

»Mladi za napredek Maribora 2015«

32. srečanje

KOLOIDNO SREBRO – PRILOŽNOST ALI GROŽNJA?

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: ANALINA KRALJ, ŠPELA CELCAR

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2015

»Mladi za napredek Maribora 2015«

32. srečanje

KOLOIDNO SREBRO – PRILOŽNOST ALI GROŽNJA?

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2015

Kazalo

Kazalo slik.....	5
Kazalo tabel.....	6
Kazalo grafov.....	6
Zahvala.....	8
Povzetek.....	9
1 UVOD.....	10
1.1 Raziskovalno vprašanje.....	10
1.2 Hipoteze.....	10
2 TEORETIČNE OSNOVE.....	11
2.1 Koloidno srebro – utekočinjeno srebro.....	11
2.1.1 Zgodovinsko ozadje.....	12
2.1.2 Pridobivanje koloidnega srebra.....	12
2.1.3 Zdravljenje s koloidnim srebrom.....	13
2.1.4 Nezaželeni stranski učinki.....	14
2.2 Bakterije.....	15
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	16
2.2.2 <i>Bacillus cereus</i>	17
2.3 Glive.....	18
2.3.1 Kvasovke.....	18
2.3.2 Kvasovka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.4 Mitoza.....	20
2.5 Metode za določanje protimikrobne aktivnosti.....	22
2.5.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski.....	22
2.5.2 Določevanje optične gostote v tekočem gojišču.....	22
2.5.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču.....	23
2.5.4 Čebulni test.....	23

3	MATERIALI IN METODE DE LA.....	25
3.1	Priprava gojišč.....	25
3.1.1	YEPD-optimalno gojišče za kvasovke	25
3.1.2	Brainheart (BHI)-optimalno gojišče za bakterije	25
3.2	Priprava prekonočne kulture kvasovk in bakterij	26
3.3	Priprava standardne raztopine	27
3.2	Material	27
3.1.2	Določevanje optične gostote.....	28
3.2.3	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči.....	29
3.1.4	Čebulni test.....	29
3.2	Metode dela.....	30
3.2.1	Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski	30
3.2.2	Določevanje optične gostote.....	30
3.2.3	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči.....	32
3.2.4	Čebulni test.....	34
4	REZULTATI.....	35
4.1	Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski	35
4.2	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči.....	36
4.3	Določevanje optične gostote	37
4.4	Čebulni test.....	38
5	RAZPRAVA	43
5.1	Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski	43
5.2	Določevanje optične gostote v tekočem gojišču	44
5.4	Čebulni test.....	48
6	DRUŽBENA ODGOVORNOST	50
7	ZAKLJUČEK.....	50
8	VIRI IN LITERATURA	52

8	PRILOGE	55
	8.1 Anketa	55
	Struktura vzorca	55
	Rezultati ankete	58
	8.2 Optična gostota testnih organizmov pri valovni dolžini 600 nm - grobi podatki	66

Kazalo slik

Slika 1: E. coli pod mikroskopom (Vir slike: http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/gram-negative%20larger/E.coli%20O157%20H7.jpg)	17
Slika 2: Bacillus cereus (Vir slike: http://cdn.phys.org/newman/gfx/news/2013/structuralst.png)	17
Slika 3: Prikaz alkoholnega vrenja, kot poteka v citoplazmi kvasovk, s pomočjo njihovih encimov (lasten vir)	19
Slika 4: Kolonije in oblika Saccharomyces cerevisiae (vir: http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-4ZE093SV/)	20
Slika 5: Interfaza in faze mitoze (vir slike: http://svet-biologije.com/biologija/biologija-celije/biljna-celija/amitoza-i-mitoza/)	22
Slika 6: Prikaz mikrotitrne plošče za Escherichio Coli in Bacillus cereus (lastni vir)	33
Slika 7: Difuzijski antibiogram brez vidnih inhibicijskih con (Bacillus cereus) (lasten vir)	35
Slika 8: Mikrotirska plošča z vidnimi obarvanji indikatorja, A: BATERIJE, B: GLIVE (lasten vir)...	37
Slika 10: Čebulice v destilirani vodi (lasten vir)	38
Slika 11: Čebulice v destilirani vodi (lasten vir)	38
Slika 12: Čebulice v koloidnem srebru 65-70 ppm (lastni vir)	38
Slika 13: Pozna profaza, kontrola, 1000x povečava (lastni vir) Slika 14: Anafaza z nekaterimi nerazdvojenimi kromatidami kromosomov, koloidno srebro 65-70 ppm, 400x povečava (lastni vir)	42
Slika 15: Anafazni mostički, koloidno srebro 20-25 ppm, Slika 16: Metafaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava, 1000x povečava (lastni vir)	42
Slika 17: Profaza, koloidno srebro 20-25 ppm, Slika 18: Profaza in telofaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava (lastni vir) 1000x povečava (lastni vir)	43

Slika 19: Anafazni mostiček, metafaza, telofaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 400x povečava (lastni vir)	43
--	----

Kazalo tabel

Tabela 1: Priprava standardne raztopine	27
Tabela 2: Prikaz materiala, ki ga potrebujemo za nastavitev poskusa za kvasovke	31
Tabela 3: Prikaz materiala, ki ga potrebujemo za nastavitev poskusa za bakterije	32
Tabela 4: Vrednosti MIC/MBC/MFC (ppm)	36
Tabela 5: Povprečne vrednosti OD testnih organizmov s standardnimi odkloni in oceno številčnosti celic	37
Tabela 6: Povprečna dolžina koreninic s standardnimi odkloni	39
Tabela 7: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla	39
Tabela 8: : Čas gojenja, povprečna dolžina korenin in mitotski indeks za celice, namočene v določeno tekočino	42
Tabela 9: Optična gostota testnih organizmov pri valovni dolžini 600 nm - grobi podatki	66

Kazalo grafov

Graf 1: Grafični prikaz vrednosti MIC/MBC/MFC (ppm)	36
Graf 2: Optična gostota bakterij in gliv v epruveh s koloidnim srebrom in brez	38
Graf 3: Povprečna dolžina koreninic v destilirani vodi, koloidnem srebru 20-25 ppm in 65-70 ppm ..	39
Graf 4: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (destilirana voda)	40
Graf 5: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (koloidno srebro 20-25 ppm)	40
Graf 6: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (koloidno srebro 65-70 ppm)	41
Graf 7: Spolna sestava	58
Graf 8: Starostna sestava anketirancev	58
Graf 9: Izobrazbena sestava	59
Graf 10: : Se v primeru bolezni poslužujete metod alternativne medicine (homeopatija, akupunktura, uporaba zdravilnih rastlin, ...)?	59
Graf 11: Ali ste že slišali za koloidno srebro?	60
Graf 12: Iz katerih virov ste zasledili zanj?	60

Graf 13: Ali veste za kaj se uporablja koloidno srebro?	61
Graf 14: Ali ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabljamo tudi na živalih?.....	62
Graf 15: Ali ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabljamo v gospodinjstvu, za preprečevanje nastajanja bakterij?	62
Graf 16: Ali uporabljate koloidno srebro?.....	63
Graf 17: Za kakšne težave uporabljate koloidno srebro?	63
Graf 18: Na kakšen način ga uporabljate?.....	64
Graf 19: Bi uporabo koloidnega srebra priporočili tudi drugim?	64
Graf 20: Ste s pomočjo koloidnega srebra hitreje ozdraveli oziroma opazili ugodne učinke za vaše zdravje?	65
Graf 21: Ste ob uporabi koloidnega srebra že kdaj pomislili na morebitne stranske učinke?	65

Zahvala

Za pomoč pri delu se zahvaljujema predvsem najini mentorici, ki nama je bila ves čas na voljo za najina vprašanja, naju usmerjala in pomagala pri pisanju raziskovalne naloge in izvajanju poskusov. Zahvaljujema se ji tudi za pomoč pri iskanju literature, potrpežljivost pri pregledovanju rezultatov in nasvete za izboljšanje.

Zahvaljujema se tudi profesorici biologije, ki nama je pri izvajanju poskusov velikokrat priskočila na pomoč, in šoli, ki nama je omogočila delo v šolskem laboratoriju.

Hvaležni sva tudi vsem, ki so rešili anketo in nama tako pomagali pri samem delu.

Povzetek

Koloidno srebro postaja vse bolj priljubljeno zdravilno sredstvo, ki naj bi brez stranskih učinkov uničevalo patogene bakterije in glive. V raziskovalni nalogi smo želeli raziskati protimikrobno delovanje koloidnega srebra in njegovo potencialno genotoksičnost. Antimikrobno delovanje smo preizkusili na testnih mikroorganizmih *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae* s pomočjo metode difuzije na agarju z diski in z merjenjem optične gostote (OD₆₀₀) v prekonočni kulturi. Z mikrodilucijsko metodo smo določili minimalne inhibitorne in baktericidne/fungicidne koncentracije. Splošno strupenost in genotoksičnost smo preverjali z *Allium* testom. Koloidno srebro je izkazalo antimikrobno delovanje na vse testne mikroorganizme. Z nižjimi vrednostmi mitoznega indeksa in številnimi motnjami v delitvi celic pa smo dokazali tudi njegov genotoksičen učinek. To kaže na potrebo po dodatnih raziskavah na človeških celicah, saj morda ni tako nedolžno kot se zdi na prvi pogled.

1 UVOD

1.1 Raziskovalno vprašanje

Kakšen je protimikrobni učinek različnih koncentracij koloidnega srebra (10 ppm - 65 ppm) na glivo *Saccharomyces cerevisiae* – in na bakteriji *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*?

Ali ima koloidno srebro toksičen in genotoksičen vpliv na celice koreninskih vršičkov čebule *Allium cepa*?

1.2 Hipoteze

Mnoge publikacije dokazujejo, da ima koloidno srebro antibakterijski učinek in da deluje tudi proti virusom in glivam - Pies, 2012 ; Petica, Gavrilu, Lungu, Buruntea, Panzaru 2008 ; Tien, Tseng, Liao, Tsung, 2008.

HIPOTEZA 1: Koloidno srebro ima antimikrobni učinek na bakteriji *Escherichia coli* in *Bacillus cereus*, kar se bo pokazalo na inhibicijskih conah.

HIPOTEZA 2: Koloidno srebro bo delovalo antimikrobno na bakterije in na glive. Optična gostota bo v epruveh z dodanim koloidnim srebrom nižja kot pa v epruveh brez dodanega koloidnega srebra (v kontroli).

HIPOTEZA 3: Pri višjih koncentracijah koloidnega srebra, bo prišlo z dodajanjem indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično do manjšega obarvanja (ali pa sploh ne), saj bo koloidno srebro na bakterije in glive delovalo antimikrobno, in tako zavrlo metabolizem bakterij oz. gliv.

HIPOTEZA 4: Različne koncentracije koloidnega srebra bodo boljše zavrle metabolizem pri bakterijah (*Escherichia coli* ter *Bacillus cereus*), kot pa pri glivah (*Saccharomyces cerevisiae*), saj glive spadajo pod evkarionte in imajo kompleksnejšo zgradbo, ki je tudi bolj odporna na zunanje dejavnike.

HIPOTEZA 5: Pri *Escherichia coli*, ki je Gram negativna bakterija, se bodo različne koncentracije koloidnega srebra odzivale drugače, kot pri *Bacillus cereus*, ki spada pod Gram pozitivno bakterijo. Pri Gram negativni bakteriji (*Escherichia coli*), bo koloidno srebro boljše delovalo, saj ima veliko tanjšo celično steno. Zato ima pri Gram negativnih bakterijah koloidno srebro boljše antimikrobno delovanje.

HIPOTEZA 6: Koreninice bodo najdaljše pri čebulicah, ki so bile namočene v destilirano vodo (kontrola), najkrajše pa pri čebulicah, namočenih v koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm.

Strupene kemikalije zaustavljajo in upočasnjujejo rast korenin. Daljše kot so korenine, manjša je splošna strupenost in krajše kot so korenine, večja je splošna strupenost (Firbas, 2010).

HIPOTEZA 7: Največji mitotski indeks pričakujemo pri celicah čebulic, ki so bile namočene v koloidno srebro, najmanjši mitotski indeks pa pri celicah čebulic, ki so bile namočene v koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm.

HIPOTEZA 8: Koloidno srebro koncentracije 20-25 ppm in 65-70 ppm bo v celicah povzročilo kromosomske poškodbe in povzročilo motnje v celični delitvi, medtem ko tega v celicah čebulic, ki bodo namočene v destilirani vodi ne bo.

Visoke vrednosti koncentracij strupenih snovi stresno vplivajo na celično delitev (mitotski indeks) v vršičkih korenin in povzročijo motnje na kromosomih (Kopušar, 2006, povzeto po Špes, 2008). Že številni drugi raziskovalci (K. Babu, M. Deepa, S. Shankar, S. Rai) so prišli do ugotovitve, da koloidno srebro povzroča v celicah čebulic številne nepravilnosti (anafazni mostiček, c-metafaza, ...) in da ima torej citotoksičen učinek na celice.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Koloidno srebro – utekočinjeno srebro

Koloidno srebro je kovina neomejenih možnosti, ki je sestavljena iz izjemno majhnih srebrovih delcev. Glede na način pridobivanja (kemično, z mletjem ali elektrolizo), je odvisna velikost delcev. Delci srebra so lahko veliki manj kot en do več kot deset nanometrov. “Skupna vsebnost srebra je izražena v miligramih srebra na liter (mg / l) vode, ki se po številu izraža enako kot delci na milijon delcev vode (ppm)” (<http://www.koloidnosrebro.si/content/8-kaj-je-koloidno-srebro>). Srebrovi delci so v destilirani vodi in nosijo električni naboj. Ostajajo v lebdečem položaju, ker imajo enake naboje in se tako odbijajo. Naboj se lahko sčasoma zgubi, zato je priporočljivo koloidno srebro shranjevati v temnih prostorih. Da zagotovimo optimalno porazdelitev delcev, moramo pred uporabo koloidno srebro rahlo pretresti. Koloidno srebro zasledimo v dveh stanjih. Kadar se delci težko premikajo, govorimo o gelu, sicer pa o koloidni

raztopini. Prehodi med tema dvema stanjema so zabrisani, saj ti dve stanji lahko prehajata druga v drugo (Pies, 2012).

Beseda koloid je sistem, kjer so najmanjši delci zelo fino porazdeljeni. Ti delci so sestavljeni iz nekaj do nekaj tisoč atomov in lahko dosežejo velikost do 200 nanometrov. Če pridobijo koloidno srebro z generatorjem, je velikost delcev še manjša. O koloidnem sistemu lahko govorimo takrat, ko so izpolnjeni trije pogoji:

1. Prisotni so različni sestavni deli, na primer srebro in voda.
2. Sestavni deli pripadajo različnim fazam, na primer tekoče/trdno ali plinasto/tekoče.
3. Delci niso topni. Govorimo tudi o liofobnih raztopinah (lio=raztopiti in phobos=strah).

Za razliko s soljo, koloidni delci ne spremenijo fizikalnih lastnosti suspenzijskega sredstva (ledišče ali vrelišče) (Pies, 2012).

2.1.1 Zgodovinsko ozadje

Konec 19. stoletja je britanski kemik Thomas Graham vpeljal pojem koloidno srebro. Zdravilna moč koloidnega srebra je bil znana že dolgo, ampak zdravilne moči koloidnega srebra so se sčasoma izgubile. Že Stari Grki so poznali njegovo medicinsko vrednost. Kralji in vladarji so se prehranjevali iz srebrnih posod in pili iz srebrnih čaš in so tako le redko obolevali (Stergar, 2011).

Predvsem medicinska znanost je izpodrinila zdravljenje s koloidnim srebrom. Kitajci so pred več kot 5500 leti za akupunkturo sprva uporabljali les, trnje, na to so svojo metodo vedno bolj izpopolnjevali. Kasneje so začeli uporabljati zlato in srebrne igle, pri čemer so ugotovili, da srebro pomirja, zlato pa pri tej obliki stimulira (Morrill, May, Leek; 2013).

Avicenna, zdravnik in fiozof (980-1037) je srebro v medicini uporabljal na različne načine. Prvi je opisal argirijo (obarvanje kože zaradi prevelikega odmerka srebra). Prva zabeležena uporaba srebra v medicinske namene pa sega v osmo stoletje (Wadheda, 2005; Gavez, 2014).

2.1.2 Pridobivanje koloidnega srebra

Prvotni postopki pridobivanja koloidnega niso bili ravno poceni. Ob odkritju penicilina leta 1928, je bil množičen razmah na novo odkritih številnih antibiotikov. Medicina je vso pozornost posvečala antibiotikom in tako pozabila na koloidno srebro. Ko je medicina ugotovila, da ob

veliki uporabi antibiotikov se lažje razvijejo odporni rodovi bakterij, je pozornost ponovno namenila koloidnemu srebru (Gavez, 2014).

Koloidno srebro pridobivajo s pomočjo elektrolize. Med elektrolizo koloidno srebro dodajajo vodnim molekulam. Z vodnimi molekulami srebro tvori nove molekule, ki so pa izjemno nestabilne. Ob izpostavljanju močni svetlobi, molekule razpadejo. Za izdelovanje utekočinjenega srebra, morata biti srebro in voda visoke čistosti. Ob nečistoti, lahko v raztopini nastanejo srebrove soli.

Na tržišču je srebro kot protimikrobno sredstvo v različnih oblikah. Največkrat se pojavi kot težko topna sol (primer: AgCl in AgNO_3), kot nanosrebro v različnih dimenzijah, ali pa kot koloidno srebro. Koloidno srebro in različni produkti srebrovih soli so stabilne disperzije oziroma koloidne raztopine. Elementarno srebro, ki je v prahu, je potrebno predhodno dispergirati v vodi. Med seboj se razlikujejo v koncentracijah srebra ter velikosti delcev, kar neposredno vpliva na njihovo protimikrobno učinkovitost (Tomšič, 2009).

2.1.3 Zdravljenje s koloidnim srebrom

V našem prostoru koloidno srebro še ni uradno prijavljeno. Zasledimo lahko govorce o njegovih pozitivnih učinkih, ampak tako kot vsako zdravilo ima tudi negativne učinke.

Koloidno srebro je zmožno uničevati organizme, ki povzročajo bolezni. Človeku je predstavljeno, kot naravni antibiotik. Pomaga pri težavah z očmi, dihalnimi potmi, s problemi s koži, pri boleznih mišično-skeletnega aparata in živčnega sistema, itd.

Srebrovi ioni ovirajo pridobivanje energije celic bakterij ter gliv, in sicer tako, da prekinejo njihovo dihalno verigo. Tako celice izbijo tekočino in elektrolite, se izsušijo in skrčijo. Srebro vpliva tudi na nukleinske kisline bakterij. Koloidno srebro preprečuje prepis dednih informacij, ki je potrebna za razmnoževanje celic. V tkivu, v katerem je prisotno koloidno srebro, pride do drugačnih delitev celic. Dr. Rober O. Becker je odkril prednost hitrega celjenja tkiv s pomočjo koloidnega srebra (Pies, 2012).

Za koloidno srebro je značilno, da ga lahko uporabljamo na različne načine. Možna je tako zunanja, kot notranja uporaba. Za zunanjo uporabo ga apliciramo pri kožnih obolenjih (akne, bradavice, odprte rane, herpes, luskavica, glivične bolezni nog in podobne težave). Pri tem

lahko prizadeto mesto oskrbimo s krpico prepojeno s koloidnim srebrom. Lahko uporabimo metodo povijanja s povoji prepojenimi s koloidnim srebrom. Uporablja se večinoma pri odrgninah, urezninah in bradavicah. Z oralnim zaužitjem, je treba upoštevati nasvet, da koloidnega srebra takoj ne pogoltujemo, temveč ga zadržimo nekaj časa pod jezikom. S tem dosežemo, da se del koloidnega srebra absorbira skozi ustno sluznico. Oralna uporaba se priporoča pri napadu parazitov, gliv kvasovk... Za vnetje dlesni, prehladi, obolenja ustne votline in žrela, je priporočljivo grganje in spiranje s koloidnim srebrom. Ob očesnih obolenjih, se lahko uporabi kot kapljice za oči, ob obolenju dihalnih poti pa kot razpršilo. Pri zastrupitvi krvi, se lahko uporabi intravenozno (<http://www.koloidnosrebro.si/content/11-uporaba-koloidnega-srebra>).

Koloidno srebro pa se ne uporablja le v zdravstvu, temveč tudi v gospodinjstvu. Možnosti uporabe v gospodinjstvu so z namenom čiščenja, pranja, dezinfekcije površin, celo preprečevanja smradu (Pies, 2012).

Živinorejci imajo pozitivne izkušnje s koloidnim srebrom na živalih. Prav tako pa vrtnarji, ki koloidno srebro razpršijo po listih oz. dodajo vodi za zalivanje.

2.1.4 Nezaželeni stranski učinki

Pri prekomerni uporabi se lahko pojavijo stranski učinki. Kot stranski učinek je najbolj izpostavljena argirija. Nastane zaradi kopičenja srebra v tkivih, pri tem pa pride do sivkasto modrega obarvanja kolagena kože in nohtov. Argirijo dobimo, če jemljemo zelo visoke koncentracije koloidnega srebra dalj časa zapored (ne glede na način priprave: kot koloidno, ion ali kot sol). Stranski učinek ne povzroča zdravstvenih okvar, je pa modro sivkasto obarvanje trajno. V prekomernih količinah, ampak le v redkih primerih naj bi koloidno srebro povzročilo poškodbe ledvic in nevrološke težave. Na splošno lahko povemo, da je zdravljenje s srebrom zelo koristno, lahko pa za seboj skriva zelo majhno tveganje (<https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=571&c=35518&h=adc309962d81a1feb640&xt=.pdf>).

2.2 Bakterije

Bakterije so enocelični mikroorganizmi. Gre za prokariotske celice brez pravega celičnega jedra, ki jih uvrščamo v kraljestvo cepljivk, kot samostojno sistematsko enoto ob glivah, živalih in rastlinah (Strgar, 2002). Bakterije so mikroskopsko majhne, kar pomeni, da jih s prostim očesom ne vidimo. Gre za zelo raznoliko skupino organizmov. Veliko izmed njih je patogenih, kar pomeni, da so sposobne povzročiti bolezen pri gostitelju. Glede na obliko, sestavo, barvanje, sposobnost razgrajevanja snovi in genotip jih uvrščamo v družine, rodove in vrste (Dragaš, 2004).

Bakterije lahko opazujemo v svetlobnem mikroskopu, zaradi lažjega obarvanja jih barvamo. Barvila so lahko bazična ali kislila, tehnike barvanja pa pozitivne ali negativne – glede na to, ali obarvamo bakterije ali okolico. Največkrat za barvanje uporabimo barvanje po Gramu, na osnovi česa ločimo Gram pozitivne in Gram negativne bakterije. Pri bakterijah, ki imajo v celični steni veliko lipidov in voskov, je potrebno uporabiti barvanje po Ziehlju in Neelsenu (Dragaš, 2004).

Bakterije imajo tri temeljne oblike, in sicer: okrogle – koki, paličaste – bacili in spiralne – spirohete. Koki so običajno veliki približno 1 μm , bacili so 2-5 μm dolgi in 0,5-1,0 μm široki, spiralne bakterije pa so dolge 5-20 μm , debele pa 0,1-0,2 μm (Dragaš, 2004).

Tipične bakterije imajo citoplazmo, v kateri je jedru podobna dedna snov. V bakterijski celici se nahajajo še ribosomi, celico pa obdaja citoplazemska mrenica (membrana) in debela celična stena. Bakterije, ki se gibajo, pa imajo tudi bičke ali flagele. Veliko bakterij, predvsem po Gramu negativne bakterije, ima na površini drobne lasaste izrastke – fimbrije, ki jim omogočajo prilepjanje na sluznice (Dragaš, 2004).

Bakterije se razmnožujejo nespolno s prečno razpolovitvijo. Bakterijska populacija raste v značilni krivulji s štirimi fazami: faza mirovanja, faza rasti, faza ravnotežja in faza odmiranja (Dragaš, 2004).

Za rast in razmnoževanje potrebujejo bakterije vodo, anorganske snovi, vire energije, dušika in ogljika ter dejavnike za rast. Poleg teh dejavnikov sta rast in razmnoževanje odvisna tudi od koncentracije vodikovih ionov (pH), oksido-redukcijskega potenciala in seveda temperature. Večini za človeka škodljivih bakterij je za razvoj najugodnejše okolje z nevtralnimi pH (7,2-7,6), optimalna temperatura rasti pa je 35-37°C, čeprav se lahko razmnožujejo med 26 in 53°C.

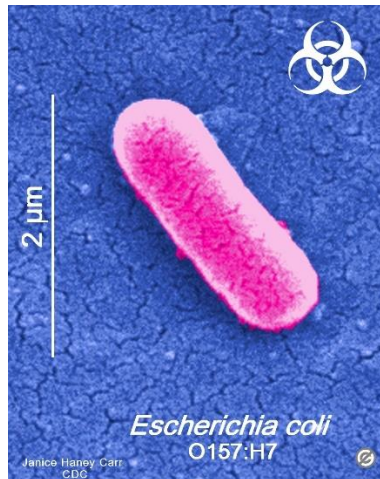
Bakterije iz okolja so ponavadi psihrofilne (imajo rade hladno) in se najbolj razmnožujejo pri 15°C, poznamo pa tudi bakterije okolja, ki imajo rade toploto (termofilne bakterije), ki potrebujejo za rast temperaturo okoli 55°C. Ob gejzirih rastejo nekatere bakterije celo pri temperaturah do 90°C (Dragaš, 2004).

Ločimo dve glavni skupini bakterij, glede na to, kakšna hranila uporabljajo za rast. Avtotrofne bakterije lahko živijo na anorganskih snoveh in so spodobne same izdelati vse potrebne sestavine iz preprostih anorganskih molekul. Heterotrofne bakterije pa za obstoj potrebujejo že pripravljene organske spojine, ki jih z encimsko razgradnjo razgradijo na manjše molekule, ki jih nato prenesejo v svojo celico in uporabijo za pridobitev energije ter za svojo rast in razvoj (Dragaš, 2004). Nekatere bakterije živijo s kisikom – aerobne, druge pa lahko živijo deloma ali popolnoma brez kisika (Strgar, 2002).

Bakterije gojimo na trdnih ali tekočih gojiščih, v katerih je vir dušika v obliki aminokislin in polipeptidov, mesni ali kvasni izvleček, kuhinjska sol, kalijeve in natrijeve fosfate in voda. Za trdnost gojišč dodamo polisaharid agar, ki ga pridobivamo iz morskih alg. V tekočih ali poltrdnih gojiščih rastejo bakterije razpršeno, kar lahko s prostim očesom vidimo kot motno tekočino, ali pa se usedejo na dno, kar vidimo kot usedlino (Dragaš, 2004).

2.2.1 *Escherichia coli*

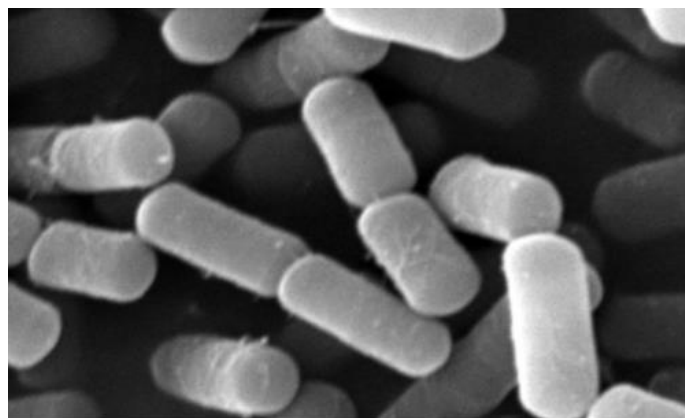
Escherichia coli je bakterija iz rodu *Escherichia*. Je gibljiva ali negibljiva Gram negativna bakterija, kar pomeni, da ni sposobna tvorjenja spor. Za uničenje bakterije *Escherichia coli* je tako dovolj že pasterizacija ali prevretje, sterilizacija, ki uničuje spore, ni potrebna. Razširjena je po vsem svetu. Živi v vodi, iztrebkih in črevesu vretenčarjev (tudi človeka) (Strgar, 2002). Je pomemben del človeške mikroflore, saj so nujno potrebne za normalno delovanje naše prebave. Večina sevov *Escherichia coli* je nepatogenih, vendar obstajajo sevi, ki povzročajo drisko in vnetja sečil, pri novorojenčkih pa lahko povzročijo neonatalni meningitis (CDC, 2014).



Slika 1: *E. coli* pod mikroskopom (Vir slike: <http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/gram-negative%20larger/E.coli%20O157%20H7.jpg>)

2.2.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je gram pozitivna aerobna bakterija iz rodu *Bacillus*. Najdemo jo v zemlji, zraku, živalskih in človeških iztrebkih, vodi, mleku, stročnicah, senu, volni, v nizkih koncentracijah pa je pogosto prisotna tudi v surovi, sušeni in kuhani hrani. V neugodnih razmerah je *Bacillus cereus* sposoben tvoriti zelo odporne spore, ki brez kakršnekoli škode prenesejo sušo in mraz. Za človeka je pogojna patogena. Tvori in izloča dva strupa, emetični povzročča bruhanje, diarealni pa drisko. Temperaturni optimum rasti za *Bacillus cereus* je 28 – 35°C (ZZV, 2013).



Slika 2: *Bacillus cereus* (Vir slike: <http://cdn.phys.org/newman/gfx/news/2013/structuralst.png>)

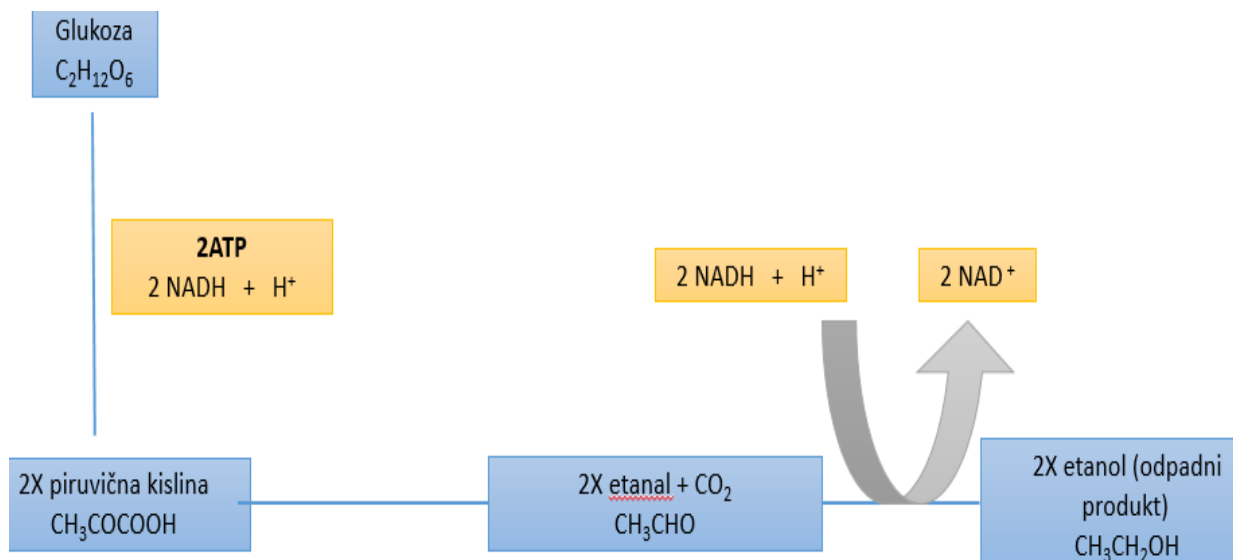
2.3 Glive

Glive (lat. *Fungi*) so evkariontski organizmi. Uvrščamo jih v posebno kraljestvo. Najdemo jih v vodi, zemlji in zraku. So pa tudi del normalne flore pri ljudeh in živalih. So heterotrofni organizmi, saj je njihova rast odvisna od organsko vezanega ogljika. Kraljestvo gliv delimo na štiri debla, glede na to, kako tvorijo spolne spore: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* in *Basidiomycota*. Poznamo pa nižje glive (plesni, kvasovke) ter višje glive (npr. gobe). Glive uspevajo počasneje od bakterij. Zmožne so rasti tudi pri nižjih pH vrednostih. Večina gliv ni patogenih, so pa pri nekaterih glivah spore zelo odporne. (Resnik, 2010)

2.3.1 Kvasovke

Kvasovke so enocelični organizmi, ki jih uvrščamo pod najenostavnejše evkarionte, pod kraljestvo gliv. Tako kot je značilno za evkarionte, imajo prisotno jedro, mitohondrije, endoplazmatski retikulum, golgijev aparat, vakuole, mikrotelesa in sekretorne vezikle. Spadajo pod netaksonomsko kategorijo gliv, za njih je značilno, da so zaprtotrošnice. Definirana so glede na morfološke in fiziološke značilnosti. Razmnožujejo se s cepitvijo ali z brstenjem. Pripadajo dvema glavnima taksonoma in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina*. (Raspor, 1996).

Za njih je značilno, da so fakultativni anaerobi. To pomeni, da kadar imajo na voljo kisik, presnavljajo sladkor (glukozo) z aerobnim celičnim dihanjem. Sladkor začnejo presnavljati anaerobno, ko jim zmanjka kisika – z alkoholnim vrenjem. (Vičar, 2011)



Slika 3: Prikaz alkoholnega vrenja, kot poteka v citoplazmi kvasovk, s pomočjo njihovih encimov (lasten vir)

Slika 1: Prikaz alkoholnega vrenja, kot poteka v citoplazmi kvasovk, s pomočjo njihovih encimov (vir slike: <http://www.druga.org/Video/kemija/KemijaInHrana/DelovniListi/Dijake/DelovanjeKvasovk/index.html>)

Kvasovke se delijo na prave in neprave kvasovke. Za neprave kvasovke je značilno, da imajo samo nespolni način razmnoževanja. K nepravim kvasovkam uvrščamo rodove: Candida, Rhodotorula, Torulopsis in vinske kvasovke.

Prednost kvasovk, v primerjavi s kompleksnejšimi gostitelji (npr. sesalske celice) je v tem, da so enostavnejše, njihova zgradba je veliko manj kompleksnejša, njihova gojenje pa je cenejše. Tudi samo njihovo poznavanje je veliko boljše od kompleksnejših gostiteljev. (Štagoj, M., Podobnik, M., 2006)

2.3.2 Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*

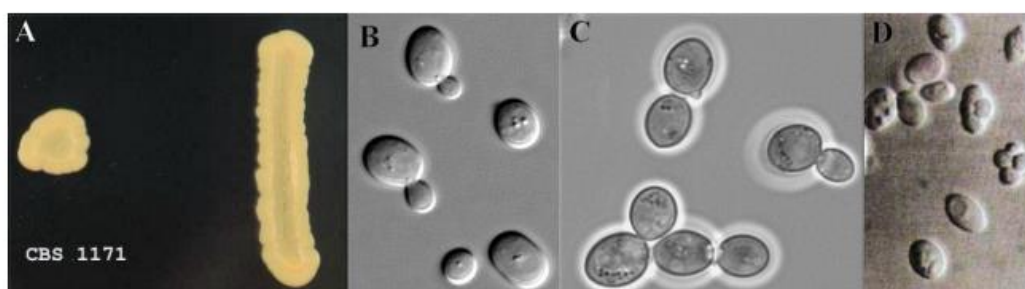
Kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae* je enocelični mikroorganizem iz kraljestva gliv. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je bolj poznana kot pekovska ali pivska kvasovka. Je tudi najbolj preučevan evkariontski mikroorganizem. Zapisi pričajo, da naj bi bila uporabljena že leta 6000 pr. n. št. pri varjenju piva v Sumeriji in Babilonu. (Feldman, 2005; Finžgar 2012)

Zaradi svojih lastnosti igra pomembno vlogo pri spoznavanju genetike. Njena rast je zelo hitra, saj potrebuje 90 minut (ponekod omenjeno 80 minut). Pivska kvasovka združuje lastnosti

prokariotov, kot je na primer rast v enostavnih in poceni gojiščih. (Štajoj, M., Podobnik, M., 2006)

Je zmožna fermentacije sladkorja. To lastnost že dolgo let uporabljajo pri proizvodnji alkoholnih pijač (npr. vino, pivo), prehrani (npr. kruh) in medicinski uporabi (npr. antibiotiki in encimi). (Kavanagh, 2005; Finžgar, 2012)

Na trdih gojiščih tvori pivska kvasovka okrogle kolonije z gladkim robom. Njen profil je na takšnih kolonijah gladek, zna pa se zgoditi, da je kolonija popkasto oblikovana. Kolonije imajo rahlo pigmentacijo- kremne barve (Walker, 2009; Finžgar, 2012) V tekočem gojišču lahko opazimo sedimentacijo.



Slika 1: Kolonije in oblika celice *S. cerevisiae* (Pitt in Hocking, 1999; CBS baza podatkov).

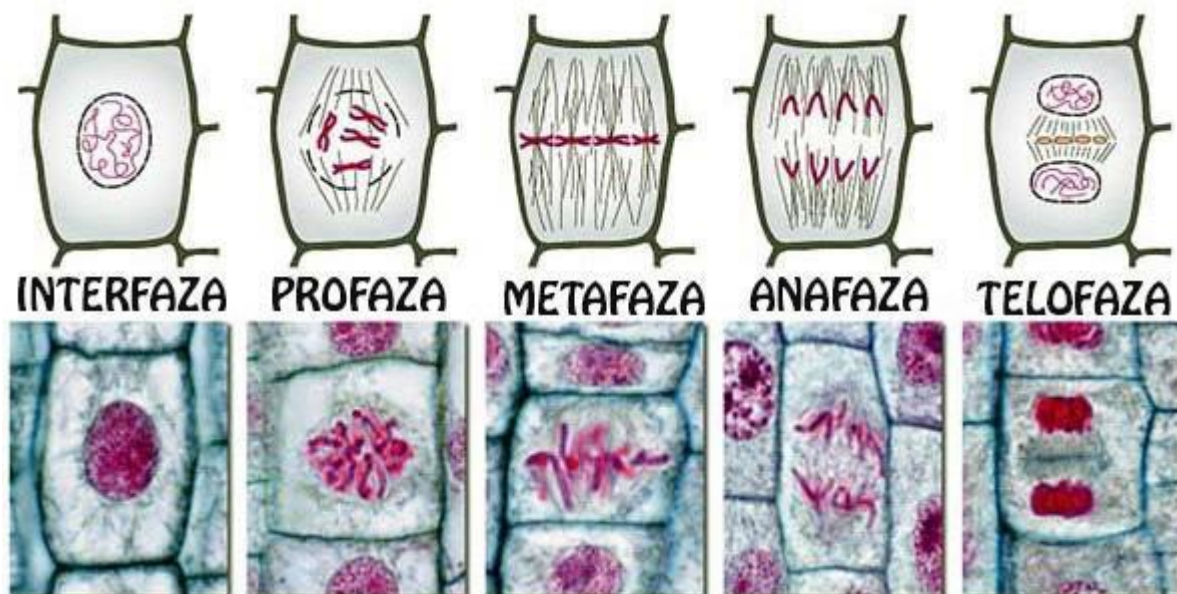
A: kolonija na MEA, B, C: celice kolonije različne povečave, D: aski in askospore

Slika 4: Kolonije in oblika *Saccharomyces cerevisiae* (vir: <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-4ZE093SV/>)

2.4 Mitoza

Mitoza je celična delitev, pri kateri se dedna snov materinske celice porazdeli med hčerinski celici, tako da ima vsaka od njiju enake dedne informacije. Hčerinski celici sta tako genetsko enaki materinski – pravimo, da sta njena klona. Mitoza omogoča mnogoceličarjem rast in obnovo poškodovanega tkiva ali izgubljenih delov telesa, enoceličarjem pa nespolno razmnoževanje (Strgar, 2002). Celoten celični cikel pa poleg mitoze zajema še interfazo:

1. **Interfaza** je stanje, v katerem se jedro celice nahaja med dvema delitvama. Kromosomi takrat niso vidni. V času interfaze se kromatin v jedru zbije v kromatinske nitke, dedni material (DNK) v celici pa se podvoji (Strgar, 2002).
2. **Mitoza** poteka neprekinjeno v štirih stopnjah:
 - a. **profaza**: delimo jo na zgodnjo, srednjo in pozno, ki jo imenujemo prometafaza. V profazi se dolge tanke niti (kromatin) spiralizirajo v krajše in debelejše kromosome. V celicah, ki imajo centriole, se število le-teh podvoji, nato pa se podvojeni centrioli pomaknejo proti poloma. V citoplazmi, v okolici centriolov začnejo nastajati mikrotubuli nastajajočega delitvenega vretena, jedrni ovoj in jedrce pa se razgradita (Svarog, 2013).
 - b. **metafaza**: niti delitvenega vretena med poloma in centromeri kromosomov so popolnoma izoblikovana. Te niti nato povlečejo kromosome na ekvatorialno ravnino celice. V metafazi so kromosomi najdebelejši in hkrati najkrajši, zato jih takrat najlažje opazujemo (Svarog, 2013).
 - c. **anafaza**: delimo jo na zgodnjo in pozno. V času zgodnje anafaze se pričneta kromatidi v centromeru ločevati ena od druge. V pozni anafazi pa pričnejo iz dvokromatidnih kromosomov nastajati enokromatidni. Niti delitvenega vretena te kromosome nato povlečejo iz ekvatorialne ravnine proti poloma celice (Svarog, 2013).
 - d. **telofaza**: prične se, ko se vsi kromosomi zberejo na polih. Takrat se delitveno vreteno razgradi, spet se pojavi jedrce in prične se oblikovati jedrni ovoj celice. Kromosomi se despiralizirajo (odvijajo in stanjšajo), zato jih pod svetlobnim mikroskopom ne moremo več videti (Svarog, 2013).
3. **Delitev citoplazme** se konča že v zadnji stopnji mitoze, telofazi, kar pomeni, da je ob končani delitvi jedra materinske celice tudi citoplazma že razdeljena. S tem sta nastali dve hčerinski celici (Svarog, 2013).



Slika 5: Interfaza in faze mitoze (vir slike: <http://svet-biologije.com/biologija/biologija-celije/biljna-celija/amitoza-i-mitoza/>)

2.5 Metode za določanje protimikrobne aktivnosti

2.5.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti določene snovi (Woods, 1999, povzeto po Arzenšek, 2009). Pri tej metodi razvrščamo mikroorganizme na občutljive, srednje občutljive ali odporne na antimikrobne snovi. Na gojišče najprej nacepimo kulturo zelenega mikroorganizma, nato pa na gojišče položimo filter papirčke – diske, prepojene s testirano antimikrobno snovjo. Snov iz diskov zaradi koncentracijskega gradienta difundira v gojišče, vendar koncentracija snovi z oddaljenostjo od diska pada. Če testirana snov deluje antimikrobno, potem mikroorganizmi v območju okoli diskov ne rastejo. (Woods, 1999, povzeto po Krznar, 2010).

2.5.2 Določevanje optične gostote v tekočem gojišču

S pomočjo merjenja številčnosti bakterij z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm lahko ugotovimo, ali koloidno zavira rast bakterij in gliv. Pri tem je intenziteta prepuščene svetlobe skozi suspenzijo odvisna od koncentracije celic v merjeni suspenziji. Večja kot je vrednost optične gostote, manj celic je v suspenziji (Vigil, 2005, povzeto po Želko, 2010). Ta

metoda je enostavna, dokaj hitra in ponovljiva metoda, zato jo uporabljajo številne raziskovalci. Pomembno je, da optična gostota raztopine ni prevelika, saj v tem primeru pride do odstopanja od linearne zveze med optično gostoto in številom organizmov v raztopini. V primeru, da je optična gostota višja od 0,5, je potrebno raztopino razredčiti (Koch, 1994, povzeto po Pohar, 2006).

2.5.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču

Pri tej metodi uporabljamo tekoče gojišče za mikroorganizme (YEPA za glive in brainheart za bakterije). Gojiščema dodajamo različne koncentracije koloidnega srebra in testirane mikroorganizme (glivo *Saccharomyces cerevisiae* ter bakteriji *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*). Vse to nanašamo v zelo majhnih količinah z avtomatsko pipeto na sterilni mikrotiterski plošči. Po inkubaciji dodamo ustrezen indikator in z njegovo pomočjo ugotavljamo, ali so še vedno prisotni mikroorganizmi. Na ta način lahko določimo minimalne inhibitorne (MIC) in minimalne bactericide/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije protimikrobih snovi (Tumpa, 2013).

“MIC je minimalna inhibitorna koncentracija (v slovenščini= MIK), to je najnižja koncentracija določenega protimikrobnega sredstva (pri nas koloidnega srebra), ki še zavira rast preiskovanega mikroorganizma. (Onawunmi, 1989)”.

“MBC je najnižja koncentracija, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti. Oziroma je najnižja koncentracija protimikrobne snovi, pri kateri po 24-urni inkubaciji preživi 0,1% bakterij (Cannilac in Mourey, 2010; Arzenšek, 2009)”.

Rezultati so bili glede na pričakovanja, tako da je metoda uspela. Metoda pa je zelo priročna za določevanje natančnih vrednosti koncentracije, potrebne za inhibicijo ali uničenje mikroorganizmov. Metoda je lahko izvedljiva, fleksibilna in dobro ponovljiva.

Metoda je zelo priročna za določevanje natančnih vrednosti koncentracije, potrebne za inhibicijo ali uničenje mikroorganizmov. Metoda je lahko izvedljiva, fleksibilna in dobro ponovljiva (Trumpak, 2013).

2.5.4 Čebulni test

Čebulni ali Allium test je test, s katerim ugotavljamo toksičnost snovi v zračnih, vodnih in kopenskih ekosistemih. Razkriva celosten vpliv snovi na rast čebule, pogled na celični nivo oz.

pregledovanje kromosomov v njej pa nam pokaže, kako določena snov vpliva na celične delitve in kromosome v celici (Firbas, 2010). Čebulni test izvajamo v treh stopnjah:

- Allium generalni toksični test – ta metoda je precej lahka in enostavna, temelji na različno hitri rasti in dolžini korenin testnih rastlin mlade čebule v določeni snovi. Odzivnost čebule na dolžino korenin imenujemo splošna toksičnost. Daljše kot so korenine, manjša je splošna strupenost (Firbas, 2010).
- Allium anafazno-telofazni genotoksični test daje podatke o celični delitvi (mitozi) in posledicah motenj v mitozi sami. Morebitne poškodbe se najbolj pokažejo v anafazi in telofazi celične delitve. Toksični učinki se odražajo v celični smrtnosti, genotoksični pa v poškodbah kromatina – anafazni most in fragmenti kromosomov, izgubljen kromosom, c-mitoza, itd (Firbas, 2010).
- Allium metafazni genotoksični test je test za ugotavljanje splošne celične toksičnosti in ravni genotoksičnosti. Z njim ugotavljamo predvsem različne poškodbe kromosomov, ki so posledica vnosa strupenih snovi v okolje (Firbas, 2010).

V raziskovalni nalogi smo izvajali Allium generalni toksični in pa Allium anafazno-telofazni genotoksični test.

3 MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 Priprava gojišč

3.1.1 YEPD-optimalno gojišče za kvasovke

3.1.1.1 Kemikalije

- kvasni ekstrakt (Fluka),
- pepton (Fluka),
- glukoza (Fluka).

3.1.2.2 Laboratorijske aparature

- tehtnica (Kern),
- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg)).

3.1.1.3 Laboratorijski pribor

- čaše (50mL, 100mL, 250mL in 500mL),
- merilni valji (50mL).

Gojišče pripravimo po postopku, ki ga je opisal Atlas (1993, povzeto po Pohar, 2006)

- | | |
|--------------------|-----------|
| • Kvasni ekstrakt | 5g |
| • Pepton | 10g |
| • D-glukoza | 10g |
| • Destilirana voda | do 500 mL |

Zatehtane sestavine smo raztopili v 400 mL destilirane vode in dolili vodo do 500 mL. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.1.2 Brainheart (BHI)-optimalno gojišče za bakterije

3.1.2.1 Kemikalije

- Brainheart

3.1.2.2 Laboratorijske aparature

- tehtnica (Kern),

- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg)).

3.1.2.3 Laboratorijski pribor

- čaša (500mL),
- steklena palčka,
- merilni valj (50mL).

Odtehtali smo 11,1 g že pripravljenega BHI in ga zmešali s 300 mL vode. Nato smo zelo dobro premešali s stekleno palčko. Gojišče smo avtoklavirali.

3.2 Priprava prekonočne kulture kvasovk in bakterij

V epruveto s 7 mL sterilnega medija YEPD smo aseptično prenesli kvasovke. Nato smo dobro pretresli in inkubirali pri sobni temperaturi preko noči.

V epruveto s 7 mL sterilnega medija BHI smo aseptično eno kolonijo bakterije *E. coli* oziroma *Bacillus cereus*, dobro pretresli in inkubirali pri temperaturi 37°C preko noči.

3.3 Priprava standardne raztopine

Tabela 1: Priprava standardne raztopine

Standardna raztopina		Destilirana voda (do 25 mL)
50 ppm	iz 65 ppm odpipetiramo 19,23 mL	5,77 mL
40 ppm	iz 50 ppm odpipetiramo 20,20 mL	5 mL
30 ppm	iz 40 ppm odpipetiramo 18,75 mL	6,25 mL
20 ppm	iz 30 ppm odpipetiramo 16,67 mL	8,33 mL
10 ppm	iz 65 ppm odpipetiramo 3,85 mL	21,15 mL

3.2 Material

3.2.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

3.2.1.1 Delovni mikroorganizem

V poskusu smo uporabili prekonočno kulturo bakterij *Escherichia coli* in *Bacillus cereus*, ki ju hranimo v šolskem laboratoriju.

3.1.1.2 Osnovni material

- petrijevke s sterilnim hranilnim agarjem.

3.1.1.3 Kemikalije

- koloidno srebro 65-70ppm (društvo Vivere),

- alkohol.

3.1.1.4 Laboratorijske aparature

- Gorilnik (Campingaz).

3.1.2.5 Laboratorijski pribor

- spatula Drigalski,
- filter papirčki – diski,
- bakteriološka zanka,
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki - LLG Micropipette (10-100 μ L, 1-10mL).

3.1.2 Določevanje optične gostote

3.2.2.1 Delovni mikroorganizem

V poskusu smo uporabili sev bakterij *Bacillus cereus* in *Escherichia coli* in glive kvasovke.

3.1.2.2 Kemikalije

- Koloidno srebro 65-70 ppm (društvo Vivere).

3.1.2.3 Laboratorijske aparature

- spektrofotometer UV/VIS (Vernier),
- prenosni računalnik z računalniškim programom Logger Pro,
- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg),
- stresalnik za epruvete (vortex) RS-VA10 (Phoenix),
- gorilnik (Campingaz),
- inkubator (Binder).

3.1.2.4 Laboratorijski pribor

- 60 epruвет (18×100 mm),
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki - LLG Micropipette (10-100 μ L, 1-10mL),

- kivete (Ratiolab, 27110).

3.2.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči

3.2.3.1 Delovni mikroorganizem

V poskusu smo uporabili sev bakterij *Bacillus cereus* in *Escherichia coli* in glive kvasovke.

3.2.3.2 Osnovni material

- mikrotitrski plošče s 96 luknjicami.

3.2.3.3 Kemikalije

- Koloidno srebro 65-70 ppm (društvo Vivere),
- Indikator iodonitrotetrazolium vijolično (Sigma-Aldrich).

3.2.3.4 Laboratorijske aparature

- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg),
- stresalnik za epruvete (vortex) RS-VA10 (Phoenix),
- gorilnik (Campingaz),
- inkubator (Binder).

3.2.3.5 Laboratorijski pribor

- laboratorijske rokavice (NITRIL),
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki - LLG Micropipette (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10mL),
- avtomatska pipeta Transferpette S (100-1000 μ L).

3.1.4 Čebulni test

3.2.4.1 Delovni mikroorganizem

V poskusu smo uporabljali čebulice *Allium cepa*, premer 1,5 – 2 cm.

3.1.4.2 Kemikalije

- barvilo karmin ocet,
- destilirana voda,
- koloidno srebro 20-25ppm, 110 ml (društvo Vivere),
- koloidno srebro 65-70ppm, 110 ml (društvo Vivere).

3.1.4.3 Laboratorijske aparature

- gorilnik (Campingaz),
- mikroskop (Leica, ICC 50).

3.1.4.4 Laboratorijski pribor

- epruvete (volumen: 11 mL 18×100 mm),
- ravnilo,
- pribor za mikroskopiranje.

3.2 Metode dela

3.2.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

Ob ognju smo z avtomatsko pipeto iz prekonočne kulture odpipetirali 200 μ L bakterijske suspenzije in jo nanegli na ploščo sterilnega agarja. Spatulo smo potopili v alkohol in jo nad gorilnim obžgali. Z njo smo razmazali suspenzijo bakterij enakomerno po gojišču. Petrijevko smo pustili v bližini ognja, da se je površina posušila. S sterilno pinceto smo prijeli sterilne diske in jih namočili v koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm, nato pa na eno ploščo enakomerno nanegli štiri namočene diske. Petrijevke smo zaprli in jih 24 ur inkubirali pri 37°C.

3.2.2 Določevanje optične gostote

Prvi dan poskusa smo v epruvete s 7 μ L sterilnega gojišča YEPD za kvasovke oz. BHI za bakterije aseptično nacepili po 100 μ L prekonočne kulture kvasok/*Escherichia coli*/ *Bacillus cereus* in dobro premešali z vorteksom. Pri bakterijah smo naredili 10 ponovitev, pri kvasovkah pa 9. V vsako epruveto smo s pomočjo avtomatskih pipet dodali še 10 mL koloidnega srebra koncentracije 60-75 ppm.

Nastavili smo tudi tri kontrole po 10 ponovitev (pri kvasovkah 9), kjer je ena epruveta vsebovala 7 mL gojišča (pri kvasovkah YEPD, pri bakterijah pa HBI), 100 μ L prekonočne kulture (kvasovk oziroma *Escherichia coli* oziroma *Bacillus cereus*), ni pa vsebovala koncentracije koloidnega srebra.

Epruvete s kvasovkami smo pustili na sobni temperaturi za 24 ur, epruvete z bakterijami pa smo inkubirali 2 dni pri temperaturi 37°C.

Suspenzijo smo po pretečenem času rahlo premešali, nato pa jo prelili v kiveto in s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 600 nm. Spektrofotometer smo predhodno umerili na tekoče gojišče YEPD za glive oz. BHI za bakterije.

Tabela 2: Prikaz materiala, ki ga potrebujemo za nastavitev poskusa za kvasovke







Za 1 epruveto potrebujemo	Kontrola (10 epruвет)	Vse skupaj	
1 mL koncentracije 65 ppm koloidnega srebra	/	10 mL koloidnega srebra	 (10) + kontrola
7 mL gojišča YEPD	70 ml gojišča YEPD	140 mL gojišča YEPD	 (10)
100 μ L prekonočne kulture kvasovk	1000 μ L prekonočne kulture kvasovk	2000 μ L prekonočne kulture kvasovk	

Tabela 3: Prikaz materiala, ki ga potrebujemo za nastavitev poskusa za bakterije

Za 1 epruveto potrebujemo		Kontrola (10 epruvet)		Vse skupaj	
<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>		
1 mL koncentracije 65 ppm koloidnega srebra	1 mL koncentracije 65 ppm koloidnega srebra	/	/	20 mL koloidnega srebra	<i>E. coli</i>  (10)
7 mL gojišča BHI	7 mL gojišča BHI	70 ml gojišča YEPD	70 ml gojišča YEPD	280 mL gojišča YEPD	+ kontrola  (10)
100 µL prekonočne kulture <i>E. coli</i>	100 µL prekonočne kulture kvasovk <i>B. cereus</i>	1000 µL prekonočne kulture kvasovk	1000 µL prekonočne kulture kvasovk	4000 µL prekonočne kulture kvasovk	<i>B. cereus</i>  (10) + kontrola  (10)

3.2.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči

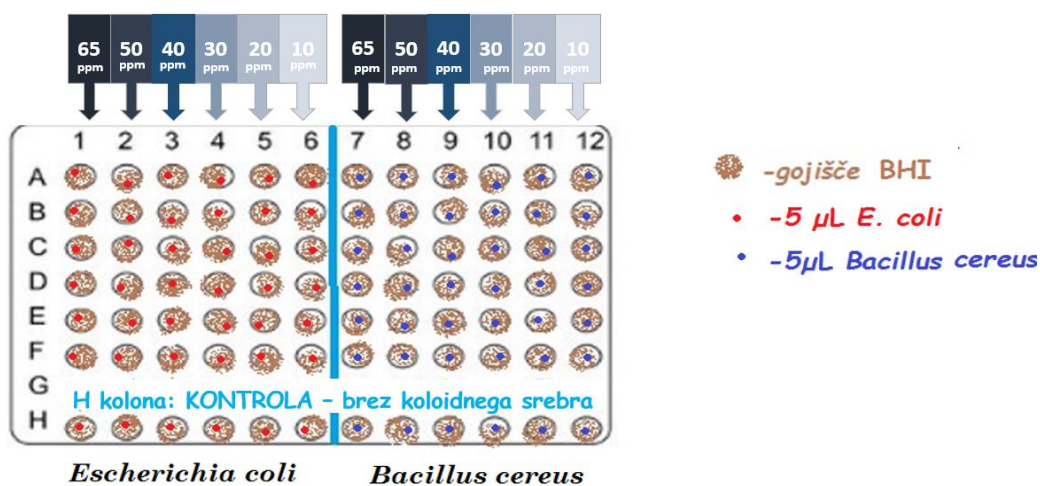
3.2.3.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči pri glivah (*Saccharomyces cerevisiae*)

Vzeli smo sterilno mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami. V prvih 6 stolpcih smo z avtomatsko pipeto dodali 200 µL steriliziranega YEPD tekočega gojišča (za glive). V nadaljevanju smo v vsako luknjico dodali po 5 µL suspenzije prekonočne kulture kvasovk. Nato smo dodali različne koncentracije koloidnega srebra. Različne koncentracije koloidnega srebra smo dobili s

pripravo standardne raztopine opisane v začetku tretjega poglavju. V stolpec števila 1 smo dodali 100 μL koncentracije 65 ppm koloidnega srebra. V preostale stolpce smo pa dodali različne 100 μL koncentracije koloidnega srebra (koncentracije: 50 ppm-10ppm). Nato smo mikrotitrsko ploščo pokrili ter inkubirali 3 ure pri 28°C.

3.2.3.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišči na mikrotitrski plošči pri bakterijah (*Escherichia coli* in *Bacillus cereus*)

Vzeli smo sterilno mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami. Označili smo jo na polovico, saj v prvih 6 stolpcev bomo dodali *Escherichia coli*, v preostale stolpce pa *Bacillus cereus*. V vseh 12 stolpcev smo z avtomatsko pipeto dodali 200 μL steriliziranega BHI (brainheart) tekočega gojišča (za bakterije). V nadaljevanju smo v vsako luknjico s ključno šestim stolpcem dodali po 5 μL *Escherichia coli*. V preostale pa 5 μL *Bacillus cereus*. Nato smo dodali različne koncentracije koloidnega srebra. Različne koncentracije koloidnega srebra smo dobili s pripravo standardne raztopine opisane v začetku tretjega poglavja. V prvi stolpec smo nanесли koncentracijo 65 ppm koloidnega srebra (v preostale luknjice pa vedno manjše koncentracije: 50-10 ppm). Enako smo ponovili za *Bacillus cereus*. Nato smo mikrotitrsko ploščo pokrili ter inkubirali 3 ure pri 37°C.



Slika 6: Prikaz mikrotitrsko plošče za *Escherichia coli* in *Bacillus cereus* (lastni vir)

- V 1 in 7 stolpec koncentracija: 65 ppm koloidnega srebra
- V 2 in 8 stolpec koncentracija: 50 ppm koloidnega srebra
- V 3 in 9 stolpec koncentracija: 40 ppm koloidnega srebra
- V 4 in 10 stolpec koncentracija: 30 ppm koloidnega srebra
- V 5 in 11 stolpec koncentracija: 20 ppm koloidnega srebra
- V 6 in 12 stolpec koncentracija: 10 ppm koloidnega srebra

Nastavitev kontrole

Ponovimo enako metodo, s tem da ne dodamo različnih koncentracij koloidnega srebra. Pri dodajanju indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično mora priti do spremembe barve. S tem smo se prepričali, da ima res koloidno srebro učinek na delovanje metabolnih poti posameznih mikroorganizmov.

Po končani inkubaciji smo v vsako luknjico dodali po 30 μL indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično, s katerim zaznavamo metabolno aktivnost preiskovanih organizmov. Med celičnim dihanjem se namreč tvori $\text{NADH} - \text{H}^+$, ki reagira z indikatorjem. Pri tem pride do spremembe barve indikatorja: iz rumene barve se spremeni v rdečo barvo. Sprememba barve torej pomeni metabolno aktivnost mikroorganizma. Če se barva ne spremeni, je koloidno srebro reagiralo ter tako popolnoma preprečilo metabolizem mikroorganizma. Za vsako koncentracijo koloidnega srebra smo naredili 4-5 ponovitev.

3.2.4 Čebulni test

Čebulni test smo izvajali pri 20-25 ppm in 65-70 ppm koncentriranem koloidnem srebru. Da bi lahko ugotovili, kakšen vpliv ima koloidno srebro na rast in celično delitev celic čebule *Allium cepa*, smo naredili še kontrolo v destilirani vodi. Suhe liste čebulice smo pred izvedbo poskusa olupili, pri tem smo pazili, da nismo poškodovali koreninskega obroča. Poskus smo izvajali na sobni temperaturi, stran od direktne sončne svetlobe. Za vsako testirano tekočino smo vzeli 11 epruвет in vsako epruветo napolnili do vrha in nanje namestili čebulice. Drugi dan poskusa smo, kjer je bilo potrebno, nadomestili tekočino, ki je izhlapela z destilirano vodo. Tretji dan smo izločili epruветi s čebulicama, ki imata najkrajše oz. najdaljše korenine, nato pa vsaki čebulici odrezali po eno koreninico in jo za 24 ur dali v fiksativ. Četrty dan smo fotografirali in izmerili dolžino najdaljše koreninice za vsako čebulico, prav tako pa smo pripravili tudi mikroskopske preparate za opazovanje faz mitoze.

Za opazovanje faz mitoze pod mikroskopom smo tretji dan poskusa odrezali 2-3mm dolge koreninice čebule in jih za 24 ur dal v epruветo s fiksativom (etanol-ledocetno kislino). Naslednji dan smo fiksativ odlili in dolili 1-2 ml barvila karmin ocet in vse skupaj segrevali na zmernem ognju 3-4 minute, da je barvilo rahlo zavrelo. Barvanje smo po 3-4 minutah prekinili in odlili barvilo. Posamične koreninice smo nato prenesli na objektno stekelce in dodali kapljico

barvila karmin ocet. Koreninske vršičke smo pristrigili na dolžino 2mm, preostanek pa zavrgli. Vršičke smo pokrili s krovnim steklom in papirnato brisačo in jih s pomočjo tope konice svinčnika mečkali, da je nastala kašasta mešanica in da so se celice razporedile v eno plast. Mikroskopski preparat smo na koncu nekajkrat previdno potegnili čez plamen.

Za vsako testno tekočino smo pregledali 5 vršičkov različnih čebulic, iz njih naredili 5 preparatov in v vsakem pregledali po 200 celic, jim določili fazo celičnega cikla, zabeležili število anomalij in s pomočjo dobljenih podatkov izračunali mitotski in metafazni indeks.

Enačba za izračun mitotskega indeksa:

$$\text{MITOTSKI INDEKS} = \frac{(P+M+A+T)}{N} \times 100$$

P – profaza, M – metafaza, A – anafaza, T – telofaza

N – število vseh celic

4 REZULTATI

4.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

Po 24 urah inkubiranja ni bilo vidnih inhibicijskih con, kar lahko vidimo tudi na sliki 5. Tudi po 48 urah inhibicijske cone niso bile vidne.



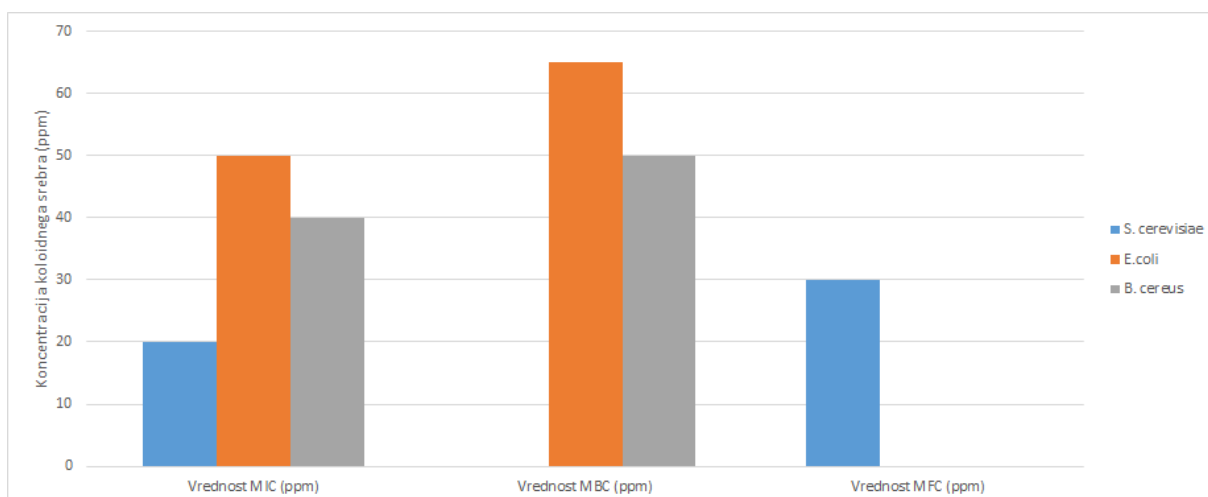
Slika 7: Difuzijski antibiogram brez vidnih inhibicijskih con (*Bacillus cereus*) (lasten vir)

4.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči

Pri vseh treh preiskovanih mikroorganizmih smo preučevali MIC ter pri bakterijah še MBC in pri glivah MFC.

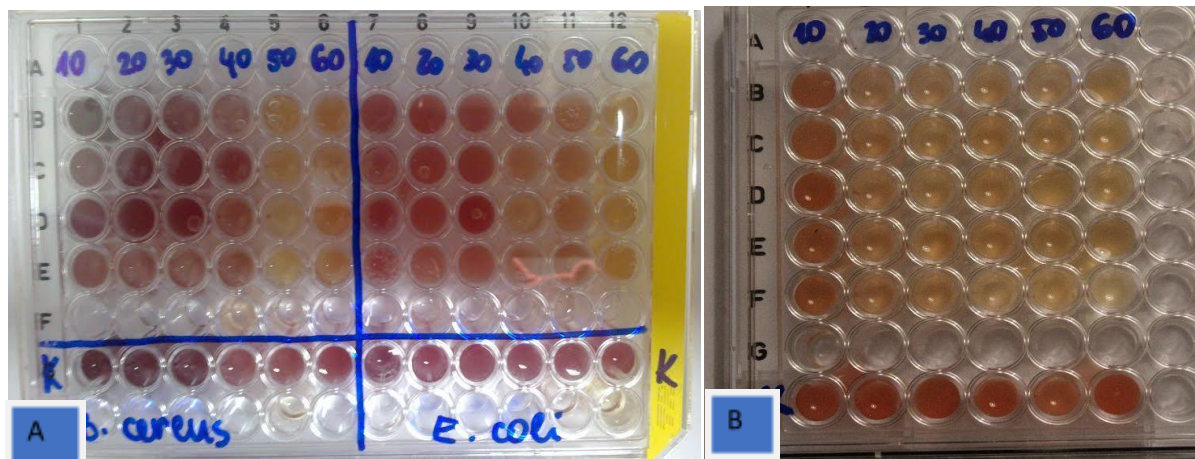
Tabela 4: Vrednosti MIC/MBC/MFC (ppm)

Testni mikroorganizem	Vrednost MIC (ppm)	Vrednost MBC (ppm)	Vrednost MFC (ppm)
<i>S. cerevisiae</i>	20	-	30
<i>E.coli</i>	50	65	-
<i>B. cereus</i>	40	50	-



Graf 1: Grafični prikaz vrednosti MIC/MBC/MFC (ppm)

Iz rezultatov lahko vidimo, da sta *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*, kot predstavnika prokariontov, manj dovzetna na koloidno srebro, kot pa kvasovke, predstavnice evkariontov. Pri kvasovkah že pri 20 ppm koncentraciji koloidnega srebra ni prišlo do velike spremembe obarvanja indikatorja, kar pomeni, da je koloidno srebro delovalo že pri majhni koncentraciji koloidnega srebra.

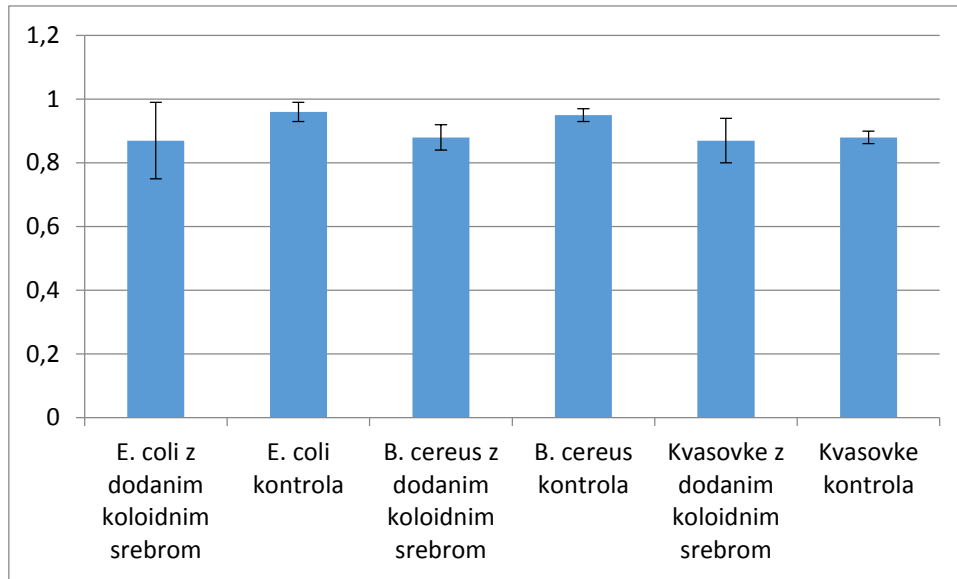


Slika 8: Mikrotitrna plošča z vidnimi obarvanji indikatorja, A: BATERIJE, B: GLIVE (lastni vir)

4.3 Določevanje optične gostote

Tabela 5: Povprečne vrednosti OD testnih organizmov s standardnimi odkloni in oceno številčnosti celic

	<i>E. coli</i> z dodanim koloidnim srebrom	<i>E. coli</i> kontrola	<i>B. cereus</i> z dodanim koloidnim srebrom	<i>B. cereus</i> kontrola	<i>S. cerevisiae</i> z dodanim koloidnim srebrom	<i>S. cerevisiae</i> kontrola
Povprečna vrednost OD₆₀₀	0,87	0,96	0,88	0,95	0,087	0,88
Standardni odklon	±0,12	±0,03	±0,04	±0,02	±0,07	±0,02
Ocena številčnosti celic /mL	$6,96 \times 10^8$	$7,68 \times 10^8$	$7,04 \times 10^8$	$7,60 \times 10^8$	$6,96 \times 10^8$	$7,04 \times 10^8$



Graf 2: Optična gostota bakterij in gliv v epruveh s koloidnim srebrom in brez

4.4 Čebulni test



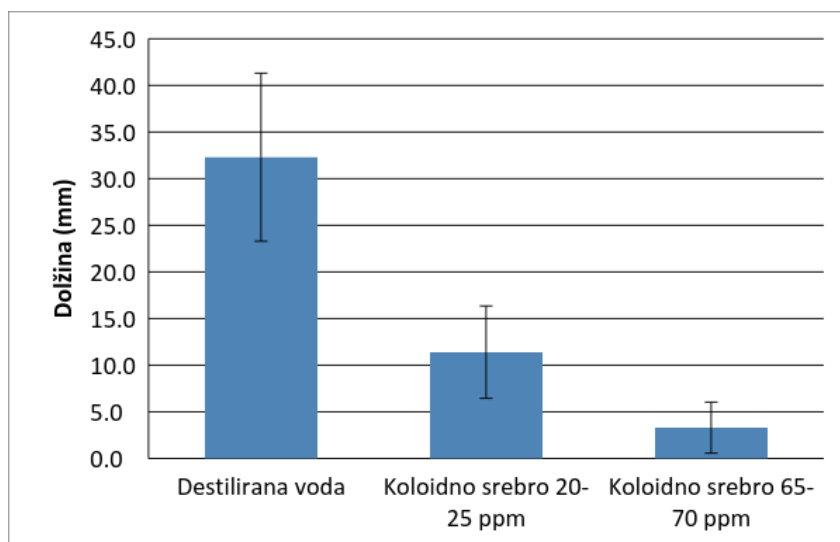
Slika 9: Čebulice v destilirani vodi (lasten vir)



Slika 10: Čebulice v destilirani vodi (lasten vir)



Slika 11: Čebulice v koloidnem srebru 65-70 ppm (lastni vir)



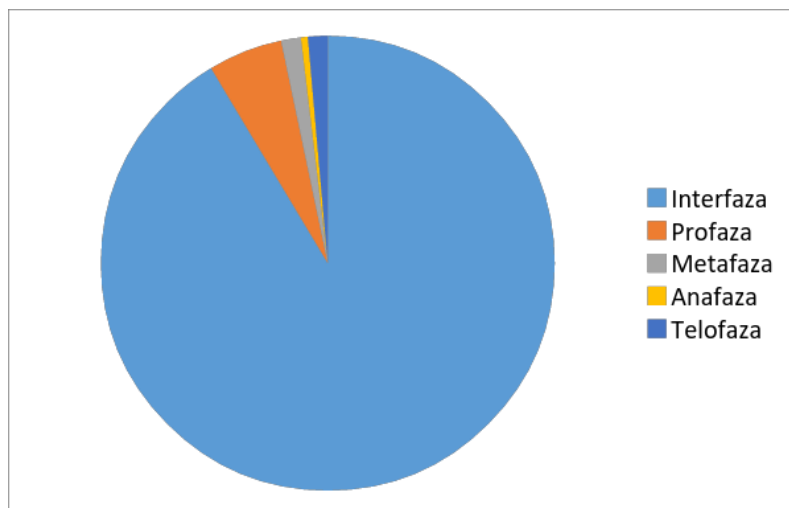
Graf 3: Povprečna dolžina koreninic v destilirani vodi, koloidnem srebru 20-25 ppm in 65-70 ppm

Tabela 6: Povprečna dolžina koreninic s standardnimi odkloni

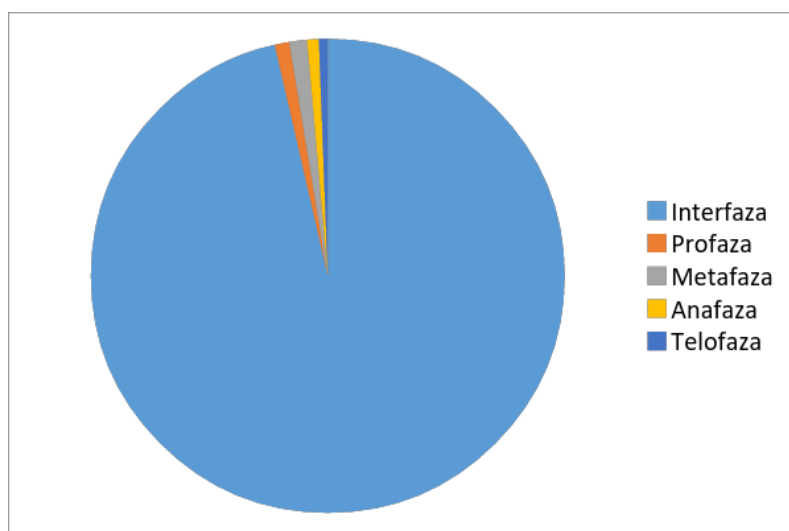
	Destilirana voda	Koloidno srebro 20-25 ppm	Koloidno srebro 65-70 ppm
Dolžina (mm)	32,3	11,4	3,3
Standardni odklon	9,0	5,0	2,7

Tabela 7: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla

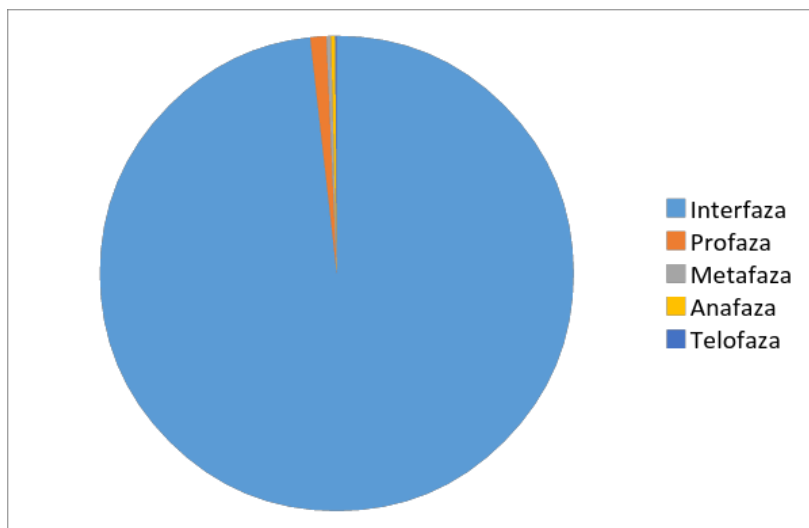
Faza celičnega cikla	Kontrola	Koloidno srebro 20-25 ppm	Koloidno srebro 65-70 ppm
Interfaza	914	964	982
Profaza	53	10	11
Metafaza	14	12	3
Anafaza	5	8	3
Telofaza	14	6	1
Vseh prešteti celic	1000	1000	1000



Graf 4: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (destilirana voda)



Graf 5: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (koloidno srebro 20-25 ppm)



Graf 6: Število celic v posamezni fazi celičnega cikla (koloidno srebro 65-70 ppm)

Mitotski indeks za celice koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v destilirani vodi:

$$MI = \frac{53+14+5+14}{1000} * 100$$

$$MI = 8,6 \%$$

Mitotski indeks za celice koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v 20-25 ppm koncentriranem koloidnem srebru:

$$MI = \frac{9+11+8+6}{1000} * 100$$

$$MI = 3,4 \%$$

Mitotski indeks za celice koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v 65-70 ppm koncentriranem koloidnem srebru:

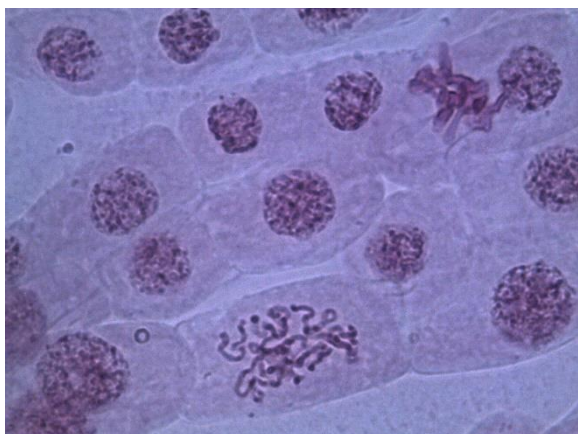
$$MI = \frac{11+3+3+1}{1000} * 100$$

$$MI = 1,8 \%$$

Tabela 8: : Čas gojenja, povprečna dolžina korenin in mitotski indeks za celice, namočene v določeno tekočino

Teočina	Čas gojenja (ure)	Povprečna dolžina korenin čebulice (mm)	Mitotski indeks (%)
Destilirana voda-kontrola	72	32,3	8,6
Koloidno srebro 20-25 ppm	72	11,4	3,4
Koloidno srebro 65-70 ppm	72	3,3	1,8

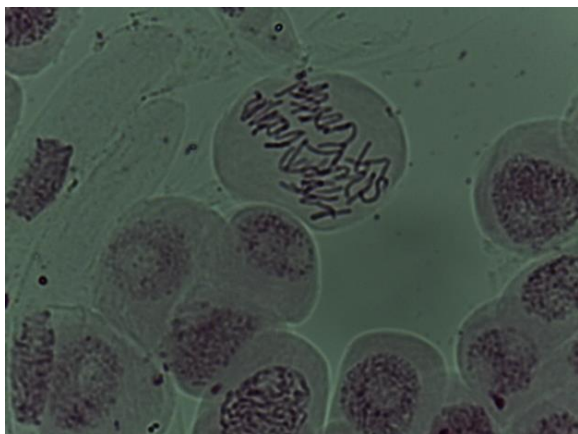
Med opazovanjem celic smo poleg normalnih faz celičnega cikla opazili tudi številne anomalije.



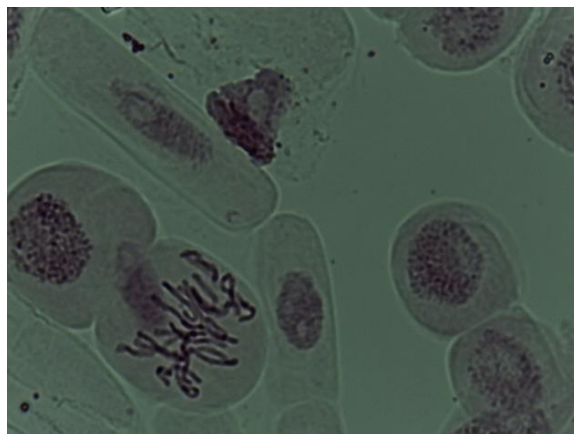
Slika 12: Pozna profaza, kontrola, 1000x povečava (lastni vir)



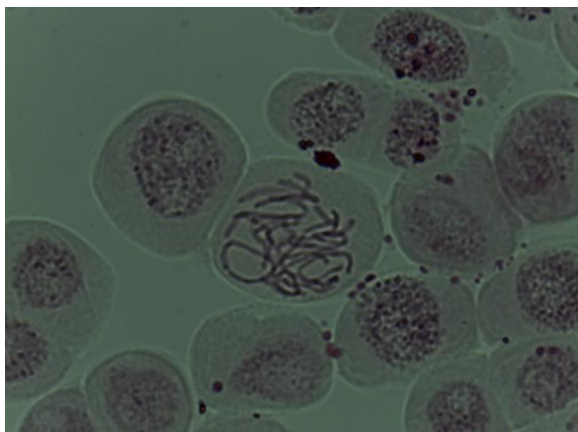
Slika 13: Anafaza z nekaterimi nerazdvojenimi kromatidami kromosomov, koloidno srebro 65-70 ppm, 400x povečava (lastni vir)



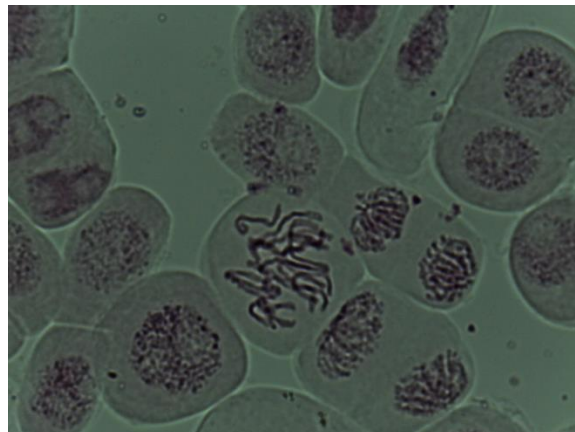
Slika 14: Anafazni mostički, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava (lastni vir)



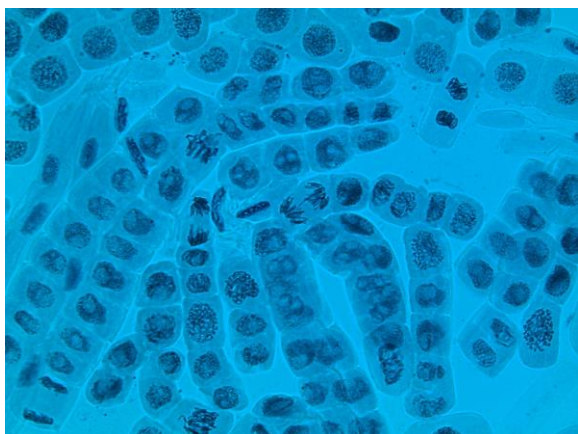
Slika 15: Metafaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava, (lastni vir)



Slika 16: Profaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava (lastni vir)



Slika 17: Profaza in telofaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 1000x povečava (lastni vir)



Slika 18: Anafazni mostiček, metafaza, telofaza, koloidno srebro 20-25 ppm, 400x povečava (lastni vir)

5 RAZPRAVA

5.1 Metoda difuzije v trdnem gojišču z diski

Hipoteza 1 je zavržena, saj z metodo difuzije v trdnem gojišču nismo uspeli dokazati antimikrobnega delovanja na nobeno izmed bakterij, saj so se bakterije (*Escherichia coli* in *Bacillus cereus*) razmnoževale neovirano okoli diskov, prepojenih s koloidnim srebrom, in inhibicijske cone se niso pojavile. Možen razlog, da ni bilo inhibicijskih con je ta, da koloidno srebro ni uspešno difundiralo iz diskov v gojišče. Predvidevamo, da koloidnemu srebru ne ustreza gost medij-agar. Za večjo zanesljivost bi morali poskus ponoviti.

5.2 Določevanje optične gostote v tekočem gojišču

Vpliv koloidnega srebra na delitev celic bakterij in gliv smo ugotavljali s primerjavo optične gostote pri valovni dolžini 600 nm med bakterijami oz. glivami, ki so rasle z dodanim koloidnim srebrom in bakterijami oz. glivami, ki so rasle brez dodanega koloidnega srebra. Vrednosti optične gostote bakterij (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*), ki so rasle v prisotnosti koloidnega srebra, so bile nižje kot pa vrednosti optične gostote bakterij (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*), ki so rasle brez dodanega koloidnega srebra ($p < 0,05$). Zaradi nižje vrednosti optične gostote lahko rečemo, da je bilo število celic manjše v primeru, ko so bakterije rasle z dodanim koloidnim srebrom, saj nizka optična gostota pomeni hkrati tudi manj celic. Iz tega pa sklepamo, da je imelo koloidno srebro zaviralni učinek na delitev obeh vrst bakterij. Vrednosti optične gostote gliv kvasovk, ki so rasle v prisotnosti koloidnega srebra, so bile sicer nekoliko nižje kot vrednosti optične gostote gliv kvasovk, ki so rasle brez dodanega koloidnega srebra, vendar je $p > 0,05$, kar pomeni, da razlike med vrednostmi niso statistično pomembne, zaradi česar ne moremo sklepati na antifungicidni učinek koloidnega srebra.

Naša hipoteza je tako le delno potrjena, saj je koloidno srebro delovalo antimikrobno le na bakterije (tako na Gram negativne kot tudi Gram pozitivne), medtem ko pri kvasovkah antimikrobnega učinka nismo zaznali.

Ocena metode in možni viri napak

Rast bakterij smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD) s spektrofotometrom pri valovni dolžini 600 nm. Optično gostoto smo merili v področju, kjer rast bakterij ni več nujno linearna, zaradi česar se zmanjša zanesljivost te metode. Če bi želeli zanesljivejše podatke, bi morali vzorce redčiti, saj se področje, kjer je zveza med optično gostoto pri 600 nm in koncentracijo linearna, nahaja med 0,2 in 0,5 (Hafner, 2008). Prav zaradi tega so naši podatki nezanesljivi, zato ne moremo s vso gotovostjo trditi, da koloidno srebro antimikrobno deluje le na bakterije, na glive pa ne.

5.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči

HIPOTEZA 3:

Pri višjih koncentracijah koloidnega srebra, bo prišlo z dodajanjem indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično do manjšega obarvanja (ali pa sploh ne), saj bo koloidno srebro na bakterije in glive delovalo protimikrobno, in tako zavrlo metabolizem bakterij oz. gliv.

Antimikrobni učinek koloidnega srebra, ki so ga že dokazali Morrill K., May K., Leek D., Langland N.; Lansdown A., Gussemme De B., Hasselt Van P, Gashe , je bil izrazitejši pri glivah. Koloidno srebro je pri bakterijah (*Escherichia coli* in *Bacillus cereus*) imelo pri višjih koncentracijah večji protimikrobni učinek. Z dodajanjem indikatorja smo dokazali NADH – H⁺, ki se tvori med celičnim dihanjem. Ob prisotnosti NADH – H⁺, je indikator zreagirala in se obarval. Temnejša barva rdeče je pomenila večjo prisotnost mikroorganizmov.

Do manjšega obarvanja pri višjih koncentracijah je prišlo, ker višje koncentracije koloidnega srebra vsebujejo več srebrovih delcev. Več srebrovih delcev pa pomeni močnejše protimikrobno delovanje.

Hipoteza je potrjena, saj smo dokazali, da pri višjih koncentracijah koloidno srebro deluje močnejše na razmnoževanje in metabolizem mikroorganizmov.

HIPOTEZA 4:

Sklepali smo, da zaradi različne kompleksnosti v zgradbi celic preiskovanih mikroorganizmov, bo pri bakterijah, ki so veliko preprostejše zgrajene od gliv, učinek protimikrobnega delovanja koloidnega srebra veliko večji. Predpostavljali smo, da bo koloidno srebro lažje prodrlo v notranjost bakterijskih celic in jim zavrlo metabolizem. Hipoteza je zavržena.

Koloidno srebro je delovalo protibakterijsko pri bakterijah, ampak veliko manj, kot so pokazali rezultati laboratorijske študije na univerzi North Texas pod vodstvom prof. dr. Marka A. Farinha. (time-skill study). Njihova študija je dokazala, da po 15 minutah, pri dodajanju nižjih koncentracijah (15 ppm) in višjih koncentracijah (30 ppm) koloidnega srebra k bakterijam, se število kultur bakterij zmanjša skoraj do nič. Naši rezultati pri bakterijah, so pokazali manjše protimikrobno delovanje. Pri *Bacillus cereus* je MIC bil 40 ppm, kar je zelo visoka

koncentracija koloidnega srebra, kjer še poteka metabolizem in razmnoževanje. MIC pri *Escherichia coli* je bil 50 ppm.

S pomočjo koloidnega srebra pri celicah kvasovk zaviramo delovanje encima (manoza-6-fosfat-izomeraza), ki je gradnik celične stene kvasovk. Z izgubo tega encima celica izgubi številne življenjske pomembne sestavine. Kot sama celica, je še vedno bolj kompleksno zgrajena od bakterij, ampak ji koloidno srebro prizadene kljub temu več škode, kot pa bakterijskim celicam. Učinek delovanja koloidnega srebra je pri kvasovkah veliko večji (Pies, 2012).

Bakterije imajo celično steno, ki je iz peptidoglikana ter drugih beljakovin; glive pa imajo celično steno iz hitina. Za našo *Saccharomyces cerevisiae* je značilno tudi, da ima prisotno jedrno membrano, ki je dodatno ščiti. Ampak bakterije so tudi veliko manj odporne na zunanje dejavnike, zato so manj odporne na koloidno srebro.

Za *Saccharomyces cerevisiae* se je izkazalo, da na njo že nižje koncentracije koloidnega srebra delujejo veliko boljše. Njena MIC je bila 20 ppm, MFC pa 30 ppm. Od koncentracij 30 ppm ni bilo možno več zaslediti metabolizma kvasovk.

HIPOTEZA 5:

Pri *Escherichia coli*, ki je Gram negativna bakterija, je prišlo do drugačnega reagiranja indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično, zato je naša hipoteza potrjena.

Intenziteta obarvanja indikatorja iodonitrotetrazolium vijolično pri preiskovanih mikroorganizmih, je bila drugačna. Pri *Escherichia coli*, ki je Gram negativna bakterija, ki ima tanjšo celično steno, je koloidno srebro učinkovalo veliko bolj antimikrobno. Pri *Escherichia coli* je bil MBC pri 50 ppm, kjer ni bilo več znakov metabolizma. *Bacillus cereus*, ki spada pod Gram pozitivno bakterijo, z debelejšo celično steno, celična stena ni bakterije varovala koloidnim srebrom. Vpliv teihočne kisline, ki jo vsebuje *B. cereus*, *E.Coli* pa ne, nismo dokazovali. Zato tudi ne moramo dokazati, če je teihočna kislina razlog za naše rezultate.

Ocena metode in možni viri napak

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči se je izkazala za zanesljivo metodo. Da bi bila naša metoda še bolj zanesljiva, bi morali opraviti še več ponovitev (imeli smo jih: 4 ponovitve za bakterije ter 5 ponovitev za glive za eno koncentracijo koloidnega srebra-postopek je dolgotrajen, mi pa nismo imeli veliko časa). Pri tej metodi se pojavijo majhne težave kot na primer: luknjice mikrotitrne plošče so zelo majhne in je potrebna velika natančnost.

Naš eksperiment smo načrtovali s pomočjo študija literature.

Poskus smo opravili v šolskem laboratoriju januarja 2015. Problem šolskega laboratorija je, da nismo edini, ki smo takrat opravljali eksperimentalno delo, zato je bila prisotna prostorska stiska in pomanjkanje materiala.

Sterilnost smo zagotavljali z dvema gorilnikoma, ki pa definitivno nista nudila prave sterilnosti. Plastična mikrotitrna plošča je že bila sterilna, tako da smo vsaj poskusili zagotoviti čim večjo sterilnost.

Mikrotitrna plošča je vsebovala pokrov, ki smo ga morali odpirati in zapirati ob nanašanju različnih snovi (gojiščih, bakterijah/gliv, koncentracijah koloidnega srebra) in pri tem je velika možnost, da smo pri odpiranju pokrova bili preveč oddaljeni od ognja in smo v mikrotitrsko ploščo spravili še kakšne druge mikroorganizme.

Z uporabo avtomatskih pipet pri dodajanju majhnih količin v luknjico mikrotitrne plošče, je bila velika verjetnost, da se ni celotna tekočina izpraznila v luknjico (ostala je v tipsu).

Predlagamo, da poskus poteka v mikrobiološkem laboratoriju, kjer je zagotovljena sterilnost. Če pa ni mogoče delati v laboratoriju, svetujemo uporabo laminarija, saj je v njem veliko manjše tveganje izpostavljenosti okoliškim bakterijam. Delo bi potekalo tako v aseptičnih pogojih.

Metoda je vsebovala veliko luknjic, ki jih je bilo potrebno napolniti. Uporabljali smo avtomatske pipete, ki pa za takšne majhne količine in za tako veliko število luknjic niso bile najbolj natančne. Z uporabo avtomatske multikanalske ali avtomatskega pipetnega sistema, bi delo bilo veliko enostavneje in natančnejše.

5.4 Čebulni test

HIPOTEZA 6:

Povprečne vrednosti dolžine koreninic so bile tako ob dodatku koloidnega srebra koncentracije 20 – 25 ppm kot ob dodatku koloidnega srebra koncentracije 65 – 70 ppm statistično pomembno krajše kot koreninice čebule v kontrolni skupini ($p < 0,05$). Zavrta rast korenin kaže na splošno toksičnost koloidnega srebra, saj strupene kemikalije upočasnjujejo rast samih korenin (Firbas, 2010).

Do statistično pomembne razlike ($p < 0,05$) je prišlo tudi med koreninicami čebulic, namočenih v koloidno srebro koncentracije 20 – 25 ppm in 65 – 70 ppm, ki so bile krajše. Na podlagi tega lahko sklepamo, da se z večanjem koncentracije koloidnega srebra večja tudi njegov toksični učinek. Pri korenincah čebule, namočene v koloidno srebro koncentracije 65 – 70 ppm smo opazili tudi rjavo obarvanost in razklanost (korenine so kratke, razklane kot »čarovniška metla«). Tudi na podlagi tega podatka lahko sklepamo o povečani toksičnosti višjih koncentracij koloidnega srebra. Sprememba barve (modro – zelena in rjava barva) in razklanost korenin je namreč pomemben parameter za ugotavljanje toksičnega učinka, pri čemer rjava barva pomeni že celično smrt v rastnem meristemu korenine (Firbas, 2010).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da je prva hipoteza potrjena.

HIPOTEZA 7:

Celice na koreninskem rastnem vršičku so se spodobne deliti zelo hitro, zato je njihov mitotski indeks visok. Vrednost mitotskega indeksa v kontroli se giblje med 5-15% (Paradiž, 1996, povzeto po Tkavc, 2008). Visoke vrednosti koncentracij strupenih snovi stresno vplivajo na celično delitev, ki je zaradi prisotnosti strupenih snovi počasnejša kot v kontroli, kar pomeni, da je tudi mitotski indeks manjši (Kopušar, 2006, povzeto po Špes, 2008). Vrednost mitotskega indeksa v naši kontroli je znašala 8,6%, kar je znotraj zgoraj navedenega intervala. Vrednosti mitotskega indeksa celic koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v koloidno srebro, pa so pod temi vrednostmi in znašajo 3,4% za koloidno srebro koncentracije 20-25 ppm in 1,8% za koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm, kar kaže na to, da koloidno srebro zavira celično delitev – deluje citotoksično. Znotraj poskusa se je spet pokazala razlika med obema koncentracijama – koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm ima večji citotoksičen učinek na delitev celic kot pa koloidno srebro koncentracije 20-25 ppm, saj je bil mitotski indeks v celicah

koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v koloidno srebro koncentracije 65-70 ppm manjši kot pa mitotski indeks v celicah koreninskih vršičkov čebulic, ki so bile namočene v koloidno srebro koncentracije 20-25 ppm. O nižjih mitotskih indeksih pri *Allium* testih po izpostavitvi koloidnemu srebru v poročajo tudi Deepa s sodelavci (2007) in Pulate s sodelavci (2011), ki predvideva, da bi lahko bil vzrok za nižje mitotske indekse zavrta sinteza (podvojevanje) DNA v s fazi celičnega cikla.

Ugotovimo lahko, da rezultati potrjujejo našo hipotezo.

HIPOTEZA 8:

Med opazovanjem celic koreninskega vršička čebule pod mikroskopom, smo v delečih se celicah koreninic, namočenih v eno ali drugo koncentracijo koloidnega srebra, opazili tudi veliko število nepravilnosti v poteku celične delitve, medtem ko tega v celicah koreninskih vršičkov čebulic v kontroli ni bilo (oz. je bilo število le-teh znatno manjše). Iz tega lahko sklepamo, da je nastale anomalije povzročilo delovanje koloidnega srebra. Med vsemi je bila najbolj pogosta anomalija anafazni mostiček (slika 15 in 19), opazili pa smo tudi zlepljene kromosome v anafazi, c-mitozo in izgubljene kromosome in na podlagi tega lahko potrdimo, da ima koloidno srebro tudi genotoksični učinek. Pojav c – mitoze, motene metafaze in anafaze, izgubljeni kromosomi kažejo na vpliv koloidnega srebra na delitveno vreteno (Pulate, 2011).

Naši rezultati potrjujejo tretjo hipotezo.

Ocena metode in možni viri napak:

Za *Allium* test smo sicer uporabili čebulice *Allium cepa* ustrezne velikosti (1,5-2,0 cm) in teže (2,5-3g) kot to navaja Firbas, 2010, vendar so bile kupljene v vrtnem centru Kalia in zato ne vemo, če so bile čebulice mlajše od 6 mesecev, zaradi česar je možno, da rezultati niso takšni kot bi morali biti. Prav tako bi lahko na rezultate vplivala temperatura, na kateri smo hranili čebulice. Temperatura, primerna za shranjevanje le-teh, se nahaja med 12-14°C, mi smo jih hranili kar na sobni temperaturi. Pri opazovanju celic pod mikroskopom smo morda bili nenatančni in spregledali kakšno fazo celičnega cikla in anomalijo. Možno je tudi, da smo zaradi nenatančnosti del preparata izpustili in ga nismo pregledali. Če bi želeli bolj zanesljive rezultate, bi moral celice pregledali strokovnjak za to.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se navezujejo na osnovna načela družbene odgovornosti. Družbeno odgovorno smo se lotili raziskovalne naloge, saj se zavedamo k vedno večjemu vplivu alternativne medicine v življenju. Upamo, da bomo z našo raziskovalno nalogo dodali majhen prispevek k prepoznavanju in preučevanju koloidnega srebra.

7 ZAKLJUČEK

Koloidno srebro je bilo uporabljano že v preteklosti, vendar se je z odkritjem penicilina njegova uporaba zmanjšala, saj je bilo pridobivanje penicilina veliko cenejše kot pridobivanje koloidnega srebra. Vendar so se, zaradi množične uporabe le-tega, razvili rodovi odpornih bakterij, ki jih penicilin ni več mogel uničiti. Zaradi tega je koloidno srebro ponovno prišlo v uporabo in ga dandanes uporablja vedno več ljudi, ki pa velikokrat sploh ne pomislijo na možne stranske učinke koloidnega srebra.

Cilj poskusa je bil raziskati antimikrobni učinek koloidnega srebra na testne organizme *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* in *Saccharomyces cerevisiae* in njegovo potencialno toksičnost na celice koreninskih vršičkov čebule *Allium cepa*.

Pri uporabi metoda difuzije na trdem gojišču koloidno srebro ni pokazalo antibakterijskega učinka na nobeno izmed bakterij, saj ni bilo vidnih inhibicijskih con, zato je naša prva hipoteza zavržena.

Z metodo merjenja optične gostote (OD_{600}) smo razliko med epruветami z dodanim koloidnim srebrom in epruветami brez dodanega koloidnega srebra opazili le pri *Escherichia coli* in *Bacillus cereus*, pri *Saccharomyces cerevisiae* pa ne, iz česar lahko sklepamo, da ima koloidno srebro antibaktericidni učinek, ne pa tudi antifungidicnega. Hipoteza 3 je bila tako le delno potrjena. Prav tako pa smo odkrili razlike med delovanjem koloidnega srebra pri Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterijah. Gram negativne bakterije (*Escherichia coli*), ki imajo tanjšo celično steno, so bile bolj občutljive na koloidno srebro, saj je na njih delovala nižja koncentracija kot pa na *Bacillus cereus*, ki je Gram pozitivna bakterija.

Z Allium testom pa smo uspeli dokazati toksičnost in genotoksičnost koloidnega srebra. Rast korenin čebulic je bila v prisotnosti koloidnega srebra zavirana, v prisotnosti koloidnega srebra koncentracije 65-70 ppm korenine skorajda niso zrasle. Ugotovili smo, da z višanjem koncentracije večamo tudi splošno toksičnost koloidnega srebra.

Med opazovanjem celic pa smo opazili tudi številne anomalije. Teh je bilo več v celicah koreninskih vršičkov, ki so bile namočene v koloidno srebro, spet pa se je izkazalo, da višja koncentracije povzročajo več nepravilnosti.

S pomočjo vseh metod smo ugotovili, da je koloidno srebro sicer dokaj dobro antimikrobno sredstvo, vendar je hkrati tudi precej toksično. Vsekakor bi bile potrebne nadaljnje raziskave učinka koloidnega srebra na človeške celice, saj če koloidno srebro negativno vpliva na celice čebulic, zakaj ne bi moglo podobno vplivati tudi na človeške celice? Ljudje, ki uporabljajo koloidno srebro, bi morali pomisliti na morebitne stranske učinke, za katere se na prvi pogled zdi, da jih ni, vendar se lahko čez čas izkažejo kot zelo neugodne.

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrski plošči pa je pokazala antimikrobni učinek koloidnega srebra na vse tri testne organizme, s čimer smo potrdili hipotezo 4. Izkazalo se je, da koloidno srebro deluje veliko bolj agresivno na celice kvasovk kot pa na celice bakterij, kar ni bilo v skladu z našimi pričakovanji, zato smo hipotezo 5 ovrgli.

8 VIRI IN LITERATURA

- Arzenšek, A. 2009. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterijske vrste *Aliclobacillus acidoterrestris* [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_arzensek_anja.pdf (povzeto 23. 1. 2015, 17:45)
- Borak, I., 2009. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v mesnih izdelkih [Online]. Dostopno na URL-naslovu http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_borak_iztok.pdf (povzeto 25. 1. 2015, 17:29)
- Centers for disease control and prevention. *Escherichia Coli*. [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.zzv-kp.si/wp-content/uploads/B.CEREUS_17062013.pdf (povzeto 1.2.2015, 11:30)
- Dragaš, A. Z. (2004). Mikrobiologija z epidemiologijo. Ljubljana: DZS.
- De Gusseme, L. Sintubin, and L. Sintubin. (2010) Biogenic silver for disinfection of water contaminated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 4, pp. 1082–1087
- Finžgar, B., 2012. Izolacija kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* iz neobičajnih naravnih habitatov [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://pefprints.pef.uni-lj.si/674/1/Izolacija_kvasovk_Saccharomyces_cerevisiae_iz_neobi%C4%8Dajnih_naravnih_habitatov.pdf (povzeto 24. 1. 2015, 14:26)
- Firbas, P. (2004). Kako zdrava je voda. Ljubljana: Ara.
- Firbas, P. (2010). Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe. Grosuplje: Ekslibris.
- Kaj je koloidno srebro [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.koloidnosrebro.si/content/8-kaj-je-koloidno-srebro> (povzeto 22. 1. 2015, 15:24)
- Koloidno srebro [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.holist.eu/argentum.html> (povzeto 4. 2. 2015, 13:26)
- Krznar, D. (2010). Protimikrobno delovanje enostavnih fenolnih spojin ter ekstraktov rožmarina in žajblja na različne vrste bakterij [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_krznar_darja.pdf (povzeto 4.2.2015, 16:40)

- Lansdown, A. (2010) A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.hindawi.com/journals/aps/2010/910686/#B1> (povzeto 2. 2. 2015, 21:10)
- Madigan, M. T. (2012). *Brock biology of microorganisms*. Boston: Pearson.
- Morril, K., May, K., Leek, D. Spectrum of Antimicrobial Activity Associated with Ionic Colloidal Silver. *The journal of alternative and complementary medicine* Volume 19, Number 3, p. 224-231
- Pavličič, M., Mrhar, A. 2001. Kako zagotoviti najprimernejše odmerjenje protimikrobnih zdravil [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.sz.d.si/user_files/vsebina/Zdravniski_Vestnik/vestnik/st10/547-552.pdf (povzeto 23. 1. 2015, 18:15)
- Pies, J. (2012). Zdravilni učinki koloidnega srebra. Ljubljana: Ara.
- P. van Hasselt, B. A. Gashe, and J. Ahmad,. (2004) Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction?" *Journal of Wound Care*, vol. 13, no. 4, pp. 154–155
- Gramnegativna bakterija [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://sl.wikipedia.org/wiki/Gramnegativna_bakterija (povzeto 23. 1. 2015, 19:54)
- Pohar, B. (2006). Primerjava spremljanja rasti kvasovk z metodo merjenja optične gostote in z metodo določanja suhe biomase [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pohar_borut.pdf (povzeto 3.2.15:15)
- Raspor, P. (1996). Kvasovke. *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Ljubljana: Bia
- Resnik, M., Kerč, J. 2010. Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov *Farmacevtski vestnik*, letnik 61, številka 1, str. 23-29 [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/fv_1_2010.pdf (povzeto 24. 1. 2015, 09:39)
- Rožman, T., 2007. Protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na različne vrste bakterij rodu *Listeria* [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_rozman_tanja.pdf (povzeto 25. 1. 2015, 16:03)
- Stergar, J., Ban, I. Nanokemija in materiali. [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://studentski.net/gradivo/umb_fkk_ke1_nim_vaj_navodila_za_laboratorijske_vaje_01?r=1 (povzeto 4. 2. 2015, 17:29)
- Strgar, J. (2002). Tematski leksikoni: biologija. Tržič: Učila International

- Svarog, Biologija. (2013). Kako se prenaša genski zapis? [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://mss.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=11156 (povzeto 5.2.2015, 23:30)
- Štagoj, M., Podobnik, M. 2006. Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov. Farmacevtski vestnik, letnik 57, številka 4, str. 235-240 [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-4ZE093SV/1354ea25-e9b7-4780-b85b-18123894692c/PDF> (povzeto 24. 1. 2015, 10:02)
- Taking silver could give you the blues [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=571&c=35518&h=adc309962d81a1feb640&xt=.pdf> (povzeto 1. 2. 2015, 17:32)
- Tomšič, B. (2009). Vpliv velikosti delcev srebra na baktericidno učinkovitost celuloznih vlaken [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.tekstilec.si/wp-content/uploads/2009/08/Vpliv-velikosti-delcev-srebra-na-baktericidno-u%C4%8Dinkovitost-celuloznih-vlaken.pdf> (povzeto 7. 2. 2015, 14:29)
- Tumpa, S. (2013) [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.zpm-mb.si/attachments/sl/1201/SS_Biologija_Protimikrobni_ucinek_rastlinskih_etanolnih.pdf (povzeto 16. 1. 2015, 18:03)
- Uporaba koloidnega srebra [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.koloidnosrebro.si/content/11-uporaba-koloidnega-srebra> (povzeto 1. 2. 2015, 13:39)
- Vičar-Potočnik, H. (2011). Kjer se življenje začne - biologija celice in genetika za gimnazije. Ljubljana: Rokus Klett.
- Vopalenska, I. et al. (2010). Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol*, 264-277.
- Zavod za zdravstveno varstvo. *Bacillus Cereus*. [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.zzv-kp.si/wp-content/uploads/B.CEREUS_17062013.pdf (povzeto 2.2.2015, 18:45)
- Zdravstvo z koloidnim srebrom [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://www.silvermedicine.org/colloidalsilverstudytexas.html> (povzeto 7. 2. 2015, 17:26)

- Želko, M. (2010). Proučevanje protibakterijskega učinka ekstraktov gliv [Online]. Dostopno na URL-naslovu: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_zelko_mateja.pdf (povzeto 3.2.2015, 14:50)
- Yamanaka, M., Hara, K., Kudo, J. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis [Online]. Dostopno na URL-naslovu: <http://aem.asm.org/content/71/11/7589.full.pdf> (povzeto 2. 2. 2015, 21:10)

8 PRILOGE

8.1 Anketa

Glavni namen ankete je bil preveriti, kako ljudje poznajo koloidno srebro. Želeli smo ugotoviti seznanjenost ljudi (osredotočili smo zlasti na mlade ljudi) na alternativno medicino, uporabe koloidnega srebra. Zanimalo nas je, kako so ljudje seznanjeni s stranskimi učinki koloidnega srebra. Zanimala nas je seznanjenost ljudi glede uporabe koloidnega srebra.

Anketo smo izvedli med 350 naključno izbranimi anketiranci, v času 2. 2. 2015 in 4. 2. 2015. Anketa je skupno vsebovala 16 vprašanj. V nadaljevanju podajamo rezultate, grafično prikazujemo in analiziramo ter komentiramo odgovore. Anketa je vsebovala vprašanja z DA ali NE, nekatera vprašanja pa so bila izbirnega tipa.

Struktura vzorca

Vzorec je sestavljal 29 % moških in 71% žensk. Razdelili smo jih v različne starostne skupine, razdeljene po spolu in sicer do 20 let, od 21 do 40 let, od 41 do 65 let in nad 65 let.

Sva dijakinji in v okviru natečaja Mladi za napredek Maribora opravljava raziskovalno nalogo. Lepo Vas naprošava, da odgovorite na kratek anonimni vprašalnik. Informacije, ki jih bova zbrali bova uporabili izključno za raziskovalne namene ter bodo objavljeni izključno v najini raziskovalni nalogi.

Starost: 10-20 let 21-40 let 41-65 let nad 65 let Spol: M Ž

ANKETA

1. Ali ste že slišali za koloidno srebro?

DA NE

2. Iz katerih virov ste izvedeli zanj?

- a) Splet b) Prijatelji c) Družina-sorodniki d) Strokovna revija e) Časopis f) Televizija
g) Radio
h) DRUGO _____

3. Ali veste za kaj se vse koloidno srebro uporablja? DA NE

3.1 Če ste na prejšnje vprašanje odgovorili z DA, kaj ste zasledili, kje se vse koloidno srebro uporablja?

4. Ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabimo tudi na živalih? DA
NE

5. Ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabimo v gospodinjstvu za preprečevanje nastajanje bakterij?
DA NE

6. Ali koloidno srebro uporabljate tudi sami? DA NE

Če ste na zgornje vprašanje odgovorili z NE, se Vam zahvaljujemo za Vaš čas in prispevek. Če ste odgovorili z DA, Vas naprošava, da nadaljujeta z odgovarjanjem.

7. Za kakšne težave vse uporabljate koloidno srebro?

- a) Rane b) Akne c) Poškodbe zaradi opeklin d) Zaradi očesnega obolenja
e) Zaradi obolenj dihal f) Glivic g) Črevesne/prebavne motnje h)
Drugo _____

8. Na kakšen način?

- a) Z zaužitjem b) Z mazanjem c) Povijanje s povoji prepojenem z koloidnim srebrom d) S spiranjem in grgranjem e) Kot kapljice (npr. za oči) f) Kot razpršilo
g) Drugo _____

9. Ste s pomočjo koloidnega srebra hitreje ozdraveli oziroma opazili ugodne učinke za vaše zdravje? DA NE

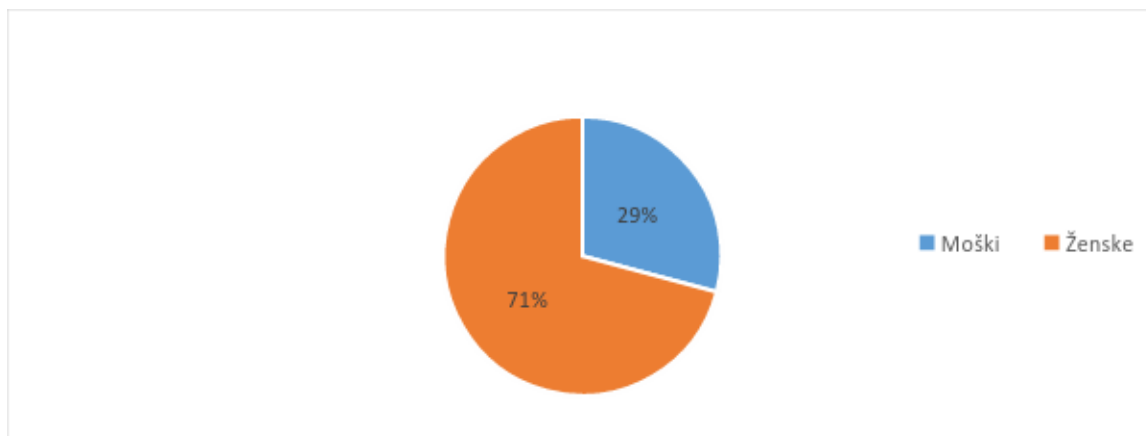
10. Bi uporabo koloidnega srebra priporočili tudi drugim? DA NE

11. Ste ob uporabi koloidnega srebra že kdaj pomislili na morebitne stranske učinke?
DA NE

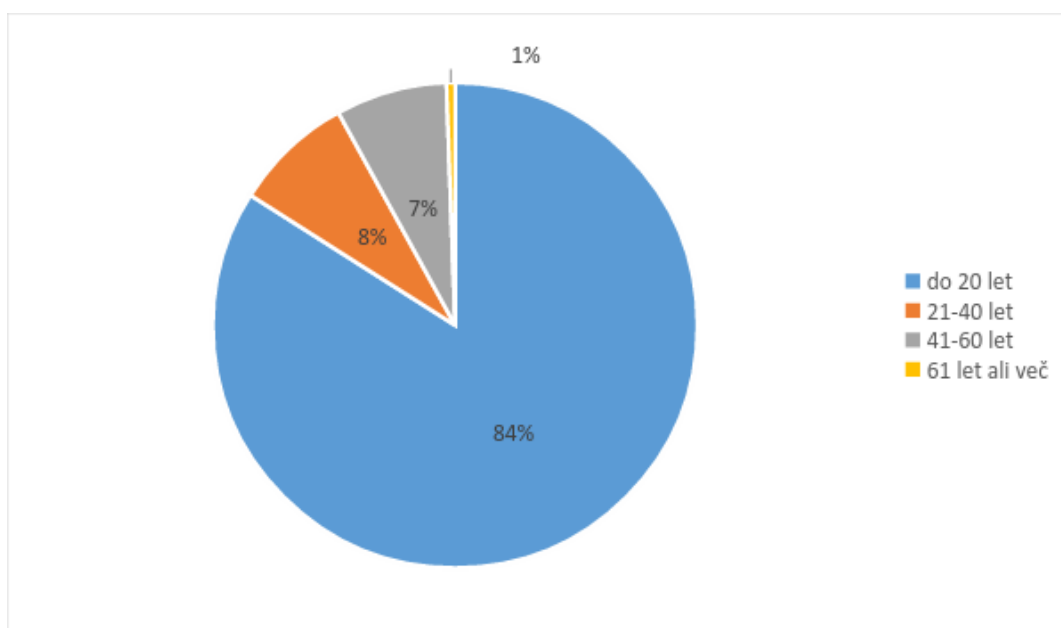
12. Se v primeru bolezni poslužujete metod alternativne medicine (homeopatija, akupunktura, uporaba zdravilnih rastlin, ...)?
Redno včasih nikoli

Hvala za Vaš čas in prispevek!

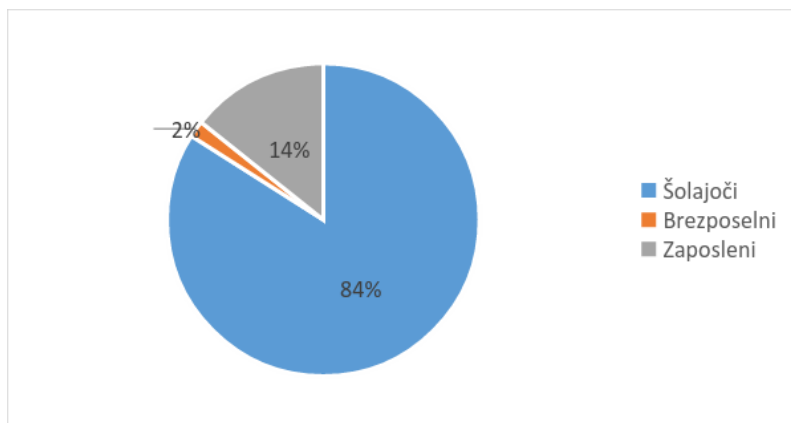
Rezultati ankete



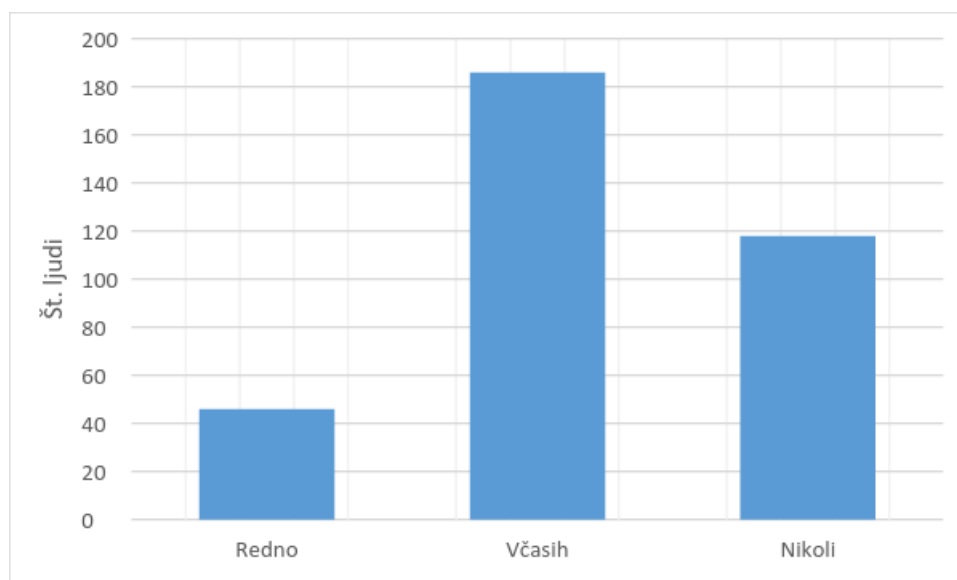
Graf 7: Spolna sestava



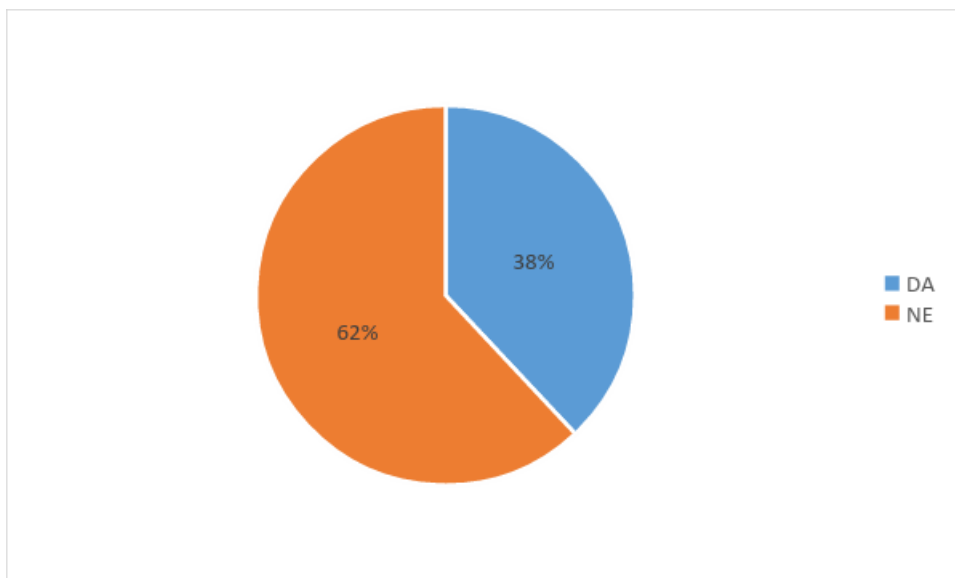
Graf 8: Starostna sestava anketirancev



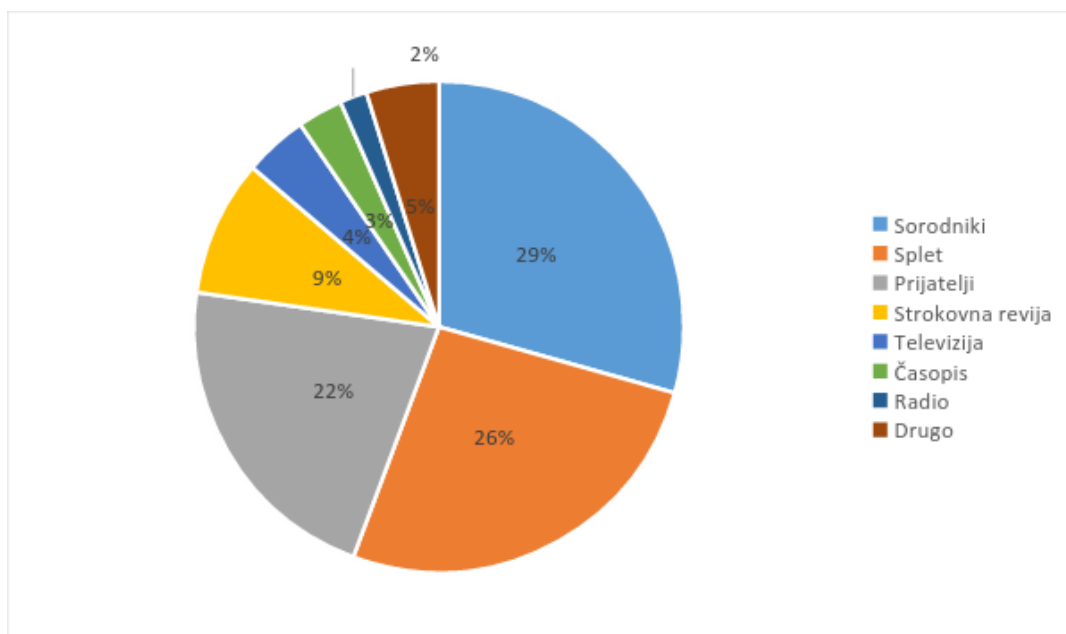
Graf 9: Izobrazbena sestava



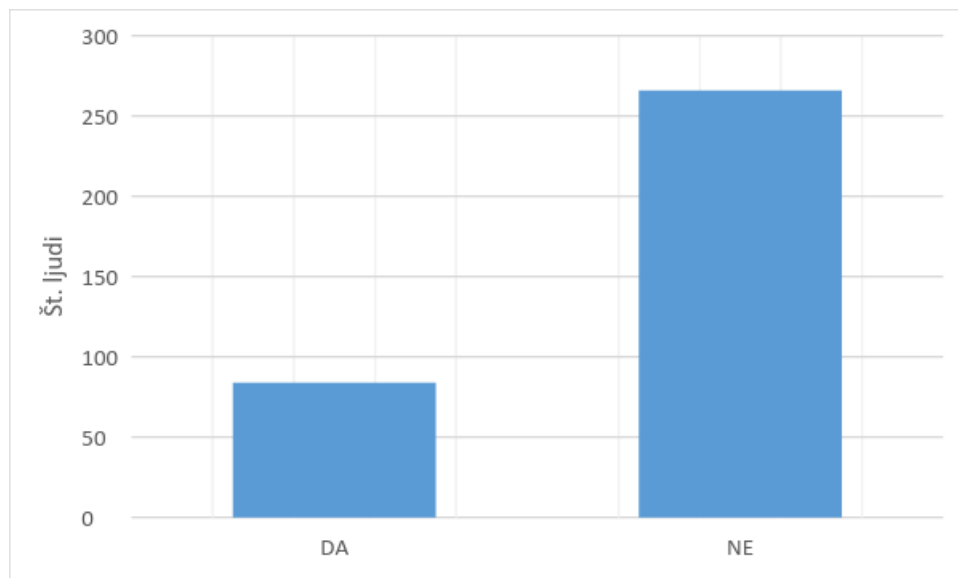
Graf 10: : Se v primeru bolezni poslužujete metod alternativne medicine (homeopatija, akupunktura, uporaba zdravilnih rastlin, ...)?



Graf 11: Ali ste že slišali za koloidno srebro?



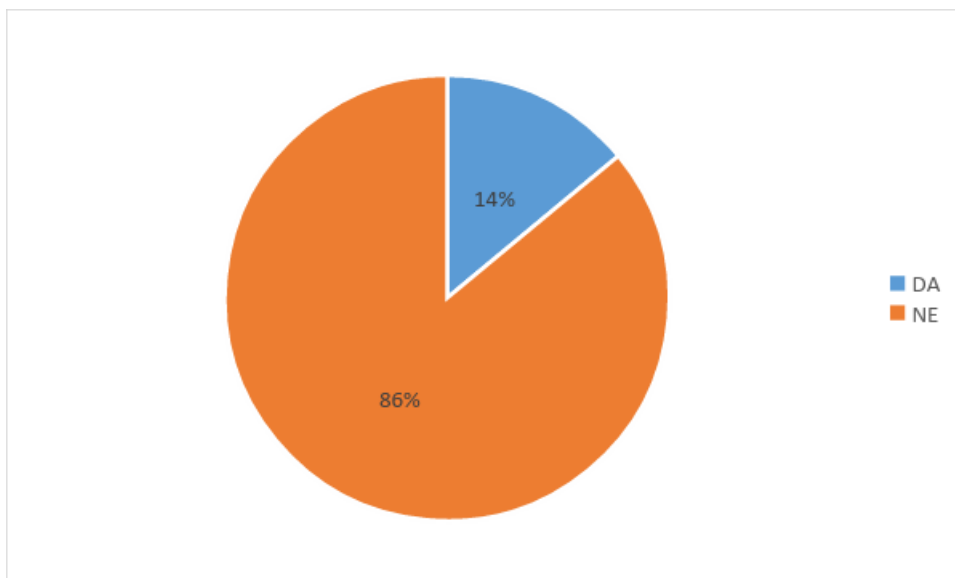
Graf 12: Iz katerih virov ste zasledili zanj?



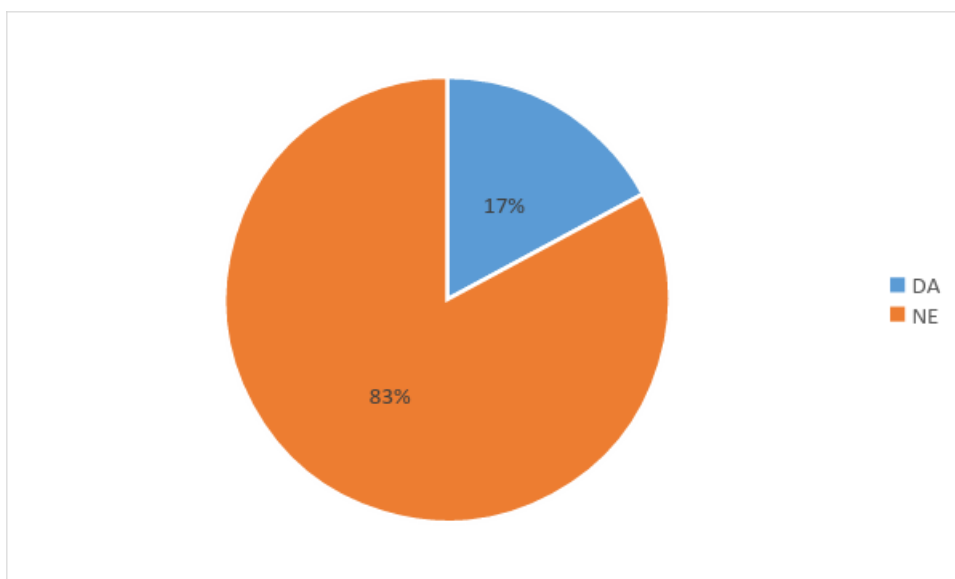
Graf 13: Ali veste za kaj se uporablja koloidno srebro?

Najbolj pogosti odgovori na vprašanje, kje vse se uporablja koloidno srebro:

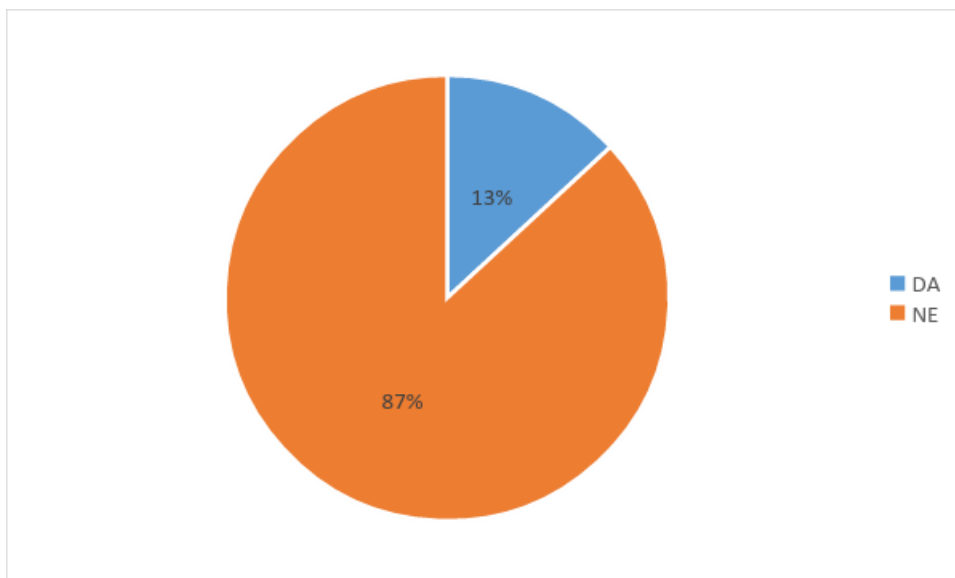
- Hitrejše celjenje
- Za krepitev imunskega sistema
- Proti bakterijskim obolenjem
- Namesto antibiotikov
- Za zdravljenje aken
- Za konzerviranje hrane
- Splošno
- Proti kožna obolenjem
- Uničevanje plesni
- Kot škropivo



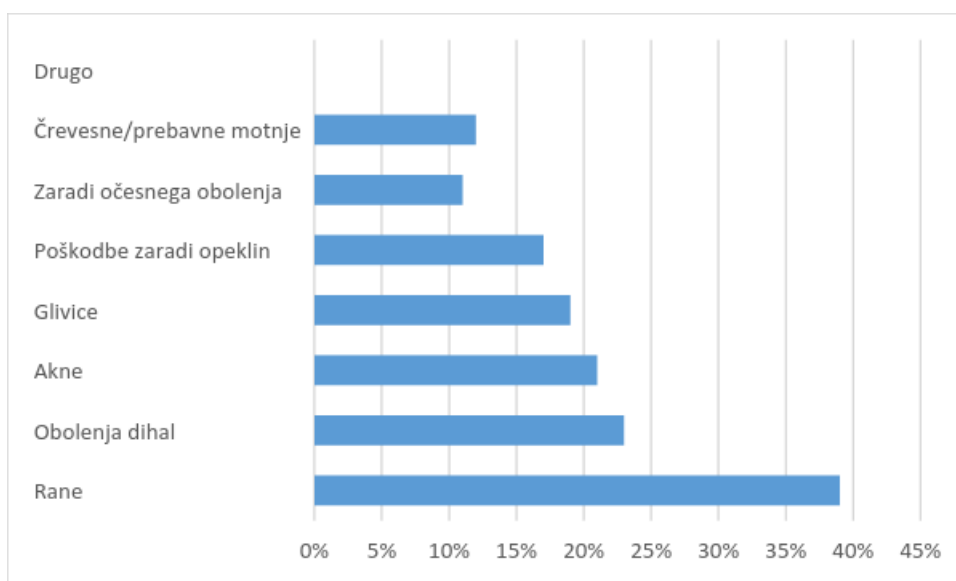
Graf 14: Ali ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabljamo tudi na živalih?



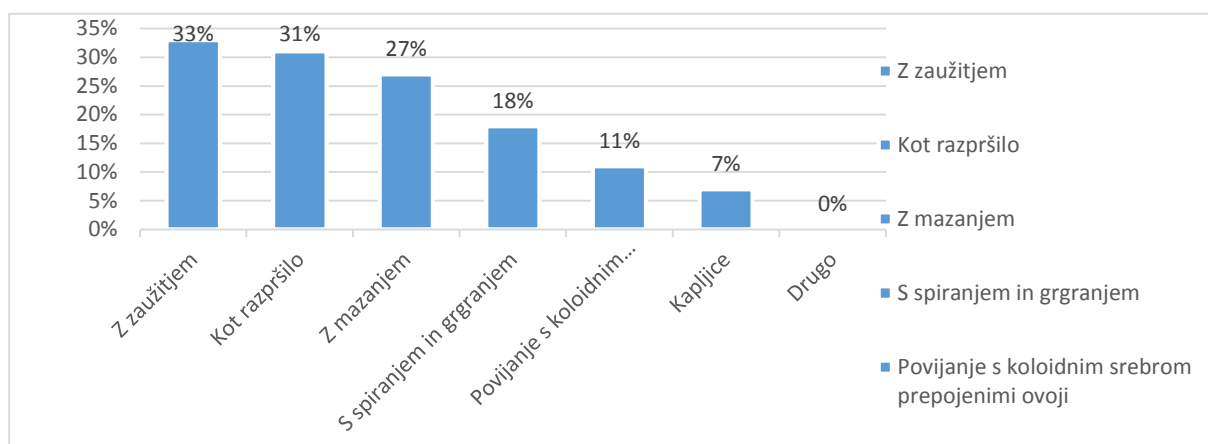
Graf 15: Ali ste vedeli, da lahko koloidno srebro uporabljamo v gospodinjstvu, za preprečevanje nastajanja bakterij?



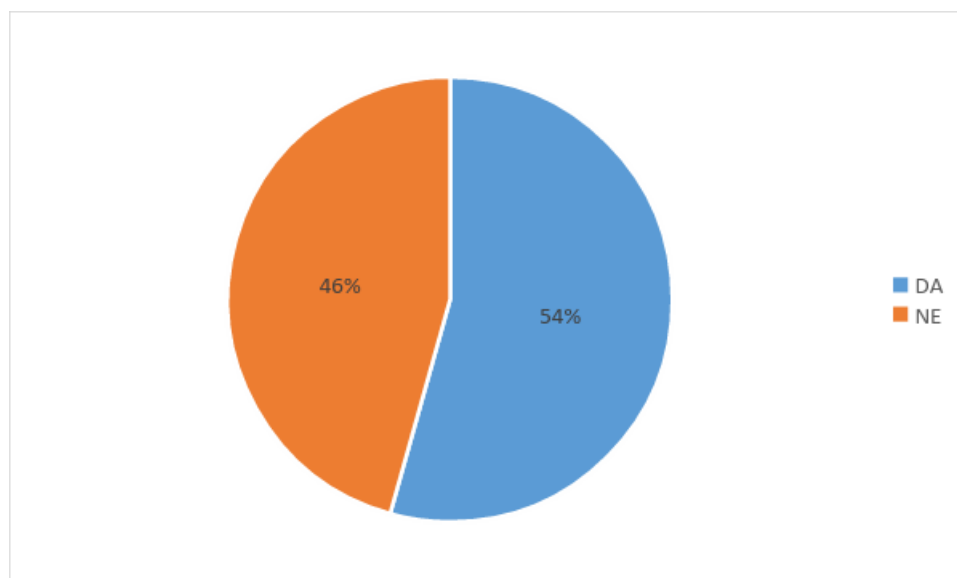
Graf 16: Ali uporabljate koloidno srebro?



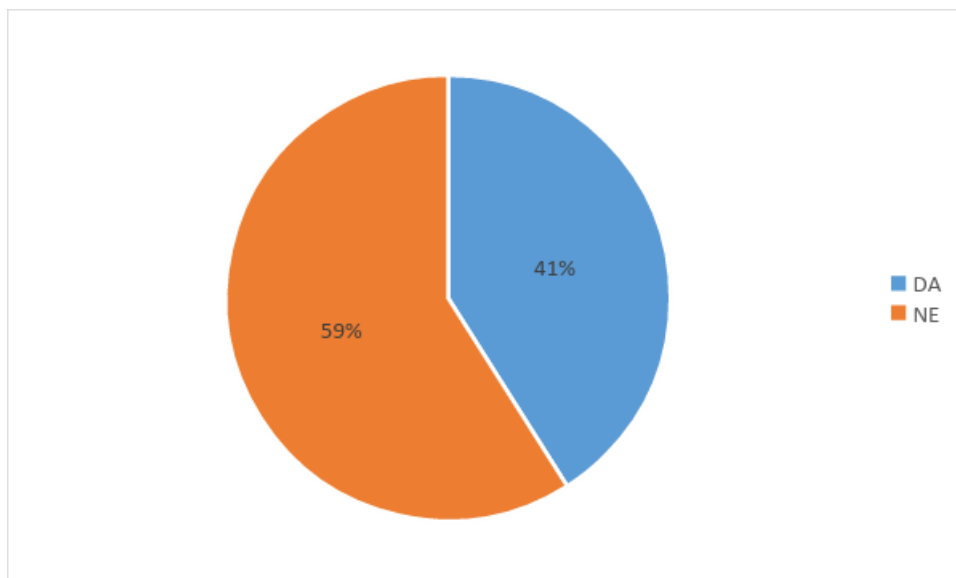
Graf 17: Za kakšne težave uporabljate koloidno srebro?



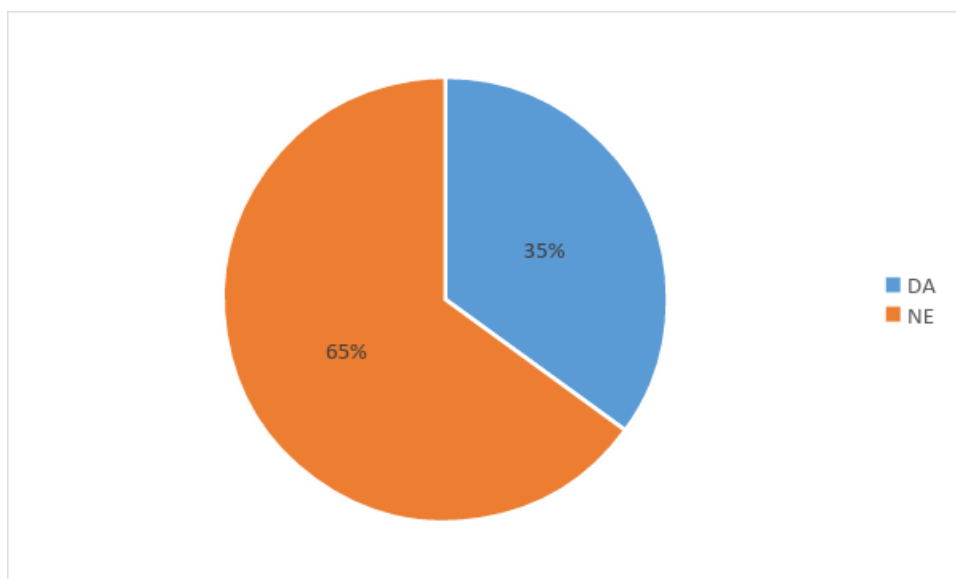
Graf 18: Na kakšen način ga uporabljate?



Graf 19: Bi uporabo koloidnega srebra priporočili tudi drugim?



Graf 20: Ste s pomočjo koloidnega srebra hitreje ozdraveli oziroma opazili ugodne učinke za vaše zdravje?



Graf 21: Ste ob uporabi koloidnega srebra že kdaj pomislili na morebitne stranske učinke?

Sklepali smo, da ljudje niso seznanjeni s koloidnim srebrom in ne poznajo njegove uporabnosti, vendar, so rezultati pokazali drugače. 38% ljudi (od 350 anketirancev) je že slišalo za koloidno srebro. Presenetilo nas je poznanje, da je bil spekter naštevanja – kje se vse uporablja koloidno srebro, zelo velik (imunski sistem, hitrejša celjenje, za zdravljenje aken, za splošno zdravljenje, proti kožnim obolenjem, namesto antibiotikov...).

Ljudje ob uporabi koloidnega srebra niso opazili hitrejšega zdravljenja ran ter ne opazijo ugodnih učinkov za njihovo zdravljenje. Kljub temu, da ima koloidno srebro protimikrobno učinkovanje, po rezultatih sledeče, bi malo več kot polovica anketirancev svetovala uporabo koloidnega srebra drugim.

Kot pričakovano, ljudje, ki uporabljajo koloidno srebro, ga uporabljajo največ za celjenje ran. Koloidno srebro uporabljajo predvsem z mazanjem in zaužitjem.

Kar veliko ljudi se včasih poslužuje alternativne medicine (homeopatija, akupunktura, uporaba zdravilnih rastlin), predvidevamo da vedno bolj in bolj bodo ljudje iskali rešitve v alternativni medicini, saj ima veliko manj stranskih učinkov. Čeprav koloidno srebro ima stranske učinke, ljudje ne pomislijo na njih.

8.2 Optična gostota testnih organizmov pri valovni dolžini 600 nm - grobi podatki

Tabela 9: Optična gostota testnih organizmov pri valovni dolžini 600 nm - grobi podatki

<i>E. coli</i> s koloidnim srebrom	<i>E. coli</i> brez koloidnega srebra	<i>B. cereus</i> s koloidnim srebrom	<i>B. cereus</i> brez koloidnega srebra	kvasovke s koloidnim srebrom	kvasovke brez koloidnega srebra
0,91	0,99	0,92	0,99	0,89	0,91
0,88	0,94	0,87	0,97	0,80	0,89
0,92	0,94	0,80	0,94	0,99	0,87
0,92	0,96	0,85	0,95	0,81	0,87
0,52	0,94	0,89	0,96	0,96	0,90
0,89	0,95	0,91	0,92	0,81	0,84
0,88	1,00	0,91	0,92	0,88	0,91
0,90	0,94	0,90	0,95	0,79	0,87
0,92	1,00	0,90	0,92	0,91	0,90
0,92	0,98	0,90	0,94	-	-