov. Izpostavitve celic nano ZnO lahko poveča membransko permeabilnost natrijevih in kalijevih tokov skozi celico, kar privede do ionske homeostazne motnje.

E. coli potrebuje Zn^{2+} v svojem metabolizmu. Homeostaza kovinskih ionov je pomembna za življenje bakterij, saj so vpleteni v regulacijo širokega spektra metaboličnih funkcij kot koencimi, kofaktorji in katalizatorji ter kot strukturni stabilizatorji encimov in DNA povezujočih proteinov (Jones in sod., 2007). Kakorkoli, presežek kovin ali kovinskih ionov je toksičen za bakterijsko celico. Zato so bakterije razvile mehanizme za regulacijo procesov pritoka in odtoka le-teh, s čimer vzdržujejo znotrajcelično koncentracijo kovinskih ionov, vključno s cinkovimi. Geni, odgovorni za transport cinkovih ionov, so bili opisani pri številnih bakterijah: *S. aureus*, *E. coli* in *B. subtilis*. Pri *S. aureus* so bili opisani geni *zntA* in *zntR*. *ZntA* je transmembranski protein, ki je odgovoren za izliv cinkovih in kobaltovih ionov, medtem ko je *ZntR* za cink občutljiv regulatorni protein (Jones in sod., 2007).

Stoimenov in sodelavci (2002) so predlagali, da so razlog za antibakterijsko aktivnost teh nanodelcev elektrostatične interakcije med bakterijsko površino in nanodelci. Zdi se, da bi lahko ROS, producirane s strani nanodelcev ZnO, bile mehanizem njihovega antibakterijskega delovanja, a za to ni nobenih dokazov. Prisotnost ROS je bila zaznana tudi s strani Sawai in sodelavcev (1995a). Manj znano pa je, kako so ROS producirane in kako dokazati njihovo produkcijo, če so glavni mehanizem antibakterijskega delovanja nanodelcev ZnO. Znano je, da so lahko nanodelci ZnO fotokatalitični pod vplivom UV svetlobe, kar bi lahko bil razlog za produkcijo ROS.



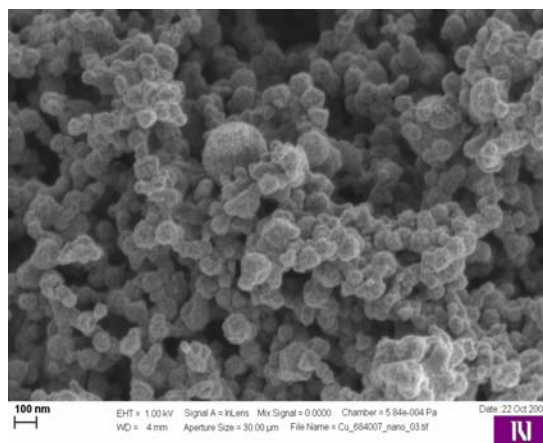
Slika 6: Površina nanodelcev ZnO, vrstični elektronski mikroskop (foto: Bele, 2010).

2.5.2.5 Nanodelci Cu in CuO

Vemo, da so uporabljali baker in bakrove zmesi za dezinfekcijo tekočin, tal ter človeškega tkiva že stoletja. Dandanes se baker uporablja kot čistilec za vodo, kot zaviralec rasti alg, fungicid, uničevalec nematod, mehkužcev in kot antibakterijsko sredstvo. Baker je tudi eden od manjše skupine kovinskih elementov, ki so nujno potrebni za človekovo zdravje. V nasprotju z nizko občutljivostjo človeškega tkiva na baker pa so mikroorganizmi nanj zelo občutljivi.

Ničvalentni nanodelci bakra so znatno uporabljeni v elektroniki, lončarstvu, premazih, kartušah... Poleg tega pa so ničvalentni nanodelci bakra pokazali velik obet pri zdravljenju osteoporoze, uporabljajo jih tudi kot dodatek hrani za živino in perutnino in kot antibakterijsko sredstvo. Izpostavljenost ničvalentnim nanodelcem bakra naravnemu okolju je povečana zaradi njihove naraščajoče proizvodnje in uporabe. CuO je pritegnil veliko pozornosti, ker je najpreprostejši član družine bakrovih zmesi in kaže vrsto uporabnih fizikalnih lastnosti. Ker so lahko nanodelci CuO pripravljani tako, da imajo ti delci zelo veliko zunanjo površino ter neobičajno kristalno morfologijo, so lahko precej dragoceni kot antimikrobne učinkovine. Nanodelci CuO so pokazali antimikrobno aktivnost proti G + in G - bakterijam. Pokazali so se kot nadvse učinkoviti pri uničevanju bakterijskih patogenov, ki so vključeni v bolniško pridobljene infekcije. Nanodelci bakra in njihovi ioni so toksični za G - bakterijo *E. coli*, saj povzročijo nastanek hidroksilnih radikalov v citoplazmi. Ti radikali poškodujejo DNA, proteine in ostale molekule, kar privede do celične smrti.

Številne študije so dokazale toksično naravo nanodelcev bakra. Študije, opravljene na miših, ki so bile izpostavljene nanodelcem bakra, so pokazale na težke poškodbe ledvic, jeter in vranice (Rispoli in sod., 2010).



Slika 7: Površina nanodelcev CuO, vrstični elektronski mikroskop (foto: Bele, 2010).

2.5.2.6 Antimikrobno delovanje bakrovih in cinkovih ionov

Baker in cink sta v majhnih količinah nujno potrebna za različne metabolne procese pri večini živečih organizmov, pri večjih količinah pa sta potencialno toksična. Trije glavni mehanizmi, ki so značilni za antimikrobno aktivnost cinkovih ter bakrovih ionov, so:

- kovinski ioni se povežejo s proteini ter jih deaktivirajo,
- kovinski ioni lahko reagirajo z mikrobo membrano, kar povzroči spremembe na membranski strukturi in njeni prepustnosti,
- kovinski ioni reagirajo z mikrobnimi nukleinskimi kislinami ter preprečijo mikrobo replikacijo.

Kovinski ioni kristalne površinske oblike se močno povežejo s tiolskimi, imidazolnimi, amino in karboksilnimi skupinami mikroorganizemskih membranskih proteinov, s čimer povzročijo strukturne spremembe. Takšni membrani se močno poveča prepustnost, kar mikroorganizemskim celicam onemogoči normalno nadzorovanje transporta snovi preko plazemske membrane, to pa vodi v celično smrt.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

agar-agar (Biolife, Italija)

destilirana voda (dH_2O)

NaCl $M_w = 58,5$ g/ml (Merck, Nemčija)

D-(+)-glukoza $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ $M_w = 180,16$ g/ml (Kemika, Hrvaška)

hranilni bujoh (Biolife, Italija)

sladni ekstrakt (Biolife, Italija)

pepton (Merck, Nemčija)

ZnCl_2 $M_w = 136,3$ g/ml (Fluka, Švica)

Pri poskusu smo uporabili sledeče nanodelce:

- titanov dioksid (TiO_2)
- cinkov oksid (ZnO)
- bakrov oksid (CuO)

3.1.2 Karakterizacija uporabljenih nanodelcev

V poskusu smo testirali dve različni velikosti nanodelcev TiO_2 . Manjši nanodelci TiO_2 imajo povprečno primarno velikost 25 nm, drugi tip pa so nanodelci TiO_2 , katerih povprečna primarna velikost je 75 nm. Prav tako smo v raziskavi uporabili dve različni velikosti nanodelcev ZnO . Manjši nanodelci imajo povprečno primarno velikost 100 nm, drugi tip pa so nanodelci ZnO , katerih povprečna primarna velikost je 1 μm . Proučili smo tudi vpliv nanodelcev CuO s povprečno primarno velikostjo 50nm. Karakteristike uporabljenih nanodelcev prikazuje preglednica 1.

Uporabljen material je bil proučen s pomočjo BET analiz (Brunaver-Emmett-Teller-površinske analize, Tristar 3000, Micrometrics) z namenom, da se prouči površina uporabljenih nanodelcev. Nesonicirani nanodelci v 2-krat destilirani vodi so bili pregledani s pomočjo SEM (vrstični elektronski mikroskop) in s pomočjo DLS (tehnika dinamičnega sipanja svetlobe). Fotografije pridobljene s pomočjo SEM prikazujejo slike 4, 5, 6 in 7.

Preglednica 1: Karakterizacija izbranih nanodelcev. (/ ni podatkov, N nesonificirani nanodelci, BET (Brunauer-Emmett-Teller-surface area analysis), DLS (Dynamic light scattering technique), TEM transmissijski elektronski mikroskop)) (Sigma-Aldrich, 2009).

Tip nanodelcev	manjši TiO ₂ (N)	večji TiO ₂ (N)	ZnO (N)	makro ZnO (N)	CuO (N)
Informacije dobavitelja (Sigma-Aldrich)	nanoprah, velikost delca <25 nm	velikost delca <75 nm (BET)	nanoprah, velikost delca <100 nm	makroprah, velikost delca <1 µm	nanoprah, velikost delca <50 nm (TEM)
BET					
Velikost nanodelca (nm)	10,24	38,45	84,90	/	/
Specifična površina nanodelca (m ² /g)	146,38	39,00	12,39	/	/
DLS					
Velikost agregatov	784 – 970 nm	109 – 207 nm	614 nm	/	/

3.1.3 Gojišča in raztopine

Gojišče HA

Uporabljali smo tekoče gojišče HA z naslednjo sestavo:

- 8 g hranilni bujon
- 5 g NaCl
- do 1 L dH₂O

Za trdno gojišče HA smo dodali 15 g agar-agar na 1 L gojišča.

Gojišče MEA

Uporabljali smo tekoče gojišče MEA z naslednjo sestavo :

- 20 g hranilni bujon
- 1 g pepton
- 20 g glukoza
- do 1 L H₂O

Za trdno gojišče MEA smo dodali 20 g agar-agar na 1 L gojišča.

pH pripravljenega gojišča je moral biti med 5-5,5.

Fiziološka raztopina

- 9 g NaCl na 1000 mL dH₂O

3.1.4 Proučevani bakterijski sevi

E. coli EXB S7, *B. subtilis* EXB L30, *S. aureus* EXB V102 in *S. epidermis* EXB V55 .

3.1.5 Proučevani sevi gliv

S. cerevisiae EXF 3362, *C. albicans* EXF 525, *H. werneckii* EXF 225 in *R. mucilaginosa* EXF 3790.

Seve najdemo v EX Mikrobiološki zbirki Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.1.6 Steklovina in potrošni material

- petrijevke
- epruvete
- pipete
- eze
- nastavki za pipete
- erlenmajerice
- male steklene stekleničke
- spatula

3.2. METODE

3.2.1.1 Priprava proučevanih kultur bakterij in gliv:

Za izvedbo poskusa smo potrebovali »sveže« bakterijske kulture, zato smo si proučevane bakterijske kulture do posameznih kolonij nacepili na agarne (HA) plošče. Proučevane bakterijske kulture so bile: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* in *S. epidermis*. Nacepljene plošče smo nato pustili preko noči na 37 °C. Naslednji dan, ko so bile bakterijske kolonije vidne pa smo plošče shranili v hladni sobi. Vsakih štirinajst dni smo bakterijske kulture precepili na nove agarne plošče. Glive, ki smo uporabili pri poskusu, so bile: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*. Delo z glivami je potekalo v laminariju.

Proučevane glive smo nacepili na poševnike (MEA), le-te pa nato shranili v inkubatorju na 28 °C toliko časa, dokler glive niso zrasle. Nato smo poševnike shranili v hladni sobi. Vsakih 30-40 dni pa smo tudi proučevane glive precepili na nove poševnike.

3.2.1.2 Določanje optične gostote proučevanih kultur:

Najprej smo iz agarne plošče, na kateri je bila nacepljena bakterijska kultura do posameznih kolonij s sterilno ezo-(predhodno je bila ožgana), odvzeli eno ali dve koloniji ter ju inokulirali v erlenmajerico s 25 mL tekočega gojišča (HA). Erlenmajerica je bila nato prenešena na stresalnik z 200 obrati na minuto, ki je bil v topli sobi na (37 °C). Gojenim bakterijskim kulturam smo ob vzorčenju, ki je potekalo vsako uro, izmerili optično gostoto pri 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) s pomočjo Perkin Elmer; Lambda Bio. UV/VIS spektrofotometra. Najprej smo spektrofotometer s pomočjo sterilnega (HA) gojišča umerili, nato smo iz erlenmajerice odpipetirali 1ml vzorca in ga vnesli v kiveto, ki smo jo vstavili v spektrofotometer in na ta način določili OD gojeni bakterijski kulturi. Ko je bila optična gostota pri 600 nm enaka 0,5, smo naredili redčitveno vrsto s fiziološko raztopino ($OD\ 0,1$ ustreza koncentraciji 10^8 celic/mL).

Na enak način je potekalo določevanje optične gostote pri proučevanih glivah. Razlika je bila zgolj v uporabi tekočega gojišča. Pri glivah smo namreč uporabili MEA gojišče, inokulirana erlenmajerica pa je bila prenesena na stresalnik z 200 obrati na minuto, ki se je nahajal v topli sobi na 28 °C.

3.2.1.3 Priprava nanodelcev

Medtem ko smo čakali, da bo dosežena optična gostota pri 600 nm enaka 0,5, smo pripravili nanodelce. Nanodelce smo stehali v sterilne steklene stekleničke s pomočjo laboratorijske tehtnice EXACTA310 EB, pri čemer smo si pomagali s spatulo. Na voljo smo imeli 9 sterilnih stekleničk. V pet stekleničk smo stehali ustrezno količino nanodelcev 4 mg, pri čemer je ena od stekleničk služila pozitivni kontroli, saj smo vanjo v nadaljevanju poskusa poleg nanodelcev dodali zgolj fiziološko raztopino. V preostale štiri pa smo po opravljeni redčitveni vrsti dodali samo ustrezno bakterijsko redčitev brez dodanih nanodelcev.

3.2.1.4 Ugotavljanje antimikrobnega delovanja nanodelcev

Pri nadaljnji izvedbi poskusa smo uporabili redčitve 10^{-4} in 10^{-5} (vsaka redčitev je bila zastopana v dveh paralelkah). Dvakrat po 4 mL redčitve 10^{-4} smo dodali v dve stekleni steklenički z nanodelci. Dvakrat po 4 mL redčitve 10^{-4} pa smo dodali dvema stekleničkama brez dodanih nanodelcev. V stekleničkah z dodanimi nanodelci je bila tako končna koncentracija le-teh 1000 $\mu\text{g/mL}$. Steklenička, ki je služila kot pozitivna kontrola, je bila namenjena preverjanju sterilnosti uporabljenih nanodelcev. Pred vsakim odvzemom bakterijske kulture smo epruveto z redčitvami premešali na vorteksu, nato odvzeli 4 mL redčitve in jo prenesli v stekleničko. Enak postopek smo izvedli tudi pri redčitvi 10^{-5} . Ko so bile vse stekleničke napolnjene z bakterijsko kulturo, smo jih ponovno premešali ter jih prenesli v toplo sobo na 37 °C. Po eno in dvourni inkubaciji oz. izpostavitvi bakterijske kulture nanodelcem je sledil razmaz redčitev (10^{-4} in 10^{-5}) na plošče. Pred odvzemom 0,1 mL kulture smo stekleničke zvorteksirali, nato pa smo 0,1 mL bakterijske kulture s pomočjo pipete nanесли na agarno (HA) gojišče. Temu je sledil razmaz s sterilno hokejko. Po razmazu smo vse plošče odnesli v toplo sobo na 37 °C. Po inkubaciji na 37 °C, ki je trajala 24 h, smo prešteli število kolonij na ploščah z in brez prisotnih nanodelcev. Sledil je izračun števila CFU mikroorganizmov na mL vzorca.

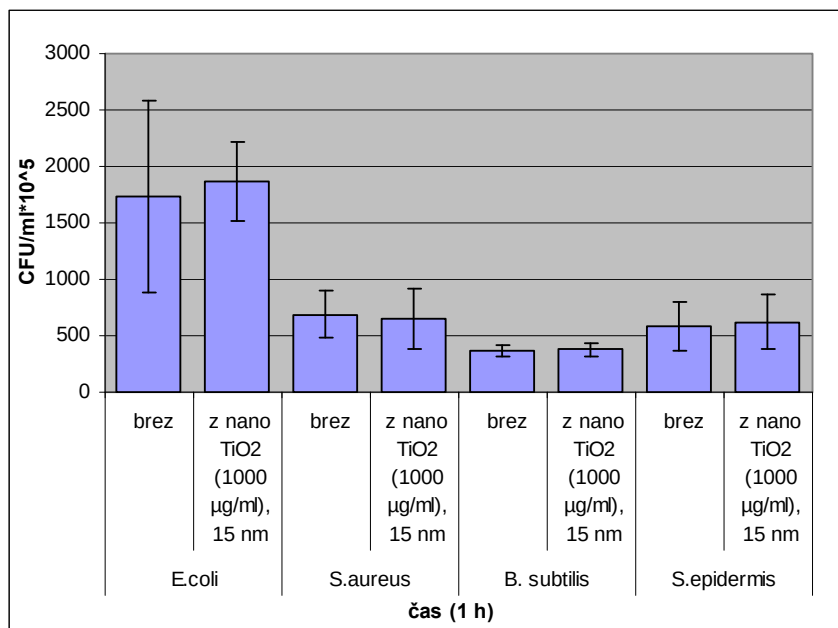
Pri glivah je bil postopek podoben. Razlika je bila le v času izpostavitve nanodelcem, ki je daljši (2 in 4 h). Poleg tega smo uporabili tudi drugačno agarne gojišče (MEA) kot pri bakterijah (HA). Inkubacija plošč je potekala teden dni na 28 °C.

4 REZULTATI

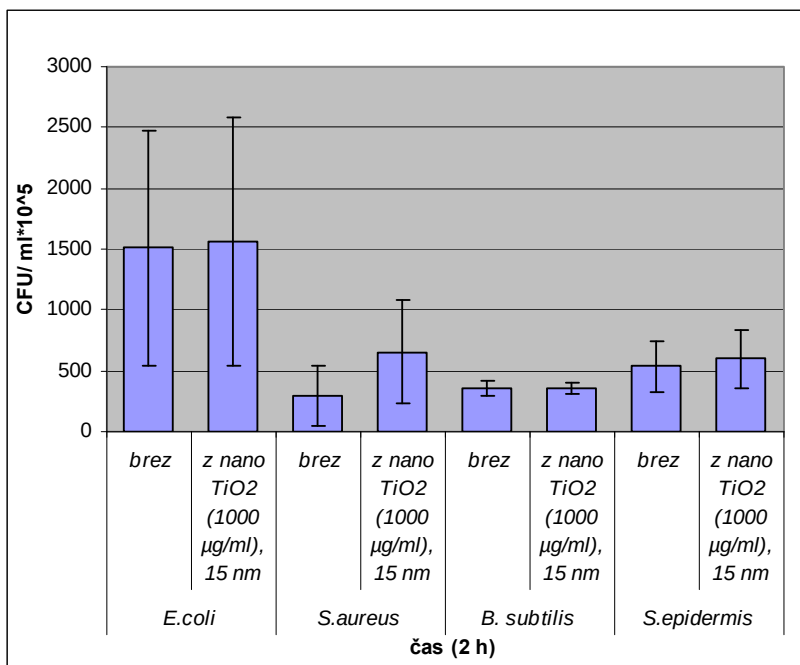
V nalogi smo ugotavljali vpliv nanodelcev različne kemijske zgradbe in različnih velikosti na izbrane bakterijske in glivne vrste. Uporabljeni nanodelci so bili: nano TiO_2 velikosti 25 nm, 75 nm, nanodelci CuO velikosti 50 nm in nanodelci ZnO velikosti 100 nm ter 1 μm . Proučevane bakterijske vrste so bile: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* in *S. epidermis*. Proučevane vrste gliv pa: *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*. Vpliv nanodelcev ZnO smo primerjali z vplivom makro delcev ZnO in ionov Zn.

Testirali smo dve velikosti nanodelcev TiO_2 . Prvi tip so nanodelci, katerih povprečna primarna velikost je 25 nm (t.i. manjši nanodelci = 15 nm) in drugi tip nanodelci, katerih povprečna primarna velikost je 75 nm (t.i. večji nanodelci = 40 nm).

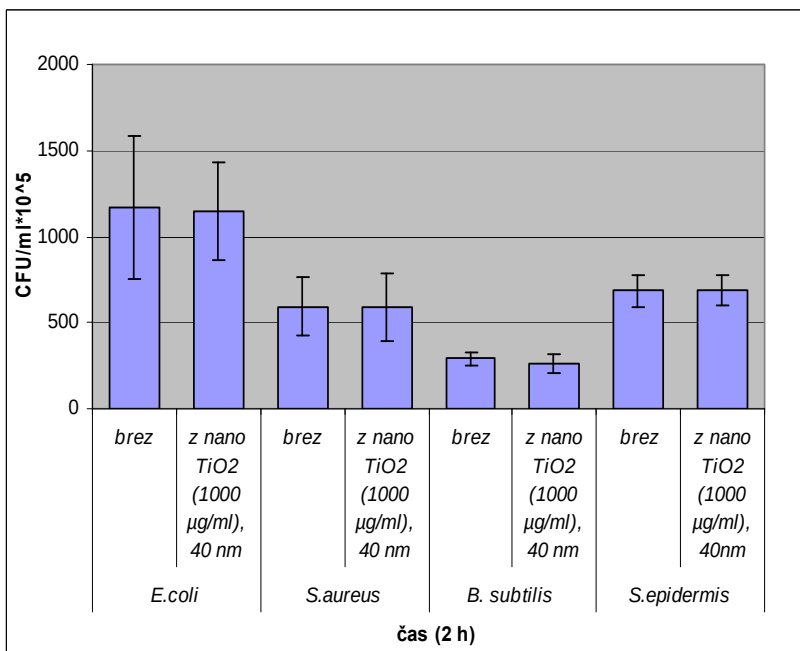
4.1 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV TiO_2 NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE



Slika 8: Število mikrobnih celic ($\text{CFU/ml} \cdot 10^5$) po 1 h izpostavitve 1000 $\mu\text{g/ml}$ nanodelcev TiO_2 velikosti 15 nm različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; $n = 8$; nano $\text{TiO}_2 = 15 \text{ nm}$)



Slika 9: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO₂ različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 15 nm)



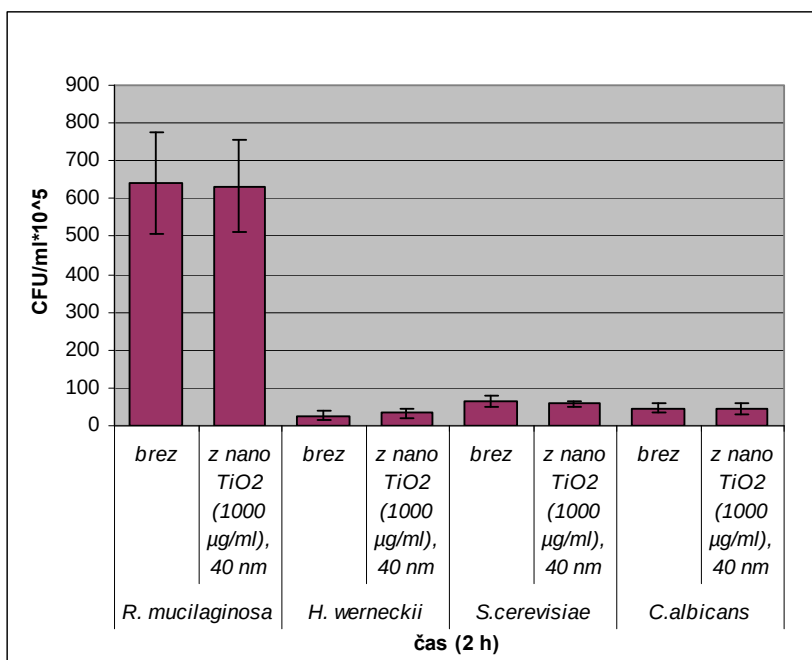
Slika 10: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO₂ različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 40 nm).

Grafa 8, 9 nam prikazujeta, da manjši delci nanodelcev TiO_2 (15 nm) nimajo vpliva na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa kažeta tudi na to, da ni bistvenih razlik v številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri bakterijah, izpostavljenih eno ali dve uri nanodelcem TiO_2 .

To pomeni, da nismo zaznali antibakterijskega učinka nanodelcev TiO_2 na bakterijske vrste : *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis*, če so bile izpostavljene nanodelcem TiO_2 za eno ali dve uri.

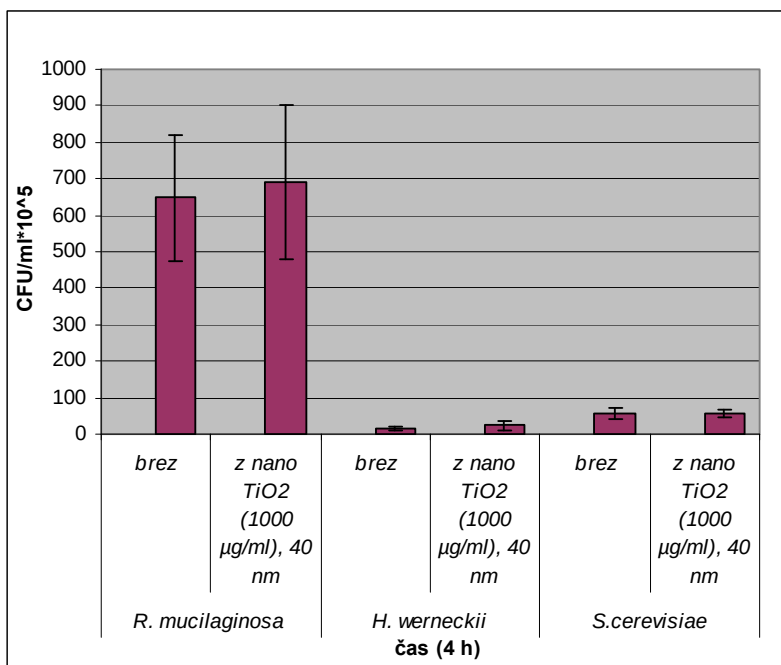
Graf 10 nam prikazuje, da tudi večji delci nanodelcev TiO_2 (40 nm) nimajo vpliva na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah po 2 h izpostavitve nanodelcem TiO_2 .

Torej tudi tu nismo zaznali antibakterijskega učinka nanodelcev TiO_2 na bakterijske vrste : *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis*, če so bile izpostavljene nanodelcem TiO_2 za 2 uri.



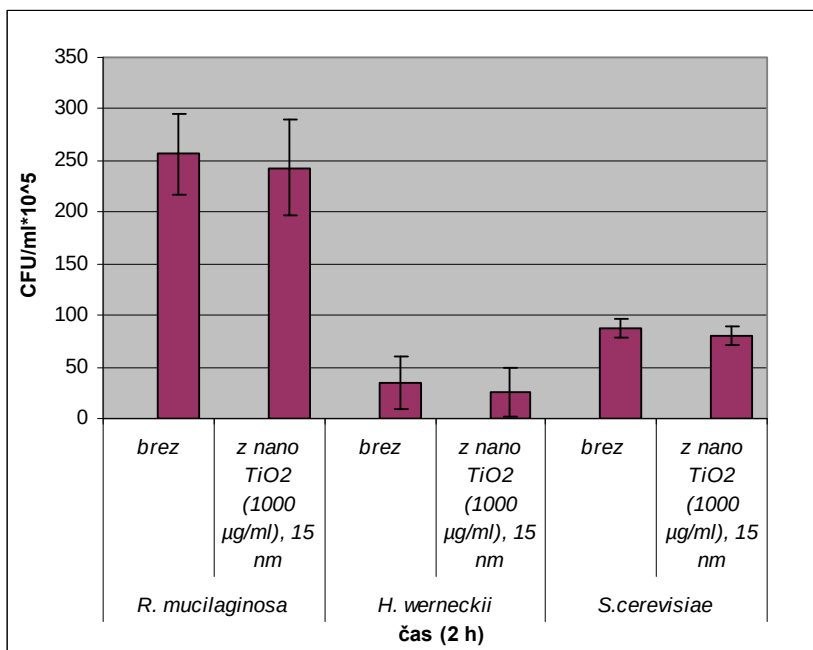
Slika 11: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO_2 različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko

raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 40 nm).

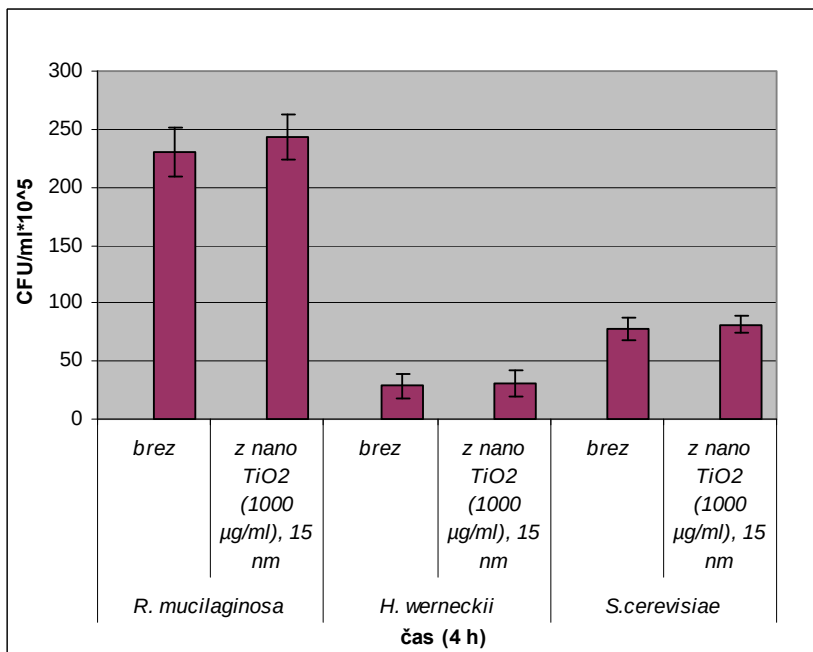


Slika 12 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO₂ različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 40 nm).

Grafa 11, 12 nam prikazujeta, da večji delci nanodelcev TiO₂ (40 nm) nimajo vpliva na število celic gliv, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa kažeta tudi na to, da ni bistvenih razlik v številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivah, izpostavljenim dve ali štiri ure nanodelcem TiO₂.



Slika 13 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO₂ različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 15 nm).



Slika 14 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev TiO₂ različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; nano TiO₂ = 15 nm).

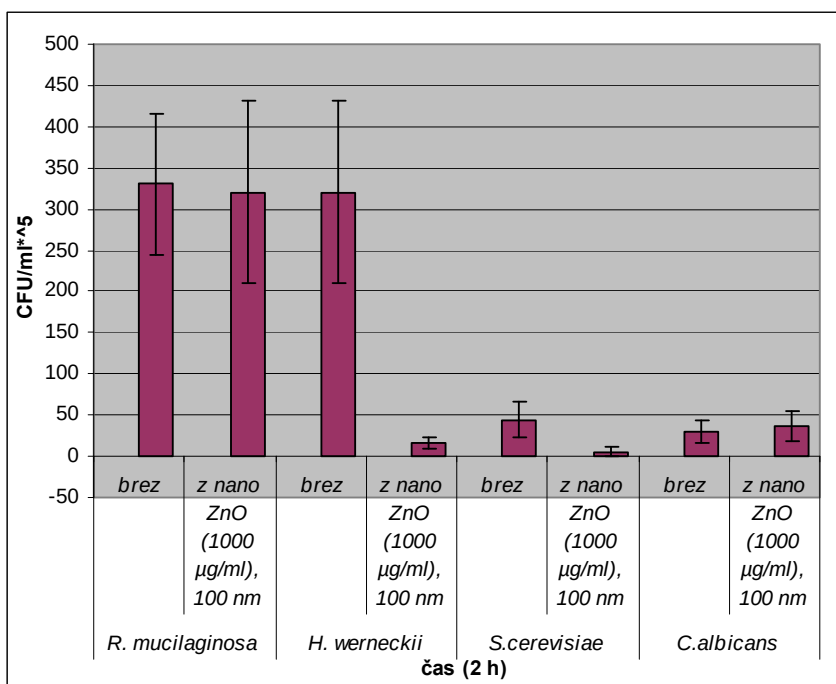
Grafa 13, 14 nam prikazujeta, da manjši delci nanoTiO₂ (15 nm) prav tako nimajo vpliva na število celic gliv, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa prikazujeta tudi to, da ni bistvenih razlik v številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivah, ki so bile izpostavljene nanodecem TiO₂ dve ali štiri ure.

Torej nismo zaznali zavirajočega učinka nano TiO₂ na rast proučevanih vrst gliv: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*, če so bile izpostavljene nanodelcem TiO₂ za dve ali štiri ure.

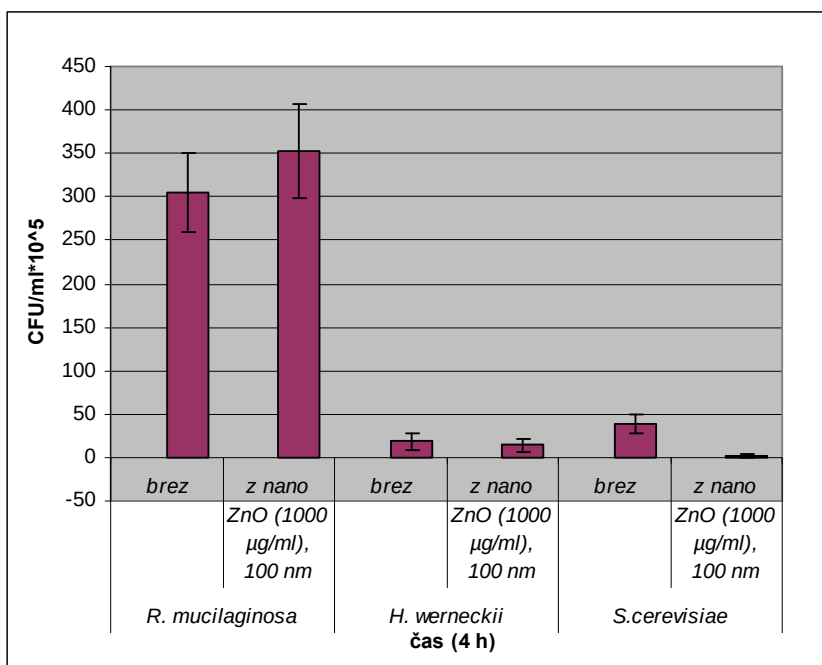
Iz dobljenih rezultatov vidimo, da je v posameznih primerih prišlo do nepričakovanega stimulatornega učinka nanodelcev TiO₂ na rast nekaterih proučevanih bakterij in gliv. Razloga, zakaj naj bi prišlo do takšnega učinka nanodelcev TiO₂ na rast proučevanih mikroorganizmov, ne moremo določiti, zato bi bile potrebne nadaljnje študije. Verjetnost, da je med poskusom prišlo do napake, je namreč majhna.

4.2 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV ZnO, MAKRODELCEV ZnO IN Zn IONOV NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE

Primerjali smo vpliv nanodelcev ZnO z vplivom makrodelcev ZnO ter vplivom Zn ionov, kar prikazujejo grafi 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 in 24. V tem delu študije smo ugotavljali vpliv na rast naslednjih bakterijskih vrst: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis* ter naslednjih vrst gliv: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*.



Slika 15: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 100 nm).



Slika 16: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko

raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 100 nm).

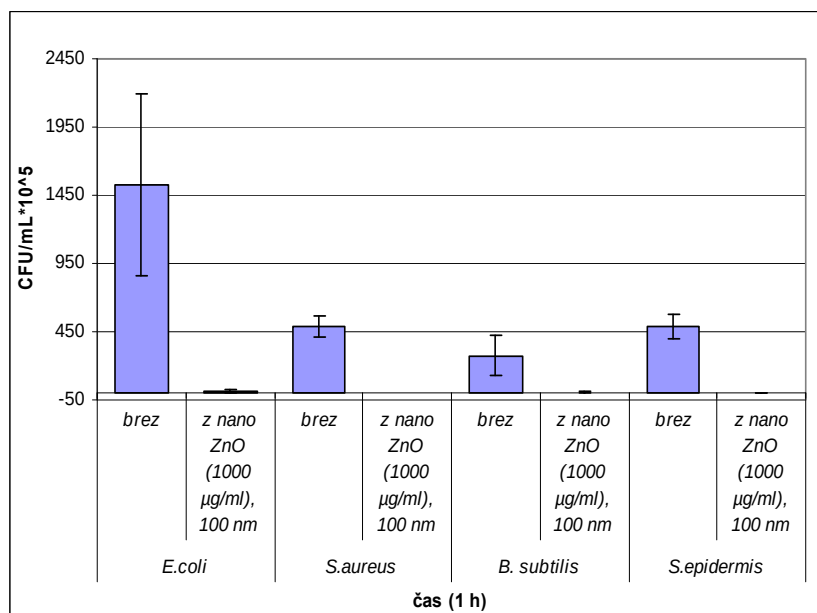
Grafa 15, 16 nam prikazujeta, da nanodelci ZnO vplivajo na število celic gliv, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa prikazujeta, da so razlike v številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri različnih vrstah gliv, izpostavljenim dve ali štiri ure nanodelcem ZnO.

Pri dvehurni izpostavitvi nano ZnO se kaže zaviralen učinek nanodelcev ZnO v zmanjšanem številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivah *S. cerevisiae* in *H. werneckii*, medtem ko nano ZnO nima bistvenega vpliva na število zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivah *C. albicans* in *R. mucilaginosa*.

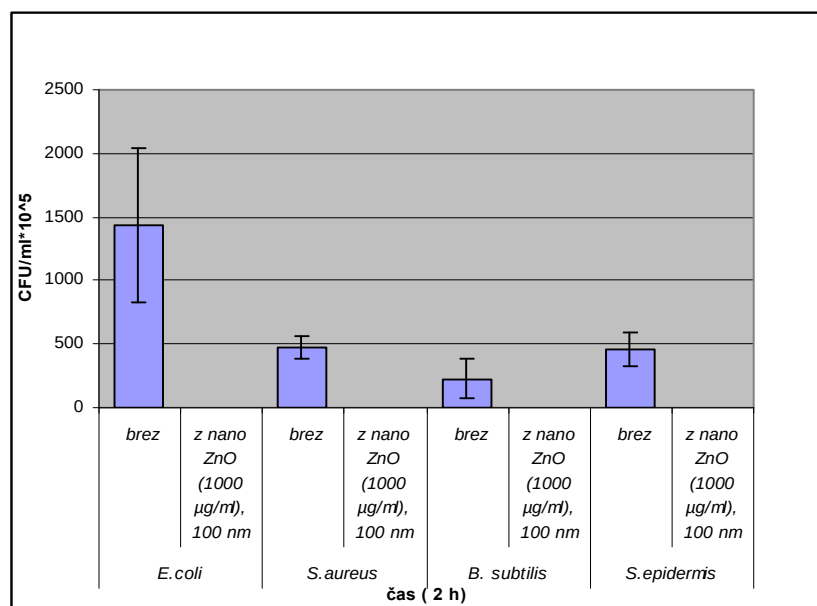
Pri štiriurni izpostavitvi nanodelcem ZnO se prav tako kaže zaviralen učinek nanodelcev ZnO v zmanjšanem številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivah *S. cerevisiae* in *H. werneckii*, medtem ko nano ZnO nima bistvenega vpliva na število zraslih kolonij na agarnih ploščah pri glivi *R. mucilaginosa*.

Na grafu opazimo zmanjšano število zraslih kolonij tako na agarnih ploščah, ki so bile izpostavljene nano ZnO kot tudi na kontrolnih ploščah, ki nanodelcem niso bile izpostavljene. Razlog za to ni znan.

Ugotovili smo, da imajo nano ZnO zaviralen učinek na rast pri glivah *S. cerevisiae* in *H. werneckii*, minimalen pa je bil vpliv nano ZnO na rast preostalih dveh gliv *C. albicans* in *R. mucilaginosa*.



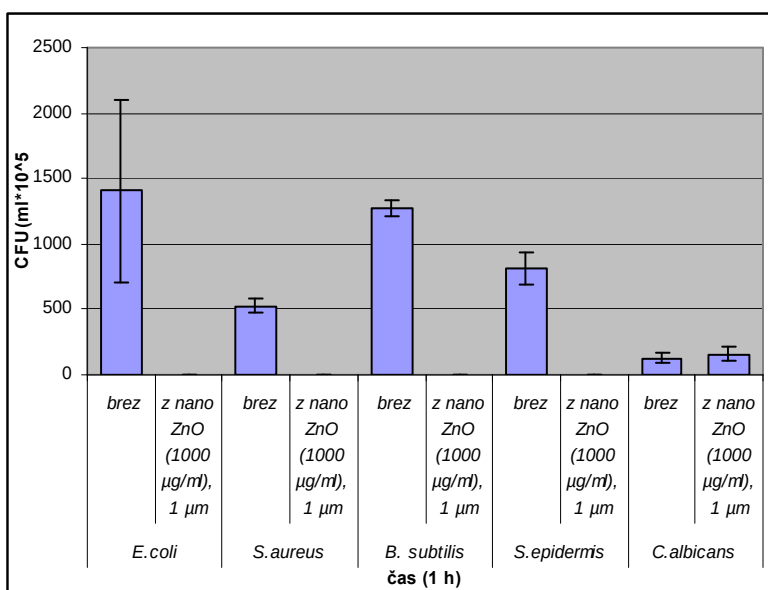
Slika 17 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 100 nm).



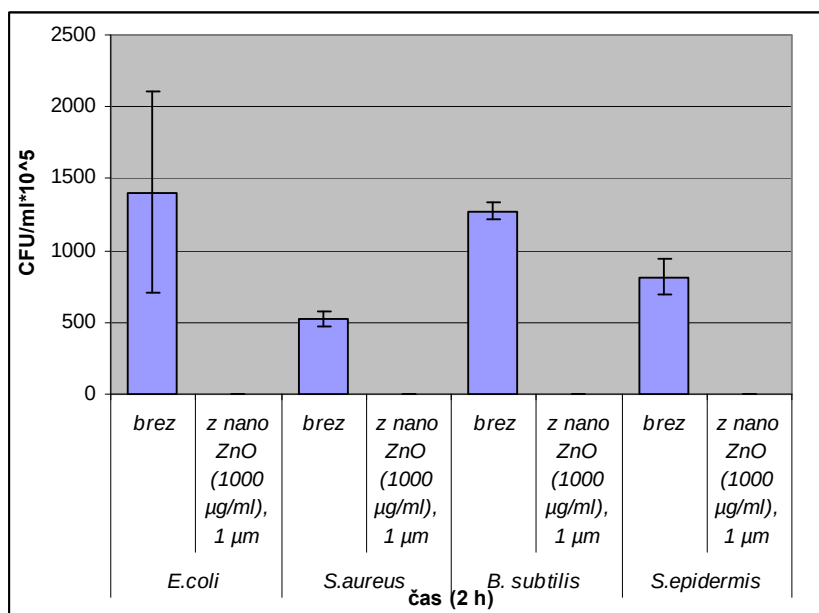
Slika 18 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev ZnO različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 100 nm).

Grafa 17, 18 nam prikazujeta, da nanodelci ZnO vplivajo na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa prikazujeta, da je bila rast pri proučevanih bakterijah ob eno in dveurni izpostavitvi nano ZnO popolnoma inhibirana.

Tako smo zaznali antibakterijski učinek nano ZnO na bakterijske vrste: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis*, če so bile izpostavljene nanodelcem ZnO za eno ali dve uri.



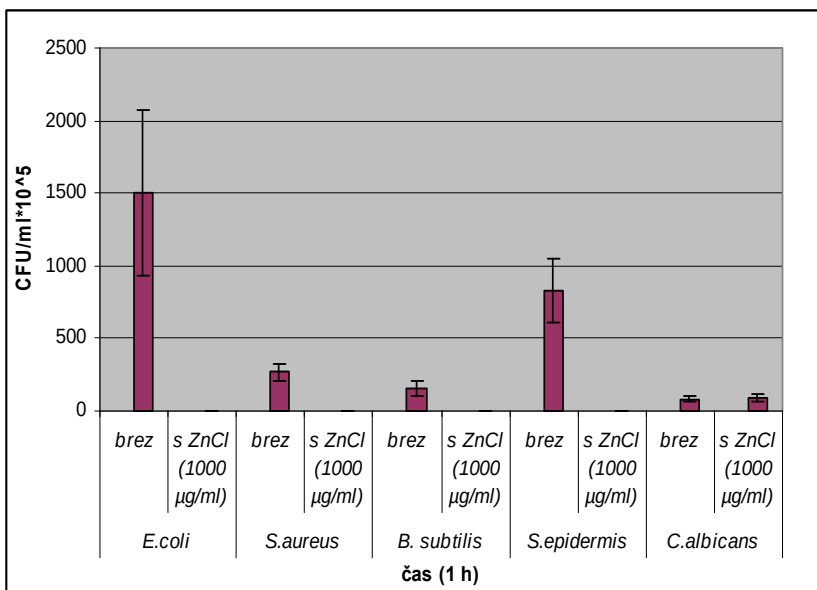
Slika 19: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml makro ZnO različnih vrst bakterij in glive *C. albicans*. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 1 µm).



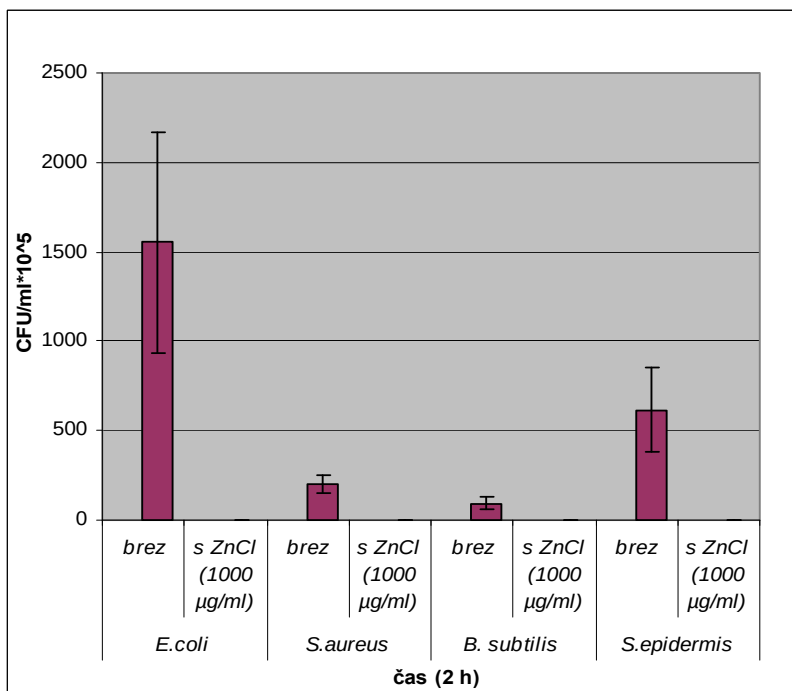
Slika 20: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml makro ZnO različnih vrst bakterij . (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnO = 1 µm).

Grafa 19, 20 nam prikazujeta, da nanodelci ZnO (makro) vplivajo na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah, da je bila rast pri proučevanih bakterijah ob eno in dveurni izpostavitvi nano ZnO (makro) popolnoma inhibirana. Iz grafa 19 pa razberemo, da nano ZnO (makro) nima vpliva na število celic, ki so sposobne delati kolonije na agarni plošči pri glivi *C. albicans*. Iz tega lahko sklepamo, da je vpliv nano ZnO (makro) ob 1 h izpostavitvi na rast glive *C. albicans* zanemarljiv.

Zaznali smo antibakterijski učinek nano ZnO (makro) na bakterijske vrste : *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis*, če so bile izpostavljene nanodelcem ZnO (makro) za eno ali dve uri. Pri glivi *C. albicans* pa zaviralnega učinka ob enourni izpostavitvi nano ZnO (makro) na rast te glive nismo zaznali.



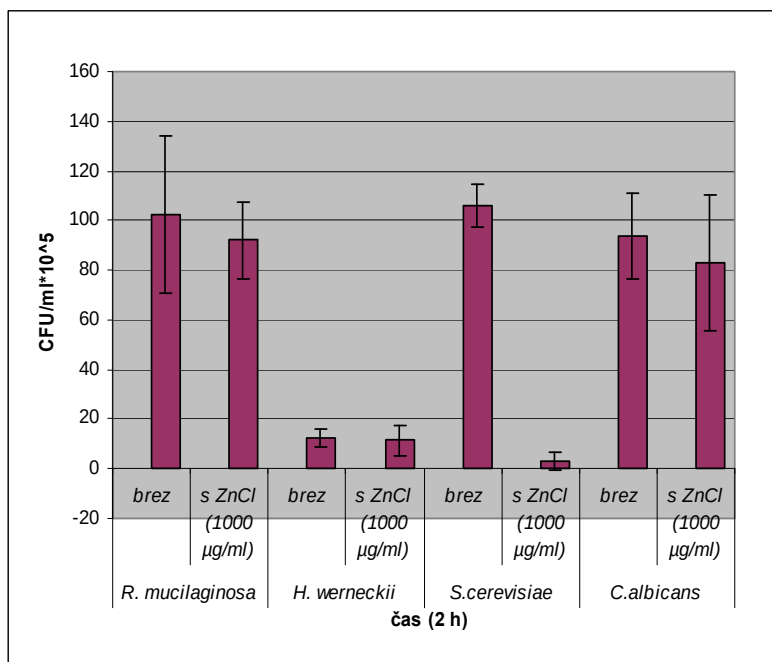
Slika 21: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl2 različnih vrst bakterij in glive *C. albicans*. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih cinkovih ionov v fiziološko raztopino; z = dodatek cinkovih ionov v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnCl2).



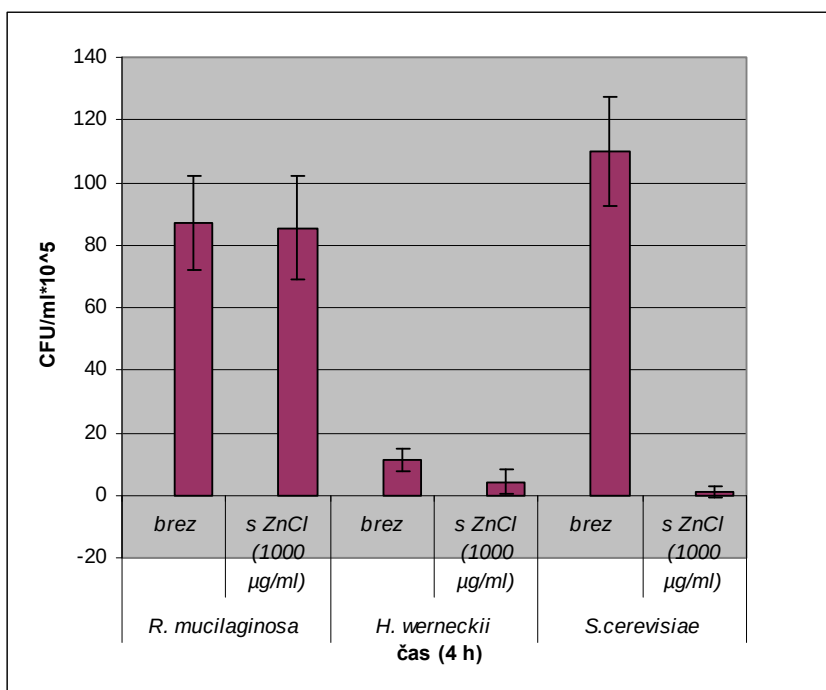
Slika 22: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl2 različnih vrst bakterij. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih cinkovih ionov v fiziološko raztopino; z = dodatek cinkovih ionov v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnCl2).

Grafa 21, 22 nam prikazujeta, da Zn ioni vplivajo na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa prikazujeta tudi, da je bila rast pri proučevanih bakterijah ob eno in dveurni izpostavitvi Zn ionom popolnoma inhibirana. Graf 21 pa nam prikazuje, da po eno urni izpostavitvi Zn ionom le-ti minimalno vplivajo na število celic, ki so sposobne delati kolonije na agarni plošči pri glivi *C. albicans*. Iz tega lahko razberemo, da je vpliv Zn ionov po enourni izpostavitvi na rast glive *C. albicans* majhen.

Zaznali smo torej antibakterijski učinek Zn ionov na bakterijske vrste : *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* in *S. epidermis*, če so bile izpostavljene Zn ionom za eno ali dve uri. Pri glivi *C. albicans* pa je bil zaviralni učinek Zn ionov po enourni izpostavitvi na rast glive *C. albicans* majhen.



Slika 23: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl₂ različnih vrst gliv . (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih cinkovih ionov v fiziološko raztopino; z = dodatek cinkovih ionov v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnCl₂).



Slika 24: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml ZnCl₂ različnih vrst gliv . (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih cinkovih ionov v fiziološko raztopino; z = dodatek cinkovih ionov v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; ZnCl₂).

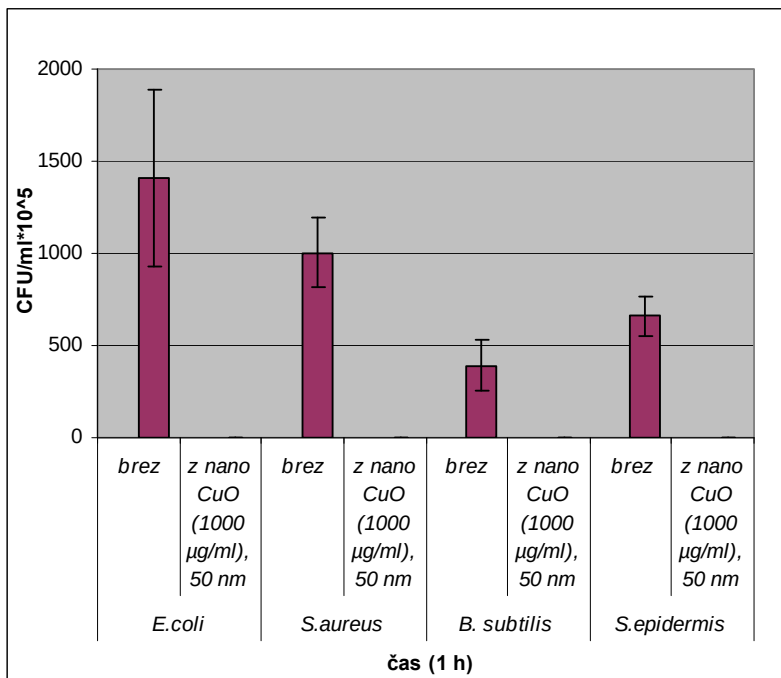
Grafa 23, 24 nam prikazujeta, da Zn ioni vplivajo na število celic gliv, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah in da se pojavijo razlike v številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri različnih vrstah gliv, izpostavljenim dve ali štiri ure Zn ionom.

Pri dveurni izpostavitvi Zn ionom se kaže zaviralen učinek Zn ionov v zmanjšanem številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri vseh proučevanih glivah. Najbolj se pokaže inhibitoren učinek Zn ionov na rast glive *S. cerevisiae*, opazen, vendar manjši, pa je tudi zaviralen učinek Zn ionov na rast preostalih gliv.

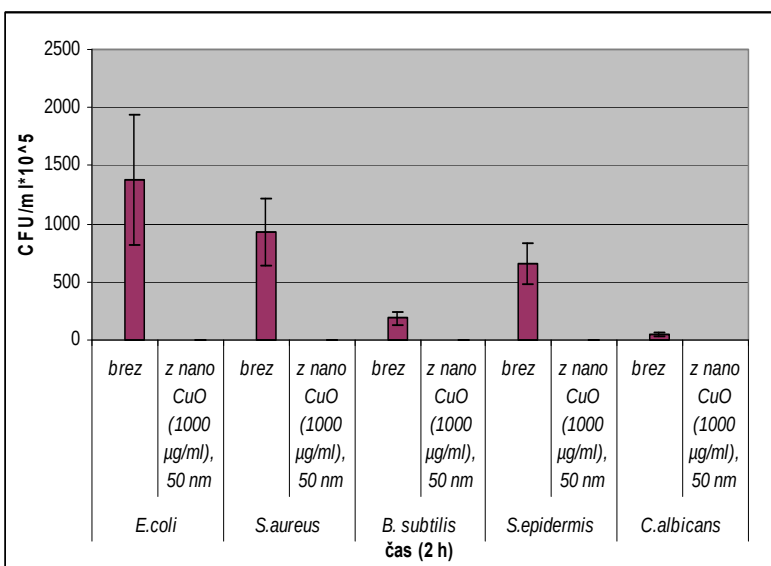
Pri 4 h izpostavitvi Zn ionom se prav tako kaže zaviralen učinek Zn ionov v zmanjšanem številu zraslih kolonij na agarnih ploščah pri vseh proučevanih glivah, najbolj inhibitoren pa je njegov učinek na rast glive *S. cerevisiae*.

To pomeni, da smo zaznali zaviralen učinek Zn ionov na rast pri glivah *S. cerevisiae*, *H. werneckii*, *C. albicans* in *R. mucilaginosa*. Kot najbolj občutljiva na vpliv Zn ionov se je pokazala gliva *S. cerevisiae*. Na preostale vrste gliv pa je bil vpliv Zn ionov na njihovo rast manjši.

4.3 REZULTATI TESTIRANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NANODELCEV CuO NA PROUČEVANE BAKTERIJSKE IN GLIVNE VRSTE



Slika 25: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 1 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO različnih vrst bakterij . (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku= standardni odklon; n = 8; CuO = 50 nm).

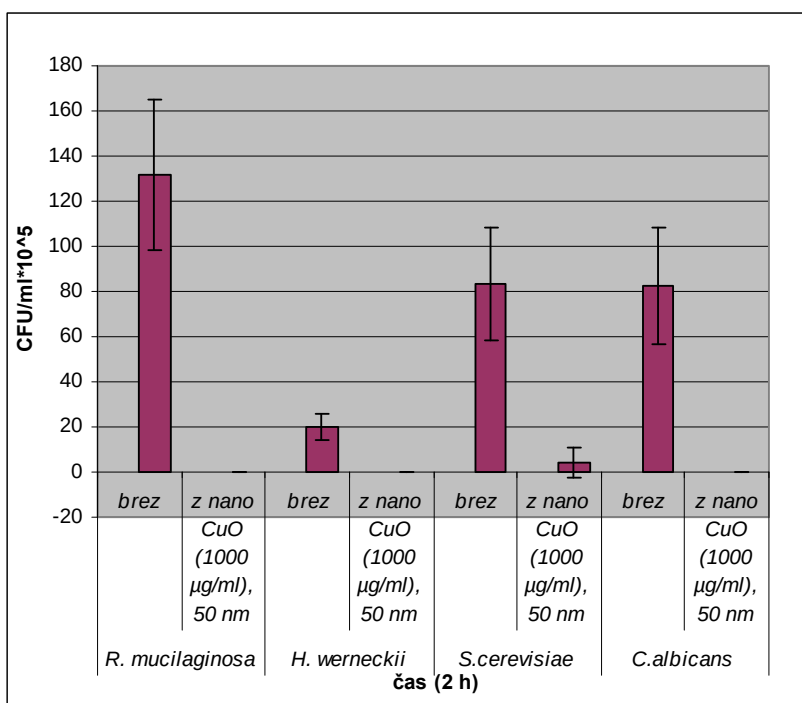


Slika 26 : Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO različnih vrst bakterij in glive *C. albicans*. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih

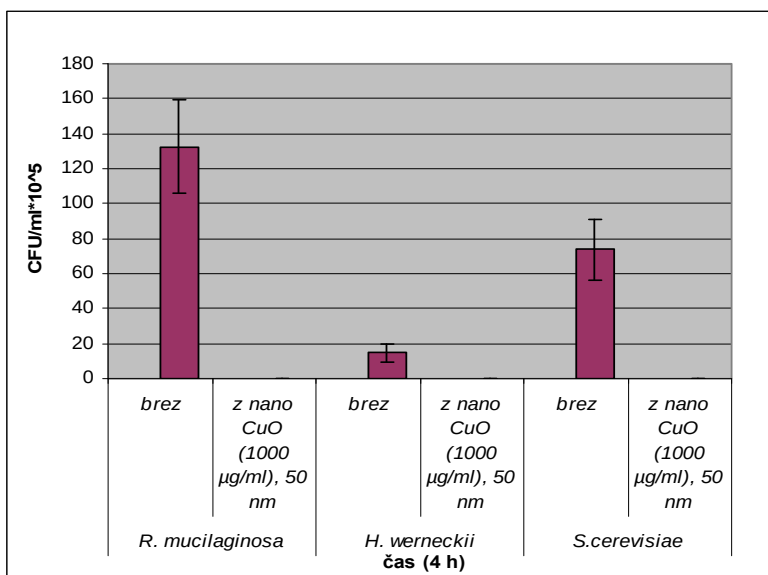
nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; CuO = 50 nm).

Grafa 25, 26 nam prikazujeta, da nanodelci CuO vplivajo na število bakterijskih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah. Grafa prikazujeta tudi to, da je bila rast pri proučevanih bakterijah ob eno in dveurni izpostavitvi nano CuO popolnoma inhibirana. Graf 26 pa nam prikazuje, da nano CuO vpliva na število celic, ki so sposobne delati kolonije na agarni plošči pri glivi *C. albicans*, saj je bila rast pri omenjeni glivi po dveurni izpostavitvi nano CuO popolnoma inhibirana.

Zaznali smo izrazit antimikroben učinek nano CuO na bakterijske vrste : *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermis* in glivo *C. albicans*, če so bile izpostavljene nanodelcem CuO za 1 ali 2 uri.



Slika 27: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 2 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; CuO = 50 nm).



Slika 28: Število mikrobnih celic (CFU/ml*10⁵) po 4 h izpostavitve 1000 µg/ml nanodelcev CuO različnih vrst gliv. (CFU = št. celic, ki so sposobne delati kolonije; brez = brez dodanih nanodelcev v fiziološko raztopino; z = dodatek nanodelcev v fiziološko raztopino; daljica na stolpičku = standardni odklon; n = 8; CuO = 50 nm).

Grafa 27, 28 nam prikazujeta, da nanodelci CuO vplivajo na število glivnih celic, ki so sposobne delati kolonije na agarnih ploščah, da je bila rast pri proučevanih glivah ob dveurni izpostavitvi nano CuO popolnoma inhibirana. Graf 28 pa nam pokaže, da rast pri glivi *S. cerevisiae* po dveurni izpostavitvi nano CuO ni bila popolnoma inhibirana kot pri vseh ostalih glivah.

Ugotovili smo izrazit antimikroben učinek nano CuO na vrste gliv: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*, če so bile izpostavljene nanodelcem CuO za eno ali dve uri.

Dobljeni rezultati potrjujejo našo hipotezo, da imajo nekateri nanodelci izrazito antimikrobno delovanje. Kot najbolj učinkoviti so se izkazali nanodelci CuO in ZnO. Brez antimikrobnega delovanja pa so bili delci nano TiO₂. Najbolj občutljive so bakterije, med najmanj občutljivimi pa so glive. Pri uporabi nanodelcev ZnO in ionov Zn se je kot najmanj občutljiva pokazala gliva *R. mucilaginosa*. Opaznih razlik v učinkovitosti antibakterijskega in antiglivnega delovanja med nanodelci ZnO in ioni Zn na podlagi dobljenih rezultatov ni. Uporaba nanodelcev CuO pa je inhibitorno delovala na rast vseh vrst proučevanih bakterij in gliv.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Skladno s pričakovanjem smo v našem delu ugotovili različen antimikrobni potencial izbranih nanodelcev. Najbolj izrazit antimikrobni potencial imajo nanodelci ZnO in CuO. Proučevane bakterije so bile bolj občutljive na nanodelce kot glive. Razlogi za različno učinkovitost delovanja nanodelcev na bakterije oz. glive so lahko temeljne razlike v zgradbi med bakterijskimi in glivnimi celicami. Najmanj dovzetna na delovanje nanodelcev, vključno z ZnO je bila *R. mucilaginosa*. Antimikrobno delovanje nanodelcev ZnO in CuO so potrdile tudi številne druge študije.

5.1.1 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev ZnO in TiO₂

Brayner in sodelavci (2006) so proučevali antimikrobno učinkovitost nanodelcev ZnO za G – *E. coli*, pri čemer so poročali o precejšnji inhibiciji bakterijske rasti. Čeprav so te raziskave pokazale inhibicijo rasti za prokarionte, ni bilo določeno, ali je delovanje nano ZnO baktericidno ali bakteristatično.

V sledeči študiji so Thill in sodelavci (2006) pojasnili, da je delovanje nanodelcev ZnO baktericidno, saj naj bi prišlo do smrti bakterijskih celic. Koncentracija nano ZnO, ki je bila potrebna za uničenje G – *E. coli*, je bila 5 mM, medtem ko je za uničenje G + *S. aureus* zadoščala že 1 mM koncentracija nano ZnO. Nadaljnje raziskave so pokazale, da se število viabilnih celic zmanjša za 90 % glede na začetno CFU vrednost/ml po 12 h izpostavitvi nanodelcem ZnO tako za G – *E. coli* kot tudi za G + *S. aureus*. Kolonije pa so popolnoma izginile po 24 h izpostavitvi nanodelcem.

Prav tako so antibakterijsko delovanje nanodelcev ZnO na G - *E. coli* ter G + *B. subtilis* in *S. aureus* proučevali Sawai in sodelavci (1995a). Nanodelci ZnO so se izkazali kot učinkovito sredstvo za inhibicijo tako G + kot G – bakterij. Da bi v tej študiji dobili več informacij o obliki, velikostni razporeditvi in morfologiji uporabljenih nanodelcev, so uporabili SEM. Pri tej študiji se je pokazalo, da je pri antibakterijski aktivnosti koncentracija nanodelcev pomembnejša od velikosti delcev.

Potencialno antibakterijsko aktivnost nanodelcev TiO_2 in ZnO so raziskovali Adams in sodelavci (2006), ki so prav tako ugotovili, da antibakterijska aktivnost nanodelcev naraste s povišano koncentracijo nanodelcev.

V številnih študijah so prišli do ugotovitev, da so G + bakterije bolj občutljive na antibakterijski učinek nanodelcev TiO_2 kot G – bakterije. Razlog za to je verjetno različna zgradba celične stene. G - bakterije imajo štiri zaščitne plasti, kamor spadajo: plazemska membrana, periplazemsko območje, peptidoglikanska plast ter zunanja membrana iz proteinov in LPS. G + bakterije pa imajo zgolj tri zaščitne plasti, in sicer plazemsko membrano, periplazemsko območje in peptidoglikansko plast.

Dokazano je, da sta tako nano ZnO kot nano TiO_2 fotosenzitivna in da producirata ROS ob prisotnosti svetlobe (Adams in sod., 2006). Pozitivna korelacija med fotokatalitično produkcijo ROS in antibakterijsko aktivnostjo nanodelcev pa je bila dokazana samo za nano TiO_2 . Pri uporabi nanodelcev ZnO se je pojavila skoraj popolna inhibicija rasti G + bakterij *B. subtilis* že pri minimalni testirani koncentraciji delcev. Do takšnih rezultatov so Adams in sodelavci (2006) prišli, kadar je bil poskus izveden pod temnimi pogoji kot tudi ob prisotnosti svetlobe. *E. coli* je pokazala manjšo občutljivost na nanodelce ZnO , minimalna rastna inhibicija pa je bila dosežena, kadar je bil poskus izveden pod temnimi pogoji. Zakaj je prišlo do tovrstnih razlik v učinku nanodelcev ZnO na omenjeni bakteriji, ni popolnoma jasno. V študiji so sklepali, da so dobljeni rezultati lahko odraz razlik v celični fiziologiji, metabolizmu ali stopnji kontakta med bakterijami in nanodelci. Antibakterijska aktivnost nanodelcev TiO_2 je bila za obe bakterijski vrsti večja ob prisotnosti svetlobe, kar je bilo še posebej izrazito pri bakteriji *B. subtilis*, saj je bila toksičnost nano TiO_2 za to bakterijo ob prisotnosti svetlobe za 2,5-krat večja. Ker je svetloba potrebna za produkcijo ROS, je mehanizem antimikrobnega delovanja na organizme, izpostavljene nanodelcem TiO_2 pod temnimi pogoji, nepojasnen. Na podlagi mehanizmov antimikrobnega delovanja nano TiO_2 , ki so bili raziskani, raziskovalci študije sklepajo, da sta nastanek OS zaradi tvorbe ROS, proizvedenih v odsotnosti svetlobe ter vloga nanomateriala v prekinitvi membranske integritete, ključna za dobljene rezultate.

Študija, ki so jo opravili Kasemets in sodelavci (2009), potrjuje, da tako nano kot makro ZnO kažeta od koncentracije odvisen antimikrobni učinek na rast kvasovke *S. cerevisiae*.

Med nano in makro ZnO ni bilo razlik v antimikrobni učinkovitosti kljub različni velikosti nanodelcev.

Adams in sodelavci (2006) so ugotovili, da nanodelci ZnO inhibirajo rast *G + B. subtilis* za 90 % pri koncentraciji 10 mg/ml, *G – E. coli* pa je bila veliko bolj odporna, saj je bila njena rast inhibirana le za 48 % pri koncentraciji 1000 mg/ml nano ZnO. Hipotezo, ki jo predpostavlja ta študija, je, da tako nano kot makrodelci ZnO uveljavljajo antimikrobne karakteristike preko raztopljenih Zn ionov.

Xia in sodelavci (2008), ki so proučevali toksičnost nanodelcev ZnO na sesalske celice, so potrdili, da ima raztapljanje Zn ionov pomembno vlogo pri citotoksičnosti, inducirani z nano ZnO. Pokazali so, da razpad nano ZnO zmoti celično homeostazo Zn, kar vodi v poškodbe lizosomov in mitohondrijev ter posledično privede do celične smrti. Relativno nizka antimikrobna učinkovitost nano in makrodelcev ZnO za *S. cerevisiae* v primerjavi z bakterijami je po vsej verjetnosti posledica relativno visoke tolerance *S. cerevisiae* na Zn ione. Dokazano je bilo, da se nestalen Zn v kvasnih celicah hitro akumulira v dinamičnih vezikularnih kompartmentih-vakuolah. Gre za pomemben celični obrambni sistem, ki blaži presežke Zn oz. njegovega pomanjkanja.

5.1.2 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev CuO

Nanodelci CuO so pokazali delovanje proti vrsti patogenih bakterij, vključno proti *S. aureus* in *E. coli* že pri minimalni koncentraciji (100 – 500 µg/ml). Ker so bili v študiji, ki so jo opravili Ren in sodelavci (2008), delci zmanjšani z mikrometrске na makrometrsko velikost, so se posledično lastnosti delcev močno spremenile. Spremenila se je elektrostatska prevodnost, aktivna zunanja površina, kemična reaktivnost ter biološka aktivnost delcev. Baktericidno učinkovitost kovinskih nanodelcev naj bi pripisali tako velikosti kot tudi veliki zunanji površini nanodelcev glede na njihov volumen. Takšne lastnosti delcev, naj bi jim dovoljevale, da reagirajo bližje bakterijski membrani. Za določitev velikosti, morfologije in sestave nanodelcev CuO so v tej študiji uporabili TEM. V študiji so uporabili različne koncentracije nanodelcev CuO, da bi določili najnižjo koncentracijo nanodelcev, ki prepreči bakterijsko rast. Pri poskusu so uporabili bakterije *E. coli*, *S. aureus* in *S. epidermis*. Pri koncentraciji 1000 µg/ml nanodelcev CuO je bilo po 2 h

izpostavitve reduciranih 68 % G + in 65 % G – bakterij. Stopnja redukcije je narasla na 88 % oz. 100 % ob dodatku 50 µg/ml nano Ag. Vse proučevane bakterije pa so bile reducirane do 0 po 4 h izpostavitvi nanodelcem CuO koncentracije 1000 µg/ml. Prav tako so v študiji primerjali delovanje nano Ag in nano CuO, pri čemer so ugotovili, da so pri nano CuO potrebne višje koncentracije, da se doseže baktericiden učinek. Predhodne raziskave so pokazale, da nanodelci, kot so Ag in Cu, sprostijo Ag in Cu ione. Oba omenjena iona sta dovolj majhna, da zmotita delovanje encimov. Opravljene študije so pri *E. coli* pokazale, da so nastale obsežne poškodbe celične stene, zaradi česar je prišlo do uhajanja vsebine celice, nanodelci pa so lahko vstopili v celično notranjost. Pri nanodelcih Ag pa je bilo dokazano, da se ti delci pripnejo na celično površino mikrobov ter prodrejo v njeno notranjost, kjer so znotrajcelične tarče delcev respiratorni encimi.

Pri študiji, ki so jo opravili Rispoli in sodelavci (2010), so proučevali antimikrobno delovanje ničvalentnih bakrovih nanodelcev (ZVCN) zoper G – *E. coli*. V tej študiji je bilo izbranih 5 okoljskih parametrov, ki naj bi imeli odločilno vlogo pri protimikrobni aktivnosti nanodelcev na izbrano bakterijsko vrsto. Ti neodvisni parametri so bili pH, T, stopnja zračenja, koncentracija nanodelcev in koncentracija bakterij. Izbrana območja omenjenih parametrov pa so bila določena na podlagi najverjetnejših naravnih pogojev, ki jih lahko najdemo v vodnih okoljih. Iz opravljene študije so prišli do sklepa, da se z naraščajočim pH v izbranem območju frakcije nanodelcev v nanometrski skali zmanjšujejo. Kopičenje CuO nanodelcev pa naj bi bilo najvišje ob izoelektrični točki (pH 7,5-8,5). S padanjem pH aglomeracija pada, kar so podprli rezultati opravljene študije. Njihovi rezultati so pokazali, da ima T obraten učinek na kopičenje nanodelcev kot pH. Ugotovili so, da ima največji pozitiven vpliv na antimikrobno delovanje nanodelcev koncentracija bakterij, najmanjšega pa stopnja zračenja. Ker ima pH negativen koeficient, se z njegovim porastom v okolju proučevana antimikrobna aktivnost zmanjšuje. Pri nizkem pH in visoki T je bila povprečna velikost agregatov manjša. Pri visoki areaciji pa so se veliki agregati delcev razbili na manjše zaradi stresanja, zaradi česar je njihova antimikrobna aktivnost narasla. *E. coli* je G – bakterija, zato so v študiji predvidevali, da interakcije med bakterijo in nanodelci zmanjšujejo agregacijo delcev, zaradi česar naj bi narasla antimikrobna učinkovitost CuO nanodelcev. Toksičnost nano CuO za *E. coli* je bila odvisna tudi od časa izpostavitve bakterije nanodelcem. Pod kislimi pogoji in visoko T se

je povprečna velikost nanodelcev zmanjšala. To je privedlo do povečanja njihove površine, dostopne za raztopljene Cu ione, zato je narasla antimikrobna aktivnost proučevanih delcev. Nanodelci CuO in njihovi ioni so se pokazali kot baktericidni za *E. coli*, saj povzročijo nastanek hidroksilnih radikalov v citoplazmi. Ti radikali poškodujejo DNA, proteine in ostale molekule, kar privede do celične smrti. Ta študija je pokazala, da bodo imeli ZVCN najvišjo antimikrobno učinkovitost pod kislimi pogoji, pri visoki T, visoki stopnji areacije in ko bo koncentracija nanodelcev in bakterij visoka. Antimikrobno delovanje nanodelcev pa se bo znatno spremenilo, če se spremeni katerikoli od teh parametrov.

5.1.3 Ugotovitve študij o antimikrobnem delovanju nanodelcev Ag

Največ študij, ki proučujejo antibakterijsko delovanje nanodelcev, pa je opravljenih predvsem za nanodelce srebra.

Študija, ki so jo leta 2006 opravili Adams in sodelavci, govori o inhibicijskem učinku srebrovih ionov na G – in G + bakterijske celice. Pri bakteriji *E. coli* so bile opazne velike morfološke spremembe po izpostavitvi bakterije nanodelcem srebra.

Mikroanalize so pokazale na prisotnost srebra in žvepla v celici-kar nakazuje, da so se srebrovi ioni, potem ko so vstopili v bakterijsko celico, povezali s celičnimi kompartmenti, ki so vsebovali žveplo. Pri *S. aureusu* je bila v elektronsko osvetljeni regiji vidna kondenzirana substanca, citoplazemska membrana bakterije pa je bila skrčena in ločena od celične stene. V zgoščeni regiji bakterijske celice *S. aureus* je bila prisotna velika količina fosfata. Opazne so bile manjše razlike pri učinku srebrovih ionov na ta dva tipa bakterijskih celic. V študiji so Adams in sodelavci (2006) sklepali, da ima *S. aureus* močnejši obrambni mehanizem v primerjavi z *E. coli*, saj imajo G + bakterije odebeljeno peptidoglikansko celično steno. Debelejša celična stena pa naj bi bolje varovala celico pred vdorom Ag ionov v citoplazmo.

Adams in sodelavci (2006) so predlagali dva možna procesa, ki sta vključena v delovanje Ag ionov:

1. Bakterijska celica pride v kontakt s srebrovimi ioni, sprejme srebrove ione le-ti pa poškodujejo bakterijsko celico.
2. Nastanek ROS inhibira respiratorne encime, zaradi česar se bakterijska celica poškoduje.

V času izvajanja poskusa so Adams in sodelavci (2006) opazili, da Ag nanodelci reagirajo z gradbenimi elementi bakterijske membrane in povzročijo poškodbe na celici. Analiza s TEM je pokazala, da so Ag nanodelci vključeni v membrano, kar je bilo vidno z luknjicami na celični površini. TEM analize so potrdile, da so Ag nanodelci prisotni v celični membrani in znotraj bakterije. Samo posamezni delci pa so bili pripeti na membransko površino. Antibakterijska aktivnost Ag nanodelcev je bila odvisna od velikosti nanodelcev, največjo antibakterijsko aktivnost pa so imeli delci velikosti 25 nm.

Pal in sodelavci (2007) so proučevali antibakterijske lastnosti Ag nanodelcev in pri tem prišli do ugotovitve, da je tudi oblika tista, ki jo določa.

Prav tako sta proučevala antibakterijski učinek nano Ag Sondi in Salopek-Sondi (2004), in sicer vpliv Ag nanodelcev na *G – E.coli*. Bakteriološki testi so bili izvedeni v LB mediju na trdnih agarah ploščah ter tekočem LB mediju, kamor so dodali različne koncentracije Ag nanodelcev. Ti delci so se pokazali kot učinkoviti baktericidi. Uporabili so SEM in TEM analize za proučevanje biocidnega delovanja tega nanomateriala. Rezultati so potrdili, da je bila obravnavana *E. coli* poškodovana, vidne so bile luknjice v celični steni bakterije, saj so se Ag nanodelci akumulirali na bakterijsko membrano. Membrani s takšno morfologijo se je močno povečala prepustnost, posledično pa je sledila smrt celice. Cilj študije je bil, da se proučijo interakcije med bakterijami in Ag nanodelci s pomočjo SEM in TEM mikroskopije. Antibakterijska aktivnost netoksičnega elementarnega Ag v obliki nanodelcev do takrat še ni bila raziskana. Velikost in morfologijo Ag nanodelcev so proučili s pomočjo TEM mikroskopije. Velikost in morfologijo bakterij pa s pomočjo SEM mikroskopije, X-ray mikroanalizami ter digitalnim predstavitvenim sistemom, medtem ko so kemično sestavo bakterijske membrane analizirali z EDAX. Kot so pričakovali, je bila inhibicija bakterijske rasti odvisna od števila celic, uporabljenih v poskusu. SEM mikroskopija so uporabili za določitev površinske morfologije tako nativne kot nanodelcem izpostavljene *E. coli* v LB mediju. Ker so bile v tej študiji uporabljen visoke CFU vrednosti, ki jih le redko najdemo v naravi, so ugotovili, da lahko imajo ti nanodelci odličen biociden učinek ter uspešno reducirajo bakterijsko rast, uporabni pa so lahko tudi za praktične namene, kot je npr. oblikovanje različnih biocidnih materialov. V nasprotju pa

so Ag nanodelci v tekočem mediju tudi pri visoki koncentraciji povzročili samo zaostanek v rasti pri bakteriji *E.coli*.

Očitno imajo ti materiali zgolj omejeno uporabo kot biocidni material v tekočem sistemu zaradi njihove nizke koloidne stabilnosti.

Panáček in sodelavci (2009) so proučevali antimikroben učinek Ag nanodelcev za *Candido spp.* Študija je pokazala, da so nestabilizirani delci Ag inhibirali vse testirane glive pri zelo nizki koncentraciji, inhibicija pa je bila odvisna od vrste testirane kvasovke. Ag nanodelci so bili stabilizirani s surfaktanti in polimeri, zato da bi povečali stabilnost agregatov Ag nanodelcev v uporabljenem gojitvenem mediju. Ag nanodelci stabilizirani s površinsko aktivnimi agensi so v vseh pogledih pokazali večjo antimikrobno aktivnost. Dobljeni rezultati so pokazali, da je antimikrobna aktivnost pri nestabiliziranih Ag nanodelcev zadostna za inhibicijo rasti kvasovk pri koncentraciji 0,21 mg/l, pri stabiliziranih pa pri koncentraciji 0,05 mg/l. Nanodelci Ag, ki so bili stabilizirani s strani polimerov in surfaktantov, so imeli zaradi stabilnosti agregatov veliko večjo antimikrobno aktivnost. Rezultati so pokazali, da je antimikrobna aktivnost močno odvisna od stabilnosti agregatov Ag nanodelcev. Kljub dejstvu, da so stabilizirani Ag nanodelci kazali večji inhibicijski učinek na rast kvasovk v primerjavi z nestabiliziranimi, pa niso kazali močnejšega citotoksičnega učinka. Primerjava antiglivnega in antibakterijskega delovanja Ag nanodelcev je pokazala, da so Ag nanodelci inhibirali rast gliv pri višji koncentraciji kot v primeru bakterij. V primeru *Candide spp* so inhibicijski učinki primerljivi z bakterijsko inhibicijo ne glede na to, kako sta si evolucijsko različna ta dva organizma.

Yoon in sodelavci (2006) so prav tako proučili antibakterijski učinek nano Ag in Cu za G – *E. coli* in G + *B. subtilis*. Občutljivostna konstanta bakterij na nanodelce je bila v tej raziskavi določena z naslednjo enačbo:

$$Z = -\ln(N/N_0)/C \quad \dots(1)$$

N je predstavljal CFU na agarški plošči z nanodelci, N_0 pa CFU na agarški plošči brez nanodelcev. C je bila koncentracija nanodelcev ($\mu\text{g/ml}$). Višja Z vrednost je pomenila, da so bile bakterije bolj občutljive na nanodelce, kar je kazalo na to, da so bili nanodelci učinkovitejši v antimikrobnem delovanju. Da so lahko proučili antimikrobne učinke Ag in Cu nanodelcev, je bilo približno 200 CFU *E. coli* in *B. subtilis* gojenih na LB agarnih

ploščah in hranljivih agarnih ploščah. Vsaki agarni plošči je bilo dodano komercialno nano Ag (40 nm) ali nano Cu (100 nm), koncentracije 10-100 µg/ml. Kolonije na agarnih ploščah za obe bakterijski vrsti so bile preštete po 24 h inkubaciji na 37 °C. Preživetvena frakcija bakterij (N/No) se je znižala z naraščajočo koncentracijo nanodelcev. *E. coli* in *B. subtilis* sta bili popolnoma inhibirani pri koncentraciji višji od 70 µg/ml in 60 µg/ml za Ag in Cu nanodelce.

Rezultati so pokazali, da je *B. subtilis* občutljivejši od *E. coli* na vpliv nanodelcev. Ena možna razlaga za to je, da je zunanja membrana G - bakterij, kot je *E. coli* prevladujoče sesavljena iz tesno pakiranega sloja LPS molekul, ki preskrbijo učinkovito rezistentno bariero proti nanodelcem (Brayner in sod., 2006; Fan in sod., 2002).

V literaturi pa nisem zasledila nobenih podatkov o antimikrobnem vplivu nanodelcev na glivi *H. werneckii* in *R. mucilaginosa*, ki sta bili uporabljeni kot testna organizma v tej diplomski nalogi.

5.2 SKLEPI

- V opravljeni študiji nismo zaznali antibakterijskega učinka nano TiO_2 (15 nm, 40 nm) na proučevane bakterijske in glivne vrste, če so bile izpostavljene nanodelcem TiO_2 (15 nm, 40 nm) za 1 oz. 2 h v primeru testiranih bakterij ter za 2 oz. 4 h v primeru testiranih gliv.
- Zaznali smo izrazit antibakterijski učinek nanodelcev CuO na vse proučevane bakterijske in glivne vrste.
- Zaznali smo zaviralen učinek nano in makro ZnO na rast vseh vrst proučevanih bakterij, če so bile izpostavljene nano in makro ZnO za 1 oz. 2 h. Prav tako so imeli omenjeni nanodelci zaviralen učinek na rast gliv *S. cerevisiae* in *H. werneckii*, mnogo manjši pa je bil vpliv teh nanodelcev na rast preostalih dveh proučevanih gliv, *C. albicans* in *R. mucilaginosa*.
- V nalogi smo zaznali antibakterijski učinek Zn ionov na vse proučevane bakterijske vrste, če so bile izpostavljene Zn ionom za 1 oz. 2 h. Pri glivi *C. albicans* je bil zaviralen učinek Zn ionov na rast minimalen, medtem ko so Zn ioni zaviralno vplivali na rast vseh preostalih proučevanih gliv.
- Bakterijske in glivne vrste so se različno odzvale na različne nanodelce. Odziv ni vezan na velikost nanodelcev pač pa na njihovo kemijsko sestavo. Bakterijske vrste so pokazale večjo občutljivost na nanodelce.
- Izbran način izpostavitve in trajanje izpostavitve se je pokazal kot ustrezen za proučevanje učinkov nanodelcev na izbrane mikroorganizme.

6 POVZETEK

Nanotehnologija je z uporabo nanomaterialov in nanodelcev postala del vsakdanjega življenja. Že konec 20. stoletja so postali proizvodi nanotehnologije močno uveljavljeni v farmacevtski, kozmetični in tekstilni industriji, njeni produkti pa so pomembni tudi v računalništvu in informatiki. Mnogi napovedujejo, da bo nanotehnologija povzročila novo industrijsko revolucijo. Prinesla naj bi rešitev mnogih tehnoloških problemov in izboljšala kvaliteto prodajnih izdelkov.

Kljub vsem pozitivnim prispevkom nanotehnologije, pa je potrebno upoštevati tudi škodljive učinke nanodelcev na biološke sisteme. S svojo ozaveščenostjo in poznavanjem lastnosti nanodelcev lahko zmanjšamo ali se vsaj obranimo pred njihovim negativnimi vplivi.

Ker je odpornost bakterij in gliv na protimikrobne učinkovine v zadnjih letih narasla, se je posledično povečalo zanimanje raziskovalcev za izdelavo novih učinkovitih antimikrobnih sredstev. Raziskave so pokazale, da imajo nanodelci kovinskih oksidov učinkovito antimikrobno delovanje, zato se je pojavila možnost oblikovanja nove generacije baktericidnih in fungicidnih materialov.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti razlike v občutljivosti različnih vrst mikroorganizmov na izbrane nanodelce, spoznati, kakšne so razlike med antimikrobnim delovanjem nanodelcev na izbrane bakterije in glive ter ugotoviti razlike o vplivu nanodelcev glede na trajanje izpostavitve le-tem.

Antimikrobno delovanje nanodelcev smo proučevali na naslednjih vrstah bakterij : *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermis*, *S. aureus* in nekaj vrstah gliv *S. cerevisiae*, *H. werneckii*, *R. mucilaginosa* in *C. albicans*.

Uporabljeni nanodelci so bili: nano TiO₂ (15 nm, 40 nm), nano CuO in nano ZnO. Vpliv nanodelcev ZnO smo primerjali z vplivom makro delcev ZnO in Zn ionov.

Po opravljenem poskusu nismo zaznali antimikrobnega učinka nano TiO₂ (15 nm, 40 nm) na testirane bakterijske in glivne vrste , če so bile izpostavljene nanodelcem TiO₂ (15 nm,

40 nm) za 1 oz. 2 h v primeru proučevanih bakterij ter za 2 oz. 4 h v primeru proučevanih gliv.

Zaznali smo izrazit antimikrobni učinek nanodelcev CuO na vse proučevane bakterijske in glivne vrste, če so bile izpostavljene nanodelcem CuO za 1 oz. 2 h v primeru proučevanih bakterij ter za 2 oz. 4 h v primeru proučevanih gliv.

Zaznali smo tudi antimikroben učinek nano in makro ZnO na vse vrste proučevanih bakterij, če so bile izpostavljene nano in makro ZnO za 1 oz. 2 h. Zaznali smo antimikrobno delovanje nano in makro ZnO na vrste gliv *S. cerevisiae* in *H. werneckii*, manjši pa je bil vpliv nano in makro ZnO na rast preostalih dveh proučevanih gliv, in sicer *C. albicans* in *R. mucilaginosa*. Viden je bil tudi antimikroben učinek Zn ionov na vse proučevane bakterijske vrste, če so bile izpostavljene Zn ionom za 1 oz. 2 h. Zn ioni so zaviralno vplivali na rast vseh proučevanih gliv. Kot najbolj občutljiva na vpliv Zn ionov se je pokazala *S. cerevisiae*, kot najmanj občutljiva pa *C. albicans*.

Naši rezultati in podatki iz literature kažejo na to, da nanodelci na različne vrste bakterij in gliv različno učinkujejo. Mnogi avtorji razlike v učinkovitosti antimikrobnega delovanja nanodelcev na bakterije in glive pripisujejo predvsem razlikam v zgradbi celične stene med omenjenima organizmoma.

Osnovni gradnik celične stene pri G + in G – bakterijah je peptidoglikan, ki v celični steni gliv ni prisoten. Pri obeh tipih bakterij pa se ta makromolekula nahaja na zunanji strani citoplazemske membrane. Zaradi dejstva, da je celična stena G + bakterij v primerjavi z G – bakterijami preprostejša, večina raziskovalcev v zgoraj navedenih študijah sklepa, da je to temeljni razlog za manjšo ali večjo občutljivost G + bakterij na vpliv nanodelcev. Poleg tega pa je prepustnost celične stene G – bakterij zaradi zunanje membrane, ki je sestavljena iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov v primerjavi z G + bakterijami manjša.

Zaradi preprostejše celične zgradbe ter manj kompleksnih struktur naj bi bile evolucijsko starejše bakterije manj uspešne v »boju«[»] proti antimikrobnemu učinku nanodelcev v primerjavi z glivami. Glive imajo kompleksneje grajeno celično steno in kompleksnejšo organizacijo celice ter uspešen detoksifikacijski sistem, kar naj bi pripomoglo k njihovi

boljši zaščiti pred delovanjem nanodelcev. Komponente, ki sestavljajo celično steno pri glivah kvasovkah, so namreč: polisaharidi, proteini, lipidi in anorganski fosfati.

Pri bakterijskih in glivnih celicah ima celična stena vlogo zaščite celice pred osmotskim pritiskom ter stresi iz okolja, obenem pa ji določa tudi obliko.

Našo hipotezo, da so različne vrste mikroorganizmov različno občutljive na nanodelce, da so bakterijske celice bolj občutljive na vpliv nanodelcev od glivnih ter da so razlike v učinku nanodelcev odvisne od trajanja izpostavitve le-tem smo z opravljenim poskusom v celoti potrdili.

7 VIRI

Adams L. K., Lyon D. Y., Alvarez P. J. J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40: 3527-3532

Barreto-Bergter E., Gorin P. A. J. 1983. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. V: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Vol. 41. Tipson R. S., Horton D. (eds.). New York, Academic Press: 67-132

Bele M. 2010a. Slika manjših nanodelcev TiO₂. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 1sl.

Bele M. 2010b. Slika večjih nanodelcev TiO₂. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 1sl.

Bele M. 2010c. Slika nanodelcev ZnO. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 1sl.

Bele M. 2010d. Slika nanodelcev CuO. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 1sl.

Biswas K. S., Yokoyama K., Nishimura K., Miyaji M. 2001. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1191-1199

Brayner R., Ferrari-Iliou R., Brivois N., Djediat S., Benedetti M. F., Fiévet F. 2006. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6: 866-870

Brunner T. J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R. N., Limbach L. K., Bruinink A., Stark W. J. 2006. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to Asbestos, Silica and the effect of particle solubility. *Environmental Science and Technology*, 40: 4374-4381

Bulawa C. E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 47: 505-534

Chang Q., Yan L., Chen M., He H., Qu J. 2007. Bactericidal mechanisms of Ag/Al₂O₃ against *Escherichia coli*. *Langmuir*, 23: 11197-11199

Choi O., Deng K. K., Kim N.-J., Jr L. R., Surampalli R. Y., Hu Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42: 3066-3074

Douglas H. 2006. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 4: 557-580

de Hoog G. S. 1993. Evolution of black yeasts-possible adaptation of the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63, 2: 105-109

Fabian E., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of Toxicology*, 82: 151-157

Fan L., Song J., Hildebrand P. D., Forney C. F. 2002. Interaction of ozone and negative air ions to control microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 144-148

Fonzi W. A., Irwin M. Y. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Publication of Genetics Society of America*, 134: 717-728

Gobec S., Urleb U. 1999. Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farmacevtski vestnik*, 50: 183-193

Gogoi S. K., Gopinath P., Paul A., Ghosh S. S., Chattopadhyay A. 2006. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, 22: 9322-9328

Gromozova E. N., Voychuk S. I. 2007. Influence of radiofrequency Emf on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system. V: *Biophotonics and coherent systems in biology*. Belousov L. V., Voeikov V. L., Martynyuk V.S. (eds). New York, Academic Press: 167-175

Grün C. H. 2003. Structure and biosynthesis of fungal α -glucans. Ph. D. dissertation. Utrecht, University of Utrecht: 143 str.

Grundmann H., Aiers-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health torea. *Lancet*, 368: 874-885

Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.-C., Kahru A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio Fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71, 7: 1308-1316

Jones N., Ray B., Ranjit K. T., Manna A. C. 2007. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279, 1: 71-76

Kahru A., Dubourguier H.-C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269: 105-119

Kapun-Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. 1. izd. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 270 str.

Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H.-C., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23: 1116-1122

Kelly S. A., Havrilla C. M., Brady T. C., Abramo K. H., Levin E. D. 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106: 375-384

Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 3: 239-256

Kloepfer J. A., Mielke R. E., Nadeau J. L. 2005. Uptake of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots into bacteria via purine-dependent mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2548-2557

Koehler A., Marx U., Broeg K., Bahns S., Bressling J. 2008. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* Gills and hepatopancreas-A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66: 12-14

Kollár R., Reinholds B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28: 17762-17775

Labille J., Feng J., Botta C., Borschneck D., Sammut M., Cabie M., Auffan M., Rose J., Bottero J.-Y. 2010. Aging of TiO₂ nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution*, v tisku, doi: 10.1016/j.envpol.2010.02.012: 8 str.

Limbach L. K., Wick P., Manser P., Grass R. N., Bruinink A., Stark W. J. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science and Technology*, 41: 4158-4163

Mack D. 2004. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilms formation. Journal of Hospital Infection, 43, 1: 113-125

Maness P. C., Smolinski S., Blake D. M., Huang Z., Wolfrum E. J., Jacoby W. A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4094-4098

Moore M. N. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment International, 32: 967-976

Moorones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology, 16: 2346-2353

Murdock R. C., Braydich-Stolle L., Scharand A. M., Seliger J. J., Hussain S. M. 2008. Characterization of nanomaterial disperzion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. Toxicological Science, 101, 2: 239-253

Muskopf S. 2009. Gram_bacteria. St. Louis, Granite City High School: 1 str.
http://www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg (avgust 2009)

Neal A. L. 2008. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? Ecotoxicology, 17: 362-371

Nel A., Xia T., Madler L., Li. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311: 622-627

Nowack B., Bucheli T. D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution, 150: 5-22

Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113: 823-839

Pal S., Tak Y.K., Song J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1712-1720

Panáček A., Kolár M., Večeřová R., Pucek R., Soukupová J., Kryštof V., Hamal P., Zbořil R., Kvítek L. 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30: 6333-6340

QingShan W., Jian J., JinHong F., JiaCong S. 2007. Norvancomycin-capped silver nanoparticles: Synthesis and antibacterial activities against *E. coli*. *Science in China Series B: Chemistry*, 50, 3: 418-424

Rai M., Yadav A., Gade A. 2008. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27: 76-83

Reddy K. M., Feris K., Bell J., Wingett D. G., Hanley C., Punnoose A. 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physical Letters*, 90: 213902-1-213902-3

Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje, Urad Republike Slovenije za kemikalije: 100 str.

Ren G., Hu D., Cheng E. W. C., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 587-590

Ross I. K. 2001. Fungal cell walls. Santa Barbara, University of California: 7 str.
<http://www.els.net> (avgust 2009)

Sawai J., Igarashi H., Hashimoto A., Kokugan T., Shimizu M. 1995a. Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 28: 288-293

Sawai J., Saito I., Kanou F., Igarashi H., Hashimoto A., Kokugan T., Shimizu M. 1995b. Mutagenicity test of ceramic powder which have growth inhibitory effect on bacteria. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 28: 352-354

Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R. R., Sastry M. 2005. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21: 10644-10654

Sigma Aldrich. 2009: Nanoparticles: composition. Suffolk, Sigma Aldrich: 1str.

Sondi I., Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182

Stoimenov P. K., Klinger R. L., Marchin G. L., Klabunde K. J. 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18: 6679-6686

Thill A., Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Auffan M., Flank A. M. 2006. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*: Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental Science and Technology*, 40, 19: 6151-6156

Todar K. 2009. Todar's online textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin University of Wisconsin: 2-2

<http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (avgust 2009)

Wang Z., Zheng L., Hauser M., Becker J. M., Szaniszlo P. J. 1999. WdCh4p, a homolog of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*, alone can not support growth of *Wangiella*

(*Exophiala*) *dermatitidis* at the temperature of infection. *Infection and Immunity*, 67, 12: 6619-6630

Wessels J. G., Sietsma J. H. 1982. Fungal cell walls: a survey . V: *Encyclopedia of plant physiology*. Vol. 13B. Pirson A., Zimmermann M. H. (eds). Berlin, Springer Verlag: 352-394

Wu H. X., Wang T. J., Jin Y. 2006. Film-coating process of hydrated alumina on TiO₂ particles. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45: 1337-1342

Xia T., Kovoichich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J. I., Zink J. I., Nel A. E. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2: 2121-2134

Yoon K.-Y., Byeon J. H., Park J.-H., Hwang J. 2006. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373: 572-575

Zalar P., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology and halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43:38-48

Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Povey M., York D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9: 479-489

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Damjani Drobne, za vso pomoč, potrpežljivost, prijaznost in strokovno vodenje pri izvajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi somentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za natančen pregled diplomske naloge.

Za recenzijo se zahvaljujem prof. dr. Ani Plemenitaš.

Za pomoč in potrpežljivost pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Domnu Jakliču ter vsem zaposlenim iz laboratorija Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov.

Prav tako bi se rada zahvalila svoji mami in očetu, ki sta dočakala zaključek mojega študija.

PRILOGE

Priloga A

Priloga A1 : Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm, / = brez rasti).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>E. coli</i> s TiO ₂ (1000 µg/ml) nanodelci (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> s TiO ₂ (1000 µg/ml) nanodelci (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	1800	1520	1680	1400	0
10 ⁻⁴	1680	1600	1600	1200	
10 ⁻⁴	1536	1760	/	800	
10 ⁻⁴	1400	/	/	/	
10 ⁻⁵	200	144	250	262	
10 ⁻⁵	230	260	240	225	
10 ⁻⁵	240	270	230	280	
10 ⁻⁵	180	220	200	100	

Priloga A2 : Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>E. coli</i> z ZnO (1000 µg/ml) nanodelci (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> z ZnO (1000 µg/ml) nanodelci (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	25	1000	0	1284	0
10 ⁻⁴	1	1040	0	1332	
10 ⁻⁴	23	800	0	840	
10 ⁻⁴	25	880	0	800	
10 ⁻⁵	0	215	0	230	
10 ⁻⁵	0	250	0	242	
10 ⁻⁵	0	190	0	120	
10 ⁻⁵	0	195	0	130	

Priloga A3 : Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>E. coli</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	860	0	960	0
10 ⁻⁴	0	980	0	800	
10 ⁻⁴	0	900	0	880	
10 ⁻⁴	0	920	0	920	
10 ⁻⁵	0	180	0	200	
10 ⁻⁵	0	150	0	180	
10 ⁻⁵	0	200	0	150	
10 ⁻⁵	0	230	0	220	

Priloga A4 : Število kolonij bakterijske kulture *E. coli*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>E. coli</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez ZnCl (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>E. coli</i> brez ZnCl (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	1120	0	1000	0
10 ⁻⁴	0	1000	0	880	
10 ⁻⁴	0	1000	0	1120	
10 ⁻⁴	0	800	0	1000	
10 ⁻⁵	0	200	0	221	
10 ⁻⁵	0	220	0	240	
10 ⁻⁵	0	180	0	183	
10 ⁻⁵	0	206	0	200	

Priloga A5 : Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm, / = brez rasti).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	884	900	1048	432	0
10 ⁻⁴	1088	888	620	572	
10 ⁻⁴	325	340	908	/	
10 ⁻⁴	380	488	/	/	
10 ⁻⁵	84	73	97	51	
10 ⁻⁵	60	70	71	42	
10 ⁻⁵	61	55	97	40	
10 ⁻⁵	50	92	/	/	

Priloga A6 : Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	524	0	532	0
10 ⁻⁴	0	560	0	448	
10 ⁻⁴	0	440	0	600	
10 ⁻⁴	0	520	0	440	
10 ⁻⁵	0	44	0	44	
10 ⁻⁵	0	35	0	36	
10 ⁻⁵	0	50	0	41	
10 ⁻⁵	0	59	0	60	

Priloga A7 : Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm (konc. makro ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z makro ZnO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z makro ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	543	0	540	0
10 ⁻⁴	0	564	0	564	
10 ⁻⁴	0	445	0	440	
10 ⁻⁴	0	550	0	545	
10 ⁻⁵	0	50	0	42	
10 ⁻⁵	0	45	0	50	
10 ⁻⁵	0	60	0	56	
10 ⁻⁵	0	53	0	53	

Priloga A8 : Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	1200	0	1160	0
10 ⁻⁴	0	1208	0	1140	
10 ⁻⁴	0	1212	0	1200	
10 ⁻⁴	0	1200	0	1216	
10 ⁻⁵	0	100	0	80	
10 ⁻⁵	0	80	0	60	
10 ⁻⁵	0	81	0	50	
10 ⁻⁵	0	60	0	80	

Priloga A9: Število kolonij bakterijske kulture *S. aureus*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez ZnCl (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. aureus</i> brez ZnCl (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	335	0	220	0
10 ⁻⁴	0	280	0	230	
10 ⁻⁴	0	200	0	145	
10 ⁻⁴	0	200	0	150	
10 ⁻⁵	0	38	0	30	
10 ⁻⁵	0	23	0	20	
10 ⁻⁵	0	24	0	22	
10 ⁻⁵	0	26	0	16	

Priloga A10: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	184	0	115	0
10 ⁻⁴	7	168	0	120	
10 ⁻⁴	4	200	0	200	
10 ⁻⁴	0	180	0	175	
10 ⁻⁵	0	52	0	50	
10 ⁻⁵	0	50	0	12	
10 ⁻⁵	3	25	0	14	
10 ⁻⁵	1	20	0	45	

Priloga A11: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm (konc. ZnO = 1000 µg/ml, makro ZnO).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	1200	0	30	0
10 ⁻⁴	0	1400	0	34	
10 ⁻⁴	0	1280	0	20	
10 ⁻⁴	0	1320	0	28	
10 ⁻⁵	0	125	0	3	
10 ⁻⁵	0	123	0	3	
10 ⁻⁵	0	125	0	4	
10 ⁻⁵	0	126	0	4	

Priloga A12: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	400	0	200	0
10 ⁻⁴	0	220	0	250	
10 ⁻⁴	0	450	0	110	
10 ⁻⁴	0	500	0	220	
10 ⁻⁵	0	60	0	20	
10 ⁻⁵	0	50	0	25	
10 ⁻⁵	0	25	0	15	
10 ⁻⁵	0	20	0	10	

Priloga A13: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez ZnCl (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> ZnCl (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez ZnCl (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	100	0	91	0
10 ⁻⁴	0	110		60	
10 ⁻⁴	0	190	0	65	
10 ⁻⁴	0	98	0	67	
10 ⁻⁵	0	16	0	10	
10 ⁻⁵	0	20	0	12	
10 ⁻⁵	0	25	0	15	
10 ⁻⁵	0	15	0	11	

Priloga A14: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	300	340	280	290	0
10 ⁻⁴	390	420	400	380	
10 ⁻⁴	440	380	320	310	
10 ⁻⁴	330	290	340	350	
10 ⁻⁵	45	43	42	45	
10 ⁻⁵	40	37	35	43	
10 ⁻⁵	32	30	32	30	
10 ⁻⁵	38	40	40	32	

Priloga A15: Število kolonij *B. subtilis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 40 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 40 nm).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>B. subtilis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	400	360	280	250	0
10 ⁻⁴	380	290	310	300	
10 ⁻⁴	300	300	350	350	
10 ⁻⁴	330	370	230	200	
10 ⁻⁵	36	28	32	30	
10 ⁻⁵	30	32	31	23	
10 ⁻⁵	35	33	24	24	
10 ⁻⁵	32	30	30	20	

Priloga A16: Število kolonij *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	600	0	676	0
10 ⁻⁴	0	420	0	400	
10 ⁻⁴	5	520	0	592	
10 ⁻⁴	4	544	0	496	
10 ⁻⁵	0	50	0	35	
10 ⁻⁵	0	58	0	52	
10 ⁻⁵	0	38	0	38	
10 ⁻⁵	1	35	0	28	

Priloga A17: Število kolonij *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 μm (konc.ZnO = 1000 $\mu\text{g/ml}$, makro ZnO).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10^{-4}	0	880	0	788	0
10^{-4}	0	800	0	800	
10^{-4}	0	840	0	800	
10^{-4}	0	760	0	840	
10^{-5}	0	106	0	110	
10^{-5}	0	85	0	100	
10^{-5}	0	65	0	76	
10^{-5}	0	70	0	80	

Priloga A18: Število kolonij *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc.CuO = 1000 $\mu\text{g/ml}$).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci CuO(1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci CuO(1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10^{-4}	0	500	0	899	0
10^{-4}	0	780	0	670	
10^{-4}	0	660	0	600	
10^{-4}	0	690	0	480	
10^{-5}	0	70	0	65	
10^{-5}	0	50	0	42	
10^{-5}	0	74	0	62	
10^{-5}	0	70	0	93	

Priloga A19: Število kolonij *S. epidermis*, po 1 in 2 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc.ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez ZnCl (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez ZnCl (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	652	0	560	0
10 ⁻⁴	0	600	0	600	
10 ⁻⁴	0	604	0	700	
10 ⁻⁴	0	700	0	780	
10 ⁻⁵	0	96	0	73	
10 ⁻⁵	0	91	0	80	
10 ⁻⁵	0	104	0	70	
10 ⁻⁵	0	116	0	60	

Priloga A20: Število kolonij *S. epidermis*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 40 nm (konc.TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 40 nm).

REDČITEV	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 1 uri)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	bakterijska kultura <i>S. epidermis</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	820	800	600	650	0
10 ⁻⁴	780	770	580	780	
10 ⁻⁴	660	650	790	600	
10 ⁻⁴	590	600	680	800	
10 ⁻⁵	80	78	80	78	
10 ⁻⁵	75	70	78	56	
10 ⁻⁵	65	68	60	60	
10 ⁻⁵	60	66	67	70	

Priloga B

Priloga B1: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 40 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 40 nm).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2h urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 4urah)	kontrola
10 ⁻⁴	400	400	392	700	0
10 ⁻⁴	750	850	700	400	
10 ⁻⁴	750	700	820	610	
10 ⁻⁴	670	650	800	800	
10 ⁻⁵	70	62	33	88	
10 ⁻⁵	66	73	90	80	
10 ⁻⁵	62	63	79	52	
10 ⁻⁵	52	55	80	48	

Priloga B2: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 2urah)	<i>R. mucilaginosa.</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	440	320	konfluentna rast	330	0
10 ⁻⁴	330	400	340	350	
10 ⁻⁴	200	350	330	konfluentna rast	
10 ⁻⁴	210	200	400	300	
10 ⁻⁵	25	24	40	21	
10 ⁻⁵	24	28	25	30	
10 ⁻⁵	48	45	40	32	
10 ⁻⁵	41	40	35	33	

Priloga B3: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	106	0	110	0
10 ⁻⁴	0	100	0	136	
10 ⁻⁴	0	110	0	98	
10 ⁻⁴	0	145	0	154	
10 ⁻⁵	0	15	0	14	
10 ⁻⁵	0	11	0	18	
10 ⁻⁵	0	13	0	11	
10 ⁻⁵	0	20	0	13	

Priloga B4: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 µm (konc. ZnO = 1000 µg/ml, ZnO = makro).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	157	223	110	100	0
10 ⁻⁴	198	200	165	112	
10 ⁻⁴	231	167	123	169	
10 ⁻⁴	278	120	100	120	
10 ⁻⁵	20	20	14	15	
10 ⁻⁵	32	29	10	13	
10 ⁻⁵	18	19	17	19	
10 ⁻⁵	28	20	14	17	

Priloga B5: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> s ZnCl (1000 µg/ml) nanodelci (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez ZnCl (po 2 urah)	<i>R. Mucilaginosa</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez ZnCl (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	85	92	67	71	0
10 ⁻⁴	83	90	85	75	
10 ⁻⁴	98	117	93	90	
10 ⁻⁴	100	100	89	100	
10 ⁻⁵	10	17	8	10	
10 ⁻⁵	8	6	6	8	
10 ⁻⁵	12	10	10	11	
10 ⁻⁵	7	9	11	7	

Priloga B6: Število kolonij *R. mucilaginosa*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm).

REDČITEV	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>R. mucilaginosa</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	222	235	270	211	0
10 ⁻⁴	210	245	234	232	
10 ⁻⁴	200	210	221	256	
10 ⁻⁴	230	240	264	225	
10 ⁻⁵	26	29	23	24	
10 ⁻⁵	30	28	25	22	
10 ⁻⁵	25	24	22	26	
10 ⁻⁵	27	31	26	20	

Priloga B7: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 40 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 40 nm).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	30	20	20	10	0
10 ⁻⁴	25	20	10	10	
10 ⁻⁴	45	kontaminacija	10	20	
10 ⁻⁴	20	30	kontaminacija	kontaminacija	
10 ⁻⁵	3	2	3	2	
10 ⁻⁵	2	5	4	1	
10 ⁻⁵	5	2	4	1	
10 ⁻⁵	5	3	2	kontaminacija	

Priloga B8: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 100 nm (konc. ZnO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> z nanodelci ZnO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	10	440	8	11	0
10 ⁻⁴	8	330	12	10	
10 ⁻⁴	15	200	10	12	
10 ⁻⁴	18	210	8	8	
10 ⁻⁵	3	25	2	3	
10 ⁻⁵	2	24	1	3	
10 ⁻⁵	2	48	3	2	
10 ⁻⁵	1	41	kontaminacija	3	

Priloga B9: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	24	34	35	35	0
10 ⁻⁴	20	30	20	24	
10 ⁻⁴	19	35	33	kontaminacija	
10 ⁻⁴	kontaminacija	18	17	10	
10 ⁻⁵	2	4	3	4	
10 ⁻⁵	2	3	2	2	
10 ⁻⁵	6	6	5	4	
10 ⁻⁵	2	3	4	3	

Priloga B10: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	0	21	0	10	0
10 ⁻⁴	0	21	0	13	
10 ⁻⁴	0	11	0	kontaminacija	
10 ⁻⁴	0	16	0	kontaminacija	
10 ⁻⁵	0	3	0	2	
10 ⁻⁵	0	2	0	1	
10 ⁻⁵	0	2	0	2	
10 ⁻⁵	0	kontaminacija	0	kontaminacija	

Priloga B11: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez ZnCl (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> s ZnCl (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez ZnCl (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	4	12	3	10	0
10 ⁻⁴	6	15	4	11	
10 ⁻⁴	6	10	4	9	
10 ⁻⁴	15	11	2	10	
10 ⁻⁵	1	1	1	1	
10 ⁻⁵	2	1	1	1	
10 ⁻⁵	2	2	0	2	
10 ⁻⁵	1	1	0	1	

Priloga B12: Število kolonij *H. werneckii*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 μm (konc. ZnO = 1000 $\mu\text{g/ml}$, makro ZnO).

REDČITEV	<i>H. werneckii</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>H. werneckii</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 4 urah)	<i>H. werneckii</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10^{-4}	26	18	9	19	0
10^{-4}	15	19	8	18	
10^{-4}	13	12	12	10	
10^{-4}	25	10	8	11	
10^{-5}	2	2	2	2	
10^{-5}	2	1	2	3	
10^{-5}	2	1	3	1	
10^{-5}	1	1	0	2	

Priloga B13: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev ZnO velikosti 1 μm (konc. ZnO = 1000 $\mu\text{g/ml}$, makro ZnO).

REDČITEV	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci ZnO (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 4 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10^{-4}	115	96	105	78	0
10^{-4}	96	101	100	83	
10^{-4}	60	88	75	71	
10^{-4}	68	60	50	66	
10^{-5}	10	19	13	14	
10^{-5}	12	12	10	16	
10^{-5}	7	10	9	7	
10^{-5}	6	9	12	7	

Priloga B14: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanem ter brez dodanega ZnCl (konc. ZnCl = 1000 $\mu\text{g/ml}$).

REDČITEV	<i>S. cerevisiae</i> s ZnCl (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez ZnCl (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> s ZnCl (1000 $\mu\text{g/ml}$) (po 4 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez ZnCl (po 4 urah)	kontrola
10^{-4}	2	105	0	100	0
10^{-4}	6	103	0	100	
10^{-4}	5	110	2	92	
10^{-4}	10	90	5	98	
10^{-5}	0	12	0	12	
10^{-5}	0	11	0	13	
10^{-5}	0	10	0	10	
10^{-5}	0	11	0	14	

Priloga B15: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev CuO velikosti 50 nm (konc. CuO = 1000 µg/ml).

REDČITEV	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci CuO (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	2	78	0	74	0
10 ⁻⁴	5	80	0	60	
10 ⁻⁴	6	62	0	57	
10 ⁻⁴	0	57	0	100	
10 ⁻⁵	0	8	0	10	
10 ⁻⁵	0	8	0	7	
10 ⁻⁵	0	9	0	7	
10 ⁻⁵	2	14	0	6	

Priloga B16: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 15 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 15 nm).

REDČITEV	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	87	90	89	81	0
10 ⁻⁴	75	98	76	75	
10 ⁻⁴	92	78	78	70	
10 ⁻⁴	67	83	90	90	
10 ⁻⁵	8	8	7	8	
10 ⁻⁵	8	10	8	9	
10 ⁻⁵	9	8	8	8	
10 ⁻⁵	7	9	9	6	

Priloga B17: Število kolonij *S. cerevisiae*, po 2 in 4 urah ob dodanih ter brez dodanih nanodelcev TiO₂ velikosti 40 nm (konc. TiO₂ = 1000 µg/ml, TiO₂ = 40 nm).

REDČITEV	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 2 urah)	<i>S. cerevisiae</i> z nanodelci TiO ₂ (1000 µg/ml) (po 4 urah)	<i>S. cerevisiae</i> brez nanodelcev (po 4 urah)	kontrola
10 ⁻⁴	58	69	52	50	0
10 ⁻⁴	55	78	55	64	
10 ⁻⁴	68	61	65	52	
10 ⁻⁴	62	45	43	41	
10 ⁻⁵	6	7	5	8	
10 ⁻⁵	5	8	7	7	
10 ⁻⁵	7	6	6	5	
10 ⁻⁵	5	4	5	4	