

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Barbara ŠOBER

**VPLIV NANODELCEV  $\text{TiO}_2$  IN  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NA SESTAVO  
MEMBRANSKIH MAŠČOBNIH KISLIN IN  
ALDEHIDOV PRI BAKTERIJI *RUMINOCOCCUS*  
*FLAVEFACIENS***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Barbara ŠOBER

**VPLIV NANODELCEV  $TiO_2$  IN  $Al_2O_3$  NA SESTAVO  
MEMBRANSKIH MAŠČOBNIH KISLIN IN ALDEHIDOV PRI  
BAKTERIJI *RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF  $TiO_2$  AND  $Al_2O_3$  NANOPARTICLES ON  
MEMBRANE FATTY ACID AND ALDEHYDE COMPOSITION IN  
BACTERIUM *RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

S tem diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je dne 27. 5. 2009 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Antonija HOLCMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 11. 11. 2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske 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.

Barbara Šober

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/bakterije/ <i>Ruminococcus flavefaciens</i> /membranske maščobne kisline/aldehydi/nanodelci
KK	AGRIS /
AV	ŠOBER, Barbara
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2010
IN	VPLIV NANODELCEV TiO <sub>2</sub> IN Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NA SESTAVO MEMBRANSKIH MAŠČOBNIH KISLIN IN ALDEHIDOV PRI BAKTERIJI <i>RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 44 str., 6 pregl., 13 sl., 7 pril., 73 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo s pripravo metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) in transesterifikacijo s kislim katalizatorjem ter detekcijo FAME s plinsko kromatografijo na nepolarni koloni ugotavljali spremembe v profilih maščobnih kislin in aldehydov (MKA) bakterije <i>R. flavefaciens</i> ob prisotnosti nano- in makrodelcev TiO <sub>2</sub> in Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v različnih koncentracijah. Povečanje deležev razvejanih MKA ter zmanjšanje deležev nasičenih MKA ob izpostavitvi TiO <sub>2</sub> in Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ne glede na vrsto, koncentracijo ali velikost dodanih delcev, kaže na povečanje fluidnosti membrane. Izpostavitev celic delcem Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v nano in makro velikosti pri visokih koncentracijah 2 in 1 g/l povzroči skrajšanje acilnih verig maščobnih kislin in aldehydov, kar prav tako kaže na povečanje fluidnosti membrane. Pri dodatku nanodelcev TiO <sub>2</sub> skrajšanje acilnih verig povzroči le koncentracija 5000 ng/l. Spremembe v profilu celičnih MKA pri <i>R. flavefaciens</i> se niso izkazale kot ustrezen pokazatelj toksičnosti nanodelcev v anaerobnih razmerah.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579(043.2)=163.6
CX	microbiology/bacteria/ <i>Ruminococcus flavefaciens</i> /membrane fatty acids/ aldehydes/nanoparticles
CC	AGRIS /
AU	ŠOBER, Barbara
AA	MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY	2010
TI	THE INFLUENCE OF TiO <sub>2</sub> AND Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NANOPARTICLES ON MEMBRANE FATTY ACID AND ALDEHYDE COMPOSITION IN BACTERIUM <i>RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 44 p., 6 tab., 13 fig., 7 ann., 73 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Changes in cellular fatty acid and aldehyde profiles of bacterial species <i>Ruminococcus flavefaciens</i> in the presence of nano and bulk sized particles TiO <sub>2</sub> and Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> were analyzed. Long chain fatty acids were transesterified with HCl in methanol and their methyl esters were analysed by gas chromatography using a non-polar column. Increased total percentage of branched fatty acids and reduction in total percentage of saturated fatty acids indicates increase in fluidity of cell membrane, regardless of the type, concentration or size of the added particles. Exposure of cells to nano and bulk sized particles Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in high concentrations of 2 and 1 g/l caused shortening of acyl chain length which also indicates an increase in membrane fluidity. The addition of nanoparticles TiO <sub>2</sub> caused shortening of acyl chain length only at the concentration 5000 ng/l. Changes in the cellular fatty acid and aldehyde profile of <i>R. flavefaciens</i> did not show to be an appropriate indicator of toxicity of nanoparticles in anaerobic conditions.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI) .....	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic .....	VIII
Kazalo slik .....	IX
Kazalo prilog .....	XI
Okrajšave in simboli.....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 CELIČNA MEMBRANA .....	2
2.2 VPLIVI OKOLJA NA SESTAVO MEMBRAN PRI BAKTERIJAH .....	2
<b>2.2.1 Homeofazna adaptacija.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2.2 Vpliv okoljskega stresa na fluidnost membrane.....</b>	<b>3</b>
2.2.2.1 Spreminjanje razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK.....	3
2.2.2.2 Cis-trans izomerizacija .....	4
2.2.2.3 Razvejane MK v membrani .....	4
2.2.2.4 Pojav MK s ciklopropanskim obročem .....	4
2.2.2.5 Pomen dolžine acilnih verig MK v membrani .....	5
2.2.2.6 Vloga plazmalogenov in MA v membrani .....	5
2.3 MAŠČOBNE KISLINE.....	5
<b>2.3.1 Struktura in nomenklatura maščobnih kislin in maščobnih aldehydov .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2 Maščobne kisline in maščobni aldehydi pri bakterijah .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.3 MK profil bakterije <i>Ruminococcus flavefaciens</i> .....</b>	<b>7</b>
2.4 NANODELCI.....	8
<b>2.4.1 Nanodelci TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2 Nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> .....</b>	<b>9</b>
2.5 NANOTOKSIKOLOGIJA .....	9
<b>2.5.1 Mehanizmi toksičnosti nanodelcev .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5.2 Bakterije in nanodelci .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.3 Toksični vpliv nanodelcev pri bakterijah .....</b>	<b>12</b>

<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	13
3.1	<i>RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS</i> .....	13
<b>3.1.1</b>	<b>Hungatova tehnika gojenja anaerobnih bakterij</b> .....	13
3.2	KEMIKALIJE .....	13
3.3	POTEK POSKUSA .....	14
<b>3.3.1</b>	<b>Gojenje in izpostavitve bakterij nanodelcem</b> .....	14
3.4	ANALIZA DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV .....	15
<b>3.4.1</b>	<b>Liofilizacija</b> .....	15
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava metilnih estrov maščobnih kislin in maščobnih aldehydov</b> .....	15
<b>3.4.3</b>	<b>Analiza in prikaz rezultatov FAME in DMA</b> .....	16
<b>3.4.4</b>	<b>Identifikacija FAME in DMA s faktorji ekvivalentne dolžine verige</b> .....	16
<b>3.4.5</b>	<b>Izračun povprečne dolžine acilnih verig</b> .....	17
<b>3.4.6</b>	<b>Statistična analiza rezultatov</b> .....	17
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	18
4.1	PROFIL CELIČNIH MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM TiO <sub>2</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH .....	18
4.2	DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM TiO <sub>2</sub> .....	21
4.3	PROFIL CELIČNIH MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM TiO <sub>2</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH .....	22
4.4	DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM TiO <sub>2</sub> .....	23
4.5	POVPREČNA DOLŽINA VERIGE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANO- OZ. MAKRODELCEM TiO <sub>2</sub> .....	24
4.6	PROFIL CELIČNIH MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH .....	25
4.7	DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	27
4.8	PROFIL CELIČNIH MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH .....	28
4.9	DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	30

4.10	POVPREČNA DOLŽINA VERIGE MKA PRI <i>R. FLAVEFACIENS</i> 007C PO IZPOSTAVITVI NANO- OZIROMA MAKRODELCEM AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	31
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	33
6	<b>POVZETEK</b> .....	38
7	<b>VIRI</b> .....	39
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: DMA (dimetilacetali) in FAME (metilni estri maščobnih kislin) (%) profil sevov 17 in FD1 <i>R. flavefaciens</i> , v mediju M3 z in brez dodatka hlapnih MK (maščobnih kislin) (Saluzzi in sod., 1993) .....	8
Preglednica 2: Sestava gojišča M 2 GSC .....	14
Preglednica 3: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu <i>R. flavefaciens</i> 007C po rasti v gojiščih z dodanimi nanodelci TiO <sub>2</sub> .....	19
Preglednica 4: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu <i>R. flavefaciens</i> 007C po rasti v gojiščih z dodanimi makrodelci TiO <sub>2</sub> .....	22
Preglednica 5: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu <i>R. flavefaciens</i> 007C po rasti v gojiščih z dodanimi nanodelci Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	26
Preglednica 6: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu <i>R. flavefaciens</i> 007C po rasti v gojiščih z dodanimi makrodelci Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	29

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Celična membrana kot model tekočega mozaika (Madigan in sod., 2000) .....	2
Slika 2: Kemijske strukture nasičene MK (maščobne kisline), cis in trans nenasičene MK, izo in anteizo razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Denich in sod., 2003) .....	6
Slika 3: Prikaz tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti v primeru nanodelcev TiO <sub>2</sub> . ( <i>hν</i> -energija svetlobe; <i>h</i> -Planckova konstanta; <i>ν</i> -frekvenca elektromagnetnega valovanja; <i>h</i> <sup>+</sup> -elektronska vrzel; <i>e</i> <sup>-</sup> -elektron) (Neal, 2008).....	10
Slika 4: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev TiO <sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.....	20
Slika 5: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev TiO <sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.....	21
Slika 6: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev TiO <sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.....	23
Slika 7: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev TiO <sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.....	24
Slika 8: Povprečna dolžina verige MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi nano- (N) oziroma makrodelcem (M) TiO <sub>2</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	25
Slika 9: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	27
Slika 10: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi nanodelcem Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	28

Slika 11: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	30
Slika 12: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi makrodelcem Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	31
Slika 13: Povprečna dolžina verige MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri <i>R. flavefaciens</i> 007C po izpostavitvi nano- (N) oziroma makrodelcem (M) Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni. ....	32

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Kromatogram vzorca z dodanimi nanodelci

Priloga A2: Kromatogram vzorca z dodanimi makrodelci

Priloga B: Faktorji ECL, pridobljeni z delom na koloni Equity-1 (nepolarna stacionarna faza 100 % poli-dimetil-siloksan), s temperaturnim programom od 150 °C do 250 °C s stopnjo naraščanja temperature 4 °C na minuto; krepko so izpisani faktorji ECL izračunani iz retencijskega časa posamezne maščobne kisline in maščobnega aldehyda, normalno izpisani so faktorji ECL izračunani prek faktorjev FCL ali predvideni glede na vrednosti iz literature.

Priloga C1: Razmerja MK/MA, razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam nanodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

Priloga C2: Razmerja MK/MA, razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam makrodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

Priloga C3: Razmerja MK/MA, razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

Priloga C4: Razmerja MK/MA, razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam makrodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a	anteizo razvejana maščobna kislina
BAME	standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu (Bacterial Acid Methyl Ester)
c	cis oblika dvojne vezi v MKA
DMA	dimetilacetal(-i), metilirana oblika maščobnih aldehydov
ECL	faktor ekvivalentne dolžine verige (Equivalent Chain Length)
FAME	metilni estri maščobnih kislin (Fatty Acid Methyl Esters)
FID	plamensko-ionizacijski detektor (Flame-Ionization Detector)
GC	plinska kromatografija (Gas Chromatography)
i	izo razvejana maščobna kislina
MA	maščobni aldehyd(-i)
MIDI	standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu
MK	maščobna(-e) kislina(-e)
MKA	maščobne kisline in maščobni aldehydi
Rt	zadrževalni čas
t	trans oblika dvojne vezi v MKA
ppm	št. delcev na milijon

## 1 UVOD

Nanodelci so delci, ki so v več kot eni dimenziji manjši od 100 nanometrov (nm) (Nel in sod., 2006). Zaradi edinstvenih lastnosti, ki jih imajo nanodelci v primerjavi z enakimi materiali v makro velikosti, njihova proizvodnja in uporaba strmo narašča. Škodljivi učinki nanodelcev na človeka in okolje še niso povsem raziskani, zato je razumevanje mobilnosti, reaktivnosti, potencialne ekotoksičnosti in zadrževanja nanodelcev v okolju ključno za zmanjšanje tveganja (Nowack in Bucheli, 2007). Posledično se je v toksikologiji razvila nova veja znanosti, nanotoksikologija.

Z vidika toksikologije sta pomembni lastnosti nanodelcev velikost in površina oz. razmerje med njima. Posledice izpostavljenosti celic nanodelcem so številne. Največkrat opisani mehanizem toksičnosti nanodelcev je tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in z njo povezani oksidativni stres. Na molekularnem in celičnem nivoju je ta povezan s spremembami mitohondrijske funkcije, poškodbami in denaturacijo proteinov, poškodbami DNA in drugimi, medtem ko se na tkivnem nivoju najpogosteje odraža v obliki vnetja (Nel in sod., 2006). Večino raziskav o potencialnih mehanizmih toksičnosti nanodelcev so izvedli v aerobnih razmerah, v katerih spremembe pripisujejo oksidativnemu stresu, medtem ko podatkov o drugih potencialnih mehanizmih, ki niso povezani s tvorbo kisikovih radikalov in bi jih bilo moč zaznati (tudi) ob odsotnosti kisika, ni.

### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Membrana je prva bariera, ki ločuje celice od okolja in se praviloma hitro odzove na okoljske dražljaje. Zato predstavlja smiselno tarčo preučevanja potencialno negativnih vplivov snovi, tudi takih, kot so nanodelci (Niazi in Gu, 2009).

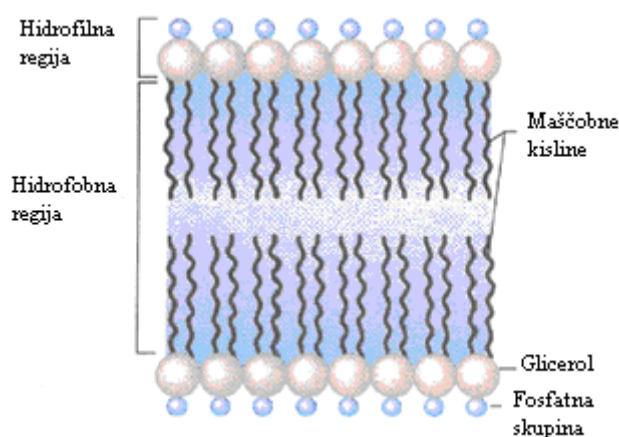
Naš namen je bil preučiti vpliv različnih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na sestavo membran oziroma na profil membranskih maščobnih kislin in aldehydov pri striktno anaerobni vampni bakteriji *Ruminococcus flavefaciens* 007C.

Naša hipoteza je bila, da nanodelci TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vplivajo na celice tudi v odsotnosti kisika (in z njim povezanega oksidativnega stresa), kar se odraža v spremembi fluidnosti celičnih membran, to pa bi lahko posredno zaznali v obliki sprememb maščobnokislinskega profila zgoraj omenjene bakterije.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 CELIČNA MEMBRANA

Celična membrana je pregrada, ki ločuje notranjost celice od njenega okolja. Preko nje celica sprejema hranila in druge molekule, ki jih potrebuje, ter izloča odpadne produkte. Njena osnovna struktura je fosfolipidni dvosloj, ki ga sestavljajo fosfogliceroli in nanje vezane maščobne kisline. Hidrofobni lipidni repi (MK) se združujejo v nepolarnem območju, medtem ko so hidrofilne glave (fosfogliceroli) lipidov obrnjene na obeh straneh dvosloja proti vodi. Celična membrana je fluidna, fosfolipidi in proteini, ki so vključeni vanjo, se lahko prosto gibajo znotraj strukture, zato je model membrane pogosto prikazan kot model tekočega mozaika (Madigan in sod., 2000).



Slika 1: Celična membrana kot model tekočega mozaika (Madigan in sod., 2000)

### 2.2 VPLIVI OKOLJA NA SESTAVO MEMBRAN PRI BAKTERIJAH

Bakterije se na spremembe v okolju (temperatura, tlak, ioni, hranila, prisotnost toksičnih snovi) odzivajo z modifikacijo membran tako, da jih ohranjajo v ustrezno fluidnem stanju (Mrozik in sod., 2004). Fluidnost membrane predstavlja dinamične lastnosti lipidnih molekul na več ravneh in vključuje rotacije okrog vezi C–C znotraj acilne verige, nihanje in rotacijo molekule MK ter lateralno difuzijo celega lipida (Hazel in Williams, 1990). Kompleksna sestava membrane mikroorganizmov je torej natančno regulirana, da ohranja ustrezno strukturo in funkcionalnost, ki je odločilnega pomena za preživetje organizma (Beney in Gervais, 2001).

#### 2.2.1 Homeofazna adaptacija

Biološke membrane se na spremenjene razmere v okolju odzivajo z mehanizmom homeoviskozne adaptacije, ki omogoča aktivnost različnih membranskih proteinov in permeabilnost membrane na enaki ravni (Sinensky, 1974).

V normalnih fizioloških razmerah v membranah prevladuje lamelarna tekoča faza ali faza tekočega kristala, ko so fosfolipidi podvrženi hitrim rotacijam in lateralnim premikom v dvosloju (Hazel in Williams, 1990). Z nižanjem temperature postaja gibanje lipidov vedno bolj omejeno in membrana vstopi v gel lamelarno fazo, ko so lipidi tesno sestavljeni in acilne verige nerazvejane. Temperatura, pri kateri preidejo lipidi iz tekoče v gel fazo, je

temperatura faznega prehoda in je značilna za razred in molekulsko vrsto fosfolipida (Hazel in Williams, 1990). Mnogi mikroorganizmi lahko rastejo in funkcionirajo tudi, kadar ima membrana zelo različno fluidnost, celične funkcije pa so okrnjene, če je kritičen del membranskih lipidov v gel fazi (McElhaney, 1984). Ta vidik ohranjanja funkcionalnosti membrane, predvsem z ozirom na regulacijo faznega stanja lipidov, opisuje homeofazna adaptacija (McElhaney, 1984).

Homeofazna adaptacija pri bakterijah vključuje spreminjanje vrste MK (s sintezo *de novo* in/ali postsintetskiimi spremembami), preoblikovanje molekulskih vrst fosfolipidov (npr. MK se med fosfolipidi lahko zamenjajo brez spremembe v celokupni sestavi MK), preoblikovanje polarne glave fosfolipida in spremembe v deležu plazmalogenov (Hazel in Williams, 1990).

Pogost odgovor bakterij na dražljaje iz okolja vključuje spreminjanje sestave MK. Lahko gre za spremembo razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK, med razvejanimi in nerazvejanimi MK, med *cis* in *trans* oblikami, za spremembe v dolžini acilnih verig ali spremembe tipa razvejanih MK. Membrana ima nižjo temperaturo faznega prehoda in je bolj fluidna, če vsebuje več MK s krajšimi verigami, več dvojnih vezi in čim večji delež razvejanih MK (Russel, 1984).

## 2.2.2 Vpliv okoljskega stresa na fluidnost membrane

Bakterije so v naravi pogosto izpostavljene okoljskemu stresu v obliki nihanj v temperaturi, dostopnosti hranil, ionov in vode ter prisotnosti strupenih molekul. Okoljski stres se največkrat odraža v spremembi fluidnosti membrane. Najpogostejša prilagoditev bakterij na prisotnost membransko aktivne snovi v okolju so spremembe v sestavi MK in interakcijah med proteini in lipidi (Mrozik in sod., 2004).

Spremembe, ki nastanejo zaradi prisotnosti membransko aktivnih snovi zaznamo v *de novo* sintezi MK ali v izomerizaciji dvojnih vezi MK iz *cis* v *trans*. V rastočih celicah sta možni obe, ko pa je rast kulture zaradi visokih koncentracij strupenih dejavnikov inhibirana, lahko poteka le proces izomerizacije (Weber in de Bont, 1996).

### 2.2.2.1 Spreminjanje razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK

Spreminjanje razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK je najbolj razširjen mehanizem za prilagajanje fluidnosti membrane spremenjenim razmeram v okolju (Russell, 1984). Membrane bakterij, ki imajo veliko nasičenih MK, preidejo v fazo tekočega kristala pri višjih temperaturah kot membrane, ki vsebujejo več nenasičenih MK. Zaradi oblike nenasičene *cis* vezi se acilna veriga prelomi pod kotom 30° in tako razmakne alifatski verigi. Fosfolipid postane bolj stožčaste oblike in s tem destabilizira strukturo lipidnega dvosloja, ker oslabijo povezave med sosednjimi acilnimi verigami. Mobilnost lipidov se poveča, kar določa nižjo temperaturo faznega prehoda (Hazel in Williams, 1990). Pri znižanju temperature celica poveča delež *cis* nenasičenih MK, ki preidejo v gel fazo pri nižjih temperaturah, in tako ohrani lipide v tekoči fazi.



#### 2.2.2.2 Cis-trans izomerizacija

Trans nenasičene MK se v bakterijskih membranah večinoma pojavljajo kot posledica cis-trans izomerizacije, ki poteče pri nekaterih vrstah aerobnih bakterij ob nenadnem povišanju temperature ali prisotnosti organskih topil (Heipieper in sod., 2003). Trans nenasičene MK imajo podobno kot nasičene MK izravnano verigo in se v membrani bolj tesno sestavljajo kot cis nenasičene MK (Keweloh in Heipieper, 1996). Lipidi s trans nenasičenimi MK imajo tako višjo temperaturo faznega prehoda kot lipidi s cis nenasičenimi MK, a še vedno malo nižjo od lipidov z nasičenimi acilnimi verigami (Heipieper in sod., 2003).

Trans nenasičene MK se pri bakterijah redko pojavljajo. Ne morejo nastati v procesu sinteze *de novo*, ker se trans oblika dvojne vezi v intermediatu saturira, nenasičena ostane le cis oblika (Marrakchi in sod., 2002). Izomerizacijo dvojne vezi iz cis v trans so dokazali le Heipieper in sod. (2003) pri rodovih *Pseudomonas* in *Vibrio*. Pri bakteriji *Pseudomonas putida* bi lahko cis-trans izomerizacija delovala kot indikator za strupenost organskih spojin (Heipieper in sod., 1995).

#### 2.2.2.3 Razvejane MK v membrani

Razvejane MK podobno kot nenasičene MK znižajo temperaturo faznega prehoda lipidov in spreminjanje njihovega deleža je eden od mehanizmov homeofazne adaptacije na višje ali nižje rastne temperature. Anteizo razvejane MK povečajo fluidnost membrane v enaki meri kot cis nenasičene MK, učinek izo razvejitve pa je manjši (Kaneda, 1991). Celice se zato lahko prilagajajo na suboptimalne rastne temperature s povečevanjem skupnega deleža razvejanih MK na račun zmanjševanja količine nasičenih MK in/ali s povečevanjem razmerja med anteizo in izo razvejanimi MK (Haque in Russell, 2004; Chihib in sod., 2005). Biokemijski mehanizem, ki določa razmerje med izo in anteizo razvejanimi MK, še ni razjasnjen (Klein in sod., 1999).

#### 2.2.2.4 Pojav MK s ciklopropanskim obročem

MK s ciklopropanskim obročem nastajajo v energetsko potratnem procesu postsintetske modifikacije cis nenasičenih MK, kar nakazuje njihovo pomembno fiziološko vlogo (Grogan in Cronan, 1997). Bakterije lahko reagirajo na okoljski stres tudi s povečanjem deleža MK s ciklopropanskim obročem. V raziskavi, ki so jo opravili Kaur in sod. (2005) sta se ob povišanju temperature, stradanju, znižanju pH, v prisotnosti težkih kovin ali drugih strupenih snovi pojavili C 17:0 cyc in C 19:0 cyc. Predvidevajo, da MK s ciklopropanskim obročem celici primarno zagotovijo odpornost na nižji pH, nekatere oblike oksidacije, povišano temperaturo in povišan tlak (Grogan in Cronan, 1997; Chang in Cronan, 1999; Pagan in Mackey, 2000).

V membranah po Gramu negativnih bakterij *P. putida* so ob izpostavljenosti visokim koncentracijam nanomateriala fulerena C<sub>60</sub> zaznali povišanje deleža ciklopropanskih MK (Fang in sod., 2007).

### 2.2.2.5 Pomen dolžine acilnih verig MK v membrani

Membrana z MK z daljšimi verigami ima višjo temperaturo faznega prehoda kot membrana s krajšimi MK, saj se daljše MK raztezajo prek dvosloja in se povezujejo z drugimi lipidi, kar poveča njihovo stabilnost (Hazel in Williams, 1990). Dolžina verige je določena po sintezi MK in homeofazna adaptacija membrane na račun skrajševanja ali podaljševanja acilnih verig je zato možna samo v rastočih celicah s sintezo *de novo*. Povečevanje deleža krajših MK in s tem skrajševanje povprečne dolžine acilnih verig v membrani je zelo razširjen odziv mnogih bakterijskih vrst na suboptimalne rastne temperature (Russell, 1971; Evans in sod., 1998; Chihib in sod., 2005). Zlasti je skrajševanje verig izrazito pri vrsti *Clostridium perfringens*, ki ima zelo malo nenasičenih MK in regulira fluidnost membrane predvsem z dolžino verig MK (de Jong in sod., 2004). S skrajševanjem verig se celica odzove tudi na povečano koncentracijo soli, npr. pri vrsti *Listeria monocytogenes* (Chihib in sod., 2005).

### 2.2.2.6 Vloga plazmalogenov in MA v membrani

Plazmalogeni so značilnost večine striktno anaerobnih bakterij, kjer lahko predstavljajo večji delež fosfolipidov, npr. pri klostridijih tudi do 80 %, v manjših deležih pa so jih odkrili tudi pri nekaterih aerobnih bakterijah (Clejan in sod., 1989).

V membrani imajo plazmalogeni strukturno vlogo, vendar ima membrana s plazmalogeni drugačne kemijske in fizikalne lastnosti. Plazmalogeni spremenijo fizikalne lastnosti membrane, tako da vplivajo na sestavljanje lipidov, fluidnost in povezave z ostalimi sestavinami membrane (Paltauf, 1994).

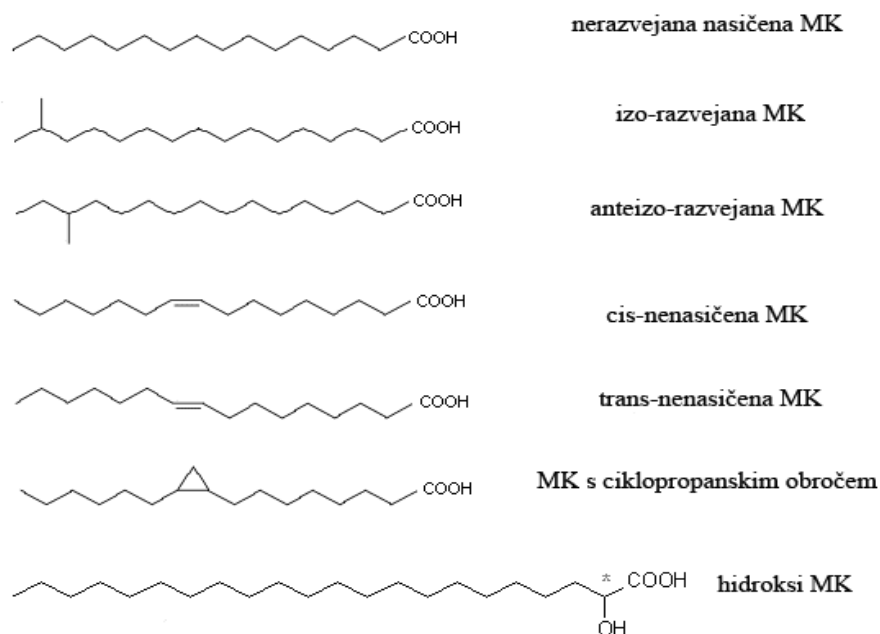
Poleg tega naj bi plazmalogeni delovali kot endogeni antioksidanti ter membrano zaščitili pred različnimi oksidativnimi reakcijami, npr. reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS), peroksidacijo in prostimi radikali (Brites in sod., 2004). Novejše raziskave postavljajo ugodno vlogo plazmalogenov pod vprašaj, saj z oksidativnim razpadom nastanejo močno reaktivni aldehidi (Stadelmann-Ingrand in sod., 2004).

## 2.3 MAŠČOBNE KISLINE

### 2.3.1 Struktura in nomenklatura maščobnih kislin in maščobnih aldehydov

MK so karboksilne kisline z alifatsko verigo in jih glede na število C-atomov razdelimo na kratkoverižne (2 do 6), srednjeverižne (8 do 10), dolgoverižne (12 do 24) in mikolne MK (od 24 do 90). Poimenujemo jih z uporabo nomenklature, na osnovi števila C-atomov in števila in položaja nenasičenih vezi glede na karboksilno skupino, kar poda natančno strukturo MK. V praksi pa velikokrat uporabljamo trivialno nomenklaturu, ki npr. poimenuje MK glede na vir, iz katerega izhajajo. Pri numeričnih okrajševah pa za opis položaja dvojnih vezi in stranskih verig lahko uporabimo kemijsko ali  $\Delta$ (delta)-poimenovanje in biokemijsko ali n-poimenovanje. Pri  $\Delta$ -poimenovanju številčimo C-atome od karboksilnega konca molekule. Pri n-poimenovanju pa v nasprotni smeri, od metilnega proti karboksilnemu koncu (Christie, 2003).

Glede na vrsto vezi MK delimo na nasičene in nenasičene MK. Če ima MK v verigi samo enojne vezi med C-atomi, je nasičena, če pa ima v verigi eno ali več dvojnih vezi, je nenasičena (Campbell, 1999). Nenasičene MK pa delimo glede na število dvojnih vezi na enkrat nenasičene (mononenasičene), te imajo v verigi samo eno dvojno vez in večkrat nenasičene (polinenasičene), ki imajo v verigi dve ali več dvojnih vezi (Leray, 2009). Glede na geometrijsko konfiguracijo pa nenasičene MK delimo na *cis* in *trans* MK.



Slika 2: Kemijske strukture nasičene MK (maščobne kisline), *cis* in *trans* nenasičene MK, izo in anteizo razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Denich in sod., 2003)

Med nerazvejanimi nasičenimi MK so v naravi najbolj pogoste tiste s 14, 16 in 18 C-atomi. Nenasičene MK, ki jih najdemo pri bakterijah, so večinoma enkrat nenasičene in imajo sodo število C-atomov. Dvojna vez je lahko na različnih položajih in v *cis* ali *trans* konfiguraciji, vendar je v *trans* konfiguraciji redkejša. Redke pa so večkrat nenasičene MK. Razvejane MK imajo običajno nasičeno verigo in eno metilno skupino. Izo razvejane MK imajo metilno skupino na predzadnjem C-atomu (drugem C-atomu z metilnega konca), anteizo pa na predpredzadnjem (na tretjem C-atomu od metilnega konca). Ciklopropanske MK imajo v verigi ciklopropanski obroč in so sintetizirane direktno iz nenasičenih MK s postsintetsko modifikacijo *cis* dvojne vezi (Grogan in Cronan, 1997). Pri hidroksi MK je alifatska veriga običajno nerazvejana nasičena, na drugem ali tretjem C-atomu pa imajo vezano hidroksi (-OH) skupino (Christie, 2003). Večina striktno anaerobnih bakterij pa vsebuje tudi posebne membranske fosfolipide plazmalogene, iz katerih se po kisli hidrolizi sprostijo MA.

### 2.3.2 Maščobne kisline in maščobni aldehidi pri bakterijah

Večina bakterij sintetizira MK z dolžino verig od 10 do 19 C-atomov, prevladujoče pa so MK s 16 ali 18 C-atomov. Bakterije vsebujejo nekatere celične MK, ki so edinstvene in jih ne najdemo v evkariontskih celicah. Razvejane in ciklopropanske MK so značilne za številne bakterije. Najdemo jih tudi pri živalih, ne pa pri glivah in ljudeh. Ciklopropanske MK so našli tudi pri nekaterih praživalih (Christie, 2010). Večkrat nenasičene MK, ki jih pogosto najdemo pri višjih organizmih, pa so pri bakterijah redke (Voet D. in Voet J.G., 2004). Po Gramu negativne bakterije imajo običajno večji delež nasičenih in enkrat nenasičenih celičnih MK s sodim številom C-atomov kot po Gramu pozitivne bakterije. Poleg lipidov in MK, značilnih za druge bakterije, mnogi anaerobi vsebujejo tudi plazmalogene. To so analogi fosfolipidov, kjer imajo MK namesto običajne estrske vezi z glicerolom etrsko vez. Derivati, ki nastanejo namesto tipičnih metil estrov, so dimetilacetali (DMA) (Welch, 1991).

### 2.3.3 MK profil bakterije *Ruminococcus flavefaciens*

V kemotaksonomiji bakterij se celični profil maščobnih kislin pogosto uporablja, saj raznolikost v strukturi MK omogoča razlikovanje bakterij na različnih taksonomskih ravneh in se običajno sklada z analizami genotipov. Kot biomarkerja za vse bakterije služita MK C 15:0 in C 17:0. Za po Gramu pozitivne bakterije so značilne izo- in anteizo-C 15:0, za po Gramu negativne bakterije pa hidroksi C 10:0 in C 12:0. Ostale MK so prisotne v različnih skupinah bakterij, npr. MK s ciklopropanskim obročem v večjih deležih najdemo v po Gramu negativnih bakterijah, vendar so prisotne tudi pri nekaterih anaerobnih sevih po Gramu pozitivnih bakterij (Kaur in sod., 2005).

Maščobnokislinski profil bakterij vrste *R. flavefaciens* je v literaturi opisan le enkrat. Saluzzi in sod. so (1993) kot najpomembnejše MK *R. flavefaciens* navedli izo-C 15:0, izo-C 17:0, C 16:0, anteizo-C 15:0 in anteizo-C 17:0. V večjih deležih prisotni DMA so bili 16:0, izo-C 15:0 in izo-C 17:0. MK in DMA, ki so bili navedeni v deležu manjšem od 0,5 % smo izpustili iz tabele (Preglednica 1).

Preglednica 1: DMA (dimetilacetali) in FAME (metilni estri maščobnih kislin) (%) profil sevov 17 in FD1 *R. flavefaciens*, v mediju M3 z in brez dodatka hlapnih MK (maščobnih kislin) (Saluzzi in sod., 1993)

Rod: <i>R. flavefaciens</i>				
Sev:	17		FD1	
Medij	M3	M3+VV	M3	M3+VV
DMA:				
14:0	0,4	0,4	0,5	0,4
15:0	0,8	0,7	1,3	1,0
16:0	11,1	9,3	12,2	9,8
17:0	0,6	0,3	0,3	1,0
18:0	5,1	4,4	0,6	0,9
a15:0	0,4	0,3	0,7	1,0
a17:0	1,6	1,3	2,5	3,3
i15:0	2,5	5,1	8,7	15,8
i17:0	10,9	14,1	6,1	8,4
FAME:				
14:0	1,0	0,7	1,2	0,9
15:0	1,3	0,7	1,6	0,9
16:0	9,8	6,1	12,3	8,3
18:0	1,8	1,2	1,2	1,0
a15:0	3,0	1,9	4,7	4,3
a17:0	4,5	2,2	3,0	2,3
i15:0	29,3	38,9	37,0	36,4
i16:0	4,2	1,8	1,5	1,4
i17:0	10,5	8,9	3,0	2,6

## 2.4 NANODELCI

Nanodelci so delci, ki so v več kot eni dimenziji manjši od 100 nanometrov (nm). Lahko so sferične, cevaste ali nepravilne oblike in se lahko združujejo v agregate ali aglomerate (Nowack in Bucheli, 2007).

Glede na izvor ločimo tri vrste nanodelcev: (1) nanodelce, ki nastajajo v naravnih procesih, npr. vulkanski pepel, (2) nanodelce, ki nastajajo kot odpadni material v industrijskih procesih (kremen in azbest v gradbeništvu, rudarstvu in steklarstvu), ter (3) nanodelce, ki načrtno nastanejo v vodenih procesih proizvodnje, npr. kovinski oksidi (ZnO, TiO<sub>2</sub>), ki se uporabljajo v optični, električni in kemični industriji ter medicini (Remškar, 2009).

Fizikalno kemične lastnosti nanodelcev so posledica njihove majhnosti (oz. velike površine glede na prostornino), kemične strukture (čistost, kristaliničnost, električni naboj, itd.), površinske strukture, topnosti, oblike in agregacije (Nel, 2006).

Ugodno razmerje med površino in prostornino nanodelcev je povezano z velikim številom atomov na površini delca in posledično veliko kemijsko (re)aktivnostjo. Višja kemijska aktivnost pa prispeva tudi k medsebojnemu združevanju delcev v večje skupke, aglomerate (Remškar, 2009).

Nanomateriali imajo širok spekter uporabe. Industrijsko izdelane nanomateriale uporabljajo pri izdelavi športne opreme, avtomobilskih gumah, oblačilih odpornih na madeže, zaščitnih kremah, kozmetiki in elektroniki. Vse bolj se uporabljajo tudi v medicini, in sicer na področju diagnostike in vnosa zdravil (Nel in sod., 2006). Po nekaterih ocenah je proizvodnja in uporaba nanodelcev v letu 2004 znašala 2000 ton, pričakujejo pa, da bo med leti 2011 in 2020 narasla na 58000 ton (Maynard, 2006).

#### 2.4.1 Nanodelci TiO<sub>2</sub>

Titanov dioksid je najbolj vsestransko uporaben nanomaterial zaradi antimikrobne aktivnosti, fotokatalitične sposobnosti in zaščitnega delovanja pred UV sevanjem (Remškar, 2009). Uporablja se v proizvodnji barv, papirja, plastike in premazov, v farmaciji in kozmetični ter prehrabeni industriji (Lommer in sod., 2002). Uporabljal naj bi se celo za zmanjšanje onesnaženja v mestih, saj katalizira pretvorbo dušikovega dioksida v manj toksične nitrate (Fabian in sod., 2008).

Titanov dioksid je zaradi širokega spektra uporabe in svojih edinstvenih lastnosti deležen veliko pozornosti tudi v številnih okoljevarstvenih raziskavah (Niazi in Gu, 2009).

#### 2.4.2 Nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Po nekaterih ocenah sodi aluminijev oksid med komercialno najbolj pomembne nanomateriale. V letu 2005 naj bi predstavljal kar 20 % svetovnega trga z nanomateriali (Rittner, 2002). Nanodelci aluminijevega oksida se uporabljajo v industrijske, vojaške in medicinske namene (Balasubramanyam in sod., 2010). Delujejo tudi antimikrobno, zato se uporabljajo tudi v izdelkih za osebno nego (Sadiq in sod., 2009). Zaradi dobrih dielektričnih in abrazivnih lastnosti se uporabljajo kot izolator in abrazivno sredstvo (Wang in sod., 2009).

### 2.5 NANOTOKSIKOLOGIJA

Zaradi naraščajoče uporabe nanodelcev v industrijske in druge namene lahko pričakujemo, da bodo ti materiali kmalu v večji meri prisotni v našem okolju. Razumevanje mobilnosti, reaktivnosti, potencialne toksičnosti in zadrževanja nanodelcev v okolju je ključno za zmanjšanje s tem povezanega tveganja (Nowack in Bucheli, 2007).

Z vidika toksikologije sta pomembni lastnosti nanodelcev velikost in površina. Razmerje med njima določa potencialno število reaktivnih skupin na površini delca. Posledično imajo nanodelci edinstvene fizikalne in kemične lastnosti in zaradi njih se bistveno razlikujejo od materialov z enako sestavo v makro velikosti (Nel in sod., 2006).

Oberdörster in sod. so leta 2005 izpostavili tri ključne pristope za ocenjevanje toksičnosti nanodelcev:

- analiza fizikalno kemičnih lastnosti (velikost, površina, oblika, topnost, agregacija), poznavanje bioloških učinkov nanodelcev in vključevanje v

- *in vitro* ter

▪ *in vivo* raziskave.

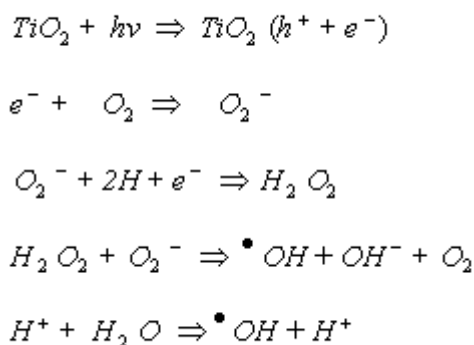
Za ocenjevanje potencialne toksičnosti nanodelcev v ekosistemu kot celoti pa je potreben širši pristop na različnih bioloških ravneh (Kahru in Dubourguier, 2010).

### 2.5.1 Mehanizmi toksičnosti nanodelcev

Najpomembnejša lastnost nanodelcev je njihova majhnost, ki jih uvršča med posamezne atome in molekule na eni strani ter makromateriale na drugi strani. Zaradi svojih specifičnih lastnosti so zaželeni, prav zaradi njih pa predstavljajo tudi potencialno nevarnost za biološke sisteme.

Splošno mnenje je, da je najpogostejši mehanizem, s katerim kovinski nanodelci ogrožajo celično membrano, lipidna peroksidacija z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) (Neal, 2008).

V prisotnosti reducenta (superoksidni anionski radikal) se oksidirana oblika O<sub>2</sub> reducira, reducirana oblika pa lahko katalizira nastanek hidroksidnega radikala iz vodikovega peroksida, tako kot prikazuje na Slika 3 (Neal, 2008).



Slika 3: Prikaz tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti v primeru nanodelcev TiO<sub>2</sub>. ( $h\nu$ -energija svetlobe;  $h$ -Planckova konstanta;  $\nu$ -frekvenca elektromagnetnega valovanja;  $h^+$ -elektronska vrzel;  $e^-$ -elektron) (Neal, 2008).

Pri evkariontskih celicah sprememba v fosfolipidni strukturi notranje mitohondrijske membrane, ki jo povzročijo prosti radikali, ogrozi delovanje elektronske transportne verige, zaradi česar pride do pomanjkanja energije v celici in posledično celične smrti (Gerlach in sod., 1994).

Potencialno toksičnost nanodelcev kovin in kovinskih oksidov predstavlja poleg tvorbe ROS tudi sproščanje topnih ionov, čeprav je s to tematiko povezanih le malo raziskav (Heinlaan in sod., 2008).

Brunner in sod. so leta 2006 potrdili povezavo med topnostjo nanodelcev in njihovim toksičnim delovanjem na človeške celice in celice glodalcev. Nanodelce so razdelili na topne in netopne, da bi preverili, ali je toksičnost topnih nanodelcev mogoče povezati s topnimi kovinskimi ioni, ki se sproščajo ob raztapljanju nanodelcev. Kot primer topnih

nanodelcev kovinskega oksida so uporabili ZnO, ki je že pri nizkih koncentracijah (15 ppm) povzročil zmanjšanje živosti celic za 100 % glede na kontrolo. Toksični učinek so povezali s sproščanjem Zn<sup>2+</sup> ionov pred ali po vstopu nanodelcev v celico.

Raziskava Yanga in sod. (2008) o citotoksičnosti nanodelcev v odvisnosti od njihove velikosti, oblike in kemične strukture, je pokazala, da imata pri tvorbi ROS kritično vlogo velikost in kemična struktura nanodelcev, medtem ko predvidevajo, da ima oblika vpliv na genotoksičnost. S kometnim testom so ocenili poškodbe DNA, ki so jih povzročili nanodelci ZnO in ogljikove nanocevke, ki so jim predhodno določili obliko in potencial tvorbe ROS. Ugotovili so, da so imele ogljikove nanocevke, ki so nitaste oblike, večji genotoksični učinek kot nanodelci ZnO s kristalno strukturo, čeprav so imele nižji potencial tvorbe ROS. Verjetno je, da so ogljikove nanocevke lažje vstopile v celično jedro zaradi svoje nitaste oblike (Pantarotto in sod., 2004).

Toksičnost nanodelcev torej lahko razdelimo v dve skupini: (1) kemično toksičnost, ki temelji na kemični strukturi nanodelcev, npr. sproščanje kovinskih ionov ali tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti ter (2) toksičnost kot posledica stresa, ki ga povzročijo površina, velikost in/ali oblika nanodelca. Razlikovanje, za katero obliko toksičnosti gre, ni vedno enostavno (Brunner in sod., 2006).

Pri posploševanju nevarnosti nanodelcev moramo torej biti previdni, ker se njihovo delovanje razlikuje glede na velikost in kemijsko sestavo. Poleg tega je potrebno testiranja opraviti na različnih bioloških ravneh in ne samo v laboratorijskih razmerah (Vernath in sod., 2007).

### 2.5.2 Bakterije in nanodelci

Bakterije igrajo pomembno vlogo pri zagotavljanju normalnega delovanja ekosistemov, zato sta bio-dostopnost ter toksično delovanje nanodelcev na bakterije pomembni področji nanotoksikologije. Poleg tega bakterije lahko služijo kot odličen model za izvajanje študij ekotoksičnosti (Neal, 2008).

Nanodelci povzročajo motnje v delovanju bakterijskih membran, najverjetneje s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Prav tako ne smemo zanemariti vpliva prostih kovinskih ionov, ki izvirajo iz nanodelcev (Neal, 2008).

Fang in sod. so leta 2007 opravili raziskavo o vplivu nanomateriala fullerena C<sub>60</sub> na sestavo membranskih lipidov pri bakterijah *Pseudomonas putida* in *Bacillus subtilis*. Pri obeh so poročali o spremembah v sestavi membranskih lipidov, temperaturi faznega prehoda in fluidnosti membrane. Pri *P. putida* so zaznali znižanje nivoja nenasičenih MK in povečanje deleža ciklopropanskih MK, najverjetneje za zaščito bakterijske membrane pred oksidativnim stresom. Odziv *B. subtilis* se je pri nizkih koncentracijah C<sub>60</sub> kazal v povečanju deleža izo- in anteizo- razvejanih MK (iz 5,8 na 31,5 % celotnega deleža MK). Pri visokih koncentracijah, ki so inhibirale rast, pa se je povišala sinteza enkrat nenasičenih MK. V nasprotju s *P. putida*, so bakterije *B. subtilis* znižale temperaturo faznega prehoda in povečale fluidnost membrane.



### 2.5.3 Toksični vpliv nanodelcev pri bakterijah

Titanov oksid se pogosto uporablja kot učinkovito antimikrobno sredstvo, ne glede na velikost delcev, a delovanje je okrepljeno, če so delci v nano obliki (Niazi in Gu, 2009).

Potencialni toksični mehanizem TiO<sub>2</sub> je povezan s fotoaktivacijo, to je z vzbujanjem elektronov zunanjih orbital na površini nanodelcev s svetlobo z valovno dolžino pod 385 nm. Vzbujeni elektroni lahko reagirajo z molekulami vode ali hidroksilnimi ioni, pri tem nastanejo hidroksilni in superoksidni radikali (Mannes in sod., 1999).

Tsuang in sod. (2008) so preizkusili vpliv TiO<sub>2</sub> na bakterije z in brez fotoaktivacije. Obsevanje z UV svetlobo ob prisotnosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> je pri po Gramu negativni aerobni bakteriji *Escherichia coli* povzročilo zmanjšanje živosti, medtem ko samo obsevanje z UV svetlobo ali samo prisotnost TiO<sub>2</sub> nanodelcev na bakterijo ni imelo vpliva. Podobno so se odzvale tudi po Gramu pozitivne aerobne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* in *Pseudomonas aeruginosa* ter anaerobna bakterija *Bacteroides fragilis*.

Tudi Heinlaan in sod. so v raziskavi v istem letu ugotovili, da nano- in makrodelci TiO<sub>2</sub> v temi niso bili akutno strupeni za bakterijo *Vibrio fischeri*, niti pri koncentraciji 20 g/L. Vendar pa so makrodelci TiO<sub>2</sub> že pri koncentraciji 100–1000 mg/L v kombinaciji z UV osvetlitvijo povzročili 70 % upad preživetja pri bakteriji *E. coli* (Maness in sod., 1999).

Pri aluminijevih nanodelcih se je tudi pri visokih koncentracijah pokazal le blag učinek zaviranja rasti na *E. coli*, verjetno kot posledica interakcij površinskih nabojev delcev in membrane (Sadiq in sod., 2009). Tudi Amesov test mutagenosti ni pokazal statistično značilnega povečanja števila povratnih mutacij različnih sevov *Salmonelle typhimurium* ob izpostavljenosti Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodelcem (Balasubramanyam in sod., 2010).

Nasprotno pa je raziskava Jianga in sod. v letu 2009 pokazala statistično značilen toksičen vpliv Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodelcev na bakterije *B. subtilis*, *E. coli* in *Pseudomonas fluorescens*. Izpostavitvev aluminijevim nanodelcem v koncentraciji 20 mg/l je povzročila visoke odstotke celičnega propada v kulturah *B. subtilis* (57 %), *E. coli* (36 %) in pri *P. fluorescens* (70 %).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 RUMINOCOCCUS FLAVEFACIENS

*R. flavefaciens* je obligatni anaerob in ena najpomembnejših celulolitičnih bakterijskih vrst v vampu prežvekovalcev, kjer ima ključno vlogo pri sproščanju energije iz rastlinske krme. Pomen pri razgradnji (hemi)celuloznih substratov ji pripisujejo tudi v prebavilih konjev (Jullian in sod., 1999), nekaterih divjih herbivorov (Nelson in sod., 2003) in tudi ljudi (Robert in Bernalier-Donadille, 2003). Vpliv izbranih nanodelcev na profil MK smo ugotavljali pri sevu *R. flavefaciens* 007C, ki je bil izoliran iz govejega vampa (Stewart, 1981).

##### 3.1.1 Hungatova tehnika gojenja anaerobnih bakterij

Bakterije smo gojili v anaerobnih razmerah po principu Hungatove tehnike. Tehnika je bila razvita v petdesetih letih prejšnjega stoletja in je zaradi svoje enostavnosti in učinkovitosti postala najbolj uporabljana anaerobna tehnika. Anaerobe gojimo v gojišču, ki je pripravljeno pod plinom, iz katerega je odstranjen kisik, prečiščen plin pa izpolnjuje tudi zračni prostor posode, v kateri gojimo kulturo. Pline (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>), ki jih uporabljamo pri Hungatovi tehniki, predhodno očistimo primesi zraka tako, da jih vodimo skozi kolono bakrovih opilkov, ki je segreta na 350 °C in smo jo predhodno reducirali z vodikom (Bryant, 1972).

#### 3.2 KEMIKALIJE

Kemikalije, ki smo jih uporabili pri delu (v oklepaju sta navedena proizvajalec in kataloška številka):

- amonijev sulfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma, A-5132)
- bakteriološki agar (Biolife, 4110302)
- BAME standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu  
(Supelco, 47080-U)
- celobioza (Sigma, C-7252)
- cistein HCl (Sigma, C-7880)
- DL-2-metil maslena kislina (Merck, 820782)
- glukoza (Kemika, 0705007)
- izo-maslina kislina (Sigma, I-1754)
- izo-valerinska kislina (Sigma, I-7128)
- kalcijev klorid, CaCl<sub>2</sub> (Sigma, C-1016)

- kalijev dihidrogen fosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 104873)
- kalijev hidrogen fosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, 1116108)
- kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202)
- metanol, za plinsko kromatografijo (Merck, 106011)
- MIDI standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu (Hewlett Packard, 19298-60500)
- n-heksan, za plinsko kromatografijo (Merck, 104371)
- n-valerinska kislina (Sigma, V-9759)
- natrijev klorid, NaCl (Merck, 106404)
- resazurin (Fluka, 83560)
- škrob (Sigma, S-9765)

### 3.3 POTEK POSKUSA

#### 3.3.1 Gojenje in izpostavitve bakterij nanodelcem

Pri preizkušanju vpliva nanodelcev na membranske maščobne kisline smo bakterijsko kulturo gojili v gojišču M2 (Hobson, 1997) s sestavo, ki je podana v spodnji preglednici 2. Za pripravo mineralne mešanice I smo uporabili: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3g/L), destilirana H<sub>2</sub>O (1 L). Za pripravo mineralne mešanice II pa smo uporabili: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6g/L), NaCl (0,6 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,6 g/L), destilirana H<sub>2</sub>O (1L).

Preglednica 2: Sestava gojišča M 2 GSC

Sestava	1 L
Tripton	10 g
Kvasni ekstrakt	2,5 g
NaHCO <sub>3</sub>	4 g
Glukoza	2 g
Škrob	2 g
Celobioza	2 g
Vampni sok	300 ml
Mineralna raztopina I	150 ml
Mineralna raztopina II	150 ml
Resazurin (0,1%)	1 ml
Cistein HCl	1 g
Destilirana H <sub>2</sub> O	400 ml

Vse našteve sestavine smo stehali ali odmerili v predpisani sestavi in jih nato mešali in segrevali do vrelišča. Raztopine nanodelcev smo pred dodajanjem v gojišča inkubirali (2 x

15 minut) v ultrazvočni kopeli (Pio, Iskra, Slovenija), da bi preprečili oz. razbili posamezne agregate. Sestavine smo kuhali 10 minut, jih odstavili in nato preprihovali s 100 % CO<sub>2</sub> do razbarvanja. Pod zaščitnim plinom smo gojišče razlili v epruvete, ki smo jih zatesnili z zamaški iz butilne gume. Tako pripravljena gojišča smo nato avtoklavirali in jih po ohlajanju nacepili z bakterijami.

Koncentracije nanodelcev, ki smo jih uporabili, so bile 5000, 1000, 100 in 10  $\eta$ g/L. Za vsak izbran nanodelec smo pripravili tudi dve različni negativni kontroli. Prvo je predstavljalo gojenje bakterijske kulture samo v gojišču (brez dodatkov), drugo pa gojenje kulture v gojišču, kjer smo dodali TiO<sub>2</sub> ali Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v obliki makrodelcev (angl. bulk), v enakih koncentracijah, kot smo dodali nanodelce. Koncentracij TiO<sub>2</sub> višjih od 5000  $\eta$ g/L nismo mogli pripraviti, ker je prišlo do oksidacije gojišča, medtem ko smo v primeru Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> lahko pripravili tudi gojišči s koncentracijama 1 in 2 g/L.

Bakterije smo gojili v anaerobnih razmerah po postopku Hungateove tehnike. Iz vbočnikov (shranjenih pri -20 °C) smo kulturo precepili v tekoče gojišče v Hungate eprugetah (8 mL M2 gojišča) in jo gojili 24 ur pri 37 °C. Po 24 urah smo zrasle kulture s sterilnimi pipetami (V=160  $\eta$ L) precepili v testna gojišča in gojišča z agarjem ter jih inkubirali nadaljnjih 24 ur pri 37 °C. Zrasle vbočnike smo shranili pri -20 °C, kulture na testnih gojiščih pa smo pripravili za analizo.

### 3.4 ANALIZA DOLGOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN MAŠČOBNIH ALDEHIDOV

#### 3.4.1 Liofilizacija

Za analizo FAME in DMA smo kulture zrasle v Hungate eprugetah centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih na minuto. Supernatant smo odlili, pelet pa resuspendirali v 1 ml vode miliQ in prenesli v 2 ml stekleničko za liofilizacijo (Wheaton, 223683). Stekleničke smo zaprli pod dušikom in jih shranili na -20 °C. Kulture smo lioflizirali 24 ur. Po liofilizaciji smo stekleničke napolnili z dušikom in tako pripravljene vzorce shranili pri 4 °C do nadaljnje analize.

(Nadaljnji postopki so povzeti po Zorec, 2006)

#### 3.4.2 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin in maščobnih aldehydov

Za analizo dolgoverižnih MKA s plinsko kromatografijo smo pripravili njihove metilne estre z neposredno metilacijo liofiliziranih celic. Pri postopku smo uporabljali izključno materiale iz stekla in zamaške s teflonskimi tesnili.

Izbrali smo metodo transesterifikacije lipidov s HCl v metanolu (Dionisi in sod., 1999). Liofilizirane celice smo homogenizirali, jih prenesli v Hachove epruvete in dodali 500  $\mu$ L n-heksana, da smo raztopili lipide. Dodali smo 1 mL 1,5M HCl v metanolu (88 mL metanola + 12 mL koncentrirane HCl) in 1 mL metanola. Epruveto smo napolnili z dušikom, dobro zaprli in inkubirali 10 minut pri 80 °C. Po končani metilaciji smo reakcijo ustavili z ohlajanjem v ledeni kopeli. Dodali smo 2 mL vode miliQ in močno mešali 1 minuto. Epruvete smo kratko centrifugirali, da sta se fazi ločili. Zgornjo organsko fazo smo

prenesli v 1,5 mL stekleničko za GC analizo, jo napolnili z dušikom, dobro zaprli in do analize shranili pri -20 °C.

### 3.4.3 Analiza in prikaz rezultatov FAME in DMA

Ekstrakte FAME in DMA v heksanu smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A z detektorjem FID. Uporabili smo kapilarno kolono Equity-1 (dolžina 30 m, notranji premer 0,25 mm, debelina filma 0,25 µm; Supelco, 28046-U) z nepolaro stacionarno fazo (100 % poli-dimetil-siloksan). Nosilni plin je bil helij (pretok 30 mL/minuto), vodik in zrak pa detektorska plina (pretok H<sub>2</sub> je bil 30 mL/minuto in pretok zraka 300 mL/minuto). Temperatura injektorja je bila 250 °C in temperatura detektorja 280 °C. Analiza je potekala po temperaturnem programu od 150 °C do 250 °C s hitrostjo naraščanja temperature 4 °C na minuto. Začetno temperaturo smo ohranjali 4 minute, končno pa 10 minut. Ročno smo vbrizgali po 1 µL vzorca ali standardne mešanice v načinu split (1:100). Rezultate smo zabeležili na integratorju Chromatopac C-R6A in jih prenesli v program Microsoft Excel za nadaljnjo obdelavo. Izločili smo sestavine, ki so se eluirale pred C10:0 in za C20:0. Za sestavine znotraj tega območja smo izračunali relativne koncentracije iz deleža površine pika.

### 3.4.4 Identifikacija FAME in DMA s faktorji ekvivalentne dolžine verige

Nekatere FAME in DMA v vzorcih smo identificirali s primerjavo zadrževalnih časov (Rt) FAME in DMA v standardnih kalibracijskih mešanicah (BAME, MIDI). Sestava standardnih mešanic je bila:

- BAME: C11:0, C10:0 2OH, C12:0, C13:0, C12:0 2OH, C12:0 3OH, C14:0, i-C15:0, a-C15:0, C15:0, C14:0 2OH, C14:0 3OH, i-C16:0, C16:1 c9, C16:0, i-C17:0, C17:0 cyc-9,10, C16:0 2OH, C18:2 c9,c12, C18:1 c9, C18:1 t9, C18:0, C19:0 cyc-9,10 in C20:0
- MIDI: C9:0, C10:0, C11:0, C10:0 2OH, C10:0 3OH, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C14:0 2OH, C14:0 3OH, C16:0, C17:0, C16:0 2OH, C18:0, C19:0 in C20:0

Za identifikacijo ostalih FAME in DMA smo retencijske čase pretvorili v faktorje ekvivalentne dolžine verige (ECL) po enačbi (Mjøs, 2003):

$$ECL(x) = \frac{\log Rt(x) - \log Rt(z)}{\log Rt(z+1) - \log Rt(z)} + z \quad \dots(1)$$

kjer je  $Rt(x)$  retencijski čas sestavine x,  $Rt(z)$  retencijski čas nerazvejane nasičene FAME pred sestavino x,  $Rt(z+1)$  retencijski čas nerazvejane nasičene FAME za sestavino x in z število ogljikovih atomov v nerazvejani nasičeni FAME, ki se eluira pred sestavino x. Po definiciji imajo nerazvejane nasičene FAME ECL faktor enak številu ogljikovih atomov v verigi (npr. ECL C18:0=18). Ostale MKA smo identificirali po tabelarnih vrednostih ECL (Priloga B 1; Zorec, 2006).

### 3.4.5 Izračun povprečne dolžine acilnih verig

Ta faktor smo izračunali tako, da smo vsaki MKA pripisali vrednost enako številu C atomov (npr. C18:0 = 18), to vrednost pomnožili z deležem MKA v profilu in zmnožke posameznih MKA sešteli.

$$\bar{D}_v = \sum_{i=12-20} (xi) \quad \dots(2)$$

V enačbi  $i$  predstavlja število C-atomov,  $x$  pa delež vseh MKA z  $i$ -številom C-atomov.

### 3.4.6 Statistična analiza rezultatov

Domneve o razlikah med aritmetičnimi sredinami posameznih vzorcev v primerjavi z negativno kontrolo smo preverili s t-testom pri stopnji značilnosti  $\alpha = 0,05$ . T-statistike so bile izračunane v programu Microsoft Office Excel po enačbi, ki ne predpostavlja enakosti vzorčnih varianc:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \delta_0}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots(3)$$

V kateri  $\bar{x}_1$  in  $\bar{x}_2$  predstavljata aritmetični sredini vzorca in negativne kontrole;  $\delta_0$  razliko povprečij v ničelni hipotezi (v našem primeru enaka 0);  $s_1$  in  $s_2$  vzorčni varianci;  $n_1$  in  $n_2$  pa velikosti vzorcev (Košmelj, 2001).

## 4 REZULTATI

V raziskavi smo proučevali vpliv nanodelcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na sestavo membran oziroma profil membranskih maščobnih kislin in aldehydov pri striktno anaerobni bakteriji *R. flavefaciens* 007C. Zanimalo nas je, ali nanodelci TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vplivajo na sestavo membran te mikrobne vrste tudi v odsotnosti kisika. Da bi preverili, ali je morebitni učinek res posledica izpostavljenosti nanodelcem in ne splošne toksičnosti uporabljenih materialov, smo celice izpostavili tudi makrodelcem TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v enakih koncentracijah in primerjali odzive na membranskem nivoju.

V nadaljevanju so prikazani profili MKA pri *R. flavefaciens* 007C za posamezno skupino nano- oziroma makrodelcev ter pripadajoče koncentracije v primerjavi z negativno kontrolo.

### 4.1 PROFIL CELIČNIH MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM TiO<sub>2</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

Z analizo in primerjavo kromatogramov smo kot glavne določili MKA, ki so bile prisotne v deležu večjem od 5 %. Kot glavne MKA smo pri *R. flavefaciens* 007C v vseh vzorcih, ne glede na koncentracijo dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub>, določili i-C 15:0, DMA i-C 17:0, C 18:0, DMA C 18:0, a-C 15:0 in DMA i-C 15:0.

Med njimi je bilo največ i-C 15:0, ki pri vseh celicah, tako pri negativni kontroli kot po izpostavitvi celic nanodelcem, predstavlja skoraj tretjino vseh prisotnih MKA, to je od 25,2–30 %. Druga najbolj zastopana MKA je bila C 18:0, katere delež je bil med 7,6 % in 17,2 %. Sledila ji je DMA i-C 17:0, katere delež je bil med 7,6 % in 10,8 %. Delež a-C 15:0 je bil pri celicah izpostavljenih nanodelcem TiO<sub>2</sub> med 5,3 % in 15,9 %, medtem ko je njen delež pri negativni kontroli znašal 5,6 %. Z več kot 5 % so bile v nekaterih vzorcih zastopane tudi DMA i-C 15:0 (4,5–6 %), C 16:0 (3,1–6,9 %) in DMA C 18:0 (3,6–7,7 %). V nekoliko višjem deležu smo pri vseh celicah zaznali tudi i-C 17:0, in sicer 3,5–5,6 % ter C 20:0 z 2,2–5,7 %. Deleži ostalih MKA so bili manjši od 5 % (Preglednica 3).

Preglednica 3: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu *R. flavofaciens* 007C po rasti v gojiščih z dodanimi nanodelci TiO<sub>2</sub>

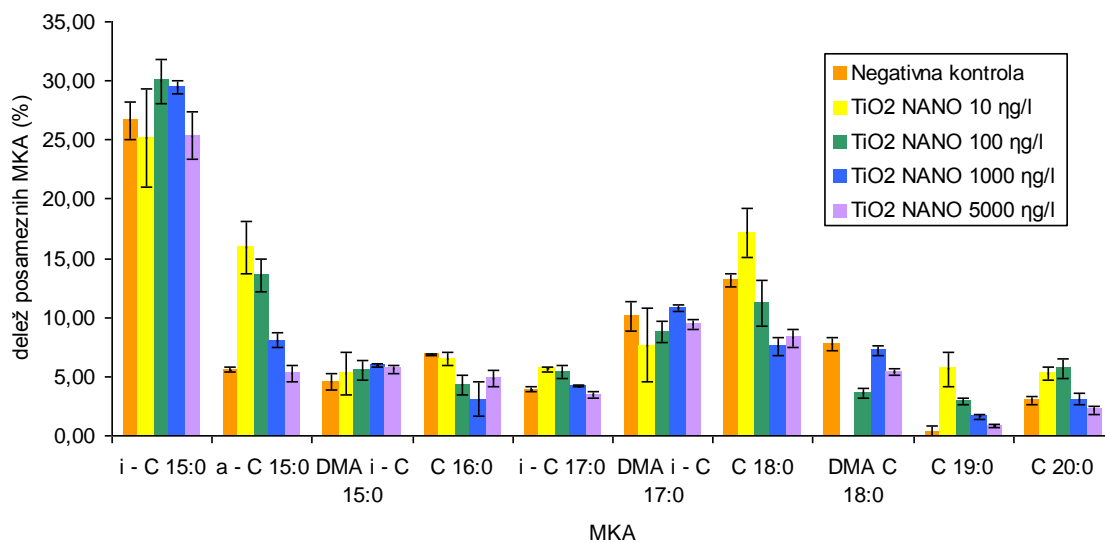
MKA	ECL	Koncentracije nanodelcev TiO <sub>2</sub>				
		Negativna kontrola	5000 ng/l	1000 ng/l	100 ng/l	10 ng/l
C 14:0	14,00	tr	1,7	2,0	tr	-
<b>i - C 15:0</b>	14,66	<b>26,6</b>	<b>25,4</b>	<b>29,5*</b>	<b>30,0</b>	<b>25,2</b>
<b>a - C 15:0</b>	14,74	<b>5,6</b>	<b>5,3</b>	<b>8,1*</b>	<b>13,6*</b>	<b>15,9*</b>
C 15:0	15,00	0,9	1,2	1,2	tr	-
<b>DMA i - C 15:0</b>	15,20	4,5	<b>5,6</b>	<b>6,0*</b>	<b>5,6</b>	<b>5,3</b>
DMA C 15:0	15,54	-	0,7	tr	tr	-
i - C 16:0	15,66	0,9	1,1	1,2	0,7	-
C 16:0	16,00	<b>6,9</b>	4,9*	3,1*	4,3*	<b>6,5</b>
DMA i - C 16:0	16,18	tr	0,8	1,1	tr	-
DMA C 16:0	16,54	4,3	4,1	4,2	1,2	-
i - C 17:0	16,65	3,9	3,5	4,2*	<b>5,4*</b>	<b>5,6</b>
a - C 17:0	16,73	1,0	1,2	1,8	1,5	3,2
C 17:0	17,00	tr	0,7	0,9	0,9	1,9
<b>DMA i - C 17:0</b>	17,17	<b>10,1</b>	<b>9,4</b>	<b>10,8</b>	<b>8,8</b>	<b>7,6</b>
DMA a - C 17:0	17,25	tr	0,7	1,0	tr	-
i - C 18:0	17,65	0,8	1,4	0,8	tr	-
C 18:2 c9, c12	17,66	tr	1,0	0,6	tr	-
C 18:1 c9	17,73	0,8	1,0	0,8	tr	-
C 18:1 c11?	17,79	0,9	1,3	1,2	0,7	-
C 18:1 t11	17,83	2,3	1,2	1,1	tr	-
<b>C 18:0</b>	18,00	<b>13,2</b>	<b>8,2*</b>	<b>7,6*</b>	<b>11,2</b>	<b>17,2*</b>
<b>DMA C 18:0</b>	18,54	<b>7,7</b>	<b>5,4</b>	<b>7,1*</b>	3,6*	-
i - C 19:0	18,65	-	-	tr	0,8	0,6
C 19:0	19,00	tr	0,8	1,6*	2,9*	5,6*
C 20:0	20,00	3,0	2,2	3,1	<b>5,7*</b>	<b>5,3*</b>

tr-delež je manjši od 0,5 %, ?- najbolj verjetna MKA, - MKA nismo zaznali, \*- delež MKA se statistično značilno razlikuje od deleža v negativni kontroli

Slika 4 prikazuje deleže glavnih MKA *R. flavofaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo.

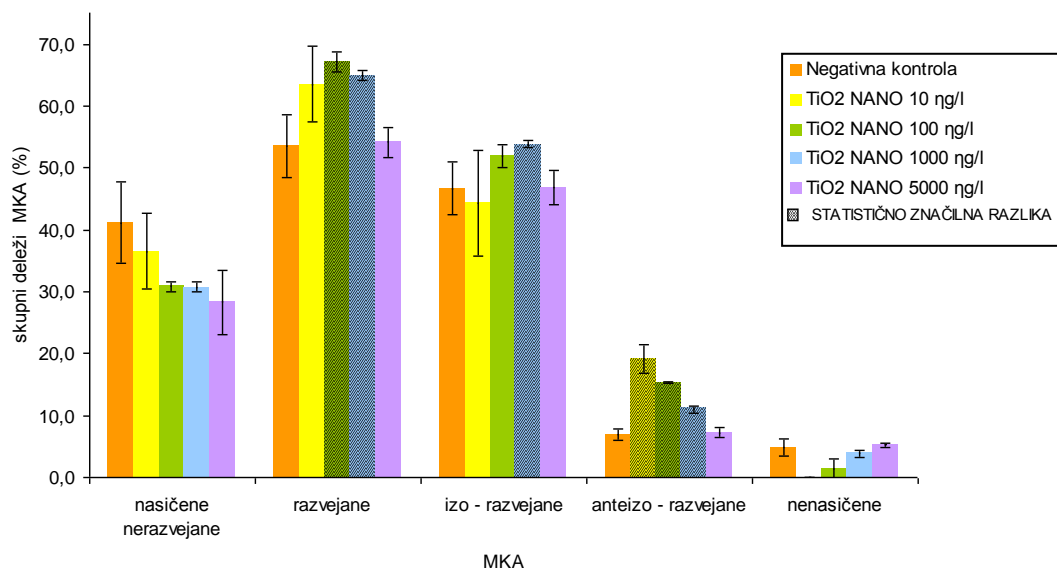
Statistično značilne razlike med celicami izpostavljenimi nanodelcem TiO<sub>2</sub> in negativno kontrolo smo ugotovili v primerih devetih MKA: i-C 15:0, a-C 15:0, DMA i-C 15:0, C 16:0, i-C 17:0, C 18:0, DMA C 18:0, C 19:0 in C 20:0. Statistično značilno povečanje deleža smo opazili pri MKA a-C 15:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000, 100 in 10 ng/l), DMA i-C 15:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000 ng/l), i-C 17:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000, 100 ng/l), C 19:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000, 100 in 10 ng/l) in C 20:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 100, 10 ng/l). Statistično značilno zmanjšanje deleža pa smo ugotovili pri MKA i-C 15:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000 ng/l), C 16:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 5000, 1000, 100 ng/l), C 18:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 5000, 1000 in 10 ng/l) in DMA C 18:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev TiO<sub>2</sub> 1000, 100 in 10 ng/l).





Slika 4: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.2 DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM TiO<sub>2</sub>



Slika 5: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

Za vsako koncentracijo nanodelcev TiO<sub>2</sub> smo izračunali skupne deleže nasičenih, nenasičenih, izo razvejanih in anteizo razvejanih MKA, kar je prikazano na sliki 5. Izračunali smo tudi razmerja med posameznimi skupinami MKA (Priloga C1).

Delež nasičenih MKA se je ob izpostavitvi celic nanodelcem pri vseh koncentracijah zmanjšal v primerjavi s celicami, ki slednjim niso bile izpostavljene. Največje spremembe smo opazili ob koncentraciji nanodelcev 5000 ng/l, kjer se je delež nasičenih MKA v primerjavi s celicami, ki niso bile izpostavljene, zmanjšal za 12,4 %.

Hkrati z zmanjšanjem deleža nasičenih MKA je pri vseh celicah inkubiranih v gojiščih z nanodelci TiO<sub>2</sub> prišlo do povečanja deleža razvejanih MKA. Razlika je bila največja ob koncentracijah 100 in 1000 ng/l, kjer smo opazili 11,3–13,7 % več razvejanih MKA. Najbolj se je spremenil delež anteizo razvejanih MKA, ki se je glede na celice negativne kontrole povečal od 0,3 % ob najvišji koncentraciji, do 12,2 % ob najnižji koncentraciji. Pri treh (5000, 1000 in 100 ng/l) izmed štirih koncentracij smo opazili tudi povečanje deleža izo razvejanih MKA, in sicer za 0,3–7,2 %. Razmerje izo/anteizo je bilo ob izpostavljenosti celic nanodelcem nižje kot pri negativni kontroli. Skladno z zmanjšanjem deleža izo razvejanih MKA ima to razmerje najnižjo vrednost ob koncentraciji nanodelcev 10 ng/l (Priloga C1).

Delež nenasičenih MKA, tako v celicah negativne kontrole kot v celicah izpostavljenih nanodelcem TiO<sub>2</sub>, ni presegal 5 %, niti ga nismo zaznali pri vseh ponovitvah za posamezne koncentracije nanodelcev TiO<sub>2</sub> enako.

Spremembe v skupnih deležih MKA so bile statistično značilne pri anteizo razvejanih MKA (1000, 100 in 10 ng/l), izo razvejanih MKA (1000 ng/l) in razvejanih MKA (1000 in 100 ng/l) (Slika 5).

#### 4.3 PROFIL CELIČNIH MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM TiO<sub>2</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

Analizo profila celičnih MKA smo opravili tudi v primeru izpostavitve *R. flavefaciens* 007C TiO<sub>2</sub> v obliki makrodelcev ter ugotavljali ali pri tem pride do enakega odziva, kot pri izpostavitvi nanodelcem. Zaznali smo enake glavne MKA kot ob izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub>, z manjšimi odstopanji v deležih posameznih glavnih MKA (Preglednica 4).

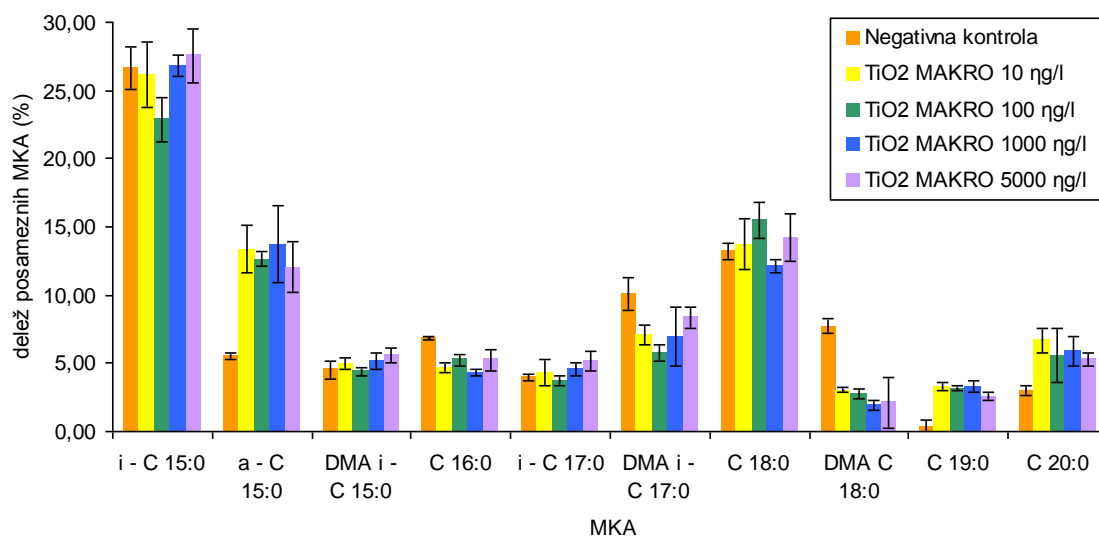
Preglednica 4: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu *R. flavefaciens* 007C po rasti v gojiščih z dodanimi makrodelci TiO<sub>2</sub>

MKA	ECL	Koncentracije makrodelcev TiO <sub>2</sub>				
		Negativna kontrola	5000 ng/l	1000 ng/l	100 ng/l	10 ng/l
i - C 14:0	13,66	-	-	tr	0,7	tr
C 14:0	14,00	tr	-	tr	0,7	tr
<b>i - C 15:0</b>	14,66	<b>26,6</b>	<b>27,5</b>	<b>26,8*</b>	<b>22,9</b>	<b>26,2</b>
<b>a - C 15:0</b>	14,74	<b>5,6</b>	<b>12,0*</b>	<b>13,7*</b>	<b>12,7*</b>	<b>13,3*</b>
C 15:0	15,00	0,9	0,7	0,9	1,0	0,7
<b>DMA i - C 15:0</b>	15,20	4,5	<b>5,6</b>	<b>5,2</b>	4,4	<b>5,0</b>
i - C 16:0	15,66	0,9	0,7	1,3	1,0	0,7
??C 16:1 C	15,87	0,0	-	1,2	tr	-
<b>C 16:0</b>	16,00	<b>6,9</b>	<b>5,2*</b>	4,3*	<b>5,3*</b>	4,6*
DMA C 16:0	16,54	4,3	2,2	1,2	1,5	1,6
i - C 17:0	16,65	3,9	<b>5,1</b>	4,6	3,8	4,3
a - C 17:0	16,73	1,0	2,3	2,1	1,8	2,1
??C 17:1 X	16,89	-	-	0,6	0,5	tr
C 17:0	17,00	tr	0,9	1,5	1,3	1,4
<b>DMA i - C 17:0</b>	17,17	<b>10,1</b>	<b>8,3</b>	<b>7,0</b>	<b>5,7*</b>	<b>7,1*</b>
i - C 18:0	17,65	0,8	tr	tr	1,0	0,6
C 18:2 c9, c12	17,66	tr	tr	tr	0,9	0,3
C 18:1 c9	17,73	0,8	0,8	tr	1,0	0,6
C 18:1 c11?	17,79	0,9	0,8	1,1	1,4	1,0
C 18:1 t11	17,83	2,3	0,8	0,9	1,6	1,1
<b>C 18:0</b>	18,00	<b>13,2</b>	<b>14,2</b>	<b>12,1</b>	<b>15,5*</b>	<b>13,7</b>
DMA C 18:0	18,54	<b>7,7</b>	2,1*	1,9*	2,7*	3,0*
i - C 19:0	18,65	-	1,1	0,8	0,9	0,8
C 19:0	19,00	tr	2,6*	3,3*	3,2*	3,3*
<b>C 20:0</b>	20,00	3,0	<b>5,2*</b>	<b>5,9*</b>	<b>5,6*</b>	<b>6,7*</b>

tr-delež je manjši od 0,5 %, ?- najbolj verjetna MKA, - MKA nismo zaznali, \*-delež MKA se statistično značilno razlikuje od deleža v negativni kontroli

Iz slike 6 je razvidno da se profil glavnih MKA pri *R. flavefaciens* 007C v primeru dodanih makrodelcev TiO<sub>2</sub> razlikuje od profila negativne kontrole *R. flavefaciens* 007C. Statistično značilne razlike med celicami, ki so bile izpostavljene makrodelcem TiO<sub>2</sub> in negativno kontrolo smo ugotovili za osem MKA: i-C 15:0, a-C 15:0, C 16:0, DMA i-C 17:0, C 18:0,

DMA C 18:0, C 19:0 in C 20:0. Makrodelci TiO<sub>2</sub> so pri vseh izpostavljenih celicah povzročili statistično značilno povečanje deleža MKA a-C 15:0, C 19:0 in C 20:0 in pa statistično značilno zmanjšanje deleža C 16:0, DMA C 18:0, i-C 15:0 (ob izpostavitvi makrodelcem TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 1000 ng/l), DMA i-C 17:0 (ob izpostavitvi makrodelcem TiO<sub>2</sub> v koncentracijah TiO<sub>2</sub> 100, 10 ng/l) in C 18:0 (ob izpostavitvi makrodelcem TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 100 ng/l).



Slika 6: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.4 DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM TiO<sub>2</sub>

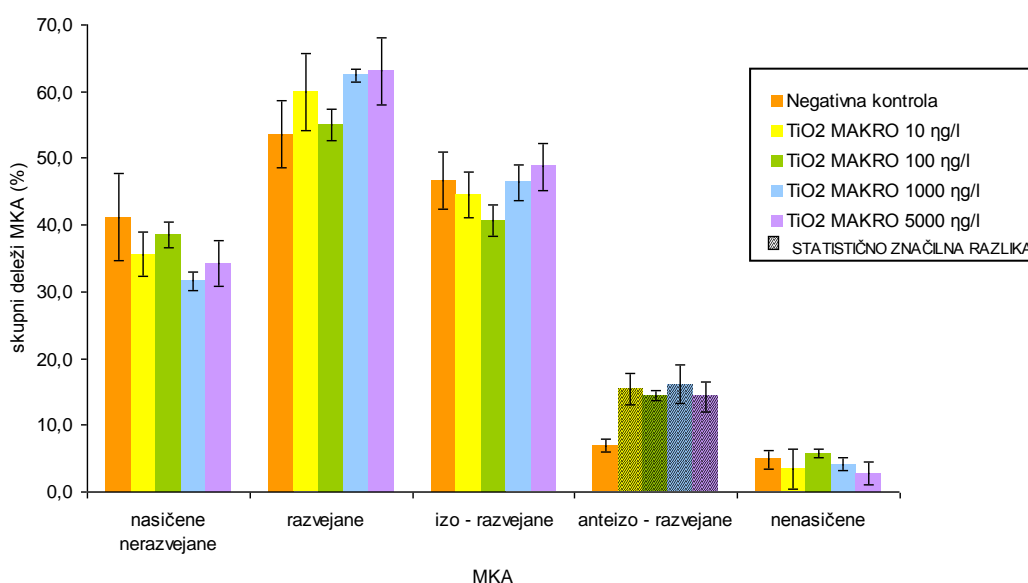
Za vsako koncentracijo makrodelcev TiO<sub>2</sub> smo izračunali skupne deleže nasičenih, nenasičenih, izo razvejanih in anteizo razvejanih MKA, ki so prikazani na sliki 7. Želeli smo ugotoviti morebitne razlike med celicami izpostavljenimi makrodelcem TiO<sub>2</sub> in negativno kontrolo.

Ob primerjavi profila MKA celic negativne kontrole in celic izpostavljenih makrodelcem TiO<sub>2</sub>, se je vpliv makrodelcev, podobno kot ob izpostavitvi nanodelcem istega materiala, pokazal kot zmanjšanje deleža nasičenih MKA in povečanje deleža razvejanih MKA. Do največje spremembe deleža nasičenih MKA je prišlo v celicah, izpostavljenih koncentracijam 5000 in 1000 ng/l, saj se je njihov delež v primerjavi s celicami, ki niso bile izpostavljene makrodelcem TiO<sub>2</sub> zmanjšal za 7 in 9,6 %. Zmanjšanje deleža nasičenih MKA je pri zgoraj omenjenih koncentracijah v razmerju s povečanjem deleža anteizo razvejanih MKA (7,4 in 9,2 %). V primeru preostalih dveh koncentracij (100 in 10 ng/l) se je delež anteizo razvejanih MKA povečal za 7,5 in 8,5 %, torej več, kot je znašalo zmanjšanje deleža nasičenih MKA (2,6 in 5,6 %). Pri teh dveh koncentracijah smo opazili tudi zmanjšanje deleža izo razvejanih MKA (5,9 in 2 %), ki ga pri preostalih dveh

koncentracijah nismo. Razmerje izo/anteizo razvejanih MKA (Priloga C 2) je bilo pri izpostavljenih celicah ob vseh koncentracijah dodanih makrodelcev TiO<sub>2</sub> bistveno nižje (2,8–3,5) kot pri celicah negativne kontrole (6,8) in odseva povečanje deleža anteizo razvejanih MKA. Posledica le-tega pa je tudi povečanje skupnega deleža razvejanih MKA.

Delež nenasičenih MKA v primeru izpostavljenosti celic makrodelcem TiO<sub>2</sub> ni presegel 5 %. Pri razmerju nasičene/nenasičene MKA je tako kot pri izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub> prišlo do velikih nihanj, ki so posledica različnih deležev nenasičenih MKA, ki smo jih zaznali v vzorcih (Slika 7).

Razlike v skupnih deležih MKA so bile pri vseh testiranih koncentracijah makrodelcev TiO<sub>2</sub> statistično značilne pri anteizo razvejanih MKA (Slika 7).

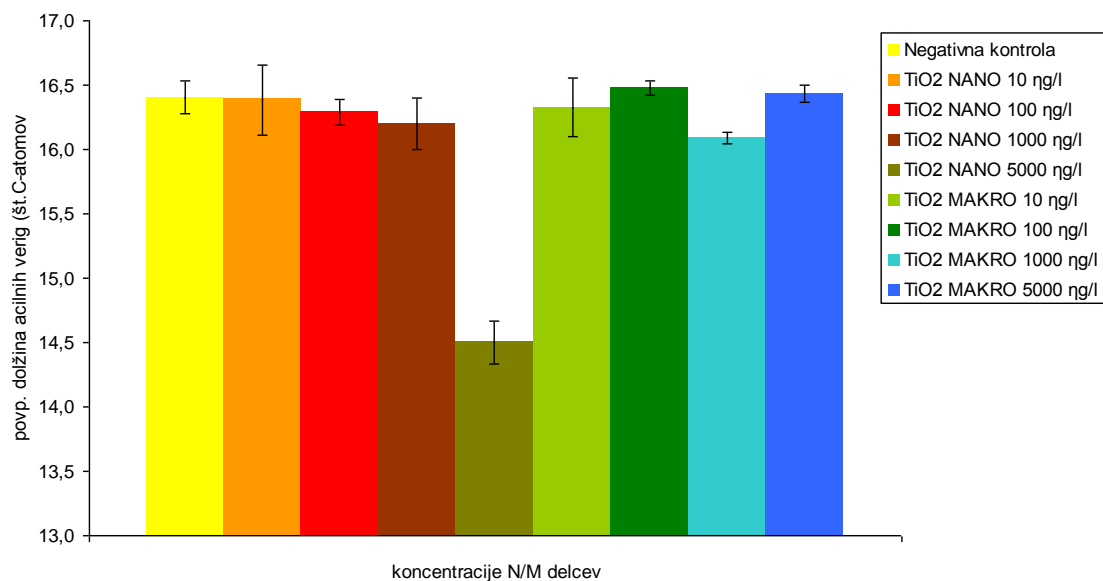


Slika 7: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.5 POVPREČNA DOLŽINA VERIGE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANO- OZ. MAKRODELCEM TiO<sub>2</sub>

Eden od kriterijev, ki nakazujejo spremembe v fluidnosti membran zaradi okoljskih vplivov, je tudi spreminjanje dolžine acilnih verig MKA.

Pri celicah negativne kontrole je bila povprečna dolžina verig MKA 16,4 C-atomov. Ob dodatku makrodelcev TiO<sub>2</sub> in nanodelcev TiO<sub>2</sub> v nižjih koncentracijah je povprečna dolžina verige ostala primerljiva z negativno kontrolo (16,2–16,4), medtem ko smo pri najvišji koncentraciji nanodelcev, 5000 ng/l, opazili skrajšanje povprečne dolžine verige na 14,5 C-atomov (Slika 8).



Slika 8: Povprečna dolžina verige MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi nano- (N) oziroma makrodelcem (M) TiO<sub>2</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.6 PROFIL CELIČNIH MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

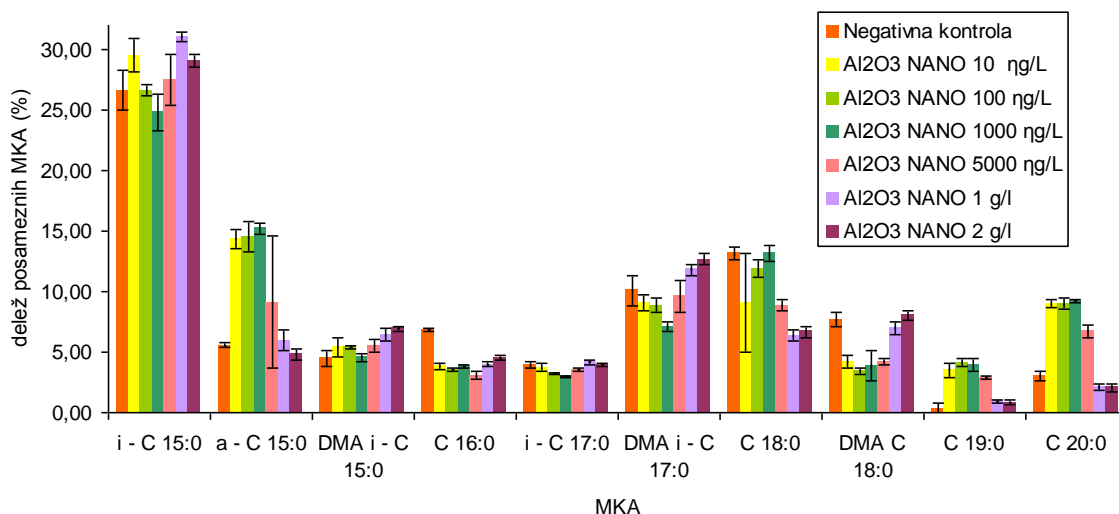
Vpliv nanodelcev na profil membranskih MKA pri *R. flavefaciens* 007C smo preverili tudi z nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Z analizo in primerjavo kromatogramov smo kot glavne določili MKA, ki so bile prisotne v deležu, večjem od 5 %. Največ, skoraj tretjino prisotnih MKA, je podobno kot ob izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub> in negativni kontroli, predstavljala i-C 15:0 (24,8–31,1 %). Sledila je MKA C 18:0, ki je bila prisotna v deležu 6,3–13,2 %. Enako kot ob izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub>, je po zastopanosti v skupnem deležu s 7,1–12,7 % na tretjem mestu DMA i-C 17:0, sledi a-C 15:0, katere delež je bil med 4,8 in 14,3 %. V večjih deležih so bile prisotne še naslednje MKA: DMA i-C 15:0; (4,5–6,9 %), DMA C 18:0 (3,4–9 %), C 20:0 (2,1–9,3 %) in C 16:0 (3–6,9 %). Ostale MKA so bile prisotne v deležu manjšem od 5 % (Preglednica 5).

Preglednica 5: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu *R. flavefaciens* 007C po rasti v gojiščih z dodanimi nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

MKA	ECL	Koncentracije nanodelcev						
		Negativ. kontrola	2 g/l	1 g/l	5000 $\eta$ /l	1000 $\eta$ /l	100 $\eta$ /l	10 $\eta$ /l
C 14:0	14,00	tr	1,9	1,6	0,4	tr	-	-
<b>i - C 15:0</b>	14,66	<b>26,6</b>	<b>29,1</b>	<b>31,1*</b>	<b>27,5</b>	<b>24,8</b>	<b>26,7</b>	<b>29,5</b>
<b>a - C 15:0</b>	14,74	<b>5,6</b>	<b>4,8</b>	<b>6,0</b>	<b>9,1</b>	<b>15,2*</b>	<b>14,5*</b>	<b>14,3*</b>
C 15:0	15,00	0,9	1,3	1,3	0,9	0,9	1,0	1,0
<b>DMA i - C 15:0</b>	15,20	4,5	<b>6,9*</b>	<b>6,4*</b>	<b>5,6</b>	<b>4,6</b>	<b>5,4</b>	<b>5,4</b>
DMA C 15:0	15,54	-	0,8	0,5	1,0	-	-	-
i - C 16:0	15,66	0,9	1,3	1,4	1,2	1,0	1,1	1,3
C 16:0	16,00	<b>6,9</b>	4,5*	4,0*	3,0*	3,8*	3,6*	3,9*
DMA i - C 16:0	16,18	tr	1,1	1,0	tr	-	-	-
DMA C 16:0	16,54	4,3	4,4	3,9	1,6	1,4	1,5	1,7
i - C 17:0	16,65	3,9	4,0	4,2	3,6	3,0*	3,2*	3,7
a - C 17:0	16,73	1,0	1,4	1,6	1,5	1,4	1,5	1,7
C 17:0	17,00	tr	tr	0,7	1,1	1,5	1,6	1,3
<b>DMA i - C 17:0</b>	17,17	<b>10,1</b>	<b>12,7*</b>	<b>11,8</b>	<b>9,6</b>	<b>7,1</b>	<b>8,9</b>	<b>9,1</b>
DMA a - C17:0	17,25	tr	1,0	1,0	0,9	tr	tr	-
i - C 18:0	17,65	0,8	0,9	0,6	0,7	tr	-	-
C 18:2 c9, c12	17,66	tr	0,9	0,7	0,7	tr	-	-
C 18:1 c9	17,73	0,8	0,9	0,8	tr	0,6	-	-
C 18:1 c11?	17,79	0,9	1,5	1,1	0,9	0,7	1,1	0,7
C 18:1 t11	17,83	2,3	1,0	0,9	0,7	0,9	0,6	-
<b>C 18:0</b>	18,00	<b>13,2</b>	<b>6,7*</b>	<b>6,3*</b>	<b>8,9*</b>	<b>13,2</b>	<b>11,9</b>	<b>9,1</b>
DMA C 18:0	18,54	<b>7,7</b>	<b>8,0</b>	<b>7,0</b>	4,2*	3,9*	3,4*	4,2*
i - C 19:0	18,65	-	-	-	0,5	tr	-	-
C 19:0	19,00	tr	0,9	0,9	2,9*	3,9*	4,1*	3,5*
<b>C 20:0</b>	20,00	3,0	2,1*	2,1*	<b>6,8*</b>	<b>9,3*</b>	<b>9,0*</b>	<b>9,0*</b>

tr-delež je manjši od 0,5 %, ?- najbolj verjetna MKA, - MKA nismo zaznali, \*- delež MKA se statistično značilno razlikuje od deleža v negativni kontroli

Iz slike 9 je razvidno, da se profil MKA pri *R. flavefaciens* 007C v primeru dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> razlikuje od profila negativne kontrole. Analiza je ob primerjavi profilov celic negativne kontrole in celic izpostavljenih nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pokazala statistično značilne razlike za deset MKA: i-C 15:0, a-C 15:0, C 16:0, DMA i-C 15:0, i-C 17:0, DMA i-C 17:0, C 18:0, DMA C 18:0, C 19:0 in C 20:0. Statistično značilno povečanje deleža smo opazili pri MKA i-C 15:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 g/l), a-C 15:0 (pri koncentracijah dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1000, 100, 10  $\eta$ /l), DMA i-C 17:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 g/l), C 19:0 in C 20:0 (obeh pri koncentracijah dodanih nanodelcev 5000, 1000, 100, 10  $\eta$ /l). Nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> so povzročili statistično značilno zmanjšanje deleža C 16:0 (pri vseh dodanih koncentracijah nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), i-C 17:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1000, 100,  $\eta$ /l), C 18:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2 in 1 g/l ter 5000  $\eta$ /l) in DMA C 18:0 (pri koncentraciji dodanih nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5000, 1000, 100, 10  $\eta$ /l).



Slika 9: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

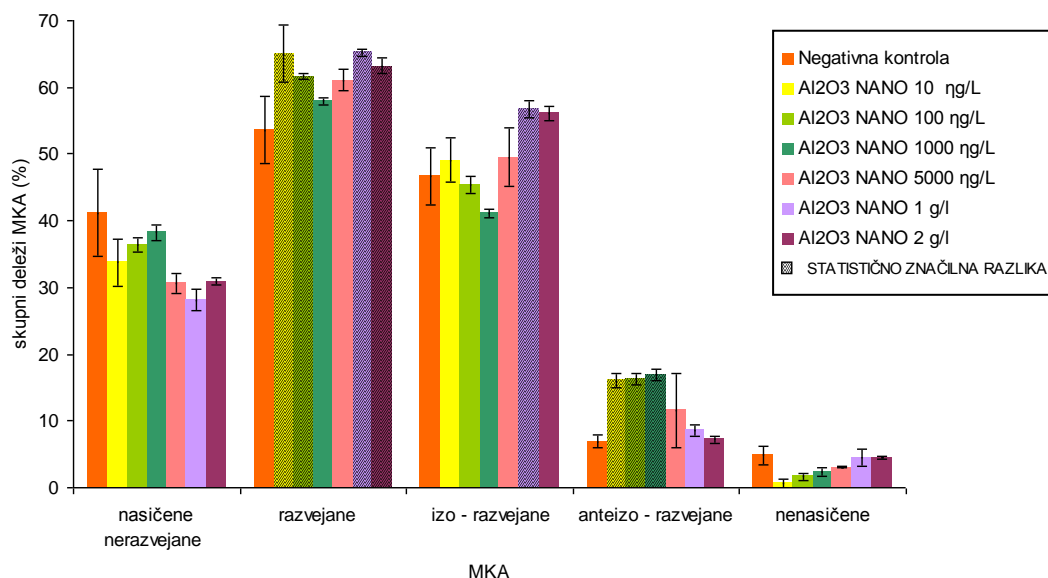
#### 4.7 DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Slika 10 prikazuje skupne deleže MK oziroma MA pri *R. flavefaciens* 007C ob dodatku različnih koncentracij nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Izračunali smo tudi razmerja med posameznimi skupinami MKA (Priloga C 3).

Ob primerjavi profila MKA celic negativne kontrole in celic izpostavljenih nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> smo vpliv nanodelcev opazili kot zmanjšanje deleža nasičenih in povečanje deleža razvejanih MKA. Najbolj očitne spremembe smo pri nasičenih MKA opazili ob izpostavljenosti celic visokim koncentracijam (2 in 1 g/l, 5000 ng/l) nanodelcev, kjer se je njihov delež v primerjavi z neizpostavljenimi celicami zmanjšal za 10,3–13,1 %. Skupni delež razvejanih MKA se je ob izpostavljenosti celic nanodelcem povečal za 7,5–15,7 %. Delež anteizo razvejanih MKA se je bistveno (9,1–10 %) povečal pri nižjih koncentracijah dodanih nanodelcev (1000, 100 in 10 ng/l), medtem ko se je delež izo razvejanih MKA očitneje spremenil pri višjih koncentracijah (2 in 1 g/l, 5000 ng/l) dodanih nanodelcev, in sicer za 2,9–10,1 %. Posledično je razmerje izo/anteizo v primerjavi s celicami negativne kontrole (6,8) nižje pri nizkih koncentracijah Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2,4–3,9), nato pa se postopno zviša na 7,8 ob izpostavitvi koncentraciji 2 g/l.

Razlike v skupnih deležih MKA so bile statistično značilne v primeru anteizo razvejanih MKA (1000, 100 in 10 ng/l), izo razvejanih MKA (1g/l) in razvejanih MKA (2 in 1 g/l, 100 in 10 ng/l) (Slika 10).





Slika 10: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

Delež nenasičenih MKA v primeru izpostavljenosti celic nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ni presegel 5 %. Pri razmerju nasičene/nenasičene MKA je tako kot pri izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub> prišlo do velikih nihanj, ki so posledica različnih deležev nenasičenih MKA, ki smo jih zaznali v vzorcih (Priloga C 3).

#### 4.8 PROFIL CELIČNIH MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH

Profil celičnih MKA smo analizirali tudi v primeru izpostavljenosti *R. flavefaciens* 007C Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v obliki makrodelcev. Zaznali smo enake glavne MKA kot pri izpostavitvi nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, z manjšimi odstopanji v deležih posameznih glavnih MKA (Preglednica 6).

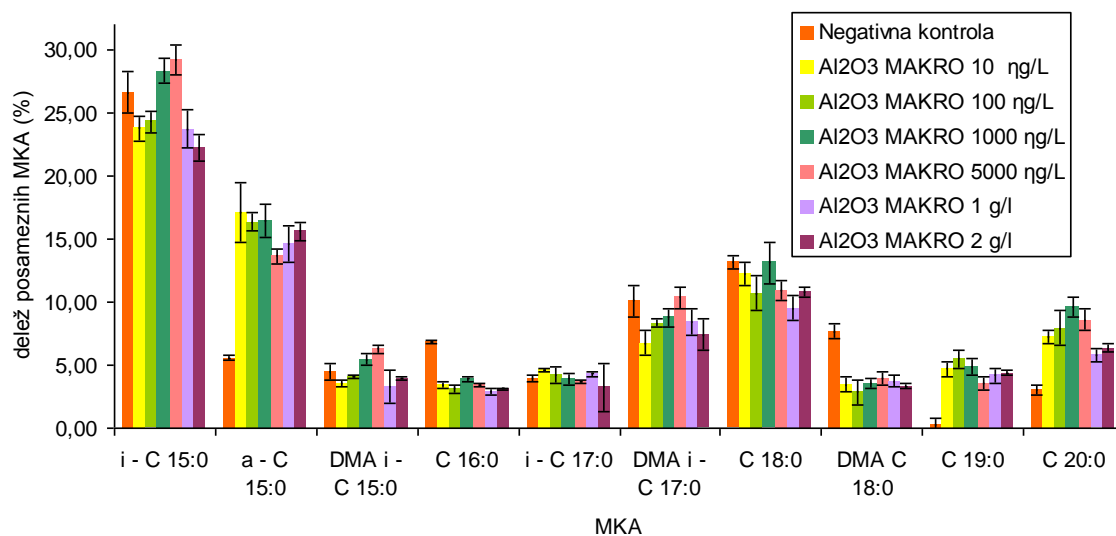
Preglednica 6: Deleži (%) posameznih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri sevu *R. flavefaciens* 007C po rasti v gojiščih z dodanimi makrodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

MKA	ECL	Koncentracije makrodelcev						
		Negativna kontrola	2 g/l	1 g/l	5000 ng/l	1000 ng/l	100 ng/l	10 ng/l
i - C 14:0	13,66	-	0,7	0,7	-	-	0,8	0,7
C 14:0	14,00	tr	0,6	0,6	-	-	tr	0,7
<b>i - C 15:0</b>	14,66	<b>26,6</b>	<b>22,3*</b>	<b>23,7</b>	<b>29,2</b>	<b>28,4</b>	<b>24,3</b>	<b>23,8</b>
<b>a - C 15:0</b>	14,74	<b>5,6</b>	<b>15,6*</b>	<b>14,6*</b>	<b>13,6*</b>	<b>16,4*</b>	<b>16,4*</b>	<b>17,1*</b>
C 15:0	15,00	0,9	0,9	0,9	tr	-	1,0	1,0
DMA i - C 15:0	15,20	4,5	4,0	3,3	<b>6,3</b>	<b>5,5*</b>	4,0	3,5
i - C 16:0	15,66	0,9	1,2	1,4	0,8	tr	1,3	1,2
C 16:0	16,00	<b>6,9</b>	3,1*	2,9*	3,5*	3,9*	3,1*	3,4*
DMA i - C 16:0	16,18	tr	tr	0,6	-	-	tr	-
DMA C 16:0	16,54	4,3	1,4	1,5	1,7	0,5	1,2	1,5
i - C 17:0	16,65	3,9	3,2	4,3	3,7	3,9	4,2	4,7*
a - C 17:0	16,73	1,0	2,3	2,2	1,6	0,6	2,1	2,6
C 17:0	17,00	tr	2,2	2,1	1,3	0,5	2,3	2,2
<b>DMA i - C 17:0</b>	17,17	<b>10,1</b>	<b>7,4</b>	<b>8,5</b>	<b>10,4</b>	<b>8,8</b>	<b>8,4</b>	<b>6,8*</b>
DMA a - C17:0	17,25	tr	0,7	0,8	0,9	-	0,8	0,5
i - C 18:0	17,65	0,8	0,5	0,7	-	-	-	tr
C 18:2 c9, c12	17,66	tr	0,8	-	-	-	-	tr
C 18:1 c9	17,73	0,8	-	-	-	-	-	-
C 18:1 c11?	17,79	0,9	0,7	0,6	tr	-	0,7	0,5
C 18:1 t11	17,83	2,3	-	-	-	-	-	-
<b>C 18:0</b>	18,00	<b>13,2</b>	<b>10,8*</b>	<b>9,5*</b>	<b>11,0*</b>	<b>13,1</b>	<b>10,7*</b>	<b>12,2</b>
DMA C 18:0	18,54	<b>7,7</b>	3,3*	3,7*	3,9*	3,5*	2,8*	3,5*
i - C 19:0	18,65	-	0,9	0,8	-	-	0,9	1,1
C 19:0	19,00	tr	4,4*	4,2*	3,5*	4,8*	<b>5,5*</b>	4,7*
<b>C 20:0</b>	20,00	3,0	<b>6,4*</b>	<b>5,8*</b>	<b>8,6*</b>	<b>9,6*</b>	<b>7,9*</b>	<b>7,2*</b>

tr-delež je manjši od 0,5 %, ?- najbolj verjetna MKA, - MKA nismo zaznali, \*- delež MKA se statistično značilno razlikuje od deleža v negativni kontroli

Iz slike 11 je razvidno, da se profil MKA pri *R. flavefaciens* 007C v primeru dodanih makrodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> razlikuje od profila negativne kontrole. Spremembe so podobne tistim, ki smo jih opazili ob izpostavljenosti celic nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Statistično značilne razlike v profilu celic izpostavljenih makrodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in negativno kontrolo smo zaznali pri naslednjih MKA: i-C 15:0, a-C 15:0, DMA i-C 15:0, C 16:0, i-C 17:0, DMA i-C 17:0, C 18:0, DMA C 18:0, C 19:0 in C 20:0.

Statistično značilno povečanje deležev v primerjavi s celicami negativne kontrole smo pri vseh koncentracijah aluminijevega oksida v obliki makrodelcev zaznali za MKA a-C 15:0, C 19:0 in C 20:0. Prav tako smo pri vseh izpostavljenih celicah zaznali statistično značilno zmanjšanje C 16:0, C 18:0 in DMA C 18:0. Statistično značilno zmanjšanje deležev smo zaznali tudi pri i-C 15:0 ob izpostavitvi celic makrodelcem s koncentracijo 2 g/l in pri DMA i C-17:0 pri koncentraciji dodanih makrodelcev 10 ng/l. V primerjavi z negativno kontrolo pa smo zaznali statistično značilno povečanje deležev DMA i-C 15:0 pri koncentraciji Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1000 ng/l in MKA i-C 17:0 pri koncentraciji aluminijevih makrodelcev 10 ng/l.



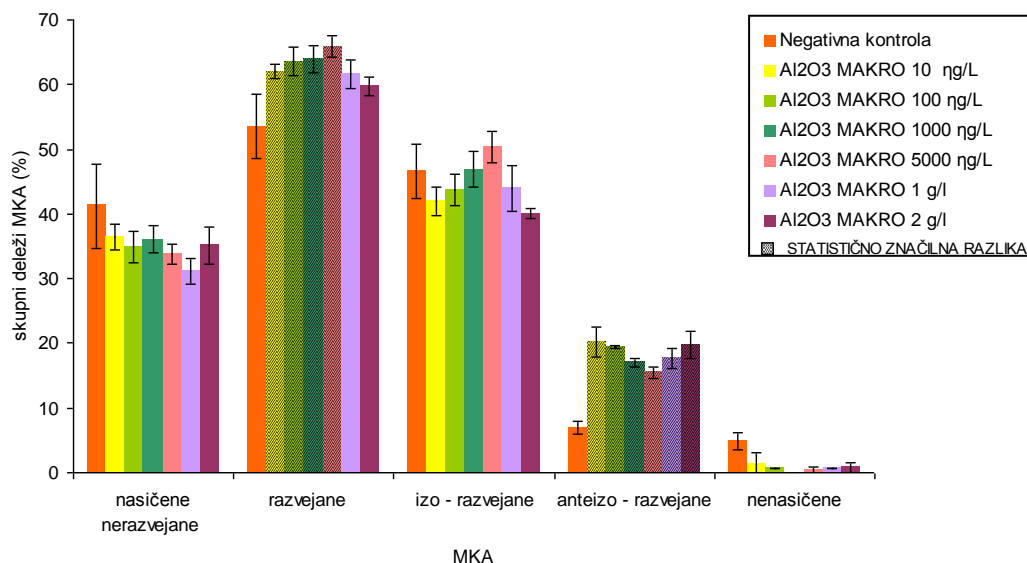
Slika 11: Profil glavnih MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi različnim koncentracijam makrodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.9 DELEŽI MKA TER RAZMERJA IZO/ANTEIZO IN NASIČENE/NENASIČENE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI MAKRODELCEM Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Za vsako koncentracijo makrodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> smo izračunali skupne deleže nasičenih, nenasičenih, izo razvejanih in anteizo razvejanih MKA, kar je prikazano na sliki 12. Ob primerjavi profila MKA celic negativne kontrole in celic izpostavljenih makrodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> smo vpliv makrodelcev opazili kot zmanjšanje deleža nasičenih in povečanje deleža razvejanih MKA, kar je skladno s spremembami, ki smo jih zaznali ob izpostavitvi celic nanodelcem. Razmerje razvejane/nerazvejane MKA je ob izpostavitvi makrodelcem višje kot pri celicah negativne kontrole. Največje spremembe smo opazili pri anteizo razvejanih MKA, katerih delež se je ob izpostavitvi celic makrodelcem povečal za 8,6–13,2 %. Delež izo razvejanih MKA se je povečal nekoliko manj, za 0,3–6,6 %. Razmerje izo/anteizo je v izpostavljenih celicah višje kot pri celicah negativne kontrole.

Delež nenasičenih MKA v primeru izpostavljenosti celic makrodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ni presegel 2 %. Pri razmerju nasičene/nenasičene MKA je tako kot pri izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub> prišlo do velikih nihanj, ki so posledica majhnih in različnih deležev nenasičenih MKA, ki smo jih zaznali v vzorcih.

Razlike v skupnih deležih MKA so bile statistično značilne pri anteizo razvejanih MKA (vse testirane koncentracije) in razvejanih MKA (5000, 1000, 100 in 10 ng/l) (Slika 12).

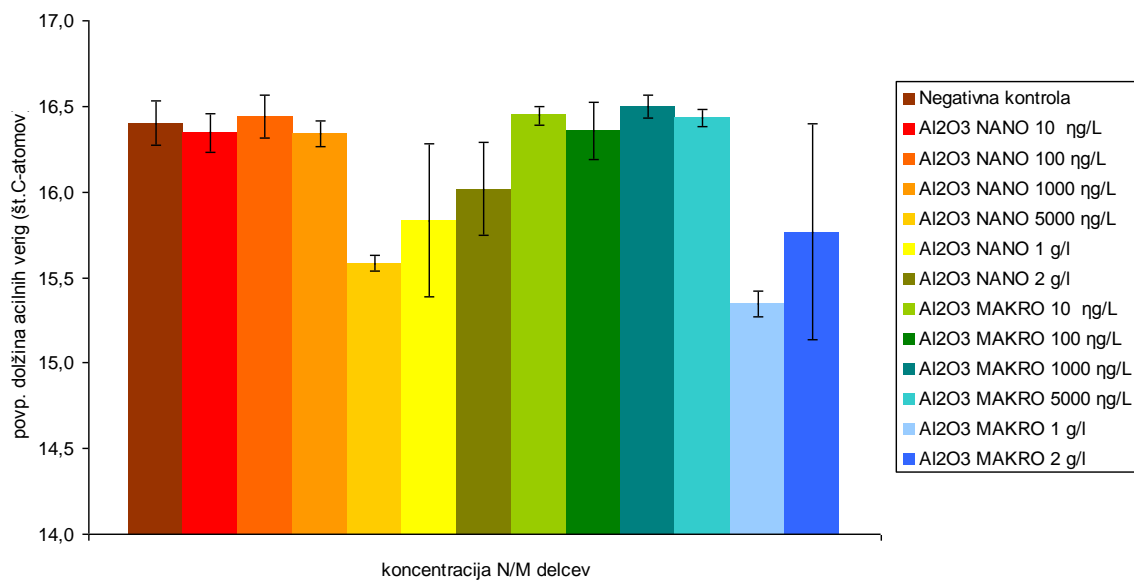


Slika 12: Skupni deleži MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi makrodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

#### 4.10 POVPREČNA DOLŽINA VERIGE MKA PRI *R. flavefaciens* 007C PO IZPOSTAVITVI NANO- OZIROMA MAKRODELCEM Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Tudi pri izpostavitvi Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> smo s primerjavo povprečne dolžine acilnih verig MKA v celicah izpostavljenih nano- oz. makrodelcem poskušali ugotoviti, ali se vpliv katerega od njiju na membransko fluidnost odraža v obliki prilagajanja dolžin acilnih verig.

Pri celicah negativne kontrole je bila veriga povprečno dolga 16,4 C-atomov. Ob dodatku aluminijevih delcev, tako v nano kot v makro obliki, smo pri najvišjih uporabljenih koncentracijah opazili spremembe v povprečni dolžini verige MKA. Pri koncentraciji 2 g/l je bila povprečna dolžina verige 15,8–16 C-atomov, pri koncentraciji 1 g/l pa 15,3–15,8-C atomov. Ob izpostavitvi celic nanodelcem smo skrajšanje verige opazili tudi pri koncentraciji 5000 ng/l, in sicer na 15,6 C-atomov. Pri nižjih koncentracijah delcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nismo opazili sprememb, saj je bila povprečna dolžina verige MKA tako pri nano- kot pri makrodelcih med 16,3 in 16,5 C-atomov (Slika 13).



Slika 13: Povprečna dolžina verige MKA (maščobnih kislin in aldehydov) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi nano- (N) oziroma makrodelcem (M) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v različnih koncentracijah v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Proizvodnja in uporaba nanodelcev je zaradi njihovih edinstvenih lastnosti in širokega spektra uporabe v strmem vzponu, zato lahko upravičeno pričakujemo, da bodo nanodelci kmalu prisotni v večjih količinah v našem okolju (Nowack in Bucheli, 2007). Bakterije igrajo pomembno vlogo pri zagotavljanju normalnega delovanja ekosistemov, zato sta biodostopnost ter toksično delovanje nanodelcev na bakterije pomembni področji raziskav (Neal, 2008). Največkrat opisani mehanizem toksičnosti nanodelcev je tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in z njo povezani oksidativni stres, zato je bila večina raziskav o potencialnih mehanizmih toksičnosti nanodelcev narejenih v aerobnih razmerah, medtem ko je v literaturi malo podatkov o drugih mehanizmih, ki niso povezani s tvorbo kisikovih radikalov in bi jih bilo moč zaznati (tudi) ob odsotnosti kisika.

Membrana je prva bariera, ki ločuje celice od okolja in se praviloma hitro odzove na okoljske dražljaje, zato predstavlja smiselno tarčo preučevanja potencialno negativnih vplivov snovi, med drugim tudi nanodelcev (Niazi in Gu, 2009). Na spremembe v okolju se bakterije največkrat prilagodijo z regulacijo sestave MK in s tem spremenjeno fluidnostjo membran. Tako se branijo pred vdorom strupenih snovi vanje (Weber in de Bont, 1996).

Fluidnost membrane celica spreminja s sestavo MK, ki je lahko sprememba razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK, med cis in trans oblikami, med razvejanimi in nerazvejanimi MK, s spremembo tipa razvejanja MK in s spremembo dolžine acilnih verig. V splošnem velja, da je membrana bolj fluidna, če ima več MK s krajšimi verigami, več dvojnih vezi in večji delež razvejanih MK (Russel, 1984).

Bakterije se na spremembe v okolju (temperatura, pritisk, ioni, hranila, prisotnost strupenih snovi) odzivajo s spreminjanjem membran tako, da jih ohranjajo v ustrezno fluidnem stanju (Mrozik in sod., 2003). Mehanizmi uravnavanja fluidnosti membrane so dobro znani in raziskani pri po Gramu negativnih bakterijah, precej manj pa je to področje raziskano pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Unell in sod., 2006). Največ raziskav s tega področja je bilo opravljenih na vrstah *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*, ki fluidnost membran uravnava s procesi cis-trans izomerizacije (*P. putida*), spreminjanjem razmerja med nasičenimi in nenasičenimi MK ali spreminjanjem razmerja med MK z različnimi dolžinami acilnih verig (Ramos in sod., 2002; Heipieper in sod., 2003). Raziskave, ki so jih opravili na nekaterih po Gramu pozitivnih bakterijah, kot najbolj verjetna mehanizma za povečanje fluidnosti membran navajajo povečanje deleža anteizo razvejanih MKA in zmanjšanje deleža nasičenih MKA (Nielsen in sod., 2005). Unell in sod. (2006) pa so kot posledico izpostavitve *Arthrobacter chlorophenolicus* različnim organskim topilom in spremembam v temperaturi navajali spremembe v razmerju izo/anteizo razvejanih MKA.

V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv različnih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na sestavo membran, oziroma na profil membranskih maščobnih kislin in aldehydov pri striktno anaerobni vampni bakteriji *Ruminococcus flavefaciens* 007C. Zanimalo nas je, ali nanodelci TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vplivajo na celice (tudi) v odsotnosti kisika, kar bi lahko zaznali s spreminjanjem membranske sestave MKA. Da bi preverili, ali so morebitni učinki res posledica izpostavljenosti nanodelcem in ne splošne toksičnosti posameznega materiala, smo celice izpostavili tudi makrodelcem TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v enakih koncentracijah. Pri izbiri

testnih koncentracij smo bili pri TiO<sub>2</sub> omejeni, saj je pri koncentraciji 10000 ng/l prišlo do oksidacije gojišča. Najvišja uporabljena koncentracija delcev TiO<sub>2</sub> je bila zato 5000 ng/l, medtem ko smo v primeru Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> lahko pripravili tudi gojišči z višjima koncentracijama.

Z analizo in primerjavo kromatogramov smo kot glavne določili MKA, ki so bile prisotne v deležu večjem od 5 %. Kot glavne MKA smo pri *R. flavefaciens* 007C določili i-C 15:0, DMA i-C 17:0, C 18:0, DMA C 18:0, a-C 15:0 in DMA i-C 15:0. Ob pregledu literature smo našli le en opis maščobnokislinskega profila bakterije vrste *R. flavefaciens* (Preglednica 1). Saluzzi in sod. (1993) so kot najpomembnejše navedli iste MKA, kot smo jih določili v naši raziskavi, z manjšimi odstopanji v deležih, ki so verjetno posledica uporabe različnih sevov in gojišč.

V primeru izpostavitve celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> smo spremembe v maščobnokislinskem profilu *R. flavefaciens* opazili pri devetih MKA. Statistično značilno povečanje deleža smo opazili pri MKA a-C 15:0, DMA i-C 15:0, i-C 17:0, C 19:0 in C 20:0, statistično značilno zmanjšanje deleža pa smo ugotovili pri MKA i-C 15:0, C 16:0, C 18:0 in DMA C 18:0, a ne pri vseh koncentracijah.

Makrodelci TiO<sub>2</sub> so pri vseh izpostavljenih celicah povzročili statistično značilno povečanje deleža MKA a-C 15:0, C 19:0 in C 20:0 in pa statistično značilno zmanjšanje deleža C 16:0, in DMA C 18:0. Statistično značilne razlike smo opazili tudi v primeru zmanjšanja deležev MKA i-C 15:0, DMA i-C 17:0 in C 18:0, a ne pri vseh koncentracijah.

Delež nasičenih MKA se je ob izpostavitvi celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> pri vseh koncentracijah zmanjšal v primerjavi s celicami, ki slednjim niso bile izpostavljene. Največje spremembe smo opazili ob izpostavitvi celic najvišji koncentraciji nanodelcev, kjer se je delež nasičenih MKA v primerjavi s celicami, ki nanodelcem niso bile izpostavljene, najbolj zmanjšal. Hkrati z zmanjšanjem deleža nasičenih MKA je pri vseh celicah inkubiranih v gojiščih z nanodelci TiO<sub>2</sub> prišlo do povečanja deleža razvejanih MKA, med katerimi se je statistično značilno spremenil delež anteizo razvejanih MKA. Pri treh izmed štirih koncentracij smo opazili tudi povečanje deleža izo razvejanih MKA. Razmerje izo/anteizo je bilo ob izpostavljenosti celic nanodelcem nižje kot pri negativni kontroli (Priloga C1). Naštete spremembe, ki smo jih po izpostavitvi celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> opazili, kažejo na povečanje fluidnosti membran.

Ob primerjavi profila MKA celic negativne kontrole in celic izpostavljenih makrodelcem TiO<sub>2</sub> se je vpliv makrodelcev, enako kot ob izpostavitvi nanodelcem istega materiala, pokazal kot zmanjšanje deleža nasičenih MKA in povečanje deleža razvejanih MKA. Razlika v deležih je bila statistično značilna pri skupini anteizo razvejanih MKA. Največjo spremembo deleža nasičenih MKA smo opazili pri najvišjih dveh uporabljenih koncentracijah makrodelcev TiO<sub>2</sub>. Zmanjšanje deleža nasičenih MKA je pri zgoraj omenjenih dveh koncentracijah v razmerju s povečanjem deleža anteizo razvejanih MKA. V primeru obeh nižjih koncentracij je bilo povečanje deleža anteizo razvejanih MKA večje kot zmanjšanje deleža nasičenih MKA. Pri teh dveh koncentracijah smo opazili tudi zmanjšanje deleža izo razvejanih MKA, ki je pri preostalih dveh koncentracijah nismo. Razmerje izo/anteizo razvejanih MKA (Priloga C 2) je bilo pri izpostavljenih celicah ob vseh koncentracijah dodanih makrodelcev TiO<sub>2</sub> bistveno nižje, kot pri celicah negativne

kontrole in odseva povečanje deleža anteizo razvejanih MKA. Posledica le tega je tudi povečanje skupnega deleža razvejanih MKA.

Delež nenasičenih MKA v primeru izpostavljenosti celic TiO<sub>2</sub> ni presegel 5 %. Pri razmerju nasičene/nenasičene MKA je tako kot pri izpostavitvi nano- kot makrodelcem TiO<sub>2</sub> prišlo do velikih nihanj, ki so posledica različnih deležev nenasičenih MKA, ki smo jih zaznali v gojiščih (Slika 5 in Slika 7). Ker so bili njihovi skupni deleži majhni in se ob izpostavitvi TiO<sub>2</sub> niso značilno spreminjali, sklepamo, da nenasičene MKA ne igrajo pomembne vloge v prilagajanju *R. flavefaciens* 007C na spremembe v okolju. Enake zaključke o nenasičenih MKA navajajo tudi v raziskavi o vplivu temperaturnega šoka na *Bacillus subtilis*. Bakterije so izpostavili temperaturni spremembi (iz 37 °C na 15 °C) in ob dodajanju aminokislina izoleucin opazovali spremembe v njihovem maščobnokislinskem profilu. Predvidevajo, da ob izpostavljenosti nizkim temperaturam povečanje deleža anteizo razvejanih MKA skupaj z zmanjšanjem deleža nasičenih nerazvejanih MKA igra ključno vlogo pri zagotavljanju ustrezne stopnje fluidnosti membrane, medtem ko naj nenasičene MKA ne bi pomembno vplivale na prilagoditev membrane (Klein in sod., 1999).

Tudi skrajšanje acilne verige je eden od mehanizmov, s katerimi bakterije uravnavajo fluidnost membrane. Membrana z daljšimi verigami MK ima višjo temperaturo faznega prehoda kot membrana s krajšimi MK (Hazel in Williams, 1990) in povečevanje deleža krajših MK ter s tem skrajševanje povprečne dolžine acilnih verig v membrani je zelo razširjen odziv mnogih bakterijskih vrst na suboptimalne (nizke) rastne temperature (Russell, 1971; Chihib in sod., 2005). S skrajševanjem verig se celica odzove tudi na povečano koncentracijo soli, npr. pri rodu *Aeromonas* (Chihib in sod., 2005). V naši raziskavi je ob dodatku makrodelcev TiO<sub>2</sub> in nanodelcev TiO<sub>2</sub> v nižjih koncentracijah povprečna dolžina acilnih verig ostala primerljiva z negativno kontrolo, medtem ko smo pri najvišji koncentraciji nanodelcev opazili skrajšanje (Slika 8). Skrajšanje acilnih verig, ki smo ga zaznali v primeru izpostavitve celic najvišji koncentraciji nanodelcev, v nasprotju s pričakovanji kaže na povečanje fluidnosti membran. Zmanjšanje deležev nasičenih MKA in povečanje deležev razvejanih MKA, ki smo jih zaznali pri vseh izpostavljenih celicah, ne glede na koncentracijo ali velikost delcev TiO<sub>2</sub>, prav tako kažejo na povečanje fluidnosti membran. Različne raziskave navajajo spremembe deležev nasičenih in razvejanih (predvsem anteizo razvejanih) MKA kot najbolj pogosta mehanizma po Gramu pozitivnih bakterij za uravnavanje fluidnosti membrane (Nielsen in sod., 2005; Unell in sod., 2006).

Razen primera skrajšanja verig ob izpostavitvi celic najvišji koncentraciji nanodelcev TiO<sub>2</sub> so bili odzivi celic na prisotnosti nano- ali makrodelcev podobni, iz česar lahko sklepamo, da spremembe, ki smo jih zaznali, niso povezane z velikostjo delcev, temveč s kemijsko sestavo TiO<sub>2</sub>.

Tsuang in sod. so leta 2008 poročali o vplivu TiO<sub>2</sub> na bakterije z in brez fotoaktivacije. Obsevanje z UV svetlobo ob prisotnosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> je pri po Gramu negativni aerobni bakteriji *E. coli* povzročilo zmanjšanje viabilnosti, medtem ko samo obsevanje z UV svetlobo ali samo prisotnost TiO<sub>2</sub> nanodelcev na bakterijo ni imelo vpliva. Podobno so se odzvale tudi po Gramu pozitivne aerobne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* in *Pseudomonas aeruginosa* ter anaerobna bakterija *Bacteroides*



*fragilis*. Tudi Heinlaan in sod. so v istem letu ugotovili, da nano- in makrodelci TiO<sub>2</sub> v temi niso bili akutno strupeni za bakterijo *Vibrio fischeri*, niti pri koncentraciji 20 g/L. Vendar pa so makrodelci TiO<sub>2</sub> že pri koncentraciji 100–1000 mg/L v kombinaciji z UV osvetlitvijo povzročili 70 % upad preživetja pri bakteriji *E. coli* (Maness in sod., 1999).

V naši raziskavi smo preverili tudi vpliv nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na profil membranskih MKA pri *R. flavefaciens* 007C. Ugotovili smo, da se je profil MKA pri *R. flavefaciens* 007C v primeru izpostavitve nanodelcem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> razlikoval od profila celic negativne kontrole. Analiza je pokazala statistično značilno povečanje deleža pri MKA i-C 15:0, a-C 15:0, DMA i-C 17:0, C 19:0 in C 20:0. Nanodelci Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> so povzročili statistično značilno zmanjšanje deleža C 16:0, i-C 17:0, C 18:0 in DMA C 18:0. Razlik nismo zaznali pri vseh koncentracijah enako (Slika 9).

Statistično značilno povečanje deleža v primerjavi s celicami negativne kontrole smo pri vseh koncentracijah aluminijevih makrodelcev zaznali za MKA a-C 15:0, C 19:0 in C 20:0. Prav tako smo pri vseh izpostavljenih celicah zaznali statistično značilno zmanjšanje C 16:0, C 18:0 in DMA C 18:0. Statistično značilno zmanjšanje deleža smo pri nekaterih koncentracijah zaznali tudi pri i-C 15:0 in pri DMA i-C-17:0. V primerjavi z negativno kontrolo pa smo zaznali statistično značilno povečanje deleža tudi za DMA i-C 15:0.

V primeru rasti v prisotnosti nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> so imele celice v primerjavi s celicami negativne kontrole manjše deleže nasičenih nerazvejanih MKA ter večje deleže razvejanih MKA (Slika 10 in Slika 12). Tudi pri celicah, ki smo jih gojili v prisotnosti aluminijevega oksida v obliki makrodelcev, smo zaznali podobne spremembe kot ob izpostavitvi celic nanodelcem. V obeh primerih se je statistično značilno povečal delež anteizo razvejanih MKA, predvsem delež a-C 15:0. Ob dodatku Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pri visokih koncentracijah smo tako pri nano- kot makrodelcih opazili skrajšanje acilne verige (Slika 13).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da visoke koncentracije Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tako nano- kot makro velikosti podobno vplivajo na celice, saj smo pri obeh opazili zmanjšanje nasičenih in povečanje razvejanih MKA ter skrajšanje dolžine acilne verige. Vse našete spremembe so v raziskavah opisane kot mehanizmi za povečanje fluidnosti celične membrane (Chihib in sod., 2005; Nielsen in sod., 2005; Unell in sod., 2006).

Raziskave o učinkih aluminijevih nanodelcev poročajo, da se je tudi pri visokih koncentracijah pokazal le blag učinek zaviranja rasti *E. coli*, verjetno kot posledica interakcij površinskih nabojev delcev in membrane (Sadiq in sod., 2009). Tudi Amesov test mutagenosti ni pokazal značilnega povečanja števila povratnih mutacij različnih sevov *Salmonelle typhimurium* ob izpostavljenosti Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodelcem (Balasubramanyam in sod., 2010). Nasprotno pa je raziskava Jianga in sod. (2009) pokazala statistično značilen toksičen vpliv nanodelcev Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na bakterije *B. subtilis*, *E. coli* in *Pseudomonas fluorescens*. Izpostavitvev aluminijevim nanodelcem v koncentraciji 20 mg/l je povzročila zmanjšanje viabilnosti pri *B. subtilis* (57 %), *E. coli* (36 %) in pri *P. fluorescens* (70 %).

Fang in sod. so leta 2007 opravili raziskavo o vplivu nanomateriala fullerena C<sub>60</sub> na sestavo membranskih lipidov pri bakterijah *P. putida* in *B. subtilis*. Pri *P. putida* so zaznali znižanje ravni nenasičenih MK in povečanje deleža ciklopropanskih MK, najverjetneje z namenom zaščite bakterijske membrane pred oksidativnim stresom. Odziv *B. subtilis* pri

nizkih koncentracijah C<sub>60</sub> se je izrazil v povečanju deleža izo- in anteizo- razvejanih MK. Pri visokih koncentracijah, ki so inhibirale rast, pa se je povečala sinteza enkrat nenasičenih MK. V nasprotju s *P. putida* so bakterije *B. subtilis* torej ob izpostavljenosti fulerenu znižale temperature faznega prehoda in povečale fluidnost membrane.

Odziv *R. flavefaciens* 007C na prisotnost delcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ki kaže na povečanje fluidnosti membrane, je bil torej podoben odzivu po Gramu pozitivne bakterije *B. subtilis* ob izpostavljenosti nanomaterialu fulerenu C<sub>60</sub>. O zmanjšanju deležev nasičenih in povečanju deležev razvejanih MKA poročajo tudi v raziskavi o vplivu toluena na *Staphylococcus haemolyticus* (Nielsen in sod., 2005).

Naši rezultati torej kažejo, da se celice *R. flavefaciens* na prisotnost nano- ali makrodelcev TiO<sub>2</sub> oz. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> odzovejo z modifikacijami membrane, ki pripomorejo k povečani in ne zmanjšani fluidnosti. Opažene spremembe so torej ravno nasprotne tistim, ki so jih opazili ob izpostavitvi mikrobnih celic npr. organskim topilom ali težkim kovinam (Heipieper in sod., 1995; Heipieper in sod., 1996; Weber in de Bont, 1996), in torej ne kažejo neposredno na obrambne prilagoditve membrane, ki običajno spremljajo izpostavitve celic strupenim snovem. Še več, ob izpostavitvi delcem TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se celice obnašajo podobno kot v prisotnosti nutrientov. Dejanske vplive TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na celice *R. flavefaciens* bi bilo v prihodnje smiselno preveriti še s sledenjem rasti.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko o vplivu delcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na profil membranskih MKA pri bakteriji *R. flavefaciens* 007C podamo naslednje sklepe:

- izpostavljenost celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v testiranih koncentracijah vpliva na sestavo membranskih MKA,
- po rasti celic v gojiščih z dodanimi nanodelci smo opazili zmanjšanje deležev nasičenih in povečanje deležev razvejanih MKA, kar kaže na prilagajanje celic v smislu povečanja fluidnosti membran,
- izpostavitve makrodelcem enake kemijske sestave ima podoben vpliv na membrane kot izpostavitve nanodelcem, iz česar lahko sklepamo, da velikost delcev ni ključnega pomena za opažene učinke,
- vrsta nanodelcev ni vplivala na spremembo sestave membranskih MKA, saj so bile spremembe (predvsem v smislu vplivov na membransko fluidnost), ki smo jih opazili ob izpostavljenosti celic pri TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podobne,
- koncentracije nano in makrodelcev so vplivale na sestavo membranskih MKA, saj smo ob izpostavljenosti celic pri visokih koncentracijah opazili skrajšanje povprečne dolžine acilnih verig, tako pri TiO<sub>2</sub> kot pri Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ne glede na velikost delcev, kar zopet kaže na povečanje fluidnosti membran.

## 6 POVZETEK

Nanodelci so delci, ki so v več kot eni dimenziji manjši od 100 nanometrov (nm). Posledica njihove majhnosti (oz. velike površine glede na prostornino) so ugodne fizikalno kemične lastnosti, zaradi katerih je njihov spekter uporabe vse širši. Hkrati s strmim naraščanjem uporabe se je pojavila potreba po poznavanju potencialne nevarnosti, ki jo predstavljajo za biološke sisteme. Ker bakterije igrajo pomembno vlogo pri zagotavljanju normalnega delovanja ekosistemov, sta bio-dostopnost ter potencialno toksično delovanje nanodelcev na bakterije pomembni področji nanotoksikologije. Še več, bakterije lahko služijo tudi kot odličen model za izvajanje analiz o ekotoksičnosti (Neal, 2008).

Znano je, da nanodelci motnje v delovanju bakterijskih membran najpogosteje povzročajo s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), manjkajo pa podatki o drugih potencialnih mehanizmih, ki niso povezani s tvorbo kisikovih radikalov in bi jih bilo moč zaznati (tudi) ob odsotnosti kisika.

Bakterije se na spremembe v okolju odzivajo s spreminjanjem membran tako, da jih ohranjajo v ustrezno fluidnem stanju. Raziskave, ko so jih na področju fluidnosti membran opravili s po Gramu pozitivnimi bakterijami, kot najbolj verjetne mehanizme za spreminjanje fluidnosti membran, navajajo spreminjanje deleža anteizo razvejanih MKA in nasičenih MKA ter spremembe v razmerju izo/anteizo razvejanih MKA.

V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv različnih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na sestavo membran oziroma na profil membranskih maščobnih kislin in aldehydov pri striktno anaerobni vampni bakteriji *Ruminococcus flavefaciens* 007C. Zanimalo nas je, ali nanodelci TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (negativno) vplivajo na celice oz. njihove membrane tudi v odsotnosti kisika.

Uporabili smo metodo priprave metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) in transesterifikacijo s kislim katalizatorjem ter detekcijo FAME s plinsko kromatografijo na nepolarni koloni. Analizirali smo profile maščobnih kislin *Ruminococcus flavefaciens* 007C v prisotnosti različnih koncentracij izbranih nanodelcev.

Rezultati so pokazali, da je izpostavljenost celic nanodelcem vplivala na sestavo membranskih MKA. Ob inkubaciji celic v gojiščih z dodanimi nanodelci smo opazili zmanjšanje deležev nasičenih in povečanje deležev razvejanih MKA, kar kaže na povečanje fluidnosti membran. Enake rezultate smo opazili tudi ob izpostavljenosti celic TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v makro velikosti, iz česar lahko sklepamo, da so spremembe profila celičnih MKA, ki smo jih opazili, posledica prisotnosti posameznega od obeh materialov in niso odvisne od velikosti dodanih delcev.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko sklepamo, da prisotnost nano (makro) delcev TiO<sub>2</sub> oz. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v gojišču pri celicah *R. flavefaciens* ne sproži obrambnega signala, ki bi se odražal v zmanjšani fluidnosti (propustnosti) celične membrane. Iz tega lahko sklepamo, da omenjeni nanodelci za celice najverjetneje niso strupeni. Še več, ob izpostavitvi delcem TiO<sub>2</sub> oz. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se celice obnašajo podobno kot v prisotnosti nutrientov. Dejanske vplive TiO<sub>2</sub> in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na celice *R. flavefaciens* bi bilo v prihodnje smiselno preveriti še s sledenjem rasti.

## 7 VIRI

- Beney L., Gervais P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 34–42
- Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., Rahman M.F., Hussain S. M., Grover P. 2010. In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay. *Toxicol. in Vitro*, 24, 6: 1871–1876
- Brites P., Waterham H.R., Wanders R.J.A. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1636: 219–231
- 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. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 4374–4381
- Bryant M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clinic. Nutr.*, 25: 1324–1328
- Campbell M.K. 1999. *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Harcourt Brace & Com: 1214 str.
- Chang Y.Y., Cronan J.E.Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 33: 249–259
- Chihib N.E., Tierny Y., Mary P., Hornez J.P. 2005. Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *Int. J. Food Microbiol.*, 102: 113–119
- Christie W.W. 2003. *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. 3<sup>rd</sup> ed. Bridgewater, The Oily Press: 416 str.
- Christie W.W. The lipid library. 2010. Dundee, Scottish Crop Research Institute. <http://www.lipidlibrary.co.uk/> (jun. 2010)
- Clejan S., Guffanti A.A., Cohen M.A., Krulwich T.A. 1989. Mutation of *Bacillus firmus* OF4 to duramycin resistance results in substantial replacement of membrane lipid phosphatidylethanolamine by its plasmalogen form. *J. Bacteriol.*, 171, 3: 1744–1746
- de Jong A.E.I., Rombouts F.M., Beumer R.R. 2004. Behaviour of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 97: 71–80
- Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods*, 52: 149–182
- Dionisi F., Golay P.-A., Elli M., Fay L.B. 1999. Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria. *Lipids*, 34, 10: 1107–1115

- Evans R.I., McClure P.J., Gould G.W., Russell N.J. 1998. The effect of growth temperature on the phospholipid and fatty acyl compositions of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 159–167
- Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. 2008. Tissue disturbance and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Tox.*, 82: 151–157
- Fang J., Lyon D. Y., Wiesner M. R., Dong J., Alvarez P. J. J. 2007. Effect of a Fullerene Water Suspension on Bacterial Phospholipids and Membrane Phase Behavior. *Environ. Sci. Technol.*, 41: 2636–2642
- Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim : B. H. 1994. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?. *J. Neurochem.*, 63: 793–807
- Grogan D.W., Cronan J.E.Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 4: 429–441
- Haque M.A., Russell N.J. 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiol.*, 150: 1397–1404
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H. C., Kahru A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosph.*, 71: 1308–1316
- Heipieper H.J., Loffeld B., Koweloh H., de Bont J.A.M. 1995. The *cis/trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S 12: An indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosph.*, 306: 104–1051
- Heipieper H.J., Maulenbeld G., van Oirschot Q., de Bont J.A.M. 1996. Effect of environmental factors on *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62: 2773–2777
- Heipieper H.J., Meinhardt F., Segura A. 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229: 1–7
- Hazel J.R., Williams E.E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.*, 29: 167–227
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Thomas Sci.: 1–9
- Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.*, 157: 1619–1625

- Julliard V., de Vaux A., Millet L., Fonty G. 1999. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the Predominant Cellulolytic Bacterial Species of the Equine Cecum. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65, 8: 3738–3741
- Kahru A., Dubourguier H.C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicol.*, 267: 105–119
- Kaneda T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.*, 55, 2: 288–302
- Kaur A., Chaudhary A., Kaur Amarjeet, Choudhary R., Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystems. *Curr. Sci.*, 89, 7:1103–1112
- Keweloh H., Heipieper H.J. 1996. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, 31: 129–137
- Klein W., Weber M.H., Marachiel M.A. 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.*, 181: 5341–5349
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. 1. izd. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 109–125
- Leray C. 2009. Fatty acids. France, Cyberlipid Centre. <http://www.cyberlipid.org/> (jul. 2010)
- Lommer M. C., Thompson R. P., Powell J. J. 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: Influence on the mucosal immune response and association with Chron's disease. *Proc. of Nut. Society*, 61: 123–130
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganism. 9<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice Hall: 991 str.
- Maness P. C., Smolinski S., Blake D. M., Huang Z., Wolfrum E. J., Jackoby W. A. 1999. Bacterial activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65, 9: 4094–4098
- Marrakchi H., Choi K.-H., Rock C.O. 2002. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 47: 44809–44816
- Maynard A.D., Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk. 2006. Washington, DC. WoodrowWilson International Center for Scholars. [http://tinhoahoc.com/Nanotechnology/RiskRelatedResearch\\_Maynard\\_7-06-Final.pdf](http://tinhoahoc.com/Nanotechnology/RiskRelatedResearch_Maynard_7-06-Final.pdf) (jul. 2010)
- McElhaney R.N. 1984. The structure and function of the *Acholeplasma laidlawii* plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 779: 1–42

- Mjøs S.A. 2003. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column. *J. Chromatogr. A*, 1015: 1515–161
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Labuzek S. 2004. Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Polish J. Environ. Stud.*, 5: 487–494
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Sci.*, 311: 622–627
- Neal A.L. 2008. What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?. *Ecotoxicol.*, 17: 362–371
- Nelson K.E., Zinder S.H., Hance I., Burr P., Odongo D., Wasawo D., Odenyo A., Bishop R., 2003. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. *Environ. Microbiol.*, 5: 1212–1220
- Niazi J.H., Gu M.B. 2009. Toxicity of metallic nanoparticles in microorganisms. *Atmosph. and Biolog. Environ. Monit.*, 3: 193–206
- Nielsen L.E., Kadavy D.R., Rajagopal S., Drijber R., Nickerson K.W. 2005. Survey of extreme solvent tolerance in Gram-positive Cocci: Membrane fatty acids changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71, 9: 5171–5176
- Nowack B., Bucheli T.D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.*, 150: 5–22
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, 113: 823–839
- Pagan R., Mackey B. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variations among strains. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 66: 2829–2834
- Pantarotto D., Briand JP, Prato M, Bianco A. 2004. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Camb.)*, 7, 1: 16–17.
- Paltauf F. 1994. Ether lipids in biomembranes. *Chem. Phys. Lip.*, 74: 101–139
- Ramos J.L., Duque E., Gallegos M. T., Godoy P., Ramos-Gonzales M.I., Rojas A., Teran W., Segura A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in Gram negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 743–68

- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije. [http://www.kemijskovaren.si/files/nano\\_knjiga.pdf](http://www.kemijskovaren.si/files/nano_knjiga.pdf) (jun. 2009)
- Rittner M.N. 2002. Market analysis of nanostructured materials. Am. Ceram. Soc. Bulletin, 81: 33–36
- Robert C., Bernalier-Donadille A. 2003. The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. FEMS Microbiol. Ecol., 46: 81–89
- Russell N.J. 1971. Alteration in fatty acid chain length in *Micrococcus cryophilus* grown at different temperatures. Biochim. Biophys. Acta, 231, 1: 254–256
- Russell N.J. 1984. Mechanism of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. Trends Biochem. Sci., 9: 108–112
- Sadiq M., Chowdhury B., Chandrasekaran N., Mukherjee A. 2009. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. Nanomed.: Nanotech., Bio. and Med., 5, 3: 282–286
- Saluzzi L., Smith A., Stewart C.S. 1993. Analysis of bacterial phospholipid markers and plant monosaccharides during forage degradation by *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* in co-culture. J. Gen. Microbiol., 139: 2865–2873
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 71: 522–525
- Stadelmann-Ingrand S., Pontcharraud R., Fauconneau B. 2004. Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates. Chem. Phys. Lip., 131: 93–105
- Stewart C. S., Paniagua C., Dinsdale D., Cheng K-J., Garrow S.H. 1981. Selective Isolation and Characteristics of *Bacteriodes succinogenes* from the Rumen of a Cow. Appl. and Environ. Microbiol., 41, 2:504–510
- Tsuang Y. H., Sun J. S., Huang Y. C., Lu C. H., Chang W., Wang C. C. 2008. Studies of Photokilling of Bacteria Using Titanium Dioxide Nanoparticles. Artif. Org., 32, 2: 167–174
- Unell M., Kabelitz N., Jansson J.K., Heipieper H.J. 2006. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fattyacids. FEMS, 266: 138–143
- Voet D., Voet J.G. 2004. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Hoboken, John Wiley & sons. Inc: 1591 str.
- Wang H., Wick R. L., Xing B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ. Pollut., 157: 1171–1177



- Weber F. J., de Bont J.A.M. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effect of organic solvents on membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1286: 225–245
- Welch D.F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinic. Microbiol. Reviews*, 4, 4: 422–438
- Yang H., Liu C., Yang D., Zhang H., Xi Z. 2008. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.*, 29: 69–78
- Vernath J. M., Kaser E. G., Vernath M. M., Koch M., Yost G. S. 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared with soil dusts. *Particl. Fibr. Toxicol.*, 4: 2–19
- Zorec M. 2006. Kemotaksonomska ananliza dolgoverižnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov v vampnih bakterijah iz rodov *Butyrivibrio* in *Pseudobutyrvibrio*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 126 str.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Romani Marinšek Logar za prevzeto mentorstvo, za vse strokovne nasvete in za potrpežljivost, ki jo je imela ob nastajanju te diplomske naloge.

Posebna zahvala gre delovni mentorici, asist. Maši Vodovnik, ki mi je prijazno pomagala v laboratoriju ter posredovala mnoge nasvete in strokovno pomoč.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gorazdu Avguštinu za pregled diplomskega dela.

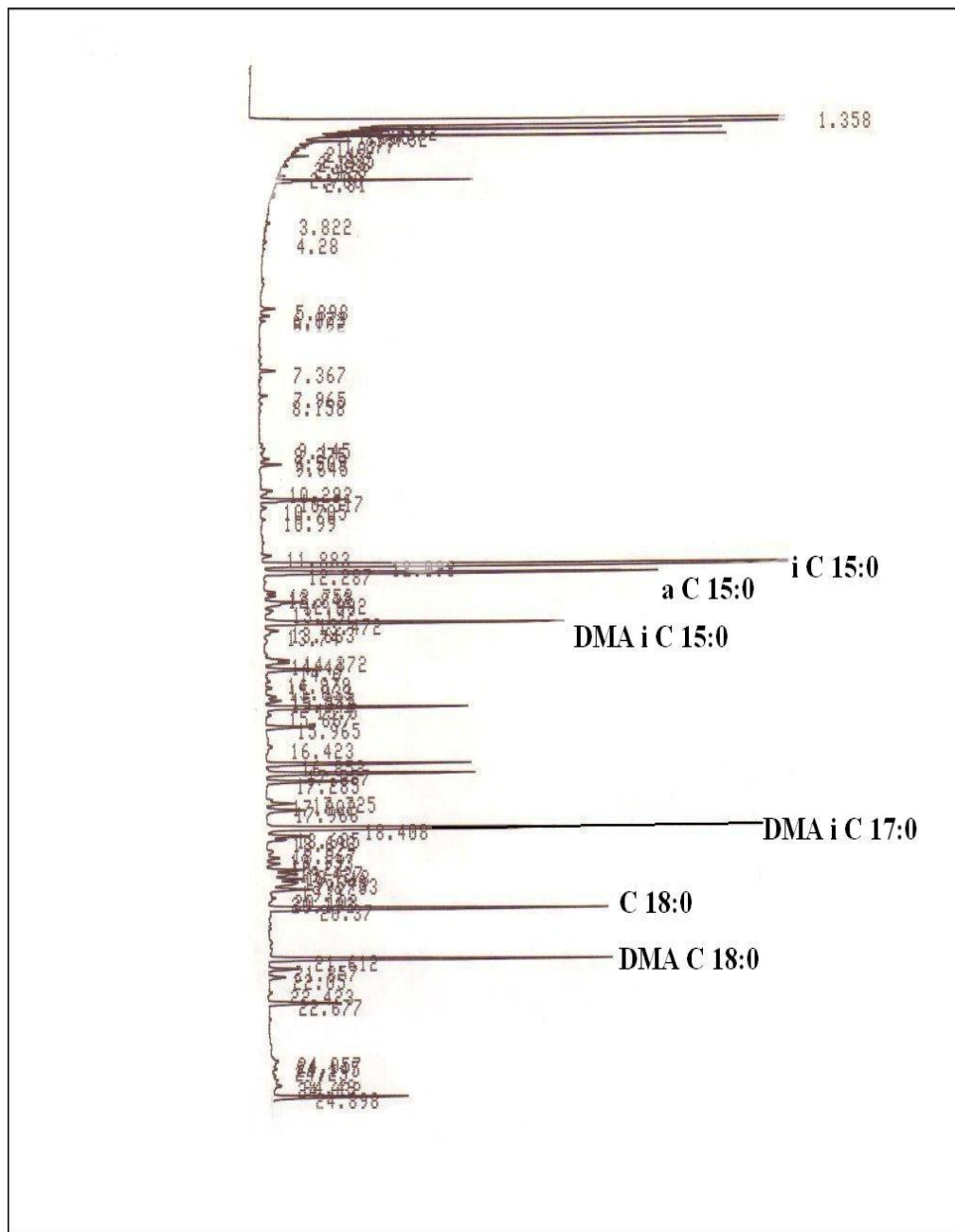
Za vzpodbudne besede in mnoge koristne nasvete pri delu in pisanju se zahvaljujem vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo.

Prav tako se zahvaljujem vsem svojim domačim in prijateljem, ki so z dobro voljo in potrpežljivostjo sodelovali, kadar nanodelci in bakterije niso.

**PRILOGE**

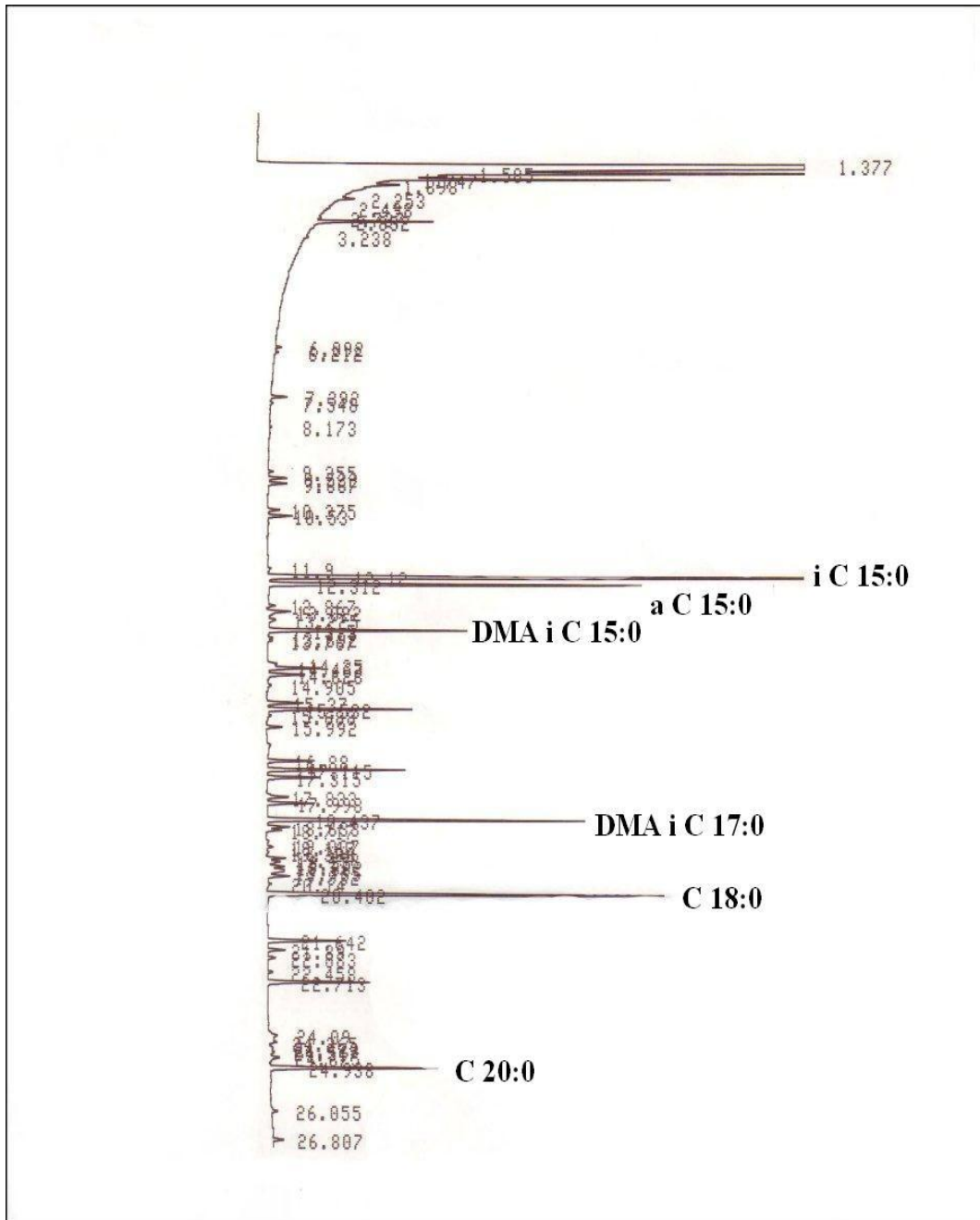
**Priloga A1:**

**Kromatogram vzorca z dodanimi nanodelci**



Priloga A2:

Kromatogram vzorca z dodanimi makrodelci



## Priloga B:

## Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistemskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

<b>sistematsko ime MKA; trivialno ime</b>	<b>okrajšava MKA</b>	<b>Equity-1<sup>a</sup></b>
nonanojska kislina; pelargonska kislina	C9:0	9,00
nonal	DMA C9:0	9,55
8-metil-nonanojska ali izo-dekanojska kislina	i-C10:0	9,66
dekanojska kislina; kaprična kislina	C10:0	10,00
3-hidroksi-nonanojska kislina	C9:0 3OH	10,43
dekanal	DMA C10:0	10,55
9-metil-dekanojska ali izo-undekanojska kislina	i-C11:0	10,66
8-metil-dekanojska ali anteizo-undekanojska kislina	a-C11:0	10,74
cis-10-undecenojska kislina	C11:1 c10	10,89
undekanojska kislina	C11:0	11,00
2-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 2OH	11,15
9-metil-dekanal, izo-undekanal	DMA i-C11:0	11,21
8-metil-dekanal, anteizo-undekanal	DMA a-C11:0	11,29
3-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 3OH	11,45
undekanal	DMA C11:0	11,55
10-metil-undekanojska ali izo-dodekanojska kislina	i-C12:0	11,66
9-metil-undekanojska ali anteizo-dodekanojska kislina	a-C12:0	11,74
cis-11-dodecenojska kislina	C12:1 c11	11,92
dodekanojska kislina; lavrinska kislina	C12:0	12,00
3-hidroksi-9-metil-dekanojska kislina	i-C11:0 3OH	-
2-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 2OH	12,16
10-metil-undekanal, izo-dodekanal	DMA i-C12:0	12,21
9-metil-undekanal, anteizo dodekanal	DMA a-C12:0	12,29
3-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 3OH	12,47
dodekanal	DMA C12:0	12,55
11-metil-dodekanojska ali izo-tridekanojska kislina	i-C13:0	12,66
10-metil-dodekanojska ali anteizo-tridekanojska kislina	a-C13:0	12,74
cis-12-tridecenojska kislina	C13:1 c12	12,92
tridekanojska kislina	C13:0	13,00
3-hidroksi-10-metil-undekanojska kislina	i-C12:0 3OH	-
2-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 2OH	13,17
11-metil-dodekanal, izo-tridekanal	DMA i-C13:0	13,21
10-metil-dodekanal, anteizo-tridekanal	DMA a-C13:0	13,29
3-hidroksi-dodecenojska kislina	C12:1 3OH	-
12-metil-tridecenojska kislina izomer E	i-C14:1 E	-
3-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 3OH	13,49
tridekanal	DMA C13:0	13,55
12-metil-tridekanojska ali izo-tetradekanojska kislina	i-C14:0	13,66
11-metil-tridekanojska ali anteizo-tetradekanojska kislina	a-C14:0	13,74
tetradecenojska kislina izomer X (cis-7?)	C14:1 X	13,80
2-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 2OH	-
cis-9-tetradecenojska kislina; miristoleinska kislina	C14:1 c9	13,88
tetradecenojska kislina izomer Y	C14:1 Y	13,91
tetradekanojska kislina; miristinska kislina	C14:0	14,00
3-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 3OH	-
2-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 2OH	14,19
12-metil-tridekanal, izo-tetradekanal	DMA i-C14:0	14,20
3-hidroksi-10-metil-dodekanojska kislina	a-C13:0 3OH	-
11-metil-tridekanal, anteizo-tetradekanal	DMA a-C14:0	14,28
tetradecenal izomer X (cis-7?)	DMA C14:1 X	14,34
sistematsko ime MKA; trivialno ime	okrajšava MKA	Equity-1a

14-metil-tetradecenojska kislina izomer E	i-C15:1 E	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomer F	i-C15:1 F	-
tetradecenal izomer Y	DMA C14:1 Y	14,45
14-metil-tetradecenojska kislina izomer G	i-C15:1 G	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomera H in I	i-C15:1 H/I	-
3-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 3OH	14,50
12-metil-tetradecenojska kislina izomer A	a-C15:1 A	-
tetradekanal	DMA C14:0	14,54
13-metil-tetradekanojska ali izo-pentadekanojska kislina	i-C15:0	14,66
12-metil-tetradekanojska ali anteizo-pentadekanojska kislina	a-C15:0	14,74
pentadecenojska kislina izomer X (cis-6?)	C15:1 X	-
pentadecenojska kislina izomer A	C15:1 A	-
pentadecenojska kislina izomer B	C15:1 B	-
cis-10-pentadecenojska kislina	C15:1 c10	14,88
pentadecenojska kislina izomer Y	C15:1 Y	14,91
pentadekanojska kislina	C15:0	15,00
3-hidroksi-12-metil-tridekanojska kislina	i-C14:0 3OH	-
13-metil-tetradekanal, izo-pentadekanal	DMA i-C15:0	15,20
2-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 2OH	15,21
12-metil-tetradekanal, anteizo-pentadekanal	DMA a-C15:0	15,28
pentadecenal izomer X (cis-6?)	DMA C15:1 X	-
pentadecenal izomer Y	DMA C15:1 Y	15,45
14-metil-pentadecenojska kislina izomer F	i-C16:1 F	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer G	i-C16:1 G	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer H	i-C16:1 H	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer I	i-C16:1 I	-
3-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 3OH	15,52
pentadekanal	DMA C15:0	15,54
14-metil-pentadekanojska kislina; izo-palmitinska kislina	i-C16:0	15,66
13-metil-pentadekanojska kislina; anteizo-palmitinska kislina	a-C16:0	15,74
cis-5-heksadecenojska kislina	C16:1 c5	-
cis-7-heksadecenojska kislina	C16:1 c7	15,74
cis-9-heksadecenojska kislina; palmitoleinska kislina	C16:1 c9	15,79
trans-9-heksadecenojska kislina; palmitelaidinska kislina	C16:1 t9	15,84
2-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 2OH	-
heksadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C16:1 C	15,87
heksadekanojska kislina; palmitinska kislina	C16:0	16,00
3-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 3OH	-
14-metil-pentadekanal, izo-heksadekanal	DMA i-C16:0	16,18
2-hidroksi-pentadekanojska kislina	C15:0 2OH	16,22
3-hidroksi-12-metil-tetradekanojska kislina	a-C15:0 3OH	-
13-metil-pentadekanal, anteizo-heksadekanal	DMA a-C16:0	16,26
cis-9-heksadecenal	DMA C16:1 c9	16,31
heksadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C16:1 C	16,39
15-metil-cis-6-heksadecenojska kislina	i-C17:1 c6	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer E	i-C17:1 E	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer G	i-C17:1 G	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer H	i-C17:1 H	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer I	i-C17:1 I	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer B	a-C17:1 B	-
3-hidroksi-pentadekanojska kislina	C15:0 3OH	16,54
heksadekanal	DMA C16:0	16,54
14-metil-heksadecenojska kislina izomer C	a-C17:1 C	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer A	a-C17:1 A	-
15-metil-heksadekanojska ali izo-heptadekanojska kislina	i-C17:0	16,65

14-metil-heksadekanojska ali anteizo-heptadekanojska kislina	a-C17:0	16,73
heptadecenojska kislina izomer A	C17:1 A	-
cis-9-heptadecenojska kislina	C17:1 c9	-
cis-10-heptadecenojska kislina	C17:1 c10	16,79
sistematsko ime MKA; trivialno ime MK	okrajšava MKA	Equity-1a
heptadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C17:1 C	16,83
cis-9,10-metilen-heksadekanojska kislina	C17:0 cyc-9,10	16,86
heptadecenojska kislina izomer X	C17:1 X	16,89
heptadekanojska kislina; margarinska kislina	C17:0	17,00
2-hidroksi-heksadecenojska kislina	C16:1 2OH	-
3-hidroksi-14-metil-pentadekanojska kislina	i-C16:0 3OH	-
15-metil-heksadekanal, izo-heptadekanal	DMA i-C17:0	17,17
2-hidroksi-heksadekanojska kislina	C16:0 2OH	17,24
14-metil-heksadekanal, anteizo-heptadekanal	DMA a-C17:0	17,25
	DMA C17:1	
cis-10-heptadecenal	c10	17,31
heptadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C17:1 C	17,35
16-metil-heptadecenojska kislina izomer G	i-C18:1 G	-
16-metil-heptadecenojska kislina izomer H	i-C18:1 H	-
heptadekanal	DMA C17:0	17,54
3-hidroksi-heksadekanojska kislina	C16:0 3OH	17,56
16-metil-heptadekanojska kislina; izo-stearinska kislina	i-C18:0	17,65
cis-9, cis-12-oktadekadienojska kislina; linolna kislina	C18:2 c9,c12	17,66
15-metil-heptadekanojska ali anteizo-oktadekanojska kislina	a-C18:0	17,73
cis-9-oktadecenojska kislina; oleinska kislina	C18:1 c9	17,73
cis-11-oktadecenojska kislina; cis-vakcenska kislina	C18:1 c11	17,79
trans-9-oktadecenojska kislina; elaidinska kislina	C18:1 t9	17,79
trans-6-oktadecenojska kislina	C18:1 t6	17,79
trans-11-oktadecenojska kislina; vakcenska kislina	C18:1 t11	17,83
oktadecenojska kislina izomer B (cis-13?)	C18:1 B	17,88
oktadecenojska kislina izomer X	C18:1 X	17,91
oktadekanojska kislina; stearinska kislina	C18:0	18,00
3-hidroksi-15-metil-heksadekanojska kislina	i-C17:0 3OH	-
16-metil-heptadekanal, izo-oktadekanal	DMA i-C18:0	18,17
3-hidroksi-14-metil-heksadekanojska kislina	a-C17:0 3OH	-
2-hidroksi-heptadekanojska kislina	C17:0 2OH	18,25
15-metil-heptanal, izo-oktadekanal	DMA a-C18:0	18,25
cis-9-oktadecenal	DMA C18:1 c9	18,25
trans-9-oktadecenal	DMA C18:1 t9	18,31
	DMA C18:1	
cis-11-oktadecenal	c11	18,31
trans-6-oktadecenal	DMA C18:1 t6	18,31
	DMA C18:1	
trans-11-oktadecenal	t11	18,35
oktadecenal izomer B (cis-13?)	DMA C18:1 B	18,40
17-metil-oktadecenojska kislina izomer I	i-C19:1 I	-
oktadekanal	DMA C18:0	18,54
3-hidroksi-heptadekanojska kislina	C17:0 3OH	18,57
17-metil-oktadekanojska ali izo-nonadekanojska kislina	i-C19:0	18,65
16-metil-oktadekanojska ali anteizo-nonadekanojska kislina	a-C19:0	18,73
cis-10-nonadecenojska kislina	C19:1 c10	18,73
nonadecenojska kislina izomer X	C19:1 X	-
trans-7-nonadecenojska kislina	C19:1 t7	-
cis-9,10-metilen-oktadekanojska kislina; dihidrosterulna k	C19:0 cyc9,10	18,84

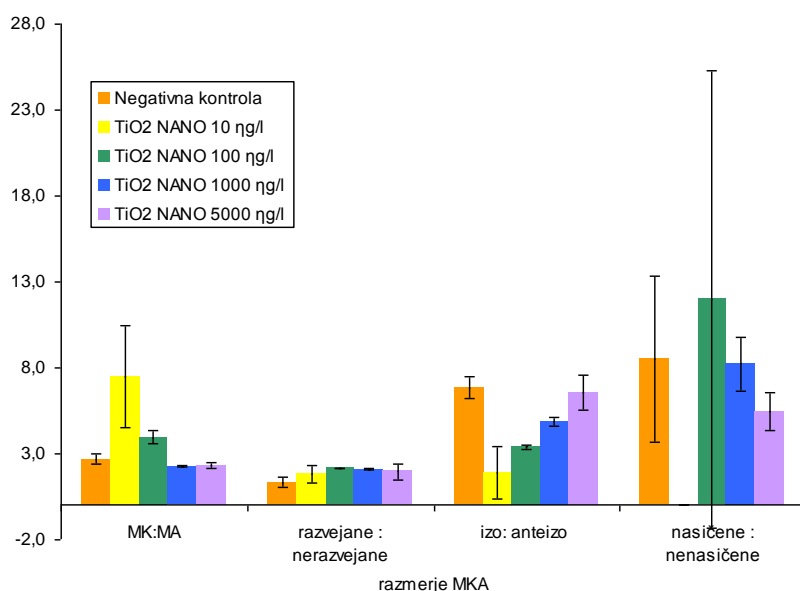
cis-11,12-metilen-oktadekanojska kislina; laktobacilna kislina	C19:0 cyc11,12	18,87
nonadekanojska kislina	C19:0	19,00
2-hidroksi-oktadecenojska kislina	C18:1 2OH	-
3-hidroksi-16-metil-heptadekanojska kislina	i-C18:0 3OH	-
17-metil-oktadekanal, izo-nonadekanal	DMA i-C19:0	19,17
16-metil-oktadekanal, anteizo-nonadekanal	DMA a-C19:0	19,25
2-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 2OH	19,27
	DMAC19:0cyc	
cis-11,12-metilen-oktadekanal	11,12	19,39
nonadekanal	DMA C19:0	19,54
3-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 3OH	19,59
18-metil-nonadekanojska kislina; izo-arahidinska kislina	i-C20:0	19,65
sistematsko ime MKA; trivialno ime MK	okrajšava MKA	Equity-1a
cis-9-eikozenojska kislina; gadoleinska kislina	C20:1 c9	-
cis-11-eikozenojska kislina	C20:1 c11	19,73
trans-11-eikozenojska kislina	C20:1 t11	19,79
cis-13-eikozenojska kislina	C20:1 c13	19,79
eikozanojska kislina; arahidinska kislina	C20:0	20,00

Priloga B 1: Faktorji ECL, pridobljeni z delom na koloni Equity-1 (nepolarna stacionarna faza 100 % poli-dimetil-siloksan), s temperaturnim programom od 150 °C do 250 °C s stopnjo naraščanja temperature 4 °C na minuto; krepko so izpisani faktorji ECL izračunani iz retencijskega časa posamezne maščobne kisline in maščobnega aldehida, normalno izpisani so faktorji ECL izračunani prek faktorjev FCL ali predvideni glede na vrednosti iz literature.



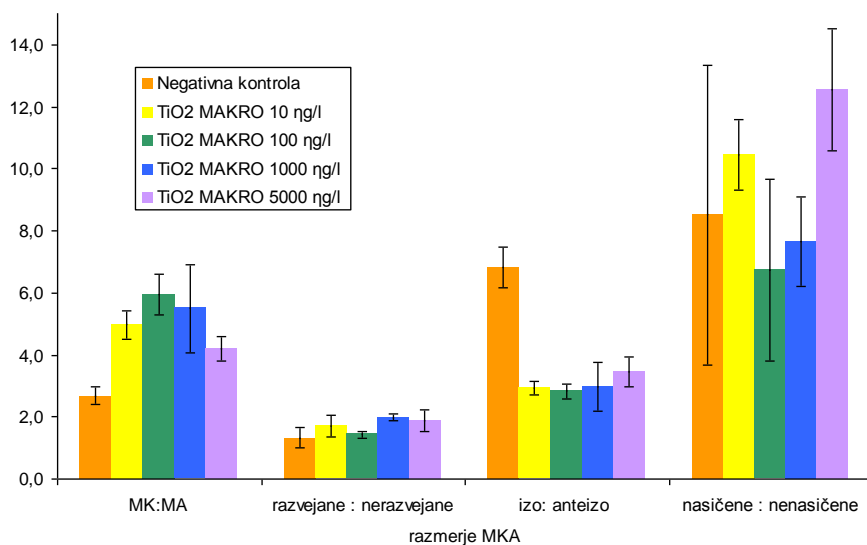
### Priloga C1:

Razmerja MK (maščobne kisline)/MA (maščobni aldehidi), razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA (maščobne kisline in aldehidi) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam nanodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.



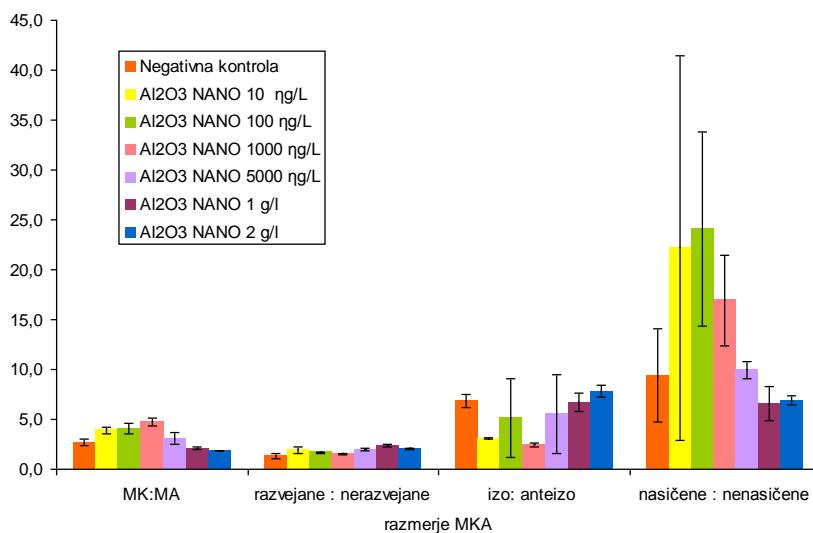
### Priloga C 2:

Razmerja MK (maščobne kisline)/MA (maščobni aldehidi), razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA (maščobne kisline in aldehidi) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam makrodelcev TiO<sub>2</sub> v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni.



### Priloga C 3:

Razmerja MK (maščobne kisline)/MA (maščobni aldehidi), razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA (maščobne kisline in aldehidi) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam nanodelcev  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja  $\pm$  standardni odkloni.



### Priloga C 4:

Razmerja MK (maščobne kisline)/MA (maščobni aldehidi), razvejane/nerazvejane, izo/anteizo in nasičene/nenasičene MKA (maščobne kisline in aldehidi) pri *R. flavefaciens* 007C po izpostavitvi izbranim koncentracijam makrodelcev  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati so prikazani kot povprečja  $\pm$  standardni odkloni.

