

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ– ПЛЕВЕН
КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ
И МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА**

Д-р Христина Йотова Хиткова

**ПРОУЧВАНЕ НА АНТИМИКРОБНАТА АКТИВНОСТ
НА НОВОСИНТЕЗИРАН НАНОРАЗМЕРЕН
ТИТАНОВ ОКСИД И НЕГОВИ ПРОИЗВОДНИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен «Доктор»

Научна специалност:

«Микробиология» 01.06.12

Научни ръководители:

Проф. д-р Мария Средкова, дм

Доц. Ангелина Стоянова, дх

Официални рецензенти:

Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн

Проф. д-р Ива Христова, дмн

Плевен, 2015

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ROS – Reactive oxygen species

$\cdot\text{OH}$ – хидроксилни радикали

$\cdot\text{O}_2^-$ – супероксидни анион радикали

e^- – електрони

h^+ – електронни дупки

UV лъчи – ултравиолетови лъчи

mg – милиграм

nm – нанометър

mL – милилитър

μL – микролитър

min – минути

\log_{10} – десетичен логаритъм

мол.% – моларен процент

CFU – colony forming units

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

ESBLs – extended-spectrum β -lactamases

Amp C – Amp C-type β -lactamase

NDM – New Delhi metallo- β -lactamase

KPC – K. pneumoniae carbapenemase

БАЛ – бронхоалвеоларен лаваж

ЦВК – централен венозен катетър

НФГБ – неферментиращи глюкоза бактерии

МДЛ – Медико - диагностична лаборатория

МУ – Медицински Университет

УМБАЛ – Университетска многопрофилна болница за активно лечение

НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести

БАН – Българска академия на науките

ИОНХ – Институт по обща и неорганична химия

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Развитието на нови, алтернативни технологии за дезинфекция доведе до широкото изследване на редица метални оксиди, сред които титанов оксид (TiO_2) и негови производни. От първото съобщение за антимикробните свойства на TiO_2 , публикувано през 1985 г. от Matsunaga et al., дезинфекционното действие на оксида е обект на многобройни проучвания. Данните от тях показват, че в присъствие на ултравиолетови лъчи TiO_2 изявява активност срещу широк спектър от микроорганизми (вируси, бактерии, гъбички, алги, протозои) и туморни клетки.

През последното десетилетие възможностите за практическо приложение на антимикробните свойства на титановия оксид се разшириха многократно. В областта на опазване на околната среда той се използва за пречистване на въздух, повърхностни и отпадни води, както и за дезинфекция на питейна вода. Съществено преимущество пред други органични и неорганични дезинфектанти е, че TiO_2 запазва антимикробното си действие след включване в полимери. От такива полимери се изработват медицински и санитарни изделия, опаковки за хранителни продукти и др.

Независимо от многобройните приложения на TiO_2 -медираната фотокатализа за отстраняване на химични замърсители, все още не са стандартизирани методите за изследване на фотокаталитичната дезинфекционна активност на титановите препарати. За изпитване на тяхното антимикробно действие са описани многобройни експериментални постановки, включващи физични, химични и микробиологични методи. Най-често срещаните електронномикроскопски, спектроскопски и други техники са скъпоструващи и изискват специална апаратура. Въпреки, че разкриват механизмите на действие на TiO_2 върху клетъчните структури, тези техники не позволяват количествена характеристика на антимикробното действие. Освен това, наличието на разнообразни опитни постановки и изследвани параметри възпрепятства сравняването на получените резултати. Оценката на антимикробното действие е затруднена и поради липсата на стандартни микробиологични методи в това направление.

Публикуваните към момента резултати за антимикробната активност на TiO_2 се отнасят предимно за санитарно-показателни микроорганизми. Освен това, в повечето проучвания са използвани търговски продукти, най-често Degussa P-25. Относително малко са изследванията върху антимикробните свойства на новосинтезирани наноразмерни титанови препарати.

Планираните в дисертационния труд изследвания са насочени към решаване на част от съществуващите проблеми. Разработването на надежден метод за тестване на антимикробната активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства и приложението му при клинично значими микроорганизми е предмет на дисертационния труд. Получената информация за чувствителността на широк спектър от бактерии и гъбички към новосинтезирани наноразмерни титанови препарати ще даде достоверна представа за тяхната антимикробна активност и възможност за приложението им в дезинфекционната практика.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ЦЕЛ на настоящия десертационен труд е да се проучи антимикробната активност на новосинтезиран наноразмерен титанов оксид и негови производни. За реализирането на тази цел се поставиха следните **задачи**:

1. Да се разработи метод за определяне на антимикробна активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства.
2. Да се определи антибактериалната активност на титанов оксид в условия на цялостен фотокаталитичен експериментален модел.
3. Да се проучи фотокаталитичната активност на титанов оксид върху широк спектър от клинични бактериални изолати.
4. Да се проучи фотокаталитичната активност на титанов оксид върху клинични изолати на гъбички.
5. Да се проучи антибактериалната активност на модифицирани титанови химични съединения и композити.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ТИТАНОВИ ХИМИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ И КОМПОЗИТИ

1.1. Титанов оксид (TiO_2). Синтезиран е чрез нехидролитична зол-гел реакция между бензилов алкохол и TiCl_4 . Новосинтезираният TiO_2 е с чист тип кристална решетка от фазата анатаз и размер на праховите частици 15-20 nm.

1.2. Цинков титанат (ZnTiO_3). Синтезиран е чрез нехидролитична зол-гел реакция между TiCl_4 , ZnCl_2 и бензилов алкохол. Новосинтезираният ZnTiO_3 е с размер на праховите частици 40 nm, които показват склонност към агломерация в агрегати с големина около 1 μm .

1.3. Fe/TiO₂ композит. Синтезиран е чрез нехидролитичен зол-гел метод. Получени са три разновидности на композита Fe/TiO₂ – с 0.5 мол.% Fe, 1 мол.% Fe и 2 мол.% Fe. Те са с чист тип кристална решетка от фазата анатаз и размер на праховите частици 12-15 nm.

1.4. Ag/TiO₂/ZnO композит. Синтезиран е чрез зол-гел метод. Отделните структурни компоненти в състава на новосинтезирания композит са с размери 6-40 nm.

TiO₂, ZnTiO₃ и Fe/TiO₂ са синтезирани в сектор “Химия” при МУ-Плевен, а композитът Ag/TiO₂/ZnO е синтезиран в лаборатория “Високотемпературни оксидни материали” на ИОНХ при БАН - София. Всички титанови препарати са характеризирани чрез рентгенографски, спектроскопски и електронномикроскопски методи в ИОНХ и Института по Физикохимия при БАН.

2. МИКРООРГАНИЗМИ

2.1. Референтни бактериални щамове

E.coli ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29212

2.2. Клинични бактериални щамове

2.2.1. Грам-отрицателни бактерии от сем. *Enterobacteriaceae* – 20

2.2.2. Грам-отрицателни бактерии от групата на НФГБ – 10

2.2.3. Грам-положителни бактерии – 10

Изолирането, идентифицирането и определянето на антибиотичната чувствителност на щамовете е извършено рутинно в МДЛ по микробиология при „УМБАЛ Д-р Г. Странски” – Плевен. За видова идентификация са използвани конвенционални методи и автоматизираните системи VITEK 2 compact и mini API (*bio Merieux*). За тестване на антибиотичната чувствителност са прилагани дисково дифузионния метод на Bauer - Kirby и автоматизираната система VITEK 2 compact (*bio Merieux*). Механизмите на резистентност са определени с фенотипни тестове, в съответствие с препоръките на CLSI (2012), а продукцията на карбапенемази е доказана в НЦЗПБ - София и Катедрата по микробиология при МУ – София

На **Табл.1** е представена информация за изпитваните клинични бактериални щамове.

Табл.1 Характеристики на клиничните бактериални щамове

№	Бактериален вид	Лаб. №	Вид на клиничния материал	Антибиотична чувствителност
1.	<i>E. coli</i>	5244/12 г.	хемокултура	чувствителен
2.	<i>E. coli</i>	1247/12 г.	урина	чувствителен
3.	<i>E. coli</i>	295/11 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
4.	<i>E. coli</i>	45/13 г.	хемокултура	ESBLs продуцент
5.	<i>E. coli</i>	5270-1/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
6.	<i>E. coli</i>	5270-2/12 г.	ранев секрет	NDM продуцент
7.	<i>K.pneumoniae</i>	184/12 г.	хемокултура	чувствителен
8.	<i>K.pneumoniae</i>	582-1/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
9.	<i>K.pneumoniae</i>	4015-1/13 г.	ранев секрет	KPC продуцент
10.	<i>E.cloacae</i>	1251/12 г.	урина	чувствителен
11.	<i>E.cloacae</i>	89-1/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
12.	<i>E.cloacae</i>	3570-2/12 г.	ранев секрет	Amp C продуцент
13.	<i>E.aerogenes</i>	853-3/13 г.	ранев секрет	чувствителен
14.	<i>S.marcescens</i>	538/12 г.	урина	чувствителен
15.	<i>S.marcescens</i>	239/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
16.	<i>S.marcescens</i>	1301/12 г.	трах. аспират	ESBLs продуцент
17.	<i>C.freundii</i>	2221/11 г.	урина	чувствителен
18.	<i>C.freundii</i>	2823/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
19.	<i>P.mirabilis</i>	2042/12 г.	урина	чувствителен
20.	<i>P.mirabilis</i>	4926-1/12 г.	ранев секрет	ESBLs продуцент
21.	<i>P.aeruginosa</i>	518/12 г.	ранев секрет	чувствителен
22.	<i>P.aeruginosa</i>	4290/11 г.	трах. аспират	чувствителен
23.	<i>P.aeruginosa</i>	4306/13 г.	трах. аспират	множествено резистентен
24.	<i>P.fluorescens</i>	414-3/12 г.	ранев секрет	чувствителен
25.	<i>A.baumannii</i>	899-2/12 г.	трах. аспират	множествено резистентен
26.	<i>A.baumannii</i>	4169/12 г.	хемокултура	множествено резистентен
27.	<i>A.haemolyticus</i>	3078/12 г.	урина	чувствителен
28.	<i>C.indologenes</i>	4007-2/12 г.	БАЛ	чувствителен
29.	<i>M.odoratus</i>	3232/13 г.	урина	множествено резистентен
30.	<i>S.maltophilia</i>	3568-1/12 г.	ранев секрет	множествено резистентен
31.	<i>S.aureus</i>	2054/12 г.	хемокултура	метицилин чувствителен
32.	<i>S.aureus</i>	4224/12 г.	ранев секрет	метицилин резистентен
33.	<i>S.epidermidis</i>	4604/13 г.	ЦВК	метицилин резистентен
34.	<i>S.saprophyticus</i>	1348/13 г.	урина	метицилин чувствителен
35.	<i>S.lugdunensis</i>	5628/13 г.	ранев секрет	метицилин чувствителен
36.	<i>E.faecalis</i>	1746/12 г.	хемокултура	ванкомицин чувствителен
37.	<i>E.faecalis</i>	873/13 г.	урина	ванкомицин чувствителен
38.	<i>E.faecium</i>	1548/12 г.	хемокултура	ванкомицин чувствителен
39.	<i>E.faecium</i>	3563/13 г.	хемокултура	ванкомицин резистентен
40.	<i>B.subtilis</i>	4123/12 г.	ранев секрет	чувствителен

2.3. Гъбички с медицинско значение – 6 щам

C.albicans – 1 щам (лаб.№ 5001/13 г., изолиран от хемокултура), *C.tropicalis* – 1 щам (лаб.№ 4326/13 г., изолиран от ранев секрет), *C.lusitaniae* – 1 щам (получен от НЦЗПБ), *C.glabrata* – 1 щам (лаб.№ 3990/11 г., изолиран от хемокултура), *C.krusei* – 1 щам (лаб.№ 1601/13 г., изолиран от ранев секрет) и *C.neoformans* – 1 щам (получен от НЦЗПБ).

Четири от щамовете са изолирани и идентифицирани до вид в МДЛ по микробиология при „УМБАЛ Д-р Г. Странски” - Плевен чрез автоматизираните системи VITEK 2 compact и mini API (*bio Merieux*). Два от щамовете са предоставени от Референтната лаборатория по Микози към НЦЗПБ - София.

3. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ И АПАРАТУРА

3.1. Хранителни среди: 5% кръвен агар [КА] (*Бул Буо, Becton Dickinson*), Сабуро агар (*Бул Буо*), месопептонов бульон [МПБ] (*Бул Буо*), триптон-глюкозов бульон [ТГБ] (*Бул Буо*), фосфатен буфериран физиологичен разтвор (*Бул Буо*), Мюлер–Хинтон агар [МХА] (*Бул Буо, Becton Dickinson*), CPS ID (*bio Merieux*) и CHROM агар *Candida* (*Becton Dickinson*).

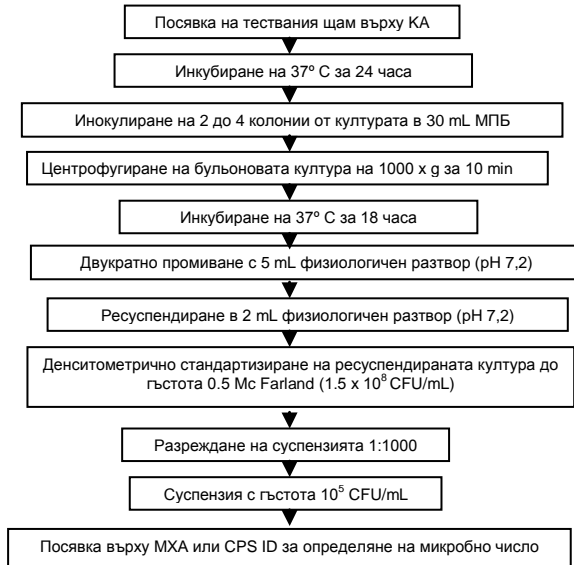
3.2. Апаратура: електронна везна (PB 602-S MonoBloc, *Mettler Toledo*), центрофуга (Hettich Zentrifugen micro 22 R, *Andreas hettich GmbH*), денситометър (Densimat, *bio Merieux*), ултравиолетова лампа (Sylvania 50 Hz F 8 W / BLB-T5), електронни броячи на колонии (Colony Counter, *bio Kobe*), електромагнитни бъркалки (MMS RCT, *IKA*), снабдени с прозрачни стъклени колби с обем 200 mL.

4. МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ И АНАЛИЗ

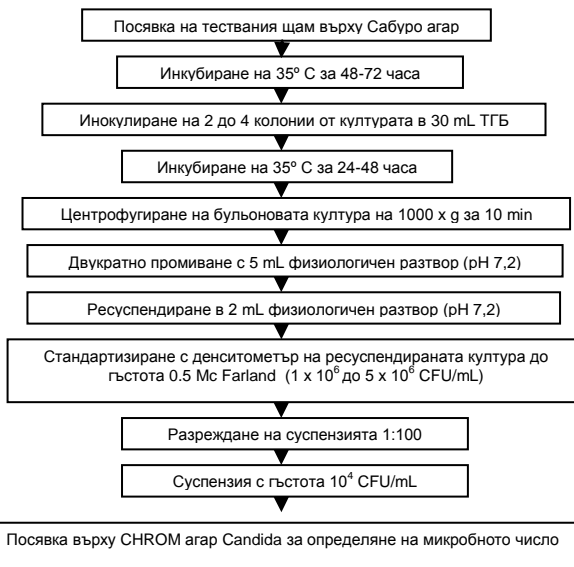
4.1. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ТИТАНОВИ ПРЕПАРАТИ С ФОТОКАТАЛИТИЧНИ СВОЙСТВА:

- Изготвяне на стандартизирана микробна суспензия;
- Третиране на суспензията в условия на фотокаталитичен експериментален модел, с вземане на проби по време на експозицията;
- Култивиране на взетите проби и определяне на микробното число;
- Характеризиране на остатъчния ефект от експерименталните въздействия;
- Оценка на експерименталните въздействия.

4.1.1. Изготвяне на стандартизирана микробна суспензия



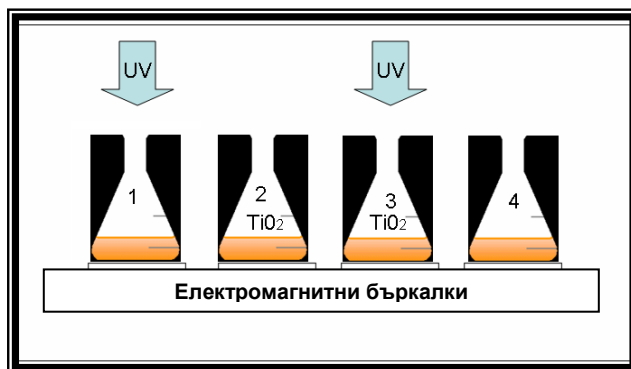
Фиг.1 Изготвяне на стандартизирана бактериална суспензия



Фиг.2 Изготвяне на стандартизирана гъбична суспензия

4.1.2. Фотокаталитичен експериментален модел

Използват се 4 прозрачни стъклени колби с обем 200 mL. Всяка колба съдържа 100 mL стандартизирана суспензия от съответния тест-микроорганизъм.



Фиг.3 Схема на фотокаталитичния експериментален модел

- (1) Първата колба се облъчва с ултравиолетова лампа, с дължина на вълната 365 nm, поставена странично на разстояние 10 cm.
- (2) Към втората колба се прибавя 100 mg TiO_2 или друг титанов препарат и колбата се обвива с алуминиево фолио.
- (3) Към третата колба се прибавя 100 mg TiO_2 или друг титанов препарат и колбата се облъчва с ултравиолетови лъчи, както първата колба.
- (4) Четвъртата колба се обвива с алуминиево фолио и служи за контрола на бактериалния растеж.

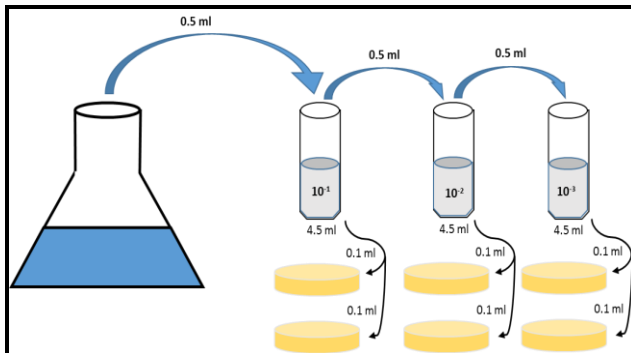
Експерименталните изследвания се провеждат на стайна температура (22° - $25^{\circ}C$), при непрекъснато разбъркване с електромангнитни бъркалки с режим 250 об/мин. Продължителността на експозицията е от 1 до 3 часа. По време на експозицията периодично се вземат проби за изследване в количество 500 μL и се определя микробното число на суспензията.

4.1.3. Метод за определяне на микробно число в твърди хранителни среди

Протокол за определяне на микробното число:

- От всяка проба се изготвят във физиологичен разтвор по 3 серийни десетократни разреждания: 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} .
- От всяко разреждане се вземат 2 инокулума по 100 μL и се посяват равномерно върху цялата повърхност на 2 петрита с MXA; CPS ID agar – за *Enterococcus spp.* и *Proteus spp.* и CHROM agar Candida – за гъбчки.

- Петритата, инокулирани с бактерии, се инкубират на 37°C за 24 часа, а инокулираните с гъбички – на 35°C за 48 - 72 часа.
- Видимите колонии се изброяват с електронен брояч.
- Микробното число се определя по формулата:
 $CFU/mL = \text{брой колонии} \times 10 \times \text{реципрочната стойност на разреждането}$



Фиг.4 Схема за определяне на микробното число

4.1.4. Характеризиране на остатъчния ефект от експерименталните въздействия

- Третираниите бактериални суспензии се съхраняват в тъмни условия при 37°C за 24 часа, а гъбичните суспензии – в тъмни условия при 35°C за 48-72 часа.
- От всяка суспензия се вземат проби за изследване в обем 500 μL и се изготвят по 2 серийни десетократни разреждания (10^{-1} и 10^{-2}).
- От всяка неразредена и разредена проба се вземат 2 инокулаума по 100 μL и се посяват върху 2 петрита с агар.
- Определя се микробното число в съответствие с 4.1.3.

4.1.5. Методи за оценка на експерименталните въздействия

- Конструирание на криви на убиване и криви на оцеляване на микробните клетки.
- Определяне на редуционни индекси и преживяемост на микробните клетки в проценти.

4.2. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

- Линеен регресионен анализ – за характеризирание на зависимостта между $\log CFU/mL$ към времето на експозиция за всеки щам и по групи бактерии.
- Еднофакторен ANOVA – за сравняване на груповите регресионни коефициенти.

- Обобщен линеен модел с повтарящи се измервания и Смесен линеен модел – за комплексна оценка на зависимостта между \log CFU/mL към времето от една страна, и вида на щама или групата бактерии - от друга.

Експерименталните данни са обработени чрез софтуерните програми Statistics X и SPSS 21. Статистическата достоверност на наблюдаваните явления е определена според установената практика ($p < 0,05$).

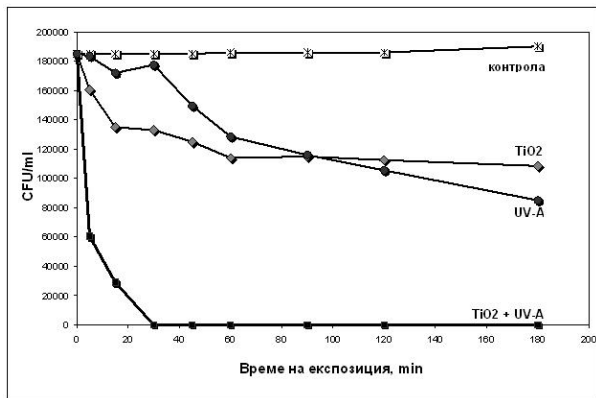
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. РАЗРАБОТВАНЕ НА МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ТИТАНОВИ ПРЕПАРАТИ С ФОТОКАТАЛИТИЧНИ СВОЙСТВА

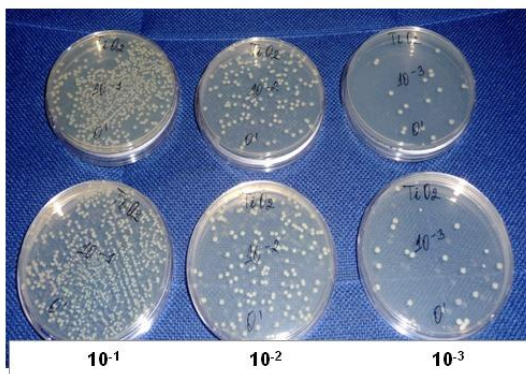
На базата на теоретични познания в областта на фотокатализата и експериментални постановки, публикувани от чуждестранни автори [Maness, 1999; Rincón, 2004; Rahmani, 2009], беше разработен метод за определяне на антимикробна активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства (Метод 4.1.). При разработването на метода бяха стандартизирани параметрите на фотокаталитичния експериментален модел и протокола за определяне на микробното число.

Методът беше апробиран чрез изследване въздействието на новосинтезиран наноразмерен TiO_2 върху референтния щам *E.coli* ATCC 25922. Получените резултати са представени на **Фиг.5**. При третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи всички бактериални клетки загиват в рамките на 30 min. При третиране с 1 mg/mL TiO_2 на тъмно, и съответно при облъчване с UV-A лъчи, количеството на жизнеспособните бактериални клетки остава сигнификантно по време на 180 min експозиция. Резултатите от апробирането на метода са в подкрепа на теорията за фотокаталитичните свойства на TiO_2 . Те показват, че антибактериалната активност на TiO_2 в присъствие на UV-A лъчи не се дължи на самостоятелната активност на TiO_2 , нито на самостоятелното въздействие на UV-A лъчите. Тези данни са доказателство, че при така разработената експериментална постановка са създадени добри фотокаталитични условия. Осигурено е оптимално въздействие на светлинните лъчи и успешно протичане на фотокаталитичния процес.

На **Фиг.6** е илюстриран бактериалният растеж на референтния щам *E.coli* при посевка на 100 μL от разрежданията на изходната суспензия. Данните за броя на колонии са представени на **Табл.2**. Като цяло, числените стойности от разреждания 10^{-2} и 10^{-3} си съответстват, а броят на колонии от двойките петрита от едно и също разреждане е сходен.



Фиг.5 Динамика на преживяемостта на *E.coli* ATCC 25922 при третиране с 1 mg/mL TiO₂ и UV-A лъчи самостоятелно, и в комбинация



Фиг.6 Колонии на *E.coli* ATCC 25922 върху МХА при посевка на 100 μ L от 10⁻¹, 10⁻² и 10⁻³ разреждания на изходната суспензия

Табл.2 Брой колонии на *E.coli* ATCC 25922 при посевка на 100 μ L от различни разреждания на изходната суспензия

Серийни разреждания	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		Микробно число (CFU/mL)
	I ^{во}	II ^{ро}	I ^{во}	II ^{ро}	I ^{во}	II ^{ро}	
Инокулирани петри							
Брой колонии	неброими	неброими	196	184	20	16	185 000
Средна стойност на броя на колониите	неброими		190		18		

Средната стойност на броя на колонии от разреждания 10^{-2} (190) и 10^{-3} (18) се използва за изчисляване на микробното число:

$$\text{CFU/mL} = \frac{(190 \times 10 \times 100) + (18 \times 10 \times 1000)}{2} = 185\,000$$

В този случай микробното число се определя от броя на колонии в съответните двойки петри от разреждания 10^{-2} и 10^{-3} , тоест от общо 4 петри, а количеството на колонии от 10^{-1} има ориентировъчно значение.

На **Табл. 3** са представени данни за броя на колонии при третиране на референтния щам *E.coli* с UV-A лъчи, TiO_2 и комбинация от TiO_2 и UV-A лъчи. Броят на колонии във всяко разреждане е средноаритметична стойност от две петрита при посявка на 100 μL .

Табл. 3 Брой колонии на *E.coli* ATCC 25922 при третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи самостоятелно, и в комбинация

Време	Експериментални фактори								
	UV-A лъчи			TiO_2 + UV-A лъчи			TiO_2		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
0 min	неброими	190	18	неброими	190	18	неброими	190	18
5 min	неброими	187	18	385	63	8	неброими	161	16
15 min	неброими	174	17	28	3	0	неброими	148	13
30 min	неброими	185	17	0	0	0	неброими	146	12
45 min	неброими	149	15	0	0	0	неброими	130	12
60 min	неброими	147	11	0	0	0	неброими	128	10
90 min	неброими	132	10	0	0	0	неброими	110	12
120 min	неброими	121	9	0	0	0	неброими	125	10
180 min	неброими	90	8	0	0	0	неброими	107	11

При самостоятелно облъчване с UV-A лъчи и третиране с TiO_2 на тъмно колонии от разреждане 10^{-1} остават неброими, което поставя въпроса за целесъобразността на посявката от това разреждане. От разреждания 10^{-2} и 10^{-3} колонии са добре преброими и техният брой намалява пропорционално по време на експозицията: от 190 до 90, съотв. 107 (10^{-2}) и от 18 до 8, съотв. 11 (10^{-3}). Незначителното намаление на количеството на колонии при тези експериментални фактори предполага скъсяване на експозиционното време от 180 на 120 min.

При комбинирано въздействие с TiO_2 и UV-A лъчи на 5^{-та} min колонииите от всички разреждания са броими. В този случай микробното число възлиза на $6,05 \times 10^4$ CFU/mL и се определя на базата на данните от 6 петрита – по 2 петри от 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} . На 15^{-та} min средноаритметичният брой на колонииите от 10^{-1} е 28, от 10^{-2} – 3, а от 10^{-3} – 0. Микробното число е $2,90 \times 10^3$ CFU/mL, изчислено от броя на колонииите в 4 петрита – по 2 петри от 10^{-1} и 10^{-2} .

При третиране с TiO_2 и UV-A лъчи за 15 min микробното число намалява от 10^5 до 10^3 CFU/mL. За да се определи ефективното време на въздействие е целесъобразно третираната с TiO_2 и UV-A лъчи суспензия да се тества през първите 30 min на 5 min интервали, а впоследствие на 10 min интервали, като времето на експозиция се съкрати от 180 на 60 min.

Резултатите от апробирането на метода са основание за промяна на параметрите на експерименталния протокол в следните насоки:

- Съкращаване на времето за самостоятелно третиране с TiO_2 или UV-A лъчи от 180 на 120 min, с посявки на 2 инокулума по 100 μL от 10^{-2} и 2 инокулума по 100 μL от 10^{-3} .

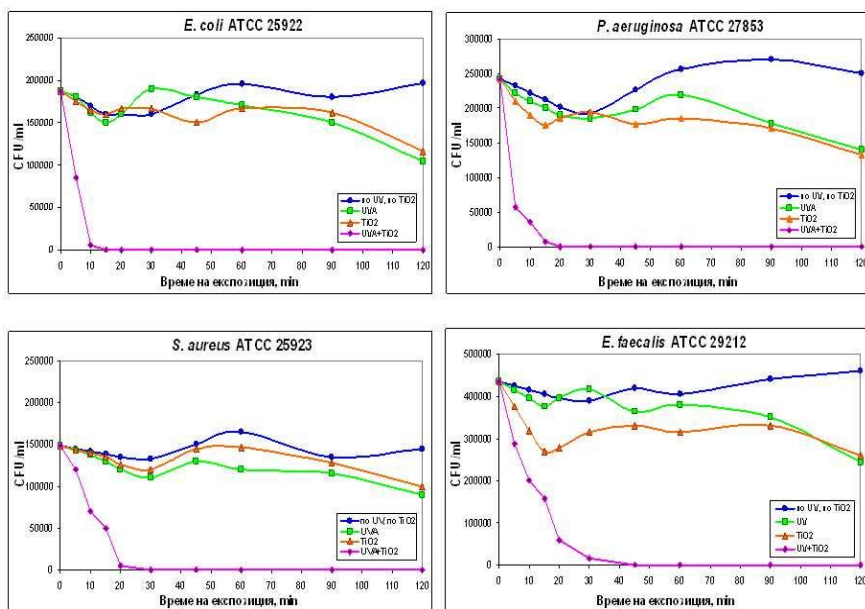
- Установяване на времето за въздействие на TiO_2 в присъствие на UV-A лъчи на 60 min. Вземане на проби за изследване на 5^{-та}, 10^{-та}, 15^{-та}, 20^{-та}, 25^{-та}, 30^{-та}, 40^{-та}, 50^{-та} и 60^{-та} min, с посявки на 2 инокулума по 100 μL от неразредената суспензия и по 2 инокулума от 100 μL от разреждания 10^{-1} и 10^{-2} . Посявките на 2 инокулума по 100 μL от неразредената суспензия дават възможност да се снижи т.нар. "detection limit" под 5 CFU/mL.

В обобщение, разработеният метод за определяне на антимикробна активност на титанови препарати дава възможност да се изпита антимикробната активност на TiO_2 на тъмно и в присъствие на ултравиолетови лъчи, да се определи ефективното време на въздействие и да се характеризира динамиката на фотокаталитичния процес. Трябва да се отбележи, че цялостната постановка е много трудоемка, изисква голям брой контейнери с физиологичен разтвор за разреждане на пробите и петрита с агар за определяне на микробното число. Освен това, в рамките на един експеримент може да се тества антимикробното действие на един титанов препарат върху един вид микроорганизъм. Това в известна степен ограничава възможностите за приложение на метода при изпитване на голям брой химични вещества върху широк спектър от микроорганизми.

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИБАКТЕРИАЛНАТА АКТИВНОСТ НА ТИТАНОВ ОКСИД В УСЛОВИЯ НА ЦЯЛОСТЕН ФОТОКАТАЛИТИЧЕН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ

Антибактериалната активност на новосинтезирания наноразмерен TiO_2 беше изпитана върху четири референтни щама в условия на цялостен експериментален модел, включващ: (1) облъчване с UV-A лъчи за 120 min; (2) третиране с 1 mg/mL TiO_2 на тъмно за 120 min (3) третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи за 60 min; и (4) инкубиране на суспензиите в тъмни условия за 120 min, при непрекъснато разбъркване с магнитни бъркалки.

Динамиката на преживяемостта на референтните щамове при различните експериментални въздействия е представена на **Фиг.7**. При всички тествани щамове кривите на убиване, отразяващи влиянието на TiO_2 на тъмно са сходни с тези, получени при облъчване с UV-A лъчи. И при двете самостоятелни въздействия на 120^{-та} min броят на колонии леко намалява, но остава в рамките на сигнификантните стойности (около 10^5 CFU/mL).



Фиг.7 Динамика на преживяемостта на референтни щамове при третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A самостоятелно, и в комбинация

Кривите на убиване, представящи комбинираното действие на TiO_2 и UV-A лъчите се снижават стръмно още в началото на експозицията. В рамките на 15 до 50 min колонииобразуващите единици намаляват рязко и от 10^5 CFU/mL достигат почти до нула. Това е доказателство за бактерицидното действие на TiO_2 във фотокаталитични условия.

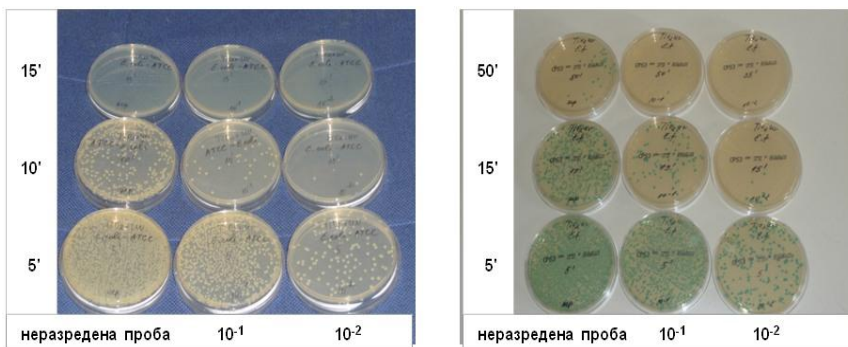
На **Табл.4** са представени данни за микробното число на фотокаталитично третирани референтни щамове. При въздействие върху *E.coli* ATCC 25922 с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи на 15^{-та} min редукиционният индекс е 100%. При останалите щамове също е налице изразен антибактериален ефект, но след по-продължителна експозиция, съответно: 20 min – при *P.aeruginosa* ATCC 27853, 30 min – при *S.aureus* ATCC 25923 и 50 min – при *E.faecalis* ATCC 29212. Следователно, фотокаталитичната чувствителност на тестваните референтни щамове може да бъде представена в следната последователност:

E.coli > *P.aeruginosa* > *S.aureus* > *E.faecalis*.

Табл.4 Сравнителни данни за преживяемостта на референтни щамове при третиране с TiO_2 и UV-A лъчи

Референтен щам	Колич. на бакт. клетки в изходната суспензия (CFU/mL)	Интервали за вземане на проби за посявка (min)	Третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи		
			Време на експозиция (min)	Колич. на бакт. клетки (CFU/mL)	Редукц. индекс (%)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	186 750	5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60'	15'	0	100
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	242 000	5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60'	20'	200	99.92
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	148 000	5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60'	30'	500	99.66
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	436 000	5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60'	50'	170	99.96

На **Фиг.8** е показан бактериалният растеж при фотокаталитично третирани референтни щамове *E.coli* и *E.faecalis*. И при двата щамове на 5^{-та} min от експозицията колонииите от неразредените проби и разреждане 10^{-1} са неброими, а от 10^{-2} те са около 100 на брой, което съответства на микробно число 10^5 CFU/mL. След 5^{-та} min количеството на колонииите започва да намалява, но времето за постигане на сигнификантна редукия е различно. При *E.coli* на 15^{-та} min липсва бактериален растеж във всички проби, докато при *E.faecalis* значителна редукия на колонииобразуващите единици се наблюдава едва на 50^{-та} min.



(a) *E. coli* ATCC 25922 върху MXA (b) *E. faecalis* ATCC 29212 върху CPS

Фиг. 8 Колонии на *E. coli* ATCC 25922 и *E. faecalis* ATCC 29212 при третиране с 1 mg/mL TiO₂ и UV-A лъчи

За да се характеризира остатъчният ефект от експерименталните въздействия, суспензиите на референтните щамове бяха съхранявани в тъмни условия при 37°C за 24 часа. След този период, проби от тях бяха рекултивирани върху твърди хранителни среди. Рекултивираните суспензии, самостоятелно облъчени с UV-A лъчи или третирани с TiO₂ на тъмно, показаха микробно число по-голямо от 10⁵ CFU/mL, а третираните едновременно с TiO₂ и UV-A лъчи не показаха бактериален растеж.

Нашите резултати потвърждават становището, че антимикробното действие на TiO₂ се изявява само при облъчване със светлинни лъчи. Доказано е, че ултравиолетовите лъчи активират молекулата на оксида и водят до образуване на високореактивни кислородни частици: $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H₂O₂ и други [Ireland, 1993; Kikuchi, 1997; Cho, 2004; Banerjee, 2006]. Образуваните ROS атакуват бактериалната клетка по оксидативен механизъм, като предизвикват липидна пероксидация на мембранните структури и инхибират някои вътреклетъчни компоненти, основно коензим А [Matsunaga, 1985; Maness, 1999; Sunada, 2003; Kiwi, 2004]. Резултатът е изтичане на клетъчно съдържимо и клетъчна смърт, а впоследствие пълна минерализация на клетъчните структури.

Установените от нас различия във фотокаталитичната чувствителност на отделните видове референтни бактерии са в съответствие с данните от други публикации [Kühn, 2003; Chung, 2009; Gomes, 2009]. Хипотезата за различен тип увреждания при Грам-положителните и Грам-отрицателните бактерии е широко дискутирана в областта на фотокаталитичните изследвания.

Според някои автори, Грам-положителните бактерии са по-устойчиви на TiO_2 фотокатализа поради по-дебелата клетъчна стена и съответно по-големия брой ROS необходими за нейното разрушаване. Други автори считат, че Грам-отрицателните бактерии са фотокаталитично по-устойчиви и това се дължи на по-сложно устроената клетъчна стена, на различия в химичния състав и механизмите за защита. От друга страна е налице становище, според което не се откриват съществени различия във фотокаталитичната чувствителност при двете групи бактерии. В специализираната литература са налице различни обяснения за механизма на действие на TiO_2 върху бактериите, някои от които доста противоречиви. Специфичните условия, в които са проведени експериментите и ограничения брой проучени щамове са вероятната причина за разнопосочните становища. За да се характеризира фотокаталитичната чувствителност на Грам-положителните и Грам-отрицателните бактерии е необходимо да се тестват голям брой щамове от различни таксономични групи в рамките на унифицирана опитна постановка.

В обобщение:

- Новосинтезираният наноразмерен TiO_2 , в концентрация 1 mg/mL, оказва бактерицидно действие върху Грам-положителни и Грам-отрицателни референтни бактерии само в присъствие на UV-A лъчи.
- Самостоятелното облъчване с UV-A лъчи не оказва бактерициден ефект върху Грам-положителни и Грам-отрицателни референтни бактерии.
- Резултатите от проучването на активността на TiO_2 върху референтни бактериални щамове са основа за разработване на протокол за изпитване на фотокаталитичната антибактериална активност на TiO_2 върху Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни неспорообразуващи бактерии.

3. ПРОУЧВАНЕ НА ФОТОКАТАЛИТИЧНАТА АКТИВНОСТ НА ТИТАНОВ ОКСИД ВЪРХУ ШИРОК СПЕКТЪР ОТ КЛИНИЧНИ БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ

Фотокаталитичната активност на новосинтезирания наноразмерен TiO_2 беше проучена върху 40 чувствителни и резистентни към антибиотици клинични бактериални изолата. Клиничните изолати на аеробните неспорообразуващи бактерии бяха третирани с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи за 60 min, а изолата на *B. subtilis* – при същите условия за 90 min.

3.1. ФОТОКАТАЛИТИЧНА АКТИВНОСТ НА TiO₂ ВЪРХУ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ ОТ СЕМ. *ENTEROBACTERIACEAE*

Резултатите за фотокаталитичната активност на TiO₂ върху клинични изолати на *E.coli* показват, че при средни стойности на началното микробно число $1,78 \times 10^5 \pm 7,8 \times 10^4$ CFU/mL до 30^{-та} min на експозицията са унищожени между 96.39% и 99.99% от бактериалните клетки.

Най-чувствителен към TiO₂ е ESBLs продуциращия щам №4, с 99.99% редукиционен индекс за 10 min. Щам №6, продуцент на NDM, е с много добра фотокаталитична чувствителност и 99.94% редукиционен индекс за 10 min. Най-резистентен към TiO₂ е ESBLs продуциращия щам №3, при който едва на 30^{-та} min загиват 99.89% от бактериалните клетки, а след 24 часа съхранение на суспензията в тъмни условия са отчетени 20 CFU/mL (99.987% краен редукиционен индекс). Другите фотокаталитично третирани суспензии са без бактериален растеж след рекултивиране, т.е. количеството на колониите е под "detection limit" (< 5 CFU/mL).

Табл.5 Фотокаталитична активност на TiO₂ върху клинични изолати на *E.coli*

<i>E.coli</i>	Чувствителност към антибиотици	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Тетриране с 1 mg/mL TiO ₂ и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
			време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
Щам №1	чувствителен	124 250	20'	4 490	96.39	< 5
Щам №2	чувствителен	194 500	15'	250	99.87	< 5
Щам №3	ESBLs продуцент	149 250	30'	170	99.89	20
Щам №4	ESBLs продуцент	159 000	10'	10	99.99	< 5
Щам №5	ESBLs продуцент	255 500	15'	1 210	99.53	< 5
Щам №6	NDM продуцент	185 000	10'	105	99.94	< 5

Получените от нас резултати са близки до тези от други проучвания, проведени при сходни експериментални условия. По данни на Huang et al., 2000, при въздействие с 1 mg/mL TiO₂ (Degussa P-25) върху *E.coli* суспензия с гъстота 10⁶ CFU/mL, 96% от клетките загубват своята жизнеспособност за 30 min, а в рамките на 60 min загиват всички бактериални клетки.

При тестването на други видове от сем. *Enterobacteriaceae* се установи, че до 40^{-та} min на фотокаталитичното въздействие се редуцират от 99.12% до 100% от бактериалните клетки (**Табл. 6**).

Табл. 6 Фотокаталитична активност на TiO₂ върху клинични изолати от сем. *Enterobacteriaceae*

Бактериален щам	Чувствителност към антибиотици	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL TiO ₂ и UV-A лъчи			Остагъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
			време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
№7 <i>K.pneumoniae</i>	чувствителен	157 000	10'	40	99.97	< 5
№8 <i>K.pneumoniae</i>	ESBLs продуцент	144 500	15'	60	99.96	20
№9 <i>K.pneumoniae</i>	KPC продуцент	112 500	40'	100	99.91	10
№10 <i>E.cloacae</i>	чувствителен	161 250	20'	0	100	< 5
№11 <i>E.cloacae</i>	ESBLs продуцент	191 000	40'	30	99.98	40
№12 <i>E.cloacae</i>	Amp C продуцент	251 250	20'	215	99.91	< 5
№13 <i>E.aerogenes</i>	чувствителен	237 250	10'	100	99.96	< 5
№14 <i>S.marcescens</i>	чувствителен	246 500	40'	2 166	99.12	90
№15 <i>S.marcescens</i>	ESBLs продуцент	442 000	30'	240	99.95	30
№16 <i>S.marcescens</i>	ESBLs продуцент	239 250	15'	20	99.99	< 5
№17 <i>C.freundii</i>	чувствителен	149 000	25'	100	99.93	< 5
№18 <i>C.freundii</i>	ESBLs продуцент	197 500	20'	270	99.86	< 5
№19 <i>P.mirabilis</i>	чувствителен	350 500	10'	403	99.89	< 5
№20 <i>P.mirabilis</i>	ESBLs продуцент	356 500	10'	20	99.99	< 5

Систематизирани по видове бактерии, данните са следните:

- Два от клиничните изолати на *K.pneumoniae* – щам №7 (чувствителен към антибиотици) и щам №8 (продуцент на ESBLs), показват изключително добра фотокаталитична чувствителност. След рекултивиране, третираната суспензия на Щам №7 е без бактериален растеж (< 5 CFU/mL), а при щам №8 са отчетени 20 CFU/mL (99.986% краен редуциционен индекс). *K.pneumoniae* щам №9, (продуцент на KPC) е сравнително устойчив на фотокаталитично въздействие с TiO₂. Налице е 99.91% редукция на клетките за 40 min и 10 CFU/mL след рекултивиране (99.991% краен редуциционен индекс).

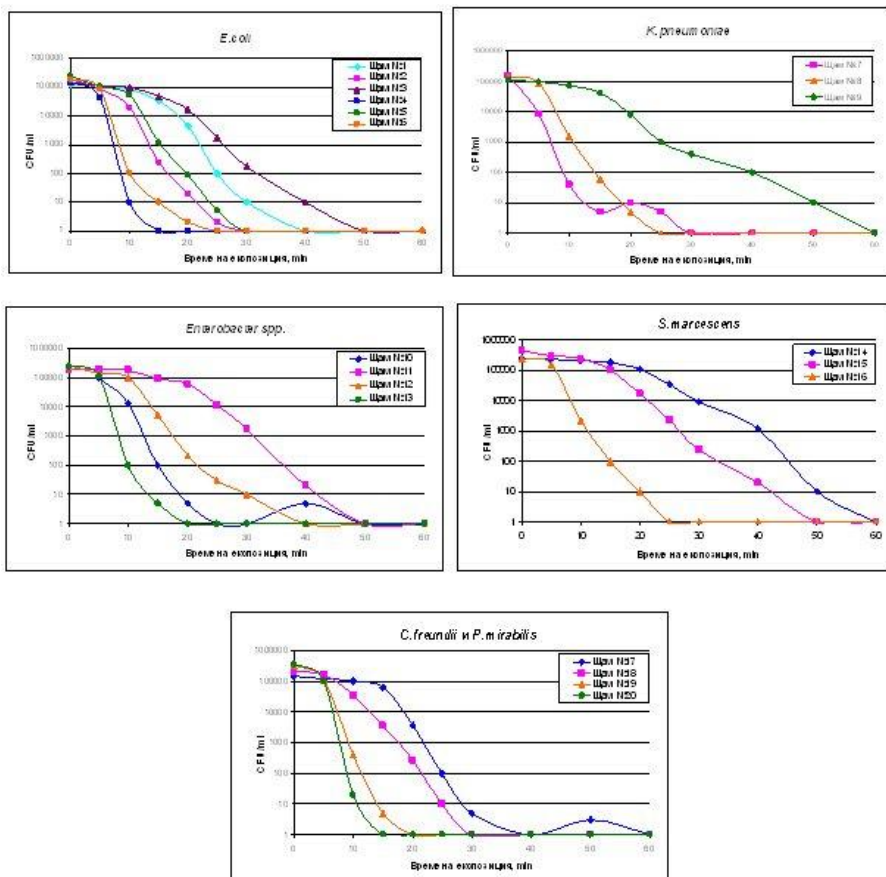
- Представителите на *Enterobacter* и *Citrobacter* показват добра фотокаталитична чувствителност към TiO_2 . При повечето от тях ефективното време на въздействие варира между 10 и 25 min.

- При изолатите на *S.marcescens* се наблюдават различия във фотокаталитичната чувствителност. Най-чувствителен е щам №16 (продуцент на ESBLs), при който 99.99% от клетките загиват за 15 min. Най-резистентен към TiO_2 е щам №14 (чувствителен към антибиотици), при който сигнификантна редукция на бактериалните клетки (99.12%) се достига за 40 min, а след рекултивиране са открити 90 CFU/mL (99.963% краен редукционен индекс).

- Клиничните изолати на *P.mirabilis* (1 чувствителен към антибиотици и 1 продуцент на ESBLs) показват изразена фотокаталитична чувствителност към TiO_2 . При равен начален брой колонииобразуващи единици ($3,5 \times 10^5$ CFU/mL) за 10 min загиват съответно 99.89% и 99.99% от бактериалните клетки.

На **Фиг.9** е представена кинетиката на фотокаталитичния процес при тестваните клинични щамове ентеробактерии. Наблюдава се намаление на колонииобразуващите единици с $5 \log_{10}$ и снижаване под границата на експерименталното откриване. Кинетичните криви на *E.coli* (щамове №1 – № 6) са сходни по между си и наподобяват криви от първи порядък. Кривите на щамове №7, №8, №10, №12, №13, №16, №18, №19 и №20 също се доближават до първи кинетичен порядък, а тези на №9, №11, №14, №15 и №17 са с по-сложна характеристика. При щамове №7, №10 и №17 се наблюдава т.нар. опашка, изразяваща се в поява на единични колонии в края на експозицията. Фотокаталитичната чувствителност на различните видове от сем. *Enterobacteriaceae* е подобна на *E.coli*, което вероятно се дължи на общия модел на изграждане на клетъчната стена.

От изключителен интерес е въпроса за активността на титановия оксид срещу резистентни към антибиотици бактерии. Данните за фотокаталитичния отговор при ентеробактериите показват, че всички продуценти на широкоспектърни β -лактамази загиват по време на 60 min третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи, въпреки различната скорост на фотокаталитичния процес. При щамове №4, №5, №8, №12, №16, №18, №20 над 99% редукционен индекс се достига за период от 10 до 20 min, а при №3, №11, №15 – съответно за 30 до 40 min. При карбапенемази продуциращите щамове *E.coli* №6 и *K.pneumoniae* №9 сигнификантна редукция на бактериалните клетки се наблюдава съответно на 10^{-7} и 40^{-7} min от експозицията. Подобни вариации в скоростта на фотокаталитичната реакция се срещат и при чувствителните към антибиотици изолати.



Фиг.9 Криви на убиване на ентеробактерии при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO₂

Преобладаваща част от публикациите за антибактериалната активност на TiO₂ са свързани с *E.coli*. Информацията за други видове ентеробактерии е оскъдна. Ibáñez et al., 2003 установяват, че над 99.9% от клетките на *E.coli* K-12 и *E.cloacae* 29C/M-A4 загиват след 40 min третиране с 0,1 g/l Degussa P-25 и UV-A лъчи, като при *E.coli* coloniите намаляват с 5 log₁₀, а при *E.cloacae* - съответно с 4 log₁₀. Block et al., 1998 съобщават, че при третиране на 10³ CFU/mL бактериални суспензии с 0,01% Degussa P-25 и UV-A лъчи, 100% от клетките на *S.marcescens* губят своята жизнеспособност за 8 min, на *E.coli* - за 7 min, а на *S.aureus* – за 10 min. Тези данни сочат, че времето за инактивиране зависи от изходното количество на бактериите и специфичните експериментални условия.

3.1. ФОТОКАТАЛИТИЧНА АКТИВНОСТ НА TiO₂ ВЪРХУ НФГБ

Резултатите от фотокаталитичните изследвания на НФГБ са представени на **Табл.7**. При изходна гъстота на *P.aeruginosa* $2,67 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ CFU/mL редуционният индекс до 30^{-та} min на експозицията е между 99.40% и 99.95%. При другите НФГБ времето за сигнификантна редукция на колонии варира между 10 и 25 min, с изключение на *S.maltophilia*, където то е 50 min.

Не се откриват съществени различия във фотокаталитичния отговор при чувствителните и резистентните към антибиотици НФГБ. Най-чувствителен към TiO₂-медирана фотокатализа е множествоно резистентният *A.baumannii* щам №25, с редуционен индекс 99.94% за 10 min, а най-устойчив – множествоно резистентният *S.maltophilia*, при който почти същият редуционен индекс се достига за 50 min. Резистентността на *S.maltophilia* към фотокатализа се свързва с ниския афинитет на TiO₂ молекулата към O антигените на този бактерий [Jucker, 1997].

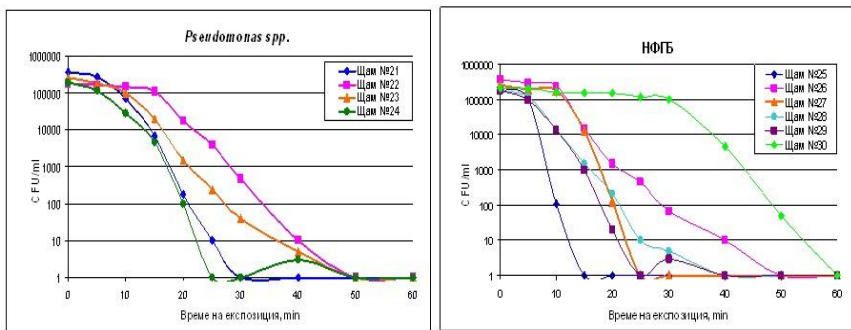
Табл.7 Фотокаталитична активност на TiO₂ върху клинични изолати от групата на НФГБ

Бактериален щам	Чувствит. към антибиотици	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL TiO ₂ и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
			време	CFU/mL	Редуци. индекс (%)	
№21 <i>P.aeruginosa</i>	чувствителен	367 250	20'	180	99.95	< 5
№22 <i>P.aeruginosa</i>	чувствителен	184 500	30'	480	99.74	80
№23 <i>P.aeruginosa</i>	множествоно резистентен	250 500	20'	1500	99.40	40
№24 <i>P.fluorescens</i>	чувствителен	185 500	20'	100	99.95	< 5
№25 <i>A.baumannii</i>	множествоно резистентен	192 750	10'	110	99.94	< 5
№26 <i>A.baumannii</i>	множествоно резистентен	366 200	25'	470	99.87	< 5
№27 <i>A.haemolyticus</i>	чувствителен	256 100	20'	130	99.95	< 5
№28 <i>C.indologenes</i>	чувствителен	188 250	20'	210	99.89	< 5
№29 <i>M.odoratus</i>	множествоно резистентен	185 250	20'	20	99.99	< 5
№30 <i>S.maltophilia</i>	множествоно резистентен	211 250	50'	50	99.98	< 5

Някои сравнителни проучвания показват, че *P.aeruginosa* е по-устойчив към TiO₂ фотокатализа, в сравнение с *E.coli*. Според данни на аржентински автори, след 40 min фотокаталитично третиране с Degussa P-25 колонии на *P.aeruginosa* ATCC 27853 намаляват с 3 log₁₀, а тези на *E.coli* K-12 – с 5 log₁₀ [Ibáñez, 2003]. Други автори публикуват противоположни резултати [Desai, 2009].

Налице са ограничен брой публикации за действието на TiO_2 върху НФГБ, различни от *P.aeruginosa*. Cohen-Yaniv et al., 2008 съобщават, че *Flavobacterium Spp.* загива по-бързо при фотокаталитично въздействие с TiO_2 , отколкото *E.coli*. Обяснението на този феномен се свързва с по-силната хидрофобност на *Flavobacterium Spp.*, която улеснява взаимодействието на оксида с клетъчната повърхност.

Кинетиката на фотокаталитичния процес при НФГБ е показана на **Фиг.10**. При щамове *Pseudomonas spp.* се наблюдава намаление на колонии с $5 \log_{10}$ за период от 25 до 50 min. Като цяло, графичните криви са сходни и се доближават до кинетика от първи порядък. Най-бърза е фотокаталитичната реакция при *P.fluorescens*, но с наличие на остатъчни колонии в края на експозицията. При другите представители на НФГБ редукция на колонии с $5 \log_{10}$ се осъществява в по-широк интервал от време – между 15^{-та} и 60^{-та} min на експозицията.



Фиг. 10 Криви на убиване на НФГБ при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO_2

Наблюдава се голямо разнообразие във вида на кинетичните криви. Някои се доближават до първи кинетичен порядък (щамове №25, №27), други са подобни на кинетика от първи порядък, но имат по-сложна характеристика (щамове №26 и №28) или опашка (щам №29). Кривата на щам №30 е с комбиниран кинетичен профил.

Тези графични резултати позволяват да се проследи динамиката на фотокаталитичния процес и са доказателство за бактерицидното действие на новосинтезирания наноразмерен TiO_2 върху *P.aeruginosa* и други видове НФГБ.

3.2. ФОТОКАТАЛИТИЧНА АКТИВНОСТ НА TiO₂ ВЪРХУ ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛНИ БАКТЕРИИ

Резултатите от фотокаталитичните изследвания на Грам-положителните бактерии показват, че над 99% от бактериалните клетки загиват по време на 60 min фотокаталитично въздействие с 1 mg/mL от новосинтезирания наноразмерен TiO₂ (Табл.8).

Данните за клиничните стафилококови изолати са близки помежду си. При начална гъстота на суспензията 1,20×10⁵ CFU/mL – 9,91×10⁵ CFU/mL до 30^{-та} min на експозицията са редуцирани средно 99.95 ± 0.05% от бактериалните клетки. След рекултивиране, при *S.saprophyticus* са налични 20 CFU/mL (99.992% краен редукиционен индекс), докато при другите стафилококови изолати липсва бактериален растеж (< 5 CFU/mL). При ентерококите началният брой на колонии варира от 7,70×10⁴ CFU/mL до 9,90×10⁵ CFU/mL, като между 25^{-та} и 30^{-та} min сумарният редукиционен индекс е 99.62 ± 0.57%.

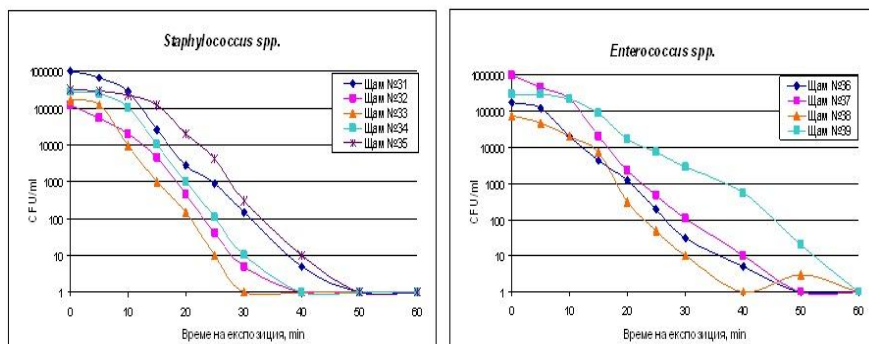
Табл.8 Фотокаталитична активност на TiO₂ върху клинични изолати на Грам-положителни бактерии

Бактериален щам	Чувствителност към антибиотици.	Колич. на бкт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL TiO ₂ и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
			време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
№31 <i>S.aureus</i>	метицилин чувствителен	990 750	30'	150	99.98	< 5
№32 <i>S.aureus</i>	метицилин резистентен	120 000	30'	0	100	< 5
№33 <i>S.epidermidis</i>	метицилин резистентен	161 500	20'	150	99.91	< 5
№34 <i>S.saprophyticus</i>	метицилин чувствителен	273 500	25'	110	99.96	20
№35 <i>S.lugdunensis</i>	метицилин чувствителен	320 000	30'	300	99.91	< 5
№36 <i>E.faecalis</i>	ванкомицин чувствителен	175 000	25'	200	99.86	30
№37 <i>E.faecalis</i>	ванкомицин чувствителен	990 000	30'	110	99.99	< 5
№38 <i>E.faecium</i>	ванкомицин чувствителен	77 000	30'	320	99.58	40
№39 <i>E.faecium</i>	ванкомицин резистентен	299 750	30'	2850	99.05	20
№40 <i>B.subtilis</i>	чувствителен	16 580	60'	160	99.03	60

В групата на Грам-положителните коки са налице вариации в скоростта на фотокаталитичната реакция, но въпреки това метицилин резистентните стафилококи и ванкомицин резистентните ентерококи са податливи на TiO₂ фотокатализа.

За 30 min клетките на метицилин чувствителния *S.aureus* (щам №31) се редуцират с 99.98%, а тези на метицилин резистентния *S.aureus* (щам №32) – със 100%. На 30^{-та} min от експозицията редукиционният индекс при ванкомицин чувствителния *E.faecium* е 99.58%, а при ванкомицин резистентния – съответно 99.05%. До края на 60^{-та} min количеството на колонии при двата щаме спада под “detection limit” (< 5 CFU/mL). Тези данни ни дават основание да считаме, че във фотокаталитични условия TiO₂ атакува както ванкомицин чувствителните, така и ванкомицин резистентните ентерококи.

Кинетиката на фотокаталитичния процес при тестваните Грам-положителни коки е представена на **Фиг.11**. Налице е намаление на колониобразуващите едининци с 5 log₁₀ в следния интервал от време: 30 – 50 min за стафилококите и 40 – 60 min за ентерококите. Като цяло, графичните криви са сходни и съответстват на първи кинетичен профил. При *E.faecium* щам №38 фотокаталитичната реакция е по-бърза, но с наличие на остатъчни колонии в края на експозицията.

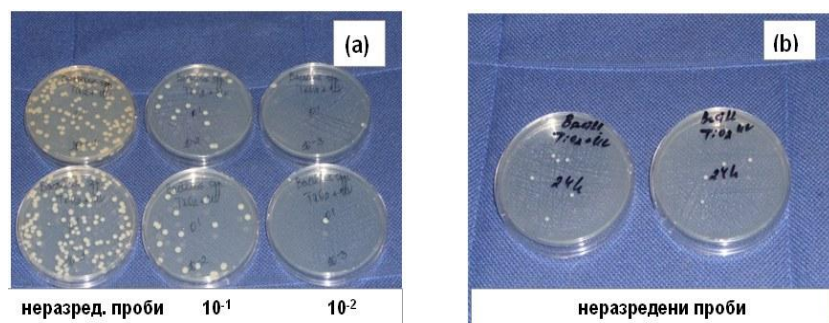


Фиг.11 Криви на убиване на Грам-положителни коки при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO₂

Ефективността на TiO₂ фотокаталитичния процес срещу представители на Грам-положителните коки е обект на редица публикации. Най-често се сравнява фотокаталитичната чувствителност на еталонния бактерия *E.coli* със *S.aureus*, *E.faecalis* и *E.faecium*. Kühn et al., 2003 наблюдават, че след 60 min фотокаталитично третиране с TiO₂ колонии на *E.coli* спадат от 10⁷ CFU/mL до < 5 CFU/mL, на *S.aureus* – от 10⁵ CFU/mL до < 5 CFU/mL, а на *E.faecium* – от 10⁷ CFU/mL до 10⁴ CFU/mL. Тези данни сочат по-силна фотокаталитична чувствителност на *S.aureus*, в сравнение с *E.faecium*, и по-слаба, в сравнение с *E.coli*.

Luo et al. (2008) установяват, че ентерококите са фотокаталитично по-резистентни от *E.coli*, но по-чувствителни от *P.aeruginosa*. Според други автори, *E.coli* и *E.faecalis* показват сходна фотокаталитична чувствителност [Grieken, 2010]. Библиографските данни в областта на фотокатализата не позволяват сравнителен анализ на абсолютните стойности, поради различия в опитните постановки по отношение на проучваните щамове, вида на фотокатализатора, светлинните източници и другите условия.

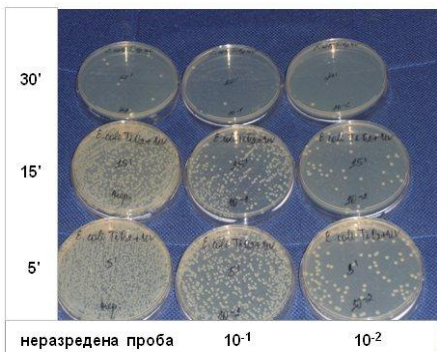
Интерес представляват резултатите за *B.subtilis*. По време на фотокаталитичното третиране с TiO_2 броят на колонии спада само с $2 \log_{10}$ до $60^{\text{та}} \text{ min}$ (от $1,66 \times 10^4$ до $1,60 \times 10^2$ CFU/mL) и с още $1 \log_{10}$ до края на $90^{\text{та}} \text{ min}$, достигайки микробно число 5×10^1 CFU/mL.



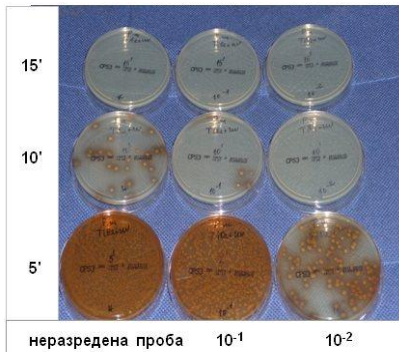
Фиг. 12 Колонии на *B.subtilis* върху МХА: (а) изходна суспензия (б) рекултивирана, TiO_2 фотокаталитично третирана суспензия

На **Фиг. 12** са представени посявки на *B.subtilis* от изходната суспензия и от фотокаталитично третираната с TiO_2 суспензия. Броят на колонии от изходната суспензия е трицифрено число в неразредените проби, двуцифрено число в разреждане 10^{-1} и единични колонии в разреждане 10^{-2} (м.ч.= $1,66 \times 10^4$ CFU/mL). След рекултивиране на фотокаталитично третираната суспензия, броят на колонии е средноаритметично 6 (м.ч.= 60 CFU/mL). Тези данни определят краен редуциционен индекс 99.638%.

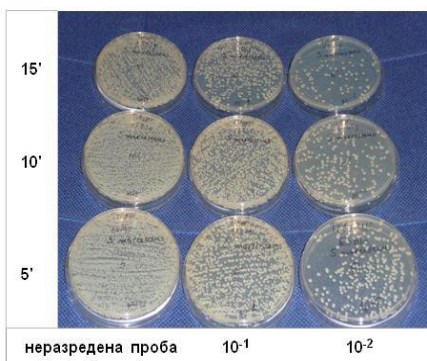
Налице са значителни различия между фотокаталитичната чувствителност на Грам-положителните коки и Грам-положителните спорообразуващи бактерии. За 60 min колонии на Грам-положителните коки се редуцират с $5 \log_{10}$, а тези на *B.subtilis* – само с $2 \log_{10}$. Нашите данни са в съответствие с очакванията за по-високата фотокаталитична устойчивост на спорообразуващите бактерии, в сравнение с другите видове бактерии.



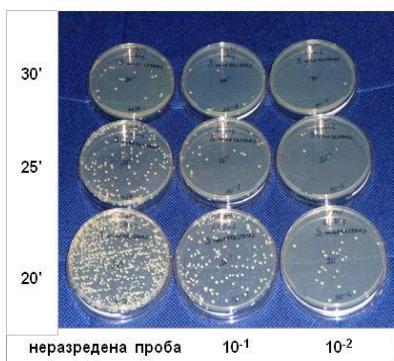
(a) *E.coli* щам №3 върху MXA.



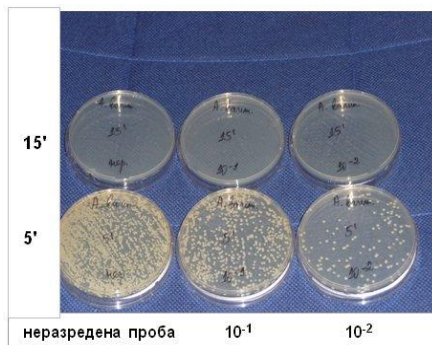
(b) *P.mirabilis* щам №19 върху CPS



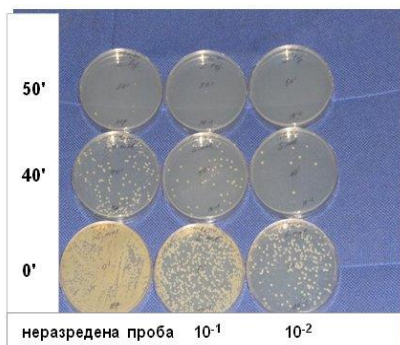
(c) *S.marcescens* щам №15 върху MXA



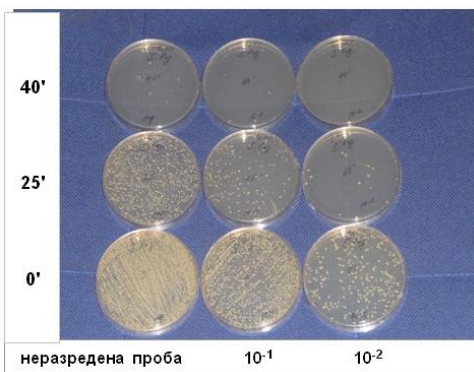
e) *S.maltophilia* върху MXA



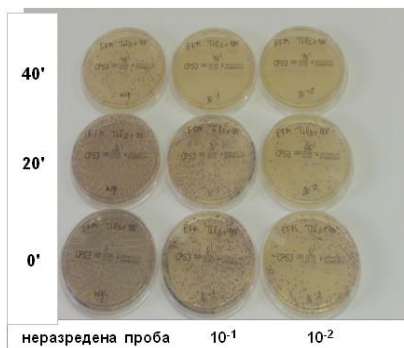
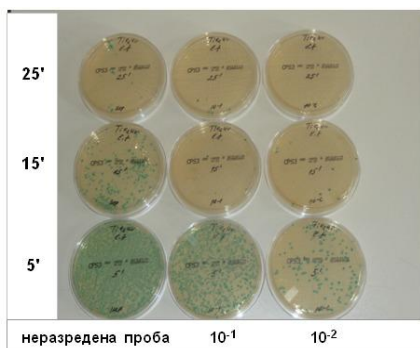
(d) *A.baumannii* щам №25 върху MXA



Фиг.13 Колонии на Грам-отрицателни бактерии при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO₂



a) *S.lugdunensis* щам №35 върху MXA



(b) *E.faecalis* щам №36 върху CPS (c) *E.faecium* щам №39 върху CPS

Фиг.14 Колонии на Грам-положителни бактерии при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO_2

На **Фиг.13** и **Фиг.14** е илюстриран бактериалният растеж на Грам-отрицателни и Грам-положителни неспоробразуващи аеробни бактерии при третиране с 1 mg/mL новосинтезиран наноразмерен TiO_2 и UV-A лъчи. Представените бактериални култури показват значителна редукция на бактериалния растеж по време на фотокаталитичното въздействие. От сигнификантни стойности в началото на експозицията (0 – 5 min), броят на колониите спада почти до нула между 15^{-та} и 50^{-та} min на експозицията.

3.4. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИТЕ ДАННИ

Статистическият анализ на експерименталните данни целеше: (1) да оцени зависимостта между CFU/mL и времето на експозиция при всеки отделен щам и (2) да установи дали е налице връзка между CFU/mL и времето от една страна, и вида на щама или групата бактерии - от друга.

Във връзка със статистическия анализ експерименталните данни бяха разпределени по групи бактерии: група I – 6 щама *E.coli*; група II – други 14 щама от сем. *Enterobacteriaceae*; група III – 10 щама НФГБ и група IV – 9 щама Грам-положителни коки. Данните за *B.subtilis* не бяха включени в статистическата обработка, тъй като този изолат е единствен представител на аеробните спорообразуващи бактерии.

Първоначално всички данни бяха логаритмувани и проверени за нормалността на разпределението на анализирания променливи чрез теста на Kolmogorov-Smirnov и теста на Shapiro-Wilk. Проверката показва нормално разпределение на стойностите на \log CFU/mL при всеки отделен щам и по групи бактерии. Стойностите на \log CFU/mL и времето бяха анализирани чрез Линеен регресионен анализ. Паралелно, всички данни бяха обработени статистически с два по-сложни метода: Обобщен линеен модел с повтарящи се измервания (General linear model with repeated measures) и Смесен линеен модел (Mixed linear model). Тези модели са подходящи за комплексна оценка на зависимостта между \log CFU/mL и времето от една страна, и вида на щама или групата бактерии – от друга. Смесеният линеен модел е по-общ и се прилага в случаите, когато липсват част от данните. Например, в нашето проучване е определен броя на CFU (респективно \log CFU) на 0^{-та}, 5^{-та}, 10^{-та}, 15^{-та}, 20^{-та}, 25^{-та}, 30^{-та}, 40^{-та}, 50^{-та} и 60^{-та} min, но не е известен броя на CFU на 35^{-та}, 45^{-та} и 55^{-та} min, което наложи използването на Mixed linear model.

Резултатите от статистическата обработка на експерименталните данни са представени на **Табл.9, 10, 11 и 12**. Те показват линейните регресионни уравнения, стойностите на началния коефициент (β), регресионния коефициент (α), корелационните коефициенти (r и r^2) и нивото на значимост (p). Регресионните уравнения се базират на формулата: $y = \beta + \alpha \cdot x$, където β отразява изходното ниво на \log CFU₀, α съответства на скоростта на убиване на бактериите, а x е времето на експозицията в минути.

Табл.9 Регресионен анализ на експерименталните данни при клиничните изолати на *E.coli* (група I)

Щам №	Регресионно уравнение	Начален коефици. (β)	Регрес. коефици. (α)	Корелационни коефициенти		Ниво на значимост (p)
				(r)	(r ²)	
1.	$y = 5,9041 - 0,1447 * x$	5,9041	- 0,1447	- 0,9584	0,9186	0,0002
2.	$y = 5,2002 - 0,1592 * x$	5,2002	- 0,1592	- 0,9443;	0,8918	0,0004
3.	$y = 5,6740 - 0,0984 * x$	5,6740	- 0,0984	- 0,9802	0,9608	0,00000
4.	$y = 5,3082 - 0,3704 * x$	5,3082	- 0,3704	- 0,9815	0,9634	0,0185
5.	$y = 5,9550 - 0,1977 * x$	5,9550	- 0,1977	- 0,9822	0,9647	0,00008
6.	$y = 5,1657 - 0,2237 * x$	5,1657	- 0,2237	- 0,9465	0,8958	0,0042

Табл.10 Регресионен анализ на експерименталните данни при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* (група II)

Щам №	Регресионно уравнение	Начален коефици. (β)	Регрес. коефици. (α)	Корелационни коефициенти		Ниво на значимост (p)
				(r)	(r ²)	
7.	$y = 4,3016 - 0,1618 * x$	4,3016	- 0,1618	- 0,9050	0,8191	0,0051
8.	$y = 5,4746 - 0,2279 * x$	5,4746	- 0,2279	- 0,9866	0,9734	0,0003
9.	$y = 5,4879 - 0,0898 * x$	5,4879	- 0,0898	- 0,9886	0,9773	0,00000
10.	$y = 4,4434 - 0,1143 * x$	4,4434	- 0,1143	- 0,8476	0,7185	0,0039
11.	$y = 6,2042 - 0,1117 * x$	6,2042	- 0,1117	- 0,9496	0,9017	0,00009
12.	$y = 5,7763 - 0,1530 * x$	5,7763	- 0,1530	- 0,9786	0,9577	0,00002
13.	$y = 5,6370 - 0,3016 * x$	5,6370	- 0,3016	- 0,9667	0,9345	0,0073
14.	$y = 6,3073 - 0,0946 * x$	6,3073	- 0,0946	- 0,9520;	0,9064	0,00002
15.	$y = 6,2854 - 0,1219 * x$	6,2854	- 0,1219	- 0,9827	0,9657	0,00000
16.	$y = 5,7289 - 0,2330 * x$	5,7289	- 0,2330	- 0,9882	0,9764	0,0002
17.	$y = 5,6741 - 0,1243 * x$	5,6741	- 0,1243	- 0,9306	0,8661	0,0003
18.	$y = 5,9814 - 0,1889 * x$	5,9814	- 0,1889	- 0,9789;	0,9583	0,0001
19.	$y = 5,8638 - 0,3086 * x$	5,8638	- 0,3086	- 0,9790	0,9584	0,0036
20.	$y = 6,0234 - 0,4074 * x$	6,0234	- 0,4074	- 0,9611	0,9238	0,0389

Табл.11 Регресионен анализ на експерименталните данни при клиничните изолати от групата на НФГБ (група III)

Щам №	Регресионно уравнение	Начален коефици. (β)	Регрес. коефици. (α)	Корелационни коефициенти		Ниво на значимост (p)
				(r)	(r^2)	
21.	$y = 6,2871 - 0,2009 \cdot x$	6,2871	- 0,2009	- 0,9778	0,9560	0,0001
22.	$y = 6,0897 - 0,1159 \cdot x$	6,0897	- 0,1159	- 0,9674	0,9359	0,00002
23.	$y = 5,7383 - 0,1222 \cdot x$	5,7383	- 0,1222	- 0,9846	0,9695	0,00000
24.	$y = 5,0377 - 0,1253 \cdot x$	5,0377	- 0,1253	- 0,8946	0,8003	0,0011
25.	$y = 5,5892 - 0,3119 \cdot x$	5,5892	- 0,3119	- 0,9520	0,9062	0,0126
26.	$y = 5,9303 - 0,1234 \cdot x$	5,9303	- 0,1234	- 0,9854	0,9710	0,00000
27.	$y = 6,3951 - 0,2157 \cdot x$	6,3951	- 0,2157	- 0,9156	0,8382	0,0104
28.	$y = 5,4300 - 0,1497 \cdot x$	5,43 -	- 0,1497	- 0,9809	0,9622	0,00002
29.	$y = 5,2458 - 0,1571 \cdot x$	5,2458	- 0,1571	- 0,9410	0,8856	0,0005
30.	$y = 6,3346 - 0,0847 \cdot x$	6,3346	- 0,0847	0,8939	0,7990	0,0005

Табл.12 Регресионен анализ на експерименталните данни при клиничните изолати на Грам-положителните коки (група IV)

Щам №	Регресионно уравнение	Начален коефици. (β)	Регрес. коефици. (α)	Корелационни коефициенти		Ниво на значимост (p)
				(r)	(r^2)	
31.	$y = 6,3089 - 0,1325 \cdot x$	6,3089	- 0,1325	- 0,9919	0,9839	0,00000
32.	$y = 5,3975 - 0,1412 \cdot x$	5,3975	- 0,1412	- 0,9863	0,9728	0,00001
33.	$y = 5,6641 - 0,1828 \cdot x$	5,6641	- 0,1828	- 0,9912	0,9826	0,00001
34.	$y = 6,0097 - 0,1531 \cdot x$	6,0097	- 0,1531	- 0,9846	0,9695	0,00001
35.	$y = 6,2887 - 0,1221 \cdot x$	6,2887	- 0,1221	- 0,9744	0,9494	0,00001
36.	$y = 5,3374 - 0,1139 \cdot x$	5,3374	- 0,1139	- 0,9915	0,9830	0,00000
37.	$y = 6,1673 - 0,1294 \cdot x$	6,1673	- 0,1294	- 0,9931	0,9851	0,00001
38.	$y = 4,7317 - 0,0938 \cdot x$	4,7317	- 0,0938	- 0,9388	0,8813	0,00006
39.	$y = 6,0666 - 0,0935 \cdot x$	6,0666	- 0,0935	- 0,9849	0,9701	0,00000

Статистическите данни се характеризират с високи корелационни коефициенти r^2 ($> 0,5$) и ниски стойности на p ($< 0,05$), което е израз на силната отрицателна корелация между \log CFU/mL и времето. При всеки отделен щам \log CFU/mL намалява линейно с времето, като тази закономерност е с много висока корелация ($0,9851 > r^2 > 0,7185$) и сигнификантна статистическа вероятност ($0,00000 < p < 0,0389$). Груповите данни (**Табл.13**) също показват линейна регресионна зависимост между \log CFU/mL и времето на експозиция ($0,0000 < p < 0,0002$).

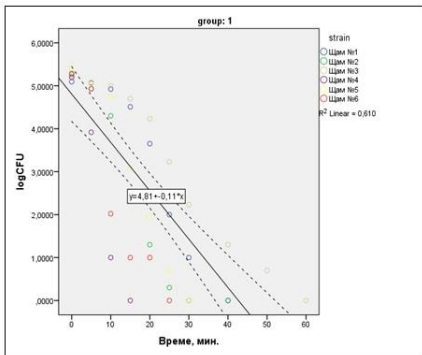
Табл.13 Регресионен анализ на експерименталните данни по групи бактерии

Група	Регресионно уравнение	Начален коефици. (β)	Регрес. коефици. (α)	Корелационни коефициенти		Ниво на значимост (p)
				(r)	(r^2)	
I	$y = 4,8071 - 0,1126 \cdot x$	4,8071	- 0,1126	-0,7809	0,6098	0,0000
II	$y = 4,9052 - 0,1023 \cdot x$	4,9052	- 0,1023	- 0,7384	0,5452	0,0002
III	$y = 5,3228 - 0,1128 \cdot x$	5,3228	- 0,1128	-0,8023	0,6437	0,0000
IV	$y = 5,5654 - 0,1131 \cdot x$	5,5654	- 0,1131	- 0,9175	0,8400	0,0000
Общо	$y = 5,1152 - 0,1047 \cdot x$	5,1152	- 0,1047	-0,7831	0,6132	0,0000

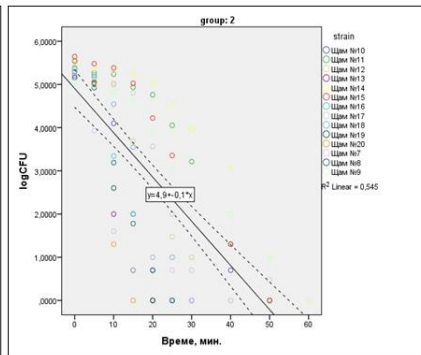
Резултатите от регресионния анализ по групи бактерии са представени в графичен вид на **Фиг.15**. Четирите регресионни прави са сходни, но с известни различия в доверителния интервал, съответно в степента на разсейване на анализирания признак. Най-силно е разсейването в група II (представители на сем. *Enterobacteriaceae*), със средна стойност на регресионния коефициент $\alpha = -0,1023$ и вариране в следните граници $-0,0898 < \alpha < -0,4074$. Това е групата с най-многобройни и най-разнообразни бактериални щамове. Сходно е разсейването в група I (*E.coli*) и група III (НФГБ), със стойности на α съответно $-0,0984 < -0,1126 < -0,3704$ и $-0,0847 < -0,1128 < -0,3119$. Най-слабо е разсейването в група IV (Грам-положителни коки) със стойности на α : $-0,0935 < -0,1131 < -0,1828$.

Четирите регресионни прави бяха сравнени чрез анализиране на груповите регресионни коефициенти α с помощта на еднофакторен ANOVA. Не се установиха статистически значими различия във варирането на регресионните коефициенти при различните групи бактерии ($p=0,347$). Ето защо може да се приеме, че във фотокаталитични условия новосинтезираният наноразмерен TiO_2 унищожава тестваните аеробни неспорообразуващи бактерии по закона на линейната регресия, със средна скорост на намаляване на $\log CFU/mL = -0,1047/min$.

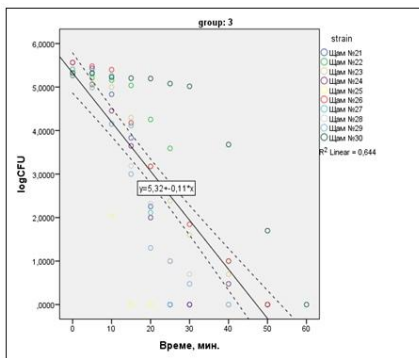
Данните от статистическия анализ са доказателство, че при Грам-отрицателните и Грам-положителните аеробни неспорообразуващи бактерии кинетиката на фотокаталитичния процес е сходна. Тя се характеризира с линейно логаритмично намаляване на жизнеспособните клетки по време на експозицията.



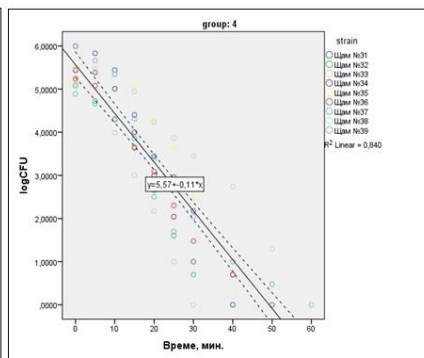
Група I



Група II



Група III



Група IV

Фиг. 15 Графичен регресионен анализ на данните за \log CFU/mL и времето по групи бактерии.

В обобщение:

- Новосинтезираният наноразмерен TiO_2 в концентрация 1 mg/mL и присъствие на UV-A лъчи оказва бактерицидно действие върху различни клинични изолати на Грам-отрицателни и Грам-положителни аеробни бактерии.
- При фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO_2 , времето за ефективно убиване на Грам-отрицателни и Грам-положителни аеробни неспорообразуващи бактерии в количество 10^5 CFU/mL е 60 min.
- Не се наблюдават статистически значими различия във фотокаталитичния отговор към TiO_2 при отделните групи Грам-отрицателни и Грам-положителни неспорообразуващи аеробни бактерии ($p > 0,10$).

- Новосинтезираният наноразмерен TiO_2 показва изразена активност както върху чувствителни към антибиотици бактериални изолати, така и върху множествено резистентни.
- Кинетиката на TiO_2 фотокаталитичния процес се характеризира с логаритмично намаляване на жизнеспособните бактериални клетки по време на експозицията. Разнообразието в профила на кинетичните криви отразява сложните взаимодействия между бактериалните клетки и титановите наночастици.
- Установява се линейна регресионна зависимост между $\log \text{CFU/mL}$ и времето на фотокаталитичната експозиция с TiO_2 при всеки отделен щам и по групи бактерии. Тази закономерност е с много висока корелация и сигнификантна статистическа вероятност ($p < 0,05$).

4. ПРОУЧВАНЕ НА ФОТОКАТАЛИТИЧНАТА АКТИВНОСТ НА ТИТАНОВ ОКСИД ВЪРХУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ НА ГЪБИЧКИ

Фотокаталитичната активност на новосинтезирания наноразмерен TiO_2 беше изпитана върху 5 изолата на *Candida spp.* и 1 изолат на *Cryptococcus neoformans*. Суспензиите на кандидатите бяха третираны с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи за 120 min, а суспензията на *C. neoformans* – при същите условия за 150 min.

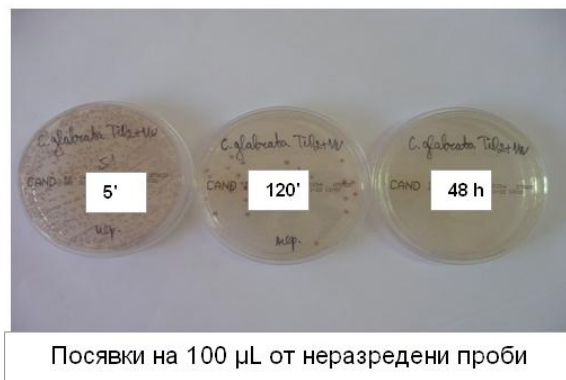
Получените резултати са представени в обобщен вид на **Табл.14**. Те показват значително разнообразие в скоростта на фотокаталитичния процес при отделните изолати на гъбички.

Табл.14 Данни за преживяемостта на *Candida spp.* и *C. neoformans* при третиране с TiO_2 и UV-A лъчи

Щам №	Микробен вид	Колич. на клетките в изходната суспензия (CFU/ml)	Третиране с 1 mg/mL TiO_2 и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 48 часа (CFU/ml)
			време	CFU/ mL	Редукц. индекс (%)	
1.	<i>C. albicans</i>	$7,83 \times 10^3$	60'	< 5	100	< 5
2.	<i>C. tropicalis</i>	$1,35 \times 10^4$	120'	$5,5 \times 10^1$	99.59	< 5
3.	<i>C. lusitanae</i>	$1,68 \times 10^4$	120'	$5,2 \times 10^2$	96.90	60
4.	<i>C. glabrata</i>	$3,93 \times 10^4$	120'	$5,6 \times 10^2$	98.58	40
5.	<i>C. krusei</i>	$1,74 \times 10^4$	120'	$4,5 \times 10^3$	74.14	340
6.	<i>C. neoformans</i>	$1,13 \times 10^4$	150'	$4,1 \times 10^3$	96.37	40

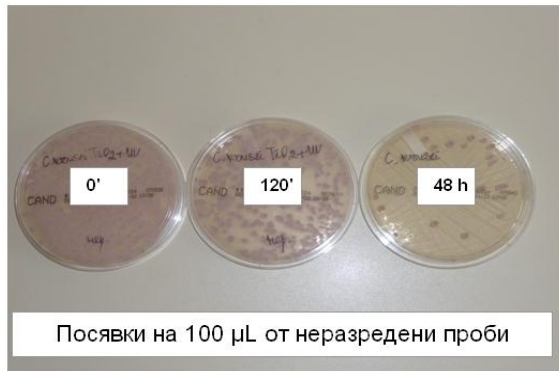
При *C.albicans* (щам №1) броят на колонии спада с повече от 3 \log_{10} за 60 min и достига стойности под 5 CFU/mL. При *C.tropicalis* (щам №2) колонииобразуващите единици намаляват с около 3 \log_{10} за 120 min (99.59% редукиционен индекс), като след рекултивиране не се наблюдава микробен растеж (< 5 CFU/mL).

При *C.lusitaniae* (щам №3) фотокаталитичният процес протича с по-бавна скорост. За 120 min броят на колонии намалява с 2 \log_{10} (96.90% редукиционен индекс), а след 48 часа са отчетени 60 CFU/mL (99.643% краен редукиционен индекс). Подобни са резултатите за *C.glabrata* (щам №4). Спад на колонииобразуващите единици с около 2 \log_{10} за 120 min (98.58% редукиционен индекс) и 40 CFU/mL след рекултивиране (99.898% краен редукиционен индекс).



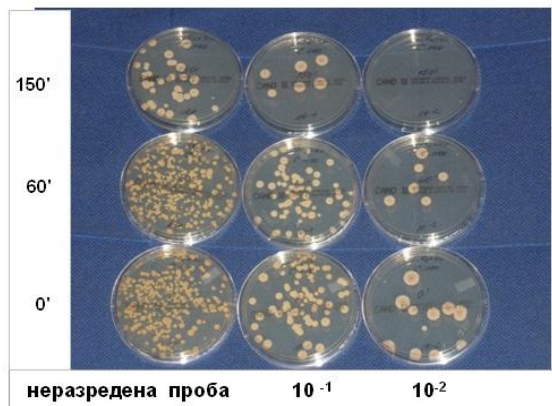
Фиг. 16 Колонии на *C.glabrata* (щам №4) на 5' и 120', и 48 часа след фотокаталитичното третиране с TiO_2

На **Фиг. 16** са представени култури на *C.glabrata*, показващи количеството на микробния растеж в началото и края на експозицията, и съответно след 48 часа. При посявка на 100 μL от неразредената суспензия на 5^{та} min колонии са в неброимо количество, на 120^{та} min техният брой е около 50, а 48 часа след края на фотокаталитичния процес са налице само единични колонии.



Фиг.17 Колонии на *C.krusei* (щам №5) на 5' и 120', и 48 часа след фотокаталитичното третиране с TiO_2

Фотокаталитичното действие на TiO_2 срещу *C.krusei* е илюстрирано на **Фиг.17**. Наблюдава се незначителен спад на колониобразуващите единици между 0^{-та} и 120^{-та} min на експозицията: от $1,74 \times 10^4$ CFU/mL до $4,5 \times 10^3$ CFU/mL. Въпреки това, резултатите от рекултивирането са изненадващо добри. Микробното число достига стойност $3,4 \times 10^2$ CFU/mL, а крайният редукционен индекс възлиза на 98.045%. Тези данни доказват наличието на антифунгална активност в периода след фотокаталитичното третиране.



Фиг.18 Колонии на *C.neoformans* върху Chrom agar при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO_2

Представените на **Фиг.18** култури илюстрират фотокаталитичия процес при *S.neoformans*. Броят на колонииите в неразредените и разредените проби не се променя съществено между 0^{-та} и 60^{-та} min на експозицията, но на 150^{-та} min се наблюдава значително намаление на колонииобразуващите единици. В неразредената проба са налице двуцифрен брой колонии, в разреждане 10⁻¹ – единични колонии, а в 10⁻² – липсва микробен растеж. Според данните от преброяването на колонииите, за 150 min микробното число спада от 1,13×10⁴ до 4,1×10³ CFU/mL (96.37% редукиционен индекс). След рекултивиране се откриват 40 CFU/mL, което определя краен редукиционен индекс 99.646%.

Резултатите от нашето проучване показват, че след 120 min въздействие с 1 mg/mL TiO₂ и UV-A лъчи при 4 от представителите на род *Candida* (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* и *C.glabrata*) се наблюдава фунгициден ефект, с краен редукиционен индекс между 99.643 и 100%. След 120 min експозиция, при *S.krusei* крайният редукиционен индекс е със стойност около 98%. Очевидно, при този шам е необходима по-продължителна експозиция, за да се постигне сигнификантна редукия на дрождевидните клетки. При *S.neoformans* също е налице фунгициден ефект, но едва след 150 min фотокаталитично въздействие с TiO₂.

В общи линии, нашите резултати са съпоставими с данните, публикувани от други автори. При фотокаталитично въздействие с TiO₂ Lonnen et al., 2005 наблюдават редукия на *C.albicans* с 4 log₁₀ за 120 min, а Kühn et al., 2003 установяват намаление на колонииите на *C.albicans* с 2 log₁₀ за 60 min.

Счита се, че гъбичките показват значително по-слаба фотокаталитична чувствителност, в сравнение с бактериите. Резултатите от нашите експерименти също са в подкрепа на това становище. При еднакви фотокаталитични условия (1 mg/mL TiO₂ и UV-A лъчи с дължина 365 nm), ефективното време на въздействие върху 10⁵ CFU/mL бактериални суспензии е 60 min, докато при 10⁴ CFU/mL суспензии на *Candida spp.* това време е двойно по-голямо.

Предполага се, че различията във фотокаталитичната чувствителност при гъбичките и бактериите се дължат на различия в размера и химичния състав на клетките и структурата на клетъчните им стени. Както е известно, фунгите са еукариотни микроорганизми с ригидна клетъчна стена, съставена от хитин, β-глюкани и манопотеини. Така структурираната клетъчна стена на гъбичките е по-устойчива на атаката на ROS, в сравнение с клетъчната стена на бактериите.

Освен това, дрождевидните клетки са около 25-50 пъти по-големи от бактериите и това вероятно също е причина за бавното им инактивиране, тъй като се изисква участие на по-голямо количество активни кислородни частици за фотодеградацията на една клетка.

Антифунгалното действие на TiO_2 е доказано още с откриването на антимикробните свойства на оксида през 1985 г. от Matsunaga et al. От тогава до наши дни, то е изследвано в редица проучвания. Въпреки това, все още няма категорично становище относно ефикасността на фотокаталитичния процес с участието на TiO_2 при отделните видове фунги и техните морфологични форми. В тази връзка, проведените от нас изследвания допринасят за характеризиране на антифунгалните свойства на титановия оксид.

В обобщение:

- Новосинтезираният наноразмерен TiO_2 притежава изразена фотокаталитична активност върху представители на род *Candida* и род *Cryptococcus*.
- Скоростта на фотокаталитичния процес е най-висока при *C. albicans* и най-ниска при *C. neoformans*.
- При фотокаталитично третиране с 1 mg/mL TiO_2 , времето за ефективно убиване на дрождевидни гъбички в количество ~ 10^4 CFU/mL варира от 60 до 150 min.

5. ПРОУЧВАНЕ НА АНТИБАКТЕРИАЛНАТА АКТИВНОСТ НА МОДИФИЦИРАНИ ТИТАНОВИ СЪЕДИНЕНИЯ И КОМПОЗИТИ

Синтезирането на модифицирани титанови съединения и композити е актуално направление в областта на фотокатализата и цели получаване на препарати с по-добри фотокаталитични и антибактериални свойства. В тази насока, често се използва дотирането на TiO_2 с йони на благородни и преходни метали (напр. Ag и Fe), както и създаването на композитни фотокатализатори с участието на метални оксиди (напр. ZnO).

В нашето проучване беше изпитана антибактериалната активност на три вида новосинтезирани, модифицирани с Zn, Fe и Ag титанови препарати в условия на експериментален модел, включващ: (1) третиране с 1 mg/mL титанов препарат и UV-A лъчи за 60 min и (2) третиране с 1 mg/mL титанов препарат на тъмно за 120 min.

5.1. АНТИБАКТЕРИАЛНА АКТИВНОСТ НА ZnTiO₃

Получените резултати от изпитването на антибактериалната активност на ZnTiO₃ са в подкрепа на теорията за фотокаталитичните свойства на металните оксиди и техните производни. При въздействие с ZnTiO₃ върху референтни щамове в тъмни условия за 120 min микробното число намалява с 50 до 97%, но след 24 часа количеството на жизнеспособните бактериални клетки е над 10⁵ CFU/mL. Тези данни показват, че в отсъствие на светлина антибактериалното действие на препаратa е много слабо и няма практическо значение.

В присъствие на UV-A лъчи ZnTiO₃ оказва бактерициден ефект върху *E.coli* ATCC 25922, с 5 log₁₀ редукция на колонииобразуващите единици за 60 min и липса на бактериален растеж след период от 24 часа (**Табл.15**). По отношение на другите бактерии, обаче, резултатите са незадоволителни. *S.aureus* ATCC 25923 и *E.faecalis* ATCC 29212 се повлияват много слабо (2 log₁₀ редукция на броя на колониите за 60 min), а при *P.aeruginosa* ATCC 27853 е налице незначителен антибактериален ефект (1 log₁₀ редукция на броя на колониите за 60 min).

Табл.15 Сравнителни данни за преживяемостта на референтни щамове при третиране с ZnTiO₃ и UV-A лъчи

Референтен щам	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL ZnTiO ₃ и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
		време	CFU/mL	Редукц. индекс (%)	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1,37 × 10 ⁵	30'	5,8 × 10 ²	95.77	< 5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	2,72 × 10 ⁵	60'	1.3 × 10 ⁴	95.22	> 10 ⁵
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	1,47 × 10 ⁵	60'	2,5 × 10 ³	98.30	3,4 × 10 ⁴
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	3,25 × 10 ⁵	60'	3,9 × 10 ³	98.80	5,5 × 10 ⁴

Считаме, че различията във фотокаталитичната чувствителност на референтните щамове са свързани от една страна с физико-химичните характеристики на ZnTiO₃, а от друга – с биологичните свойства на бактериите. Като цяло, взаимодействието между фотокаталитичните частици и микробните клетки е комплексен процес, който зависи от различни фактори.

Тестваният $ZnTiO_3$ е с размер на праховите частици 40 nm, които се характеризират със силна склонност към агломерация. По-големият размер на наночастиците и способността да агломерират са вероятната причина за по-слабото антибактериално действие на $ZnTiO_3$. Известно е, че намаляването на размера на фотокаталитичните частици засилва антибактериалната активност, а склонността им към агломерация я отслабва. Изследвайки влиянието на ZnO с размери 10 до 50 nm върху суспензии на *E.coli* с гъстота 10^5 CFU/mL, Padmavathy и Vijayaraghavan, 2008 установяват, че най-малките частици показват най-силен бактерициден ефект. Наночастиците с малък размер имат по-голяма повърхностна площ, което е предпоставка за генериране на по-голямо количество ROS. Освен това, те могат да преминат през клетъчната стена на бактериите и директно да инхибират респираторните ензими, докато големите агломерати не пенетрират във вътрешността на клетката.

Наблюдаваните различия във фотокаталитичната чувствителност на тестваните щамове, вероятно са свързани с някои биологични свойства на бактериалните клетки. Налице са доказателства, че *E.coli* се адхерира силно към повърхността на наночастиците, което благоприятства взаимодействието бактерий-катализатор и улеснява клетъчната деструкция. От друга страна, наличието на слайм при *P.aeruginosa* пречи на контакта с фотокатализатора и възпрепятства фотокаталитичния процес. Големината и формата на бактериалните клетки също оказват влияние върху фотокаталитичния процес. Бактерии с по-малки размери и по-кръгла или неправилна форма взаимодействат с по-малко на брой наночастици, което може да обясни по-слабата фотокаталитична активност при определени видове.

В специализираната литература са налице многобройни данни за антимикробното действие на TiO_2 и ZnO , но информацията за производното на тях химично съединение $ZnTiO_3$ е оскъдна. Цинковият титанат се образува при синтеза на композита ZnO/TiO_2 . $ZnTiO_3$, обаче, не може да бъде получен лесно и бързо се разгражда и вероятно поради това е по-слабо проучен, отколкото ZnO , TiO_2 и ZnO/TiO_2 . Счита се, че фотокаталитичната активност на $ZnTiO_3$ е сравнима с тази на ZnO и TiO_2 , тъй като двата оксида имат близки ширини на оптичната забранена зона и сходни фотокаталитични свойства. Повечето автори изследват синтетичните процеси, физико-химичните характеристики и фотокаталитичните свойства на $ZnTiO_3$, но не и неговата антимикробна активност.

5.2. АНТИБАКТЕРИАЛНА АКТИВНОСТ НА КОМПОЗИТА Fe/TiO₂

Данните за самостоятелната активност на Fe/TiO₂ върху *E.coli* ATCC 25922 показват, че на 120^{-та} min от третирането с 0.5, 1 и 2 мол.% Fe/TiO₂ на тъмно редукиционният индекс е средно 24.97 ± 6.53%, а след рекултивиране микробното число е над 10⁵ CFU/mL (**Табл.16**). Следователно, в тъмни условия антибактериалното действие на композита е незначително и не зависи от концентрацията на Fe. Потвърждава се становището, че титановите нанокompозити не осъществяват ефективно антибактериално действие в отсъствие на светлинни лъчи.

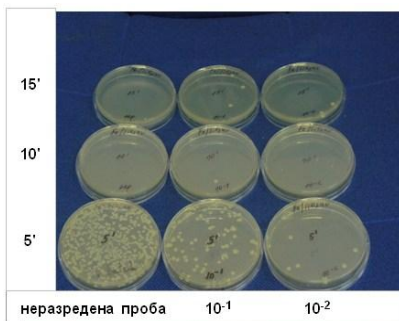
Табл.16 Сравнителни данни за преживяемостта на *E.coli* ATCC 25922 при третиране с Fe/TiO₂ на тъмно

Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране на <i>E.coli</i> ATCC 25922 с 1 mg/mL Fe/TiO ₂ на тъмно				Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
	Fe/TiO ₂	време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
2,25 × 10 ⁵	0.5 мол.% Fe/TiO ₂	120'	1,65 × 10 ⁵	26.67	> 10 ⁵
1,41 × 10 ⁵	1 мол.% Fe/TiO ₂	120'	9,90 × 10 ⁴	29.79	> 10 ⁵
1,41 × 10 ⁵	2 мол.% Fe/TiO ₂	120'	1,15 × 10 ⁵	18.44	> 10 ⁵

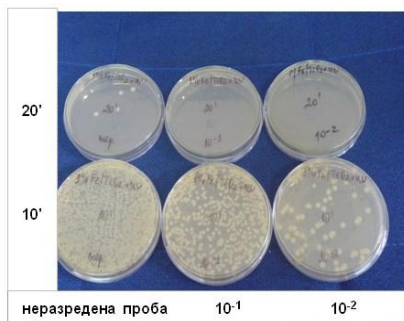
Табл.17 Сравнителни данни за преживяемостта на *E.coli* ATCC 25922 при третиране с Fe/TiO₂ и UV-A лъчи

Колич. на бакт. кл. в изходните суспензии (CFU/mL)	Третиране на <i>E.coli</i> ATCC 25922 с 1 mg/mL Fe/TiO ₂ и UV-A лъчи				Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
	Fe/TiO ₂	време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
2,25 × 10 ⁵	0.5 мол.% Fe/TiO ₂	10'	1 × 10 ¹	99.99	< 5
1,41 × 10 ⁵	1 мол.% Fe/TiO ₂	20'	5 × 10 ¹	99.96	< 5
1,41 × 10 ⁵	2 мол.% Fe/TiO ₂	60'	6,66 × 10 ³	95.28	> 10 ⁵

В присъствие на UV-A лъчи (**Табл.17**) композитите с 0.5 и 1 мол.% Fe изявяват силна бактерицидна активност, като унищожават над 99.9% от колонииите на *E.coli* още в първите 10 – 20 min. Композитът с 2 мол.% Fe редуцира 95.28% от колонииите по време на 60 min експозиция, а след рекултивиране микробното число е над 10^5 CFU/mL. Тези данни дават основание да се заключи, че във фотокаталитични условия антибактериалното действие на Fe/TiO₂ зависи от съдържанието на желязо.

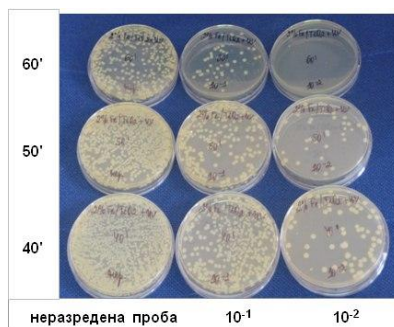
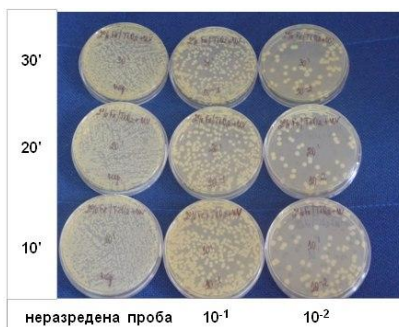


(a) 0.5 мол.% Fe/TiO₂



(b) 1 мол.% Fe/TiO₂

Фиг.19 Колонии на *E.coli* ATCC 25922 върху МХА при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL от: (a) 0.5 мол.% Fe/TiO₂ и (b) 1 мол.% Fe/TiO₂



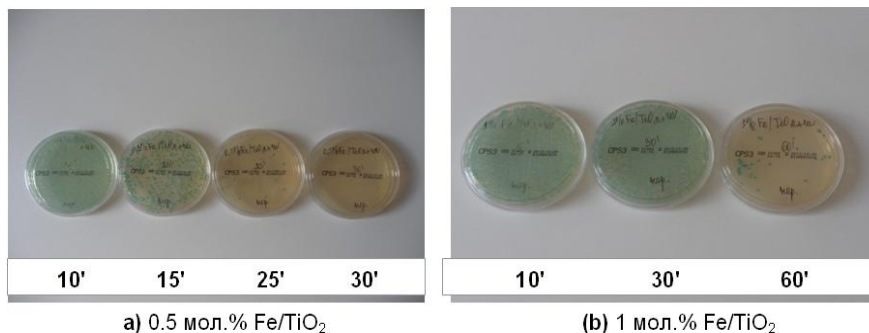
Фиг.20 Колонии на *E.coli* ATCC 25922 върху МХА при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL от композита 2 мол.% Fe/TiO₂

Визуализацията на бактериалния растеж е показана на **Фиг.19** и **Фиг.20**. Виждат се различията в антибактериалната активност на трите вида Fe/TiO₂. Композитът с 0.5 мол.% Fe инхибира почти напълно бактериалния растеж за 10 min, а този с 1 мол.% Fe води до сигнификантна редукция на колониобразуващите единици за 20 min.

При използване на 2 мол.% Fe/TiO₂, обаче, количеството на колонии не се променя съществено между 10^{-та} и 50^{-та} min на експозицията и едва на 60^{-та} min е налице спад в броя на колонии.

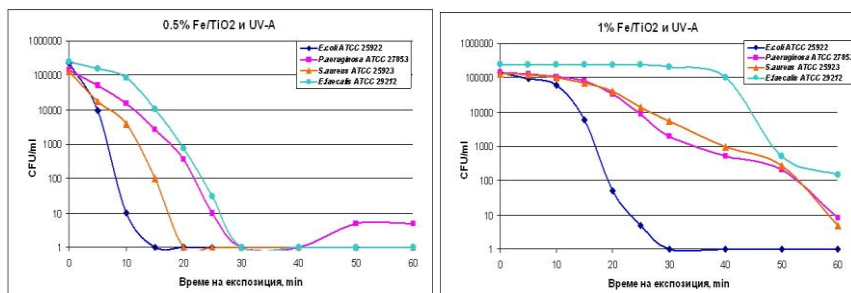
Незначителното антибактериално действие на трите вида Fe/TiO₂ в тъмни условия, както и слабата фотокаталитична активност на 2 мол.% Fe/TiO₂ върху *E.coli* ATCC 25922, ни дадоха основание да третираме фотокаталитично другите референтни щамове само с композитите, съдържащи 0.5 и 1 мол.% Fe.

При фотокаталитично въздействие с 0.5 мол.% Fe/TiO₂ между 99.69% и 100% от колонии на референтните щамове се редуцират за 20 min. При третиране на *E.coli* ATCC 25922 с 1 мол.% Fe/TiO₂ редуцираният индекс на 20^{-та} min е 99.96%, а след 24 часа не се установява бактериален растеж. При другите референтни щамове едва на 50^{-та} min редуцираният индекс показва стойност над 99% (сумарно 99.79 ± 0.05%). След рекултивиране, при *E.coli* и *S.aureus* не се наблюдава бактериален растеж, а при *P.aeruginosa* и *E.faecalis* се отчитат 45 и 70 CFU/mL, което определя краен редуцираният индекс съответно 99.969% и 99.971%.



Фиг.20 Колонии на *E.faecalis* ATCC 29212 върху CPS при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL: **(a)** 0.5 мол.% Fe/TiO₂ и **(b)** 1 мол.% Fe/TiO₂

Представените на **Фиг.20** култури от неразредени суспензии на *E.faecalis* ATCC 29212 илюстрират разликата в скоростта на фотокаталитичния процес. При използване на 0.5 мол.% Fe/TiO₂ още на 20^{-та} min колонииобразуващите единици намаляват значително, на 25^{-та} min се наблюдават единични колонии, а на 30^{-та} min липсва бактериален растеж. При третиране с 1 мол.% Fe/TiO₂ на 10^{-та} и 30^{-та} min колонии са в неброимо количество, и едва на 60^{-та} min е налице съществен спад в броя на колонии.



Фиг.22 Криви на убиване на референтни щамове при фотокаталитично третиране с 1 mg/mL от композитите 0.5 и 1 мол.% Fe/TiO₂

Динамиката на фотокаталитичния процес показва, че при въздействие с 0.5 мол.% Fe/TiO₂, в рамките на 10 до 30 min колонии се редуцират с 5 log₁₀ до стойности под “detection limit”. Кривите на убиване при четирите референтни щам са сходни и наподобяват първи ред кинетика, а при *P.aeruginosa* ATCC 27853 е налице опашка, дължаща се на оцелели бактериални клетки.

При третиране с 1 мол.% Fe/TiO₂ кинетичните криви са доста разнообразни. Кривата на *E.coli* се доближава до първи кинетичен порядък и показва редуция на колонии с 5 log₁₀ за 30 min. Графичните криви на *P.aeruginosa* и *S.aureus* са с по-сложна характеристика и достигат до “detection limit” в края на експозицията. Кривата на *E.faecalis* е с комбиниран профил и спада само с 3 log₁₀ за 60 min.

Резултатите от фотокаталитичните изследвания с трите вида Fe/TiO₂ показват съществени различия, свързани с концентрацията на Fe³⁺. Композитите с 0.5 мол.% и 1 мол.% Fe изявяват силен бактерициден ефект срещу референтния щам *E.coli*, докато композитът с 2 мол.% Fe е слабо активен.

Композитите с 0.5 мол.% и 1 мол.% Fe унищожават сигнификантно количество клетки от всички референтни щамове, но 0.5 мол.% Fe/TiO₂ е по-ефективен. Тези данни са доказателство, че фотокаталитичната антибактериална активност на Fe/TiO₂ зависи от съдържанието на Fe, чиято оптимална концентрация е 0.5 мол.%. Подобни резултати съобщават и други автори [Zhang, 2008; Endrino, 2011]. Трябва да се има предвид, че оптималната концентрация на добавката е различна при всеки конкретен синтетичен метод.

Тестваният от нас новосинтезиран нанокomпозит Fe/TiO₂ е чист анатаз, с размер на кристалите 12-15 nm. Тези характеристики се отнасят за трите вида Fe/TiO₂ (0.5, 1 и 2 мол.% Fe). Счита се, че фазата анатаз е по-активна от другите кристални фази, поради високата мобилност на електрони, по-високата степен на хидроксилване и по-широката оптична забранена зона [Banerjee, 2006]. От друга страна, намаляването на кристалния размер е начин да се увеличи повърхностната площ на катализатора, което води до образуване на повече каталитични центрове.

Физико-химичните свойства на Fe-съдържащите титанови препарати са предпоставка за силно фотокаталитично антибактериално действие и на трите вида Fe/TiO₂. Микробиологичните данни, обаче, разкриват различия в активността на препаратите и доказват зависимостта на бактерицидното действие от съдържанието на желязо.

5.3. АНТИБАКТЕРИАЛНА АКТИВНОСТ НА КОМПОЗИТА Ag/TiO₂/ZnO

Данните от проучването на антибактериалната активност на композита Ag/TiO₂/ZnO на тъмно, и в присъствие на UV-A лъчи са представени на **Табл.18** и **Табл. 19**. И при двата вида въздействия още на 20^{та} min редукиционният индекс е висок: средно 91.45 ± 7.63% при третиране с Ag/TiO₂/ZnO на тъмно и съответно 98 ± 1.78% при третиране с Ag/TiO₂/ZnO и UV-A лъчи. Всички третирани суспензии са без бактериален растеж след рекултивирание (< 5 CFU/mL).

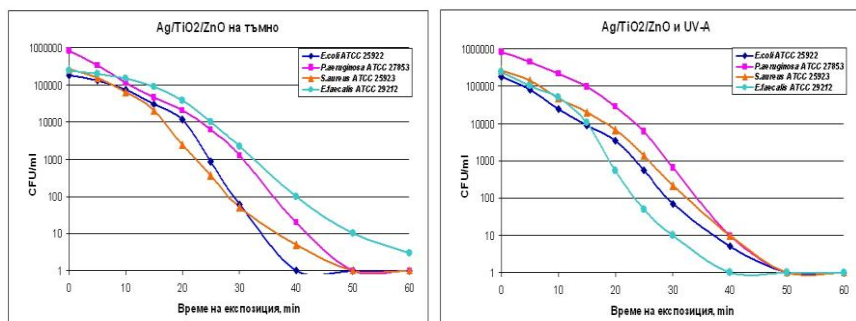
Табл.18 Сравнителни данни за преживяемостта на референтни щамове при третиране с Ag/TiO₂/ZnO на тъмно

Референтен щам	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL Ag/TiO ₂ /ZnO на тъмно			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
		време	CFU/mL	Редуц. индекс (%)	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1,82 × 10 ⁵	20'	1,18 × 10 ⁴	93.52	< 5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8,45 × 10 ⁵	20'	2,02 × 10 ⁴	97.61	< 5
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	2,68 × 10 ⁵	20'	2,45 × 10 ⁴	90.86	< 5
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	2,41 × 10 ⁵	20'	3,90 × 10 ⁴	83.82	< 5

Табл. 19 Сравнителни данни за преживяемостта на референтни щамове при третиране с Ag/TiO₂/ZnO и UV-A лъчи

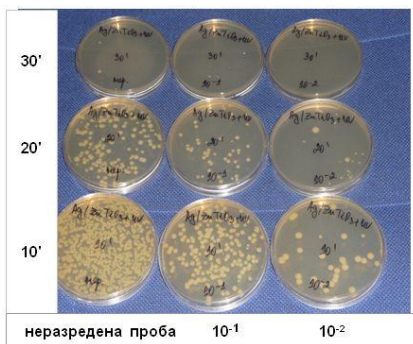
Референтен щам	Колич. на бакт. кл. в изходната суспензия (CFU/mL)	Третиране с 1 mg/mL Ag/TiO ₂ /ZnO и UV-A лъчи			Остатъчен ефект след 24 часа (CFU/mL)
		време	CFU/mL	Редукц. индекс (%)	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1,82 × 10 ⁵	20'	3,52 × 10 ³	98.07	< 5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8,45 × 10 ⁵	20'	2,85 × 10 ⁴	96.63	< 5
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	2,68 × 10 ⁵	20'	6,63 × 10 ³	97.53	< 5
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	2,41 × 10 ⁵	20'	5,40 × 10 ²	99.78	< 5

На **Фиг.23** е показан кинетичният процес с участието на Ag/TiO₂/ZnO при третиране на тъмно и в присъствие на UV-A лъчи. Наблюдава се редукция на колонии с 5 log₁₀ и достигане на стойности под границата на експерименталното откриване в границите на 40 – 60 min (при третиране с Ag/TiO₂/ZnO на тъмно) и 40 – 50 min (при третиране с Ag/TiO₂/ZnO и UV-A лъчи). Кривите на убиване са сходни помежду си и се доближават до първи кинетичен профил, но са с по-сложна характеристика. Представените резултати са доказателство за силната бактерицидна активност на Ag-модифицирания титанов композит, която се изявява както в присъствие на ултравиолетови лъчи, така и в тъмни условия.

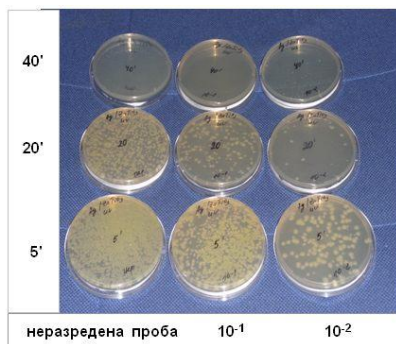


Фиг.23 Криви на убиване на референтни щамове при третиране с 1 mg/mL Ag/TiO₂/ZnO

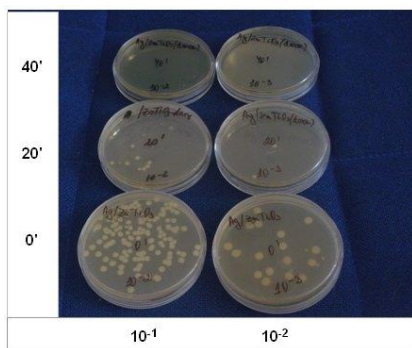
На **Фиг.24** е илюстрирано антибактериалното действие на композита $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ върху референтните щамове *E.coli* и *P.aeruginosa*. Представените култури показват значително намаление на броя на колонии и липса на бактериален растеж на 40^{та} min. Тази характерна тенденция се наблюдава както при третиране с $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ и UV-A лъчи, така и при третиране с $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ в тъмни условия.



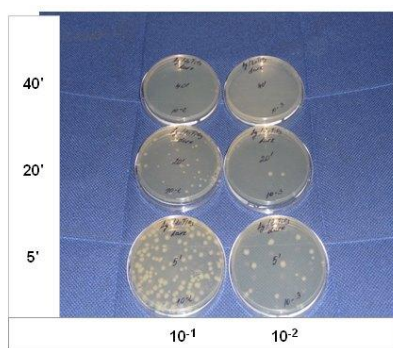
(a) *E.coli* ATCC 25922



(b) *P.aeruginosa* ATCC 27853



(c) *E.coli* ATCC 25922



(d) *P.aeruginosa* ATCC 27853

Фиг.24 Колонии на референтни щамове *E.coli* и *P.aeruginosa* върху MXA при третиране с: (a, b) 1 mg/mL $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ и UV-A и (c, d) 1 mg/mL $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ на тъмно.

Голяма част от съвременните проучвания в областта на фотокатлизата включват Ag-модифицирани оксидни композити (напр. Ag/TiO_2 , Ag/ZnO) или двукомпонентни оксидни композити (напр. TiO_2/ZnO).

Въпреки големия брой публикации за ефекта на Ag наночастици върху фотохимичните и антибактериални свойства на металните оксиди, Ag-съдържащите двукомпонентни оксидни композити са недостатъчно проучени. Според наскоро публикувани данни, във фотокаталитични условия Ag/TiO₂/ZnO за 80 min редуцира колонии на *E.coli* от 10⁷ CFU/mL почти до 0 и проявява антибактериално действие в отсъствие на светлинни лъчи [Pant, 2013].

Счита се, че фотокаталитичната способност се повишава при легиране на TiO₂ наночастици с ZnO, а добавянето на Ag може да засили тези свойства. При облъчване със светлинни лъчи молекулите на оксидните нанокompозити се активират, като се образуват двойки e⁻/h⁺. Част от e⁻ и h⁺ бързо се рекомбинират и това намалява активността на препарата. Установено е, че Ag наночастици пречат на рекомбинацията на фотогенерираните двойки e⁻/h⁺ [Subramanian, 2001; Pant, 2013]. В допълнение, Ag наночастици абсорбират светлинните лъчи, при което възниква повърхностен плазмонен резонанс и се индуцира трансфер на фотовъзбудени e⁻ от повърхността към зоната на проводимост на металните оксиди [Zielinska, 2010]. Наличието на повече свободни зарядоносители води до генериране на по-голямо количество ROS и обуславя по-силната фотокаталитична активност на съответния препарат. Въпреки големия научен интерес в тази област, механизмът на действие на Ag/TiO₂/ZnO върху бактериите не е изяснен в детайли. Възможността за изява на самостоятелно антимикробно действие при този нанокompозит обаче, е важно предимство, тъй като отпада необходимостта от облъчване със светлинни лъчи.

В обобщение, модифицираните с Zn, Fe и Ag титанови препарати показват различна антибактериална активност, в зависимост от химичния състав и физико-химичните свойства.

- Синтезираният наноразмерен ZnTiO₃ показва антибактериална активност само в присъствие на UV-A лъчи. Налице са значителни различия във фотокаталитичното действие на ZnTiO₃ върху тестваните референтни щамове.
- Синтезираният нанокompозит Fe/TiO₂ с 0.5 мол.%, 1 мол.% и 2 мол.% Fe показва антибактериална активност само в присъствие на UV-A лъчи. Най-силно е фотокаталитичното действие на 0.5 мол.% Fe/TiO₂. Този композит оказва силен бактерициден ефект срещу всички тествани референтни щамове.
- Синтезираният нанокompозит Ag/TiO₂/ZnO притежава силна бактерицидна активност срещу всички тествани референтни щамове, която се изявява както в присъствие на UV-A лъчи, така и в тъмни условия.

VI. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Разработеният от нас метод за определяне на антимикробна активност на титанови препарати дава възможност да се изпита антимикробното действие на препарата самостоятелно и в присъствие на ултравиолетови лъчи, да се определи ефективното време на въздействие, да се характеризира кинетиката на фотокаталитичния процес и да се проследи състоянието на микробната популация в периода след третирането. Този метод е подходящ за изследване на различни видове Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни бактерии и дрождевидни гъбички.
2. Новосинтезираните наноразмерни титанови препарати TiO_2 , ZnTiO_3 и Fe/TiO_2 извяват антимикробна активност само при облъчване с UV-A лъчи.
3. Новосинтезираният $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ извява антимикробна активност както при облъчване с UV-A лъчи, така и в тъмни условия.
4. Новосинтезираният по нехидролитичен зол-гел метод наноразмерен TiO_2 притежава широк спектър на антимикробно действие. Във фотокаталитични условия той унищожава ефективно ентеробактерии, НФГБ, Грам-положителни бактерии и дрождевидни гъбички. Този препарат е активен срещу чувствителни и резистентни към антибиотици бактериални щамове.
5. Кинетиката на фотокаталитичния процес с участието на TiO_2 при Грам-положителните и Грам-отрицателните неспорообразуващи аеробни бактерии е сходна и се характеризира с линейна регресионна зависимост между $\log \text{CFU/mL}$ и времето на експозиция.
6. При фотокаталитично третиране с 1 mg/mL от новосинтезирания наноразмерен TiO_2 времето, за ефективно убиване на Грам-положителни и Грам-отрицателни неспорообразуващи аеробни бактерии в количество 10^5 CFU/mL , е 60 min , а за убиване на дрождевидни гъбички в количество 10^4 CFU/mL то е между 60 и 150 min .
7. Фотокаталитичното антибактериално действие на новосинтезирания по нехидролитичен зол-гел метод Fe/TiO_2 нанокompatит зависи от съдържанието на желязо. Оптималната концентрация на Fe за извята на антибактериален ефект е $0.5 \text{ mol.}\%$.
8. С най-изразено бактерицидно действие сред новосинтезираните наноразмерни титанови препарати са TiO_2 , $0.5 \text{ mol.}\%$ Fe/TiO_2 и $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$. При фотокаталитично третиране на референтните щамове *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.faecalis* с 1 mg/mL от тези препарати се постига редукция на колонииите с 5 логаритъма за 60 min .

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въпреки, че TiO_2 и синтезираните на негова основа химични съединения и композити са предмет на интензивни изследвания през последните три десетилетия, техните антимикробни свойства все още не са напълно проучени. Причината за това е липсата на общоприет метод за изследване на антимикробна активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства.

Ние разработихме стандартизиран метод за оценка на антимикробните свойства на TiO_2 и негови производни. Методът е много добре възпроизводим и е приложим при Грам-положителни бактерии, Грам-отрицателни бактерии и дрождевидни гъбички. Негови предимства са използването на достъпна лабораторна апаратура, стандартни хранителни среди и конвенционални микробиологични техники. С разработването на метода беше решен важен методологичен проблем в областта на микробиологичните изследвания на вещества с фотокаталитични свойства.

С разработения метод изпитахме антибактериалната активност на новосинтезиран наноразмерен TiO_2 върху 4 референтни бактериални щама в условия на пълен експериментален модел. По-нататък проучихме фотокаталитичното действие на TiO_2 върху 40 клинични бактериални изолата и 6 изолата на дрождевидни гъбички. Определихме активността на няколко новосинтезирани наноразмерни титанови препарата (ZnTiO_3 , Fe/TiO_2 и $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$) върху 4 референтни бактериални щама в тъмни условия и при облъчване с UV-A лъчи. Характеризирахме динамиката на фотокаталитичните процеси и проследихме състоянието на микробните популации в периода след третирането. Проведените изследвания представляват най-мащабното до сега проучване върху антимикробните свойства на TiO_2 и негови производни.

Получените резултати показват добре изразена антибактериална и антимикотична активност на изпитвания новосинтезиран TiO_2 . Информацията за активността на ZnTiO_3 , Fe/TiO_2 и $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ върху референтни бактериални щамове може да послужи като основа за характеризиране на антибактериалните свойства на тези новосинтезирани наноразмерни титанови препарати. Като цяло, данните от проведеното проучване сочат възможност за използване на титановите препарати като алтернатива на някои от съществуващите технологии за дезинфекция.

VIII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път в България е разработен и приложен метод за определяне на антимикробна активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства.
2. За първи път в света са изследвани антибактериалните и антимикотичните свойства на синтезиран по нехидролитичен зол-гел метод наноразмерен TiO_2 .
3. За първи път в света е извършено мащабно проучване върху активността на TiO_2 срещу широк спектър от Грам-отрицателни бактерии, Грам-положителни бактерии и гъбички.
4. За първи път в България са изпитани антибактериалните свойства на синтезирани по нехидролитичен зол-гел метод ZnTiO_3 и Fe/TiO_2 , и на новосинтезирания нанокompозит $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Потвърдена е ролята на ултравиолетовите лъчи от клас А за изявата на антимикробното действие на титановите химични съединения и композити.
2. Установено е, че композита $\text{Ag/TiO}_2/\text{ZnO}$ притежава антибактериална активност в отсъствие на светлинни лъчи.
3. Установено е, че във фотокаталитични условия TiO_2 унищожава чувствителни и резистентни към антибиотици бактерии.
4. Потвърдено е становището, че гъбичките са по-резистентни към TiO_2 фотокаталитично въздействие, в сравнение с бактериите.
5. Потвърдена е линейната регресионна зависимост между $\log \text{CFU/mL}$ и времето на експозиция при фотокаталитичното третиране с TiO_2 на Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни неспорообразуващи бактерии.

ПРИНОСИ С НАУЧНО–ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

1. Стандартизирани са основните етапи на метода за определяне на антимикробна активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства:
 - Изготвяне на стандартизирана бактериална и гъбична суспензия;
 - Провеждане на фотокаталитичния експериментален модел;
 - Определяне на микробното число;
 - Характеризиране на остатъчния ефект от фотокаталитичното въздействие.
2. Осигурени са сравнимост, достоверност и възпроизводимост на резултатите при определяне на антимикробната активност на титанови препарати с фотокаталитични свойства.
3. Изготвен е протокол за изпитване на фотокаталитична антибактериална активност на TiO_2 върху Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни неспорообразуващи бактерии.

IX. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В ЧУЖДЕСТРАННИ СПИСАНИЯ

1. Stoyanova A., M. Sredkova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, Y. Dimitriev, **H. Hitkova**, Tz. Iliev. Nonhydrolytic sol-gel synthesis and antibacterial properties of nanosized TiO₂. *Optoelectronics and advanced materials - rapid communications*, 2010,12 (4), 2059 – 2063. **(IF 2010 0.477)**
2. **Hitkova H.**, A. Stoyanova, N. Ivanova, M. Sredkova, V. Popova, R. Iordanova, A. Bachvarova-Nedelcheva. Study of antibacterial activity of nonhydrolytic synthesized TiO₂ against *E.coli*, *P.aeruginosa* and *S.aureus*. *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials*, 2012, 4 (1), 9 – 17.
3. Stoyanova A., **H. Hitkova**, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, N. Ivanova, M. Sredkova. Synthesis, photocatalytic and antibacterial properties of nanosized ZnTiO₃ powders obtained by different sol - gel methods. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2012, 7 (2), 777 – 784. **(IF 2012 1.092)**.

ПУБЛИКАЦИИ В БЪЛГАРСКИ СПИСАНИЯ

1. Stoyanova A., N. Ivanova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, **H. Hitkova**, M. Sredkova. Sol-gel preparation, characterization and photocatalytic properties of nanocrystalline TiO₂ powders. *Nanoscience & Nanotechnology*, 2012, 12, 23 – 27.
2. Stoyanova A., **H. Hitkova**, N. Ivanova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, M. Sredkova. Photocatalytic and antibacterial activity of Fe-doped TiO₂ nanoparticles prepared by nonhydrolytic sol-gel method. *Bulgarian Chemical Communications*. 2013, 45, 497 – 504. **(IF 2013 0.349)**

СЪОБЩЕНИЯ, ИЗНЕСЕНИ НА НАУЧНИ ФОРУМИ В ЧУЖБИНА

1. Sredkova M., A. Stoyanova, **H. Hitkova**, R. Iordanova, Y. Dimitriev, A. Bachvarova-Nedelcheva. Antibacterial activity of nanosized TiO₂ against *Escherichia coli*. *21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Milan, Italy, 7-10 May, 2011, S 304.
2. Stoyanova A., N. Ivanova, **H. Hitkova**, M. Sredkova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova. Synthesis and photodegradation activity of pure and Fe-modified TiO₂. *32 Balkan Medical Week*, Nis, Serbia, 21-23 September, 2012.

СЪОБЩЕНИЯ, ИЗНЕСЕНИ НА НАУЧНИ ФОРУМИ В БЪЛГАРИЯ

1. Stoyanova A., A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, N. Ivanova, **H. Hitkova**, M. Sredkova. Synthesis and photocatalytic properties of ZnTiO₃ powders obtained by different sol-gel methods. *Third National Crystallographic Symposium with international participation*, 3-5 October, 2011, Sofia, Abstracts, p. 41.
2. **Hitkova H.**, A. Stoyanova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, N. Ivanova, M. Sredkova. Synthesis and bactericidal effect of TiO₂ on selected pathogenic bacteria. *Fifth Balkan Conference on Glass Science and Technology, 17th Conference on Glass and Ceramics*, Nessebar, 25-29 September, 2011, Abstracts, p. 101.
3. Stoyanova A., N. Ivanova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, **H. Hitkova**, M. Sredkova. Nonhydrolytic preparation of Fe-doped TiO₂ nanoparticles and their photocatalytic activities for Reactive Black 5 degradation. *Fourth National Crystallographic Symposium - NCS 2012*, 01-03 November, 2012, Sofia, Abstracts, p. 75.
4. Stoyanova A., N. Ivanova, **H. Hitkova**, M. Sredkova, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova. Effect of synthesis conditions on photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles prepared by nonhydrolytic method. *14th International workshop on Nanoscience and Nanotechnology, NANO'2012*, Sofia, 22-23 November, 2012.
5. **Хиткова Х.**, М. Средкова, А. Стоянова, В. Попова, Н. Иванова, Р. Йорданова, А. Бъчварова-Неделчева. Антибактериална активност на наноразмерен титанов оксид срещу патогенни бактерии. *XI Национален Конгрес по Клинична микробиология и Инфектология на БАМ*, София, 09-11 май, 2013, Сб. рез., стр.75 – 76.