

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETA BOŠTJANČIČ

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018



Univerza *v Ljubljani*  
Fakulteta *za farmacijo*



**MARJETA BOŠTJANČIČ**

**RAZVOJ METOD IMOBILIZACIJE BAKTERIJ TER VREDNOTENJE  
VPLIVOV NA NJIHOVO MORFOLOGIJO IN RAST**

**DEVELOPMENT OF IMMOBILISATION METHODS OF BACTERIA  
AND EVALUATION OF EFFECTS ON THEIR MORPHOLOGY AND  
GROWTH**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2018



*Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratoriju Univerze v Ljubljani na Fakulteti za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm, in somentorstvom asist. Janje Mirtič, mag. farm.*

*Zahvaljujem se prof. dr. Julijani Kristl in asist. Janji Mirtič za vso nudeno pomoč, nasvete in spodbudo pri izdelavi magistrske naloge. Na tem mestu se zahvaljujem tudi dr. Špeli Zupančič, mag. farm., za napotke in pomoč pri eksperimentalnem delu. Posebno zahvalo namenjam družini in fantu Mateju, ki so mi stali ob strani in me podpirali tekom celotnega študija.*

*Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl ter somentorstvom asist. Janje Mirtič, mag. farm.*

*Marjeta Boštjančič*



## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Bakterije in spore</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	2
1.1.2	Bakterije iz rodu <i>Bacillus</i> sev 25.2.M .....	3
<b>1.2</b>	<b>Imobilizacija bakterij</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Tehnika plastenja - plast-na-plast.....	4
1.2.2	Elektrostatsko sukanje .....	7
1.2.3	Elektrostatsko sukanje celic ali »celični electrospinning« in princip.....	9
<b>1.3</b>	<b>Metode vrednotenja velikosti in morfologije imobiliziranih celic</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Metode za vrednotenje preživetja celic</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Kemikalije in materiali</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Celice, vključene v imobilizacijo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Predpriprava raztopin in gojišč</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4</b>	<b>Laboratorijska oprema</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Metode</b> .....	<b>20</b>
3.5.1	Gojenje in spiranje bakterij .....	20
3.5.2	Priprava raztopin polimerov .....	20
3.5.3	Oblaganje celic s polielektroliti s tehniko plastenja .....	23
3.5.4	Preživetje celic in spor v polimernih raztopinah .....	24
3.5.5	Vgrajevanje celic v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem .....	24
3.5.6	Spremljanje imobilizacije celic .....	25
3.5.7	Testi viabilnosti .....	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Oblaganje celic s polielektroliti s tehniko plastenja</b> .....	<b>31</b>
4.1.1	Oblaganje živih celic .....	35









4.1.2	Vpliv števila plasti polielektrolitov na rast celic .....	37
4.1.3	Vpliv števila plasti polielektrolitov na metabolično aktivnost bakterij.....	40
<b>4.2</b>	<b>Imobilizacija bakterij z elektrostatskim sukanjem .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Vrednotenje nanovlaken brez vgrajenih celic .....	43
4.2.2	Viabilnost bakterij v polimernih raztopinah.....	46
4.2.3	Prikaz nanovlaken z vgrajenimi neobloženimi bakterijami .....	47
4.2.4	Morfologija nanovlaken z obloženimi celicami .....	51
<b>4.3</b>	<b>Viabilnost gramnegativnih in grampozitivnih bakterij po elektrostatskem sukanju .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>59</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Princip oblaganja celice s tehniko plastenja.....	4
Slika 2:	Shema naprave za elektrostatsko sukanje. ....	8
Slika 3:	Orientacija paličastih bakterij v Taylorjevem stožcu. Povzeto po Salalha et al. (2). .....	10
Slika 4:	Shematski načrt eksperimentalnega dela.....	15
Slika 5:	Struktura razvejanega polietilenimina.....	21
Slika 6:	Struktura alginske kisline. ....	21
Slika 7:	Običajna rastna krivulja bakterij. ....	27
Slika 8:	Shema napolnjene mikrotitrskeske plošče s pozitivno in negativno kontrolo ter obloženimi celicami Escherichia coli; NK- negativna kontrola, PK- pozitivna kontrola, PEI- polietilenimin, ALG- alginat. ....	29
Slika 9:	Padec zeta potenciala bakterij Escherichia coli po začetnem oblaganju z različnimi volumni 0,1 % (m/V) alginata (ALG). OB-oblaganje.....	33
Slika 10:	Posnetki bakterije Escherichia coli med oblaganjem z optičnim mikroskopom, 400× povečava: a) 1 plast PEI; b) 2 plasti PEI+ALG; c) 3 plasti PEI+ALG+PEI; d) 4 plasti PEI+ALG+PEI+ALG. PEI- polietilenimin, ALG- alginat.....	35
Slika 11:	Spreminjanje zeta potenciala celicam Escherichia coli glede na število polielektrolitnih plasti: 1. in 3. plast je 200 $\mu$ L 0,1 % (m/V) polietilenimin, 2. in 4. plast pa 200 $\mu$ L 0,1 % (m/V) alginata.....	36







Slika 12: SEM slike obloženih Escherchia coli: a) 1 plast PEI; b) 2 plasti PEI+ALG; c) 3 plasti: PEI+ALG+PEI; d) 4 plasti PEI+ALG+PEI+ALG. PEI- polietilenimin, ALG- alginat. ....	37
Slika 13: Zakasnitev začetka celične rasti (zamik lag faze) Escherichie coli glede na naraščajoče število polimernih plasti iz polietilenimina in alginata. $\Delta OD_{600}$ je razlika med $OD_{600}$ vzorca in $OD_{600}$ sterilnega medija. $OD_{600}$ - optična gostota pri 600 nm. ....	38
Slika 14: Metabolična aktivnost neobloženih bakterij Escherichia coli v redčenih vzorcih; aktivnost izražena kot fluorescenca. ....	40
Slika 15: Metabolična aktivnost neobloženih celic Escherichie coli v primerjavi z obloženimi celicami Escherichie coli s polietileniminom in alginatom. ....	41
Slika 16: SEM slike nanovlaken iz izdelanih iz: a) 4 % (m/m) polietilenoksida, b) 15 % (m/m) polivinilpirolidona. ....	43
Slika 17: SEM slike nanovlaken s kompozicijo a) ALG/PEO 80/20, b) ALG/PEO 40/60, in c) ALG/PEO 20/80. ALG- alginat, PEO- polietilenoksid. ....	45
Slika 18: Viabilnost bakterij Escherichia coli in bakterij Bacillus sp. med 24-urno inkubacijo v različnih polimernih raztopinah. PEO- polietilenoksid, PVP- polivinilpirolidon, ALG- alginat. ....	46
Slika 19: a) Slika nanovlaken pod optičnim mikroskopom z vgrajenimi celicami E. coli, označene z rdečo; vidna longitudinalna postavitev celic (400× povečava), b) vzdolžno glede na nanovlakno vgrajena celica E. coli (SEM slika). ....	47
Slika 20: Vgrajene celice Escherichie coli v nanovlakna iz: a) 15 % (m/m) polivinilpirolidona ter b) alginat/polietilenoksid 20/80. ....	48
Slika 21: a) SEM slika vegetativnih bakterij Bacillus sp. 25.2.M; b) SEM slika spor Bacillus sp. 25.2.M. ....	49
Slika 22: Nanovlakna iz 4 % polietilenoksida z vgrajenimi: a) neobloženimi bakterijami Bacillus sp.; b) obloženimi bakterijami Bacillus sp. z eno plastjo polietilenimina (PEI); c) neobloženimi sporami Bacillus sp.; d) obloženimi sporami Bacillus sp. z eno plastjo PEI. ....	50
Slika 23: Nanovlakna iz 4% polietilenoksida z bakterijami Escherichia coli, obloženimi z: a) eno plastjo polietilenimina (PEI); b) eno plastjo PEI ter eno plastjo alginata. Zelena puščica kaže na zažemke in odebelitve nanovlaken, z rdečo je obkrožena izkristalizirana sol. ....	51
Slika 24: Stolpci prikazujejo teoretične vgradnje neobloženih celic Escherichie coli v različnih nanovlaknih; manjkajo pa stolpci za eksperimentalno določeno število celic, ki bi iz teh nanovlaken zrasle. PEO- polietilenoksid, PVP- polivinilpirolidon, ALG- alginat. ....	53









Slika 25:Teoretično in eksperimentalno določene vgradnje neobloženih in obloženih Escherichie coli ter bakterij in spor Bacillus sp. 25.2.M po elektrostatskem sukanju v polietilenoksidni disperziji. \*Rezultati neobloženih spor so iz doktorske naloge dr. Špele Zupančič, mag. farm. (49). ..... 54

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Primeri naravnih ter sinteznih polielektrolitov, primernih za tehniko plastenja. ....	5
Preglednica II: Parametri elektrostatskega sukanja. ....	8
Preglednica III: Metode vrednotenja velikosti ter morfologije obloženih delcev/celic, izdelanih s tehniko plastenja, ter nanovlaken, izdelanih z elektrostatskim sukanjem (17,23). ....	11
Preglednica IV: Metode za določanje oz. spremljanje živosti (viabilnosti) celic (17).....	13
Preglednica V: Glavne fizikalno-kemijske značilnosti polietilenoksida (PEO) 900 000 ter polivinilpirolidona (PVP) F90 (34,39,40) .....	22
Preglednica VI: Predhodna testiranja različnih vrst kationskih (PEI- polietilenimin, hitosan) in anionskih (alginat, Carbopol) polimerov, v različnih koncentracijah in volumnih za plast-na-plast oblaganje živih Escherichia coli. V- volumen, OB-oblaganje.....	31
Preglednica VII: Uporabljeni polielektroliti, pH pred in po prilagajanju in viskoznost raztopine; pH uravnan s 1M HCl.....	34
Preglednica VIII: Koncentracije preizkušenih polimerov ter procesni parametri elektrostatskega sukanja; oddaljenost igle od zbirala: 15 cm.....	44
Preglednica IX: Razmerje alginata in polietilenoksida (PEO) v 5 % (m/m) vodni raztopini, procesni parametri elektrostatskega sukanja pri 15 cm razdalji med iglo in zbiralom, nastali produkti elektrostatskega sukanja ter povprečni premeri nanovlaken s standardno deviacijo (SD). ....	45







## POVZETEK

Industrijska proizvodnja bioloških učinkovin temelji na uporabi bakterijskih celic. Z namenom ohranitve biološkega materiala se raziskovalci že vrsto let ukvarjajo z razvojem tehnik, ki bi omogočale umetno imobilizacijo živih celic na laboratorijskem ter industrijskem nivoju.

Namen magistrske naloge je bil razvoj in ovrednotenje dveh vrst imobilizacije živih bakterijskih celic *Escherichia coli*, kot predstavnika gramnegativnih bakterij, ter bakterij iz rodu *Bacillus* sp. sev 25.2.M, kot grampozitivnih, ki so za razliko od *E. coli* zmožne tvoriti spore. Imobilizacijo celic smo izvedli s tehniko plastenja ter elektrostatskim sukanjem po razvitih protokolih. Kationski polietilenimin ter anionski alginat sta se izkazala kot ustrezna za elektrostatsko oblaganje živih celic. Naboj celične površine ter nalaganje polielektrolitov s plastenjem smo spremljali z merjenjem zeta potenciala, vpliv na rast pa smo ovrednotili z merjenjem optične gostote suspenzije celic v času in metabolične aktivnosti z resazurinsko metodo. Z elektrostatskim sukanjem smo iz polietilenoksida, polivinilpirolidona ter kombinacije alginata in polietilenoksida izdelali nanovlakna brez in z vgrajenimi bakterijskimi celicami ter preverili uspešnost vgradnje in viabilnost celic. Tehniki plastenja in sukanja smo povezali tako, da smo v nanovlakna vgradili s plastenjem obložene celice.

Polelektrolitno oblaganje celic je bilo glede na meritve zeta potenciala uspešno tako na živih bakterijah *E. coli* kot na bakterijah in sporah iz rodu *Bacillus*. Ugotovili smo, da se z večanjem števila plasti v oblogi časovno zamakne eksponentna faza rasti celic, obložene celice pa so metabolno aktivne skozi daljši čas kot neobložene celice. Z elektrostatskim sukanjem smo iz navedenih polimerov izdelali nanovlakna, v katerih so bile imobilizirane bakterijske celice ali spore. Celice so vgrajene vzporedno s smerjo nanovlaken. Naši poskusi na agarjih ploščah so pokazali, da *E. coli* niso preživele elektrostatskega sukanja, bakterije in spore *Bacillus* sp. pa so pokazale visoko viabilnost. Tudi polielektrolitna obloga na bakterijah *E. coli* ni izboljšala njihove viabilnosti med sukanjem. Sklepamo, da so različne bakterije različno odporne na stres, ki so mu izpostavljene med elektrostatskim sukanjem. Glede na rezultate se je tehnika plastenja izkazala za primeren način imobilizacije *E. coli*, medtem ko je elektrostatsko sukanje primerno za grampozitivne bakterijske celice (pokazano na bakterijah iz rodu *Bacillus*), ne pa za gramnegativne *E. coli*.

**Ključne besede:** imobilizacija, bakterijske celice, tehnika plastenja, polielektrolitna obloga, elektrostatsko sukanje, nanovlakna









## ABSTRACT

The industrial production of biopharmaceutical product is based on the use of bacterial cells. For the purpose of preserving biological material, researchers have been developing techniques that would enable artificial immobilization of living cells at the laboratory and industrial level. The purpose of the master's thesis was to develop and evaluate two types of immobilization of living bacterial cells *E. coli*, as gramnegative bacteria, and bacteria from the genus *Bacillus* sp. 25.2.M, as grampositive bacteria that are unlike *E. coli* capable of forming spores. Cell immobilization was carried out with polyelectrolyte coating (layer-by-layer deposition method) and electrospinning, according to the developed protocols. Cationic polyethylenimine and anionic alginate proved to be suitable for electrostatic coating of living cells. The charge of the cell surface and the loading of the polyelectrolyte layers were monitored by measuring zeta potential, the effect on growth was evaluated by measuring the optical density of the cell suspension in time and the metabolic activity by resazurin reduction assay. We used dispersions of polyethylene oxide, polyvinylpyrrolidone, and a combination of alginate and polyethylene oxide with and without bacterial cells for electrospinning of nanofibers, checked the level of cell incorporation in nanofibers and viability of the cells after incorporation. We connected the polyelectrolyte coating technique and electrospinning by incorporating coated cells into the nanofibres. The coating of cells with polyelectrolytes was successful on living bacteria *E. coli* and vegetative bacteria and spores of *Bacillus* sp., according to the measurements of zeta potential. We found out that with increasing number of polyelectrolyte layers the exponential growth phase of the cells is delayed, and that the coated cells are metabolically active on longer term than uncoated. From polymers mentioned above, we prepared nanofibers with immobilized living bacterial cells. Cells were aligned longitudinally with the direction of nanofibres. Our experiments on agar plates showed that *E. coli* did not survive electrospinning, while bacteria and spores of *Bacillus* sp. showed high viability. The coating of *E. coli* with polyelectrolytes did not improve their viability during electrospinning. We can conclude that different bacteria have different resistance to stress during electrospinning process. According to the results, the layer-by-layer deposition method is suitable for immobilization of *E. coli* and electrospinning is more appropriate for grampositive bacterial cells (shown on bacteria from the genus *Bacillus*), but not for gramnegative *E. coli*.

**Key words:** *immobilization, bacterial cells, layer-by-layer deposition method, polyelectrolyte coating, electrospinning, nanofibers*







## **SEZNAM OKRAJŠAV**

Mm: molekulska masa

ALG: alginat

PEI: polietilenimin

PEO: polietilenoksid

PVP: polivinilpirolidon

SEM: vrstični elektronski mikroskop (angl. scanning electron microscop)

LB: Luria-Bertani, rastni medij

NB: Nutrient broth, obogaten rastni medij

*E. coli*: *Escherichia coli*









# 1 UVOD

Mikroorganizmi so v naravi oziroma okolju, kjer so prisotni, podvrženi številnim stresnim dejavnikom. Z namenom zaščite pred škodljivimi vplivi okolja mikroorganizmi pogosto ustvarijo biofilme s samo-enkapsulacijo celic, ki zajema tudi razvoj ekstracelularnega polimernega matriksa ter tvorijo kompleksno ter dinamično skupnost celic. Biofilm zaščiti mikroorganizme pred neugodnim pH, neugodno koncentracijo soli, toksičnostjo kovin. Biofilm vpliva tudi na razvoj rezistence pri zdravljenju z antibiotiki (1).

Raziskovalci skušajo razumeti kompleksnost teh sistemov. Pridobljene informacije uporabljajo v razvoju različnih vrst imobilizacije z mikroorganizmi uporabnimi v biotehnologiji. Edinstvene lastnosti biofilma so podlaga za oblikovanje umetne imobilizacije, bodisi posameznih mikroorganizmov ali za ujetje večjega števila mikroorganizmov v film oziroma v ogrodje. Imobilizirane mikroorganizme uporabljajo tudi pri čiščenju okolja/odpadnih vod, kot reaktorje v obliki delcev in reaktorje za fermentacijo.

Umetni biofilmi kot reaktorji omogočajo večjo celično gostoto ter večjo stabilnost celic v primerjavi s tradicionalnimi reaktorji v proizvodnih serijah. Razvoj umetnih biofilmov teži k izdelavi filma, ki bi bil primeren za večkratno uporabo in tako ohranitev biološkega materiala, poleg tega bi omogočal prenos na industrijski nivo, s tem pa bi dosegli ponovljivost postopka (1).

Imobilizacija biološkega materiala v suhi obliki je pomembna za veliko število aplikacij, predvsem je v ospredju imobilizacija mikroorganizmov ter ohranitev njihove aktivnosti. Primer je imobilizacija bakterijskih virusov v terapiji s fagi, ki služi kot alternativa bakterijskim antibiotikom (2).

## 1.1 Bakterije in spore

Bakterije se pojavljajo v dveh oblikah, in sicer kot vegetativne celice ali kot spore. Bakterije opredeljujemo kot grampozitivne ter gramnegativne, glede na njihov odziv na barvanje po Gramu. Delitev temelji na razliki v zgradbi celične stene. Celična stena gramnegativnih bakterij je sestavljena iz lipopolisaharidov na zunanji površini, membrane iz lipidnega dvosloja, periplazmatskih prostorov, celične membrane ter nekaj plasti peptidoglikana, ki zaseda 5-10% celične stene. Peptidoglikan je kompleksen polimer N-acetilglukozamina ter N-acetilmuraminske kisline, ki s svojo strukturo daje obliko celici. Celična stena

grampozitivnih bakterij je sestavljena iz celične membrane ter do 40 plasti peptidoglikana, brez vmesnih periplazmatskih prostorov (3, 4). Pretvorba v sporogeno obliko je ena izmed strategij preživetja bakterij v okolju, ki jim ni naklonjeno. S sporulacijo postanejo celice bolj odporne na mehanski stres, UV sevanje, vročino, kemikalije, za kar je odgovorna struktura samih spor. Sredico, ki je protoplast spore, obdaja peptidoglikanska celična stena, nato pa sledi debela skorja iz manj premreženega peptidoglikana. Naslednja plast je sestavljena iz keratinu podobnih proteinov ter je odgovorna za neprepustnost protibakterijskih snovi v celico. Zunanost spore predstavlja lipoproteinska membrana, ki se imenuje eksosporij. V primeru izboljšanja okoljskih razmer se spore z germinacijo pretvorijo v vegetativne celice, ki so manj odporne na mehanske dražljaje in ostale dejavnike (3).

### **1.1.1 *Escherichia coli***

V magistrski nalogi smo uporabili kot modelno gramnegativno bakterijo *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* je najbolj raziskan prokariotski mikroorganizem, ki ga uporabljajo tako na laboratorijskem kot na industrijskem nivoju. Svoje mesto zaseda v mikrobiologiji ter v biotehnologiji. *E. coli* je namreč prvi mikroorganizem, ki so ga uporabili za biotehnološko pripravo rekombinantnih proteinov (5).

*E. coli* je fakultativni anaerob paličaste oblike. Dolga je med 2 in 6  $\mu\text{m}$  ter široka med 1,1 in 1,5  $\mu\text{m}$  (6). Bakterija v naravi ne tvori spor. Naseljuje tanko črevesje sesalcev, v naravi pa so prisotni tudi patogeni sevi te bakterije. *E. coli* spada med mezofile, tj. mikroorganizme, ki uspevajo pri srednjih temperaturah (med 10 in 40 °C). *E. coli* je tudi neutrofilen ter nehalotoleranten organizem, kar pomeni, da ji najbolj ustreza pH med 6 in 8 in da tolerira nizke koncentracije soli. Fiziološka raztopina, ki vsebuje 0,9 % NaCl, je optimalna vodna raztopina soli, v kateri preživi *E. coli*. V hipotoničnem okolju pride do povečanja pritiska znotraj celice, zaradi česar lahko membrana celice počí (7, 8).

Za negativen naboj na zunanji površini so odgovorne karboksilne in fosfatne skupine lipopolisaharidov, ki so pripeti nanjo. Peptidoglikan se v *E. coli* pojavlja največkrat v enem sloju ter pomembno vpliva na obliko in robustnost same celice (3, 9).

### **Biotehnološka raba *E. coli***

Bakterija *E. coli* je dobro raziskana tako na genetskem kot tudi na molekularno biološkem področju. Leta 1997 je Blattner s sodelavci prvič predstavil celotno zaporedje genoma *E. coli* za sev K-12. Bakterija je enostavna za gojenje, cena procesa pridobivanja

rekombinantnih proteinov v njej je nizka do zmerna in je odvisna od izbranega promotorja (promotorji so zaporedja DNA, ki usmerjajo vezavo polimeraze RNA in omogočijo začetek transkripcije). Danes je *E. coli* poleg nekaterih kvasovk in sesalskih celic še vedno eden najpogostejših mikroorganizmov, ki se uporabljajo za proizvodnjo bioloških zdravil. Njeno mesto sicer v zadnjem času prevzemajo predvsem sesalske celice, ki so sposobne proizvajati bolj kompleksne proteine (npr. protitelesa). Glavne pomanjkljivosti *E. coli* so, da ne omogoča ustreznih posttranslacijskih sprememb, kot je glikozilacija, ne omogoča pravilnega zvijanja bolj kompleksnih proteinov, poleg tega omejeno izloča rekombinantni protein. Slednji se namreč pogosto oblikujejo v inkluzijska telesa, netopen agregat, ki je biološko neaktiven. Izolacija in čiščenje teh agregatov je dokaj enostavno, vendar pa je ponovno zvitje teh proteinov v aktivno obliko zahtevno in drago (9, 10). Najpogostejši vektorski sistemi, ki jih vstavijo v *E. coli*, so derivati plazmidov (11).

### **1.1.2 Bakterije iz rodu *Bacillus* sev 25.2.M**

Sev iz rodu *Bacillus* z oznako 25.2.M, katerega delna sekvenca ribosomalne RNA je dostopna v GeneBank pod številko MG461560, smo v magistrski nalogi uporabili kot modelno grampozitivno bakterijo (12). Sev 25.2.M je izoliran iz vzorcev ustne votline prostovoljcev v okviru magistrske naloge, v kateri so preučevali protibakterijsko aktivnost ustnih bakterij proti bakterijam *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (13).

Gre za paličasto oblikovane, aerobne mikroorganizme. Za razliko od *E. coli* bakterije iz rodu *Bacillus* sporulirajo. Celična stena vegetativne oblike celic je sestavljena iz debele plasti peptidoglikanov, ki daje obliko celicam ter določeno stopnjo gibljivosti, kljub robustnosti same celične stene (3).

## **1.2 Imobilizacija bakterij**

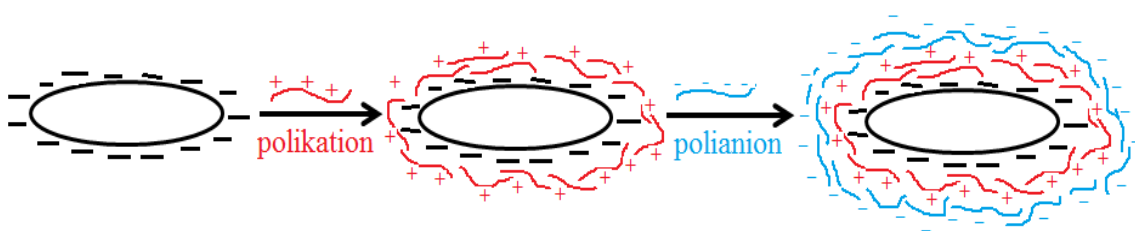
Bakterije *E. coli* so med biotehnološkimi procesi izpostavljene dejavnikom, ki niso vedno ugodni. Iz tega izhaja potreba po zaščiti celic, kar posledično vodi v izboljšanje izkoristka. Ustrezno zaščito je možno doseči s primernim načinom imobilizacije, med katere spadata tehnika plastenja bakterijskih celic s polielektroliti ter vgradnja celic v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem.

### 1.2.1 Tehnika plastenja - plast-na-plast

Tanke obloge, narejene s tehniko plastenja plast-na-plast (angl. layer-by-layer deposition method), so razvili v zgodnjih devetdesetih letih. Decher je s sodelavci razvil protokol za pripravo tankih filmov, ki temelji na alternirajoči adsorpciji polimerov z nasprotno nabitimi naboji na trdno površino. Glavno vlogo pri tem imajo elektrostatske sile (14). Imobilizacijo, pripravljeno s tehniko plastenja, uporabljajo na različnih področjih (biologija, biokemija, biomedicina) za pripravo biomotorjev, biosenzorjev, bioreaktorjev, za dostavo zdravilnih učinkovin in v tkivnem inženirstvu (15).

#### Oblaganje celic s tehniko plastenja

Oblaganje celic s tehniko plastenja je uporabna metoda za ustvarjanje večslojne polimerne obloge na celičnih površinah. Plastenje omogoča načrtovanje kemijskih in fizikalnih lastnosti obloge, ki jo ustvarjamo. Osnova za to metodo je nabita površina oblaganca. V primeru negativno nabitega oblaganca sledi dodajanje kationskega polielektrolita. Polikation se adsorbira na površino negativno nabite celične površine zaradi elektrostatskih interakcij. Po inkubaciji substrata v polikationu sledi spiranje površine, s čimer odstranimo odvečen polielektrolit. Nato sledi oblaganje s polianionom po enakem postopku (slika 1). Z izmenjevanjem različno nabitih polielektrolitov ustvarimo na površini substrata večplastno oblogo, ki jo lahko kasneje modificiramo z namenom povečanja funkcionalnosti (6). Oblogo se lahko premreži z ionskimi premreževalci (angl. cross-linker) ter vgradi organske molekule ali bio-komponentne, kot so proteini, delci, bio-polimeri ter površinsko aktivne snovi (6, 16).



Slika 1: Princip oblaganja celice s tehniko plastenja

#### Polielektroliti

Za oblaganje s tehniko plastenja uporabljamo polimere iz skupine polielektrolitov, ki vsebujejo ponavljajoče se monomerne enote s funkcionalnimi skupinami sposobnimi ionizacije v vodnih raztopinah v odvisnosti od pH. Polielektrolite delimo na polianione

(spojine z mnogo negativnih nabojev na verigi) ter polikatione (spojine z mnogo pozitivnih nabojev).

Polielektroliti so lahko naravnega ali sinteznega izvora (preglednica I). Polielektroliti naravnega izvora so zaželeni zaradi biokompatibilnosti in biorazgradljivosti, v določenih primerih pa izboljšajo razpoložljivost celičnih vezavnih mest preko različnih mehanizmov (uporabno v tkivnem inženirstvu) (16). Sintezni polielektroliti so prav tako primerni za oblaganje s plastenjem. Pri tem je potrebno upoštevati nerazgradljivost le-teh, kar lahko vodi do nalaganja v telesu ter posledično do pojava toksičnih učinkov (11).

*Preglednica I: Primeri naravnih ter sinteznih polielektrolitov, primernih za tehniko plastenja.*

	<b>Naravni polielektroliti</b>	<b>Sintezni polielektroliti</b>
<b>Polianioni</b>	alginat hialuronska kislina karagenan pektin	poliakrilna kislina (PAA) polistirensulfonat (PAS)
<b>Polikationi</b>	hitosan poli-L-arginin poli-L-lizin	polialilamin hidroklorid (PAH) polietilenimin (PEI)
<b>Amfioni</b>	želatina	

### **Parametri, pomembni za oblaganje celic s tehniko plastenja**

Lastnosti nastalega filma uravnavamo z izborom vrste polielektrolitov, molekulske mase in gostote naboja polielektrolita, količine adsorbiranih snovi, časa spiranja, pH ter ionske moči medija (17). Polielektroliti, uporabljeni za plastenje, morajo biti sposobni ionizirati pri pH, pri katerem izvajamo oblaganje, na kar moramo paziti predvsem v primeru šibkih polielektrolitov. Posledično je od tega odvisna sama izdelava plasti s plastenjem, saj pH določa polielektrolitu gostoto naboja na površini. V primeru, da je pH raztopine blizu pKa funkcionalnih skupin uporabljenega polimera, debelina filma pade (18). V obzir je treba vzeti tudi celice, katerih viabilnost je odvisna od pH okolnega medija. pH polimerne raztopine lahko prilagodimo do take mere, da polielektroliti še vedno izkazujejo ionizacijo in so tako primerni za plastenje. Prav tako je v raztopinah pomembna vsebnost soli, ker ustrezna ionska moč raztopine preprečuje agregiranje obloženih delcev med seboj (6).

Viskoznost polielektrolitnih raztopin vpliva na agregiranje delcev oziroma celic, nanjo pa najbolj vpliva koncentracija polielektrolita. Z večanjem koncentracije namreč narašča viskoznost raztopine. Izbrati je potrebno tako koncentracijo polielektrolita, da njena

viskoznost ne ovira odlaganja polielektrolita na nabito površino. Pri previzkoznih raztopinah je odstranjevanje polimera po plastenju neučinkovito in prihaja do agregacije.

### **Prednosti plastenja bakterijskih celic**

Oblaganje bakterijskih celic s polimeri oziroma polielektroliti je zanimivo za raziskovalce številnih področij, saj ima metoda številne prednosti. Celice so mehke strukture, navadno mikrometrskih velikosti in jih lahko nagojimo v velikih količinah z majhnimi stroški. Celice med posameznimi vrstami bakterij se razlikujejo po velikosti in obliki; tako je na voljo širok nabor struktur, ki služijo kot osnova za plastenje.

Naslednja prednost je poljubna debelina filma, ki jo lahko uravnavamo na nanometrskem nivoju s prilagajanjem števila plasti. Poleg tega plastenje izvajamo v vodnem okolju pod blagimi pogoji, kar je primerno za večino bakterijskih vrst, ki v vodi oziroma fiziološki raztopini ohranjajo določen nivo biološke aktivnosti, medtem ko bi organska topila povzročila celično smrt (14). Polielektrolitni sloj lahko zakrije napake oblaganih celic, ustvarimo pa lahko tudi sistem z dobrimi adhezijskimi lastnostmi (19).

### **Omejitve tehnike plastenja**

Tehnika plastenja je relativno enostavna in prilagodljiva metoda za oblaganje celic, vendar se je potrebno zavedati njenih omejitev. Celice so živ sistem in so se sposobne aktivno odzvati na spremembe, ki jih povzročimo s plastenjem (17).

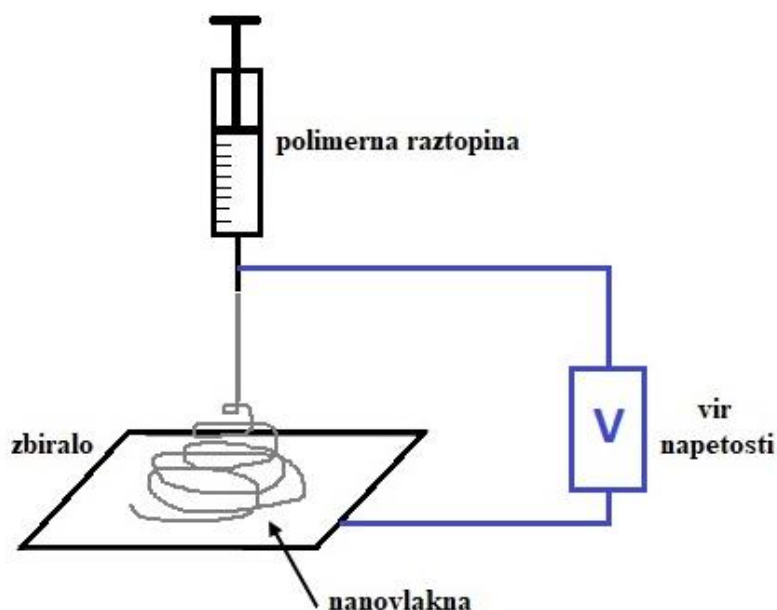
Plast polimera na površini celice predstavlja pregrado med celico in okolnim medijem. Z ujetjem celice v oblogo se lahko zmanjša njena komunikacija z zunanjim svetom. Poleg tega lahko ovojnica zmanjša transport hranil v celico ter zmanjša elastične lastnosti celične membrane. Zunanja ovojnica po oblaganju nosi naboj, kar ima lahko vpliv na tok ionov v celico. Smiselno je ovrednotenje toksičnosti polielektrolitov na celice, predvsem kadar gre za sintezne polielektrolite. V nekaterih primerih te spojine povzročajo nastanek por v membrani celic, kar vodi do porušanja koncentracijskih razmerij snovi znotraj celice. Pomembno je dejstvo, da se pri oblaganju celične površine z nabitimi polimeri spremenijo adhezijske lastnosti celic (17). Pri načrtovanju eksperimentov ter samega polielektrolitnega sloja je potrebno izbrati ustrezen postopek, sestavljen iz spiranja, centrifugiranja ter oblaganja celic, ter ustrezen material, da čim manj posegamo v sposobnost celične delitve in rasti. Upoštevati je potrebno lastnosti samih celic, ki se lahko razlikujejo med posameznimi sevi (debelina celične stene, velikost celic) (20).



## 1.2.2 Elektrostatsko sukanje

Elektrostatsko sukanje (angl. electrospinning) je tehnika, poznana že več kot 100 let. Spada med elektrohidrodinamske tehnike in je ena najbolj raziskanih metod za proizvodnjo nanovlaken. Nanovlakna, pripravljena s sukanjem, uporabljajo za namene tkivnega inženirstva, za dostavo zdravil (tudi bioloških) ter za izdelavo katalitičnih filmov (21, 22). Vgradnja živih bakterijskih celic v nanovlakna je način imobilizacije, privlačen za področje biotehnologije, saj se s primernim oblikovanjem biokompatibilnih polimerov lahko posnema naravni zunajcelični matriks v smislu bioloških ter mehanskih lastnosti (23). Z izbiro primerne materiala (polimera) ter s spreminjanjem procesnih parametrov lahko enostavno pripravimo polimerno ogrodje, ki vsebuje enakomerno razporejeno zdravilno učinkovino ali biološki material, pri čemer je stopnja vgradnje visoka, izguba učinkovine ali materiala pa majhna. Med elektrohidrodinamske tehnike spada tudi elektrostatsko razprševanje, ki je tehnika priprave delcev mikro in nano velikosti (24).

Sistem za pripravo nanovlaken sestavljajo brizga s kovinsko iglo, vir električne napetosti ter zbiralo (slika 2). Brizgo napolnimo s polimerno raztopino ustrezne prevodnosti ter vpnemo na črpalko. Za nastanek razlike v električnem potencialu sta potrebni dve elektrodi, kjer je ena pripeta na šobo igle, druga pa povezana z zbiralom. Pri izhajanju polimerne raztopine iz konca šobe se ustvari meniskus tekočine. Aplikiranje električne napetosti na iglo povzroči nabiranje naboja, privlačne sile med iglo ter zbiralom z nasprotnim nabojem ter odbojne sile znotraj raztopine ustvarijo iz meniskusa koničast Taylorjev stožec. S povečevanjem napetosti se iz Taylorjevega stožca postopoma izoblikuje curek polimerne raztopine, ki se podaljšuje in tanjša med padanjem proti zbiralu. Do tega pojava pride, ko sila električne napetosti premaga silo površinske napetosti raztopine in pri tem pride do podaljšanja curka raztopine. Med potovanjem curka tekočine proti zbiralu topilo izhlapeva, kar vodi do končnega produkta, suhih polimernih nanovlaken (23–25).



Slika 2: Shema naprave za elektrostatsko sukanje.

Morfologija in debelina posameznih nanovlaken, izdelanih z elektrostatskim sukanjem, sta odvisni od več parametrov, ki jih delimo v tri skupine: parametre raztopine, procesne parametre ter pogoje okolja (preglednica II). Kljub temu, da je v marsikaterem primeru težavno izdelati nanovlakna, ki si jih zamislimo, se je možno želenemu produktu približati z optimiziranjem spodaj naštetih parametrov (23).

Preglednica II: Parametri elektrostatskega sukanja.

Parametri raztopine	Procesni parametri	Pogoji okolja
Lastnosti polimera	Električna napetost	Temperatura
Koncentracija polimera	Pretok	Relativna vlažnost
Površinska napetost	Razdalja med iglo in zbiralom	
Prevodnost	Zbiralo	
Dielektrična konstanta topila		

Med parametre raztopine spadajo lastnosti polimera ter topila. Izbira topila je odvisna predvsem od topnosti polimera v njem, pri sukanju bakterij pa je treba paziti tudi na morebitno toksičnost topil za celice. Za elektrostatsko sukanje bakterijskih celic so primerni hidrofilni, biokompatibilni in biorazgradljivi polimeri, ki so netoksični, ter hkrati omogočajo ustrezno mehansko moč nastalih nanovlaken (23). Molekulska masa, linearnost oziroma razvejanost, narava ter koncentracija polimera so ključne lastnosti za intra- ter inter-

molekularne interakcije v raztopini in igrajo vlogo pri oblikovanju nanovlaken. Elektrohodinamski procesi temeljijo na prisotnosti električnega naboja v uporabljeni raztopini, za kar sta odgovorni električna prevodnost ter dielektrična konstanta raztopine. Prevodnost raztopine je torej odvisna od izbire topila, pomembna pa je tudi površinska napetost raztopine, saj je to glavna sila, ki nasprotuje nastanku Taylorjevega stožca (23, 26, 27). Polielektroliti z veliko gostoto naboja v raztopini povzročijo, da se med sukanjem generirajo močne odbojne sile, kar vodi v nestabilnost curka. Slednjo težavo se lahko reši s kombiniranjem polielektrolitov z neionogenimi polimeri (primer kombinacije sta alginat ter polietilenoksid) (26).

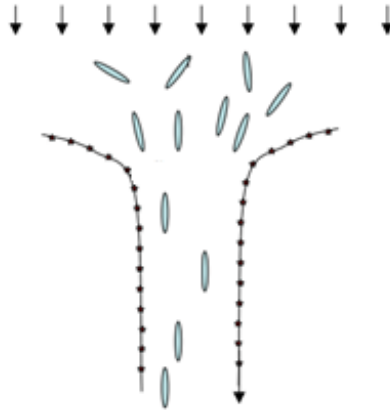
Procesni parametri so vezani na napravo za elektrostatsko sukanje, ki je shematsko predstavljena zgoraj na sliki 2. Hitrost pretoka polimerne raztopine iz igle je ključna za začetek sukanja, saj se mora najprej na koncu igle izoblikovati kapljica, kasneje pa mora biti izhajanje raztopine iz igle kontinuirano, da proces poteka zvezno. Najpomembnejši procesni parameter je električna napetost oziroma gradient le-te, aplicirana na polimerno raztopino in zbiralo. Gre za gonilno silo elektrostatskega sukanja, saj se z dovolj visoko napetostjo preseže površinska napetost polimerne kapljice, ki jo raztegne v tanek curek. Nanovlakna se zbirajo na prevodnem zbiralu, postavljeno vertikalno ali horizontalno, razdalja med iglo in zbiralom pa v manjši meri vpliva na debelino in morfologijo končnega produkta (23, 24). Čas elektrostatskega sukanja vpliva na debelino plasti izdelanih nanovlaken.

Temperatura okolja, pri kateri poteka sukanje polimerne raztopine, vpliva na hlapnost topila ter na viskoznost polimerne raztopine ter ima tako nasprotujoč vpliv na debelino nastalih nanovlaken (23, 24). Pomembna je tudi relativna vlažnost (angl. relative humidity ali krajše RH), ki vpliva na debelino, morfologijo ter mehanske lastnosti polimernih nanovlaken. V napravi za elektrostatsko sukanje s klimatsko komoro lahko oba parametra poljubno nastavimo (23, 27).

### **1.2.3 Elektrostatsko sukanje celic ali »celični electrospinning« in princip**

Z elektrostatskim sukanjem lahko izdelamo nanovlakna z možnostjo vgradnje zdravilne učinkovine ali bakterijskih celic. Imobilizirane celice imajo določene prednosti pred prostimi celicami. V nekaterih primerih jih lahko ponovno uporabimo, zasedejo manj prostora ter imajo manjše potrebe glede rastnega medija (21).

Cilj celičnega elektrostatskega sukanja je torej vgradnja mikroorganizmov v nanovlakna. Predpriprava obsega pripravo disperzije celic v izbrani polimerni raztopini. V primeru bakterij *E. coli* ter *Bacillus* sp. gre za paličasto oblikovane celice, katerih prostorska usmeritev je v polimerni disperziji naključna. Taylorjev stožec deluje kot »odtok« za celice. Pri tem se celice usmerijo vzdolžno glede na pretok in so tako že pri izstopu iz igle vzdolžno usmerjene glede na tok in nato v nastajajočih nanovlaknih (slika 3) (2).



Slika 3: Orientacija paličastih bakterij v Taylorjevem stožcu. Povzeto po Salalha et al. (2).

Elektrostatsko sukanje celic je podobno običajnemu sukanju samega polimera. Pri načrtovanju eksperimentov se je potrebno zavedati, da se po dodatku mikroorganizmov k polimerni raztopini lahko spremenijo lastnosti raztopine, izbira sestavin pa vpliva na končne lastnosti in morfologijo nanovlaken.

Sama voda ni optimalno topilo za elektrohodinamsko sukanje zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki vplivajo na nestabilnost procesa elektrostatskega sukanja. Prav tako ima voda visoko dielektrično konstanto ter površinsko napetost, zato je za izdelavo vlaken potrebno uporabiti precej visoko električno napetost, da premaga površinsko napetost vodne polimerne raztopine (1, 2, 28). Kljub določenim težavam, ki jih predstavlja voda kot topilo, je njena prednost v primerjavi z organskimi topili netoksičnost tako za bakterije kot za ljudi in okolje, saj polimerne suspenzije z *E. coli* ne moremo pripraviti z organskimi topili zaradi njihove toksičnosti.

### 1.3 Metode vrednotenja velikosti in morfologije imobiliziranih celic

Vzorci tehnike plastenja ter elektrostatskega sukanja lahko ovrednotimo na različne načine. Pri tem si pomagamo z različnimi neposrednimi in posrednimi metodami vrednotenja velikosti in morfologije nastalih vzorcev (preglednica III). Pri našem delu smo uporabljali merjenje zeta potenciala za spremljanje nalaganja plasti polielektrolitov ter optično in elektronsko mikroskopijo za karakterizacijo velikosti in morfologije celične površine ter površine vlaken.

*Preglednica III: Metode vrednotenja velikosti ter morfologije obloženih delcev/celic, izdelanih s tehniko plastenja, ter nanovlaken, izdelanih z elektrostatskim sukanjem (17, 23).*

<b>Metode vrednotenja obloženih celic s tehniko plastenja</b>	<b>Metode vrednotenja nanovlaken</b>
Optična mikroskopija	Optična mikroskopija
SEM (angl. scanning electron microscopy): <i>Vrstična elektronska mikroskopija</i>	SEM (angl. scanning electron microscopy): <i>Vrstična elektronska mikroskopija</i>
TEM (angl. transmission electron microscopy): <i>Presevna elektronska mikroskopija</i>	TEM (angl. transmission electron microscopy): <i>Presevna elektronska mikroskopija</i>
AFM (angl. atomic force microscopy): <i>Mikroskopija na atomsko silo</i>	SWLI (angl. scanning white light interferometry): <i>Vrstična interferometrija z belo svetlobo</i>
Zeta potencial	FE-SEM (angl. field emission scanning electron microscopy): <i>Vrstična elektronska mikroskopija s hladnim virom elektronov na poljsko emisijo</i>
IR ter UV-VIS spektrometrija <i>(IR- infrardeča, UV- ultravijolična, VIS- vidna svetloba)</i>	PALS (angl. positron annihilation lifetime spectroscopy): <i>Pozitronska anihilacijska spektroskopija</i>
Elipsometrija	BET (angl. Brunauer-Emmett-Teller surface area analysis): <i>BET analiza površine</i>
Resonanca površinskih plazmonov	
SAXS (angl. Small-angle X-ray scattering): <i>Optična dvojna difrakcija z ozkokotnim rentgenskim sipanjem</i>	

Princip merjenja **zeta potenciala** temelji na laserski Dopplerjevi mikroeletroforezi. Elektroforeza je gibanje delcev, relativno glede na medij. Vzorec z nabitimi delci priključimo na vir električne napetosti, ki sproži potovanje delcev proti nasprotno nabiti elektrodi. Hitrost potovanja se določi s tehniko fazne analize sipane svetlobe, kar omogoči izračun elektroforetske mobilnosti in preko le-te izračun zeta potenciala delcev. Izračun zeta potenciala temelji na Henry-jevi enačbi:  $\mu_e = \frac{2 * \epsilon * \zeta * f(Ka)}{3 * \eta}$ , pri čemer je  $\mu_e$  elektroforezna mobilnost,  $\epsilon$  dielektrična konstanta,  $\zeta$  zeta potencial,  $\eta$  viskoznost medija in  $f(Ka)$  Henry-jeva funkcija, ki se v našem primeru nanaša na Smoluchowski aproksimacijo (29).

**Vrstična elektronska mikroskopija** (angl. scanning electron microscopy- SEM) je uporabna tehnika predvsem za opazovanje morfologije trdnih vzorcev, kemijske strukture ter kristaliničnosti vzorcev. Slike posnamemo na podlagi interakcij med elektroni in trdno snovjo. Ustrezno predpripravljen vzorec v brezračni komori obstreljujemo s snopom elektronov z visoko kinetično energijo. Pri stiku z vzorcem je izbitih več vrst elektronov, fotonov, vidna svetloba ter toplota. Za opazovanje morfologije vzorca so pomembni sekundarni elektroni. Detektor izoblikuje sliko glede na prejete signale. SEM omogoča nastanek slik visoke ločljivosti, ključnih za preučevanje površine vzorcev (30).

## 1.4 Metode za vrednotenje preživetja celic

Celice so med oblaganjem s polielektroliti ali med elektrostatskim sukanjem podvržene različnim dejavnikom, ki lahko nanje delujejo škodljivo. V primeru, da so v zelenem produktu prisotne žive celice, je ključnega pomena spremljanje njihove živosti oziroma viabilnosti tekom celotnega procesa. Za spremljanje oziroma določanje viabilnosti celic uporabljajo različne teste, ki so naštetih v preglednici IV. Teste delimo v tri skupine, in sicer za spremljanje celične rasti, za določanje viabilnosti ter biokemične aktivnosti.

Spremljanje celične rasti najpogosteje poteka z inokulacijo trdnih ali tekočih gojišč. Turbidimetrična tehnika oziroma merjenje optične gostote (angl. optical density ali krajše OD) je običajna tehnika za določanje faze rasti bakterij v mediju ali določanje števila celic v aktivno rastoči kulturi. Gre za merjenje sipane svetlobe v mediju, ki postane moten zaradi rasti bakterij. Meritve smo izvajali na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 600 nm ( $OD_{600}$ ), pri kateri je prisotnih najmanj interferenc. Z merjenjem  $OD_{600}$  smo torej preverili sposobnost delitve celic ter kinetiko rasti bakterij, s štetjem kolonij na trdnih gojiščih pa smo določili število celic v preiskovanem vzrocu (17, 31).

Spremljanje viabilnosti temelji na biokemični aktivnosti znotraj celic. Poleg viabilnosti testi pravzaprav določajo funkcionalnost celic, kar je zelo primerno za predhodna testiranja. Osnova testov so biokemične reakcije, ki potekajo le v živih celicah. Tako lahko enostavno primerjamo imobilizirane celice z neimobiliziranimi oz. prostimi celicami (17, 31). Metoda, ki temelji na biokemični aktivnosti celic, je resazurinska metoda. Resazurin je redoks barvilo in je indikator celične metabolične aktivnosti. Uporabljamo ga za spremljanje celične viabilnosti, proliferacije celičnih kultur ali za študije citotoksičnosti. Test temelji na znotrajcelični redukciji resazurina do resorufina, redukcijo pa so zmožne izvajati viabilne in metabolično aktivne celice. Raztopino lahko pripravimo v fizioloških pufrih, kar nam omogoča neposredno uporabo na celični kulturah. Raztopina resazurina je v osnovi temno modra in nima intrinzične fluorescence. Nastala spojina po redukciji resorufina izkazuje fluorescenco rožnate barve. Če resorufin ekscitiramo z valovno dolžino 579 nm, emitira fluorescenčni signal pri 584 nm, ki ga izmerimo s čitalcem mikrotitrskih plošč (32).

*Preglednica IV: Metode za določanje oz. spremljanje živosti (viabilnosti) celic (17).*

SKUPINE TESTOV	TESTI
<b>Spremljanje celične rasti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inokulacija tekočih gojišč (spremljanje OD<sub>600</sub>)</li> <li>• Štetje kolonij na trdnih gojiščih</li> </ul>
<b>Barvila za določanje viabilnosti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trypan blue</li> <li>• FDA (fluorescein diacetat)</li> <li>• DAPI (2-fenilinodol dihidroklorid)</li> <li>• Kombinacije barvil</li> </ul>
<b>Biokemična aktivnost</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Privzem kisika</li> <li>• Resazurinska metoda</li> <li>• Spremljanje aktivnosti GFP (angl. green fluorescent protein)</li> <li>• Indukcija encimov</li> <li>• Avtofluorescenca</li> </ul>

## 2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je imobilizacija gramnegativnih bakterij *E. coli* in grampozitivnih bakterij iz rodu *Bacillus* (GeneBank accession no. MG461560) ter njihovih spor s tehniko plastenja in elektrostatskim sukanjem. Razvili in pripravili bomo postopke za oblaganje celic s polielektroliti s tehniko plastenja ter za izdelavo nanovlaken z vgrajenimi celicami s procesom elektrostatskega sukanja.

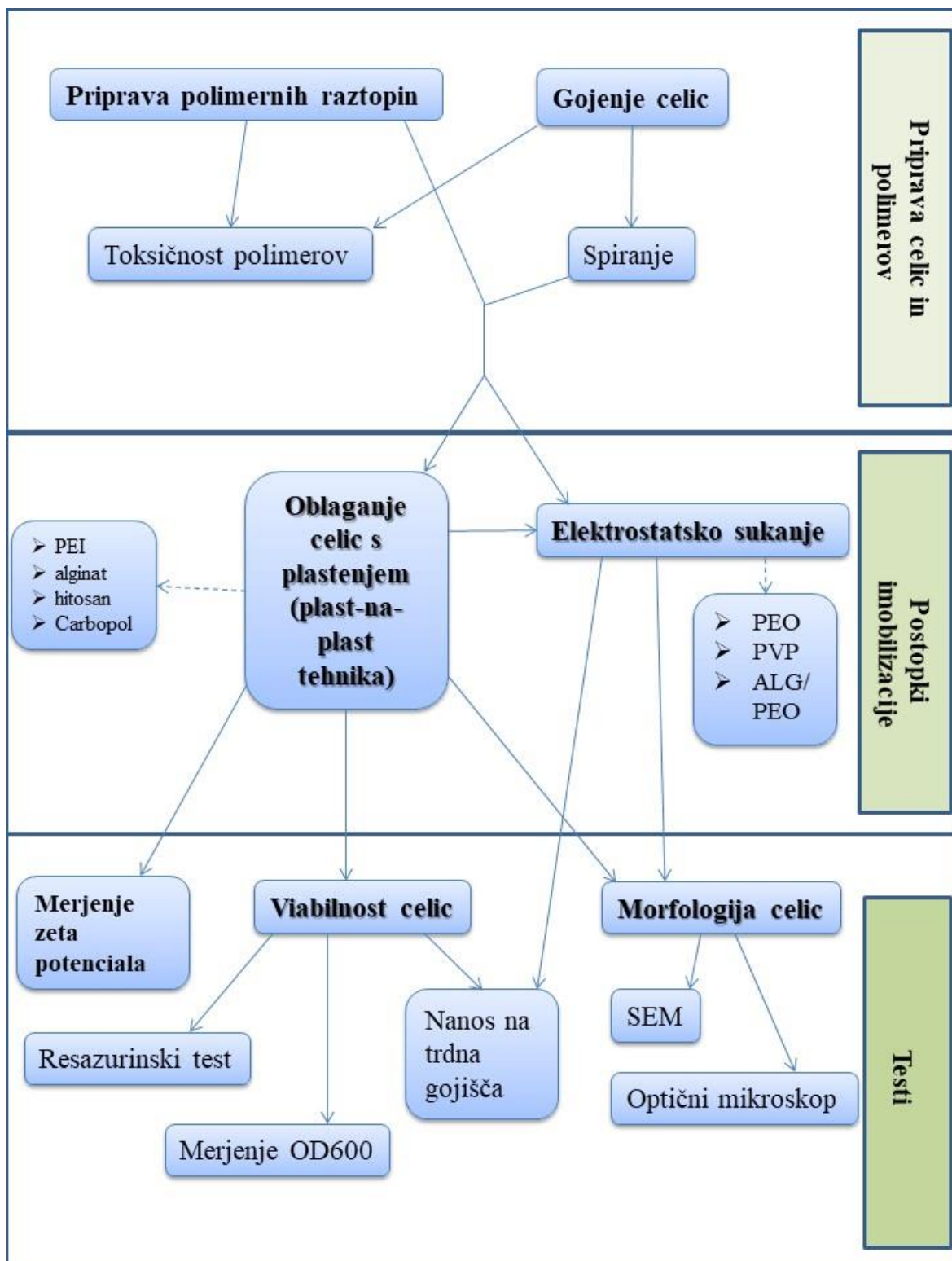
Načrt eksperimentalnega dela je predstavljen na sliki 4. Najprej bomo razvili pogoje za gojenje bakterij *E. coli* in bakterij *Bacillus* sp. iz njihovih spor. Nato bomo na osnovi predhodnih poskusov razvili postopek oblaganja celic s tehniko plastenja. Z variiranjem koncentracij in volumnov polielektrolitov (polietilenimin, alginat, hitosan, poliakrilna kislina) bomo določili najbolj optimalno kombinacijo polielektrolitnih disperzij za oblaganje celic. Oblaganje bomo spremljali pod optičnim mikroskopom, nalaganje plasti pa z merjenjem zeta potenciala. Vpliv plasti na celični metabolizem bomo preverili z resazurinskim testom ter merjenjem OD<sub>600</sub> po inokulaciji tekočega gojišča.

Za vgradnjo celic v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem bomo testirali naslednje polimere: polietilenoksid (PEO), polivinilpirolidon (PVP) ter kombinacijo alginata in PEO. Najprej bomo poiskali ustrezne koncentracije polimerov, s katerimi lahko izdelamo nanovlakna primerne debeline. V nanovlakna bomo vgradili neobložene in obložene celice *E. coli* ali *Bacillus* sp. ter z gojenjem na trdnem gojišču preverili, ali celice preživijo sukanje. Z vrstičnim elektronskim mikroskopom bomo ovrednotili izdelana nanovlakna. Izmerili bomo premere, ovrednotili površino nanovlaken ter vgrajene celice.

Hipoteze, ki smo jih postavili, so naslednje:

1. Tehnika plastenja omogoča pripravo polielektrolitne obloge na bakterijskih celicah.
2. Metabolizem obloženih bakterij *E. coli* s tehniko plastenja se razlikuje od metabolizma prostih, neimobiliziranih celic.
3. Z izbranimi polimeri lahko pripravimo nanovlakna, v katera lahko vgradimo bakterije *E. coli*, bakterije iz rodu *Bacillus* ali njihove spore ter bakterijske celice, obložene s polielektroliti.
4. Viabilnost gramnegativnih in grampozitivnih bakterij po procesu elektrostatskega sukanja se razlikuje, prav tako prisotnost polielektrolitne obloge vpliva na preživelost bakterij.
5. Oblika oz. morfologija celic *E. coli* se med elektrostatskim sukanjem spremeni.





Slika 4: Shematski načrt eksperimentalnega dela.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Kemikalije in materiali

- Carbopol 941 NF, Lubrizol, Life Sciences, ZDA
- Hitosan, nizkomolekularni, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Natrijev alginat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polietilenimin, Mm 25 000 g/mol, razvejan, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polietilenimin Mm 600 000 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polietilenoksid Mm 400 000 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polietilenoksid Mm 900 000 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polivinil pirolidon 30K, Lek d.d., Slovenija
- Polivinil pirolidon F90, Lek d.d., Slovenija
- NaCl, Merck KgaA, Nemčija
- Resazurin, natrijeva sol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Agar, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, ZDA
- Medij LB Broth base (Lennox L Broth Base), Invitrogen, ThermoFisher Scientific, ZDA
- Medij Nutrient Broth I, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Prečiščena voda (pripravljena na Fakulteti za farmacijo, UL)
- Visoko prečiščena voda- MilliQ voda, ThermoFisher Scientific, ZDA
- Etanol 96% (ustreza Ph. Eur.), Kefo, Slovenija
- Incidin liquid, Ecolab, ZDA
- Aluminijska folija, Labor
- Membranski filter (5  $\mu$ m pore) Sartorius, Nemčija
- Hemocitometer Brand GmbH, Nemčija
- Injekcijske brizge (5 ml), B. Braun Melsungen AG, Nemčija
- Mikrotitrne plošče Nunclon Surface, črne, 96 vial, Nunc, ThermoFisher Scientific, ZDA
- Prevoden ogljikov trak Oxon, Oxford Instruments, Velika Britanija
- Plošče za pripravo trdnih gojišč

### **3.2 Celice, vključene v imobilizacijo**

V poskusih smo uporabili gramnegativne bakterije *E. coli*, sev Top10, ki je bil pridobljen s strani projektnega partnerja. Uporabili smo grampozitivne bakterije in spore *Bacillus* sp. sev 25.2.M, ki so ga izolirali iz ustne votline zdravih ljudi v okviru projekta in magistrske naloge z naslovom Izolacija in karakterizacija bakterij z antimikrobnim učinkom proti bakteriji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Vzorčenje ustne votline so izvajali z dovoljenjem Komisije RS za medicinsko etiko (številka: 74/04/14) (13). Modelna organizma se poleg različnega barvanja po Gramu razlikujeta tudi po tvorbi spor. Bakterije *E. coli* jih ne tvorijo, medtem ko bakterije *Bacillus* sp. v neugodnem okolju tvorijo spore.

### **3.3 Predpriprava raztopin in gojišč**

#### **Raztopine NaCl**

Natehtali smo 9 g NaCl ter jo raztopili v manjši količini destilirane vode v litrski bučki. Nato smo dopolnili do oznake z vodo ter premešali. Tako pripravljeno 0,9 % raztopino NaCl smo prenesli v pollitrsko steklenico in jo sterilizirali v avtoklavu na 121 °C 20 min in nadtlaku 1 bar. Na enak način smo pripravili 0,45 % in 0,09 % raztopino NaCl.

#### **70% etanol**

V dvolitrsko steklenico smo nalili 1670 g 96 % etanola ter dodali 330 g prečiščene vode. Raztopino smo dobro premešali in odmerili želeno količino 70 % etanola v manjše vsebnike.

#### **Rastni medij Luria-Bertani (LB broth)**

Rastni medij Luria-Bertani vsebuje 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta in 5 g NaCl na 1 liter raztopine.

Tekoče gojišče z rastnim medijem smo pripravili tako, da smo v pollitrsko steklenico natehtali 8 g LB rastnega medija ter dodali 400 mL prečiščene vode z merilnim valjem. Mešanico smo dobro premešali in avtoklavirali na 121 °C 20 min pri nadtlaku 1 bar. Po sterilizaciji smo gojišče do uporabe shranili v hladilniku.

Za pripravo trdnega gojišča smo v mešanico dodali 6 g agarja in jo sterilizirali pri istih pogojih. Po sterilizaciji smo medij ohladili na 60 do 70 °C. Vlivanje plošč je potekalo v LAF (angl. laminar air flow) komori, v aseptičnih pogojih. Komoro smo najprej prebrisali z etanolom in Incidinom ter pustili prižgano UV lučko. Po koncu vlivanja smo plošče pustili

v komori toliko časa, da je odparela kondenzirana vodna para s pokrovov. Plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.

### **Obogateno gojišče hranilni bujon (angl. Nutrient broth I medium)**

Obogaten medij hranilni bujon vsebuje 1 g glukoze, 15 g peptona, 6 g NaCl in 3 g kvasnega ekstrakta na 1 liter raztopine.

Trdno obogateno gojišče smo pripravili tako, da smo v politrsko steklenico zatehtali 1,771 g hranilnega bujona in 6,375 g agarja ter dodali 425 ml prečiščene vode. Mešanico smo dobro premešali, nadaljnja postopka sterilizacije raztopine in vlivanje plošč sta potekala na enak način, kot je opisan zgoraj.

### 3.4 Laboratorijska oprema

- Analitska tehtnica AX224 M-Pact, Sartorius, Nemčija
- Analitska tehtnica XS 205 Dual Range, Mettler Toledo, Švica
- Tehtnica Sartorius AX4202 M-Pact, Nemčija
- Naprava za elektrostatsko sukanje brez zračne komore: črpalka R-99E, RazelTM, Italija; izvor visoke napetosti HVG-P60-R-EU, Linari Engineering, Italija
- Naprava za elektrostatsko sukanje Fluidnatek LE100, Bioinicia, Španija
- Avtoklav A-21CA, Kambič, Slovenija
- Centrifuga za posedanje celic Minig, IKA GmbH, Nemčija
- Inkubator Orbital Shaker-Inkubator ES-20, Grant-Bio, Velika Britanija
- LAF komora Variolab Mobilien W90, Nemčija
- Liofilizator Beta 1-8K Manual, Martin Christ GmbH, Nemčija
- Magnetno mešalo, IKA GmbH, Nemčija
- Aparat za določanje zeta potenciala Zetasizer Nano, Malvern, Velika Britanija
- pH/ion meter 220 SevenCompact, Mettler Toledo, Švica
- Viskozimeter And Vibro Viscometer SV-10, Japonska
- Čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire, Švica
- UV- VIS spektrofotometer Agilent 8453, Agilent technologies, ZDA
- Fotoaparatus Olympus Camedia C-7070 Wide Zoom, Japonska
- Optični mikroskop Olympus CX41RF, Japonska
- Vrstični elektronski mikroskop, SEM Supra 35 VP, Nemčija

## 3.5 Metode

### 3.5.1 Gojenje in spiranje bakterij

Postopek gojenja in spiranja celic *E. coli* ter *Bacillus* sp. smo razvili z modificiranjem postopka iz literature (6, 19). Celice *E. coli* smo gojili v erlenmajericah s 50 mL rastnega medija, v inkubatorju z aerobnimi pogoji na 37 °C s stresanjem (150 rpm) približno 5 ur. Nagojeno disperzijo celic smo do uporabe shranili v hladilniku pri 4-8 °C. Na dan poskusa smo v 50 mL svežega rastnega medija odpipetirali 5 mL celic, nagojenih en dan prej ter jih inkubirali v inkubatorju pri istih pogojih. Rast celic smo spremljali z merjenjem OD<sub>600</sub> na UV-VIS spektrofotometru; kot referenčni vzorec smo uporabili rastni medij brez celic. Celice smo gojili do OD<sub>600</sub> ~ 0,8, ko so v eksponentni fazi rasti. Za zmanjšanje možnosti za okužbo smo delo izvajali ob prižganem gorilniku.

Gojenju je sledilo spiranje celic, s čimer smo zamenjali rastni medij z 0,9 % raztopino NaCl in tako odstranili hranila in soli iz rastnega medija. V 1,5 mL epice smo odpipetirali po 1000 µL sveže nagojenih *E. coli* ter jih centrifugirali 5 min na 2000 g na centrifugi za posedanje celic. Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili, pregledali pelet ter dodali v vsako epico 1000 µL 0,9 % NaCl. Vzorce smo vorteksirali (~ 15 s), tako smo ponovno dobili disperzijo celic, tokrat v 0,9 % NaCl. Postopek centrifugiranja, vorteksiranja in ponovnega dodajanja 0,9 % NaCl smo ponovili še dvakrat. Po koncu spiranja so bile celice v vsaki epici redispergirane v 500 µL 0,9 % NaCl.

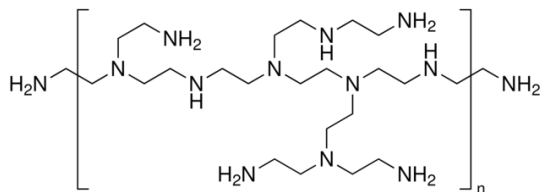
Bakterije *Bacillus* sp. smo spirali na enak način. Začetno disperzijo spor smo dobili z Inštituta Jožefa Stefana. Disperzija v 0,9 % NaCl je bila močno koncentrirana, zato smo se odločili za redčenje disperzije z 0,9 % NaCl do OD<sub>600</sub> ~ 0,8, brez dodatnega spiranja in centrifugiranja spor.

### 3.5.2 Priprava raztopin polimerov

Celice *E. coli* smo v preliminarnih poskusih obložili z različnimi vodotopnimi polimeri oziroma polielektroliti. Iskali smo optimalno kombinacijo polimerov s testiranjem različnih polimerov ter različnih koncentracij in volumnov.

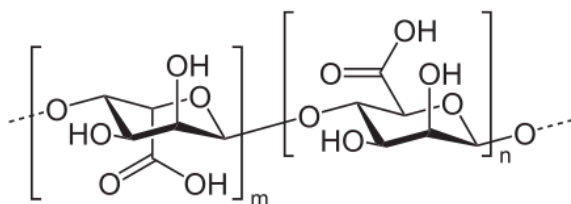
**Polietilenimin** [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>n</sub>] je sintezni polimer, ki v strukturi nosi aminske skupine (slika 5). Za plastenje celic smo uporabili razvejan polietilenimin z molekulsko maso 25 000 g/mol

ter 600 000 g/mol. Razvejan polietilenimin vsebuje primarne, sekundarne ter terciarne amine. Gre za vodotopen polimer, s pKa 8,4 (33).



Slika 5: Struktura razvejanega polietilenimina.

**Alginska kislina**  $[(C_6H_8O_6)_n]$  je naraven biopolimer, prisoten v celični steni rjavih alg (slika 6). Gre za biokompatibilen ter biorazgradljiv polimer, zelo uporaben kot stabilizator ter krioprotektant (34). Alginat je anionski polisaharid, sestavljen iz beta-D-manuronskih ter iz alfa-L-glukuronskih delov, negativen naboj pa nosijo karboksilne skupine. pKa alginske kisline znaša 3,5 (vrednosti pKa manuronskih in guluronskih kislinskih delov alginata znašata 3,38 in 3,65) (19, 35). Alginska kislina ni topna v vodi, vodotopna pa je njena natrijeva sol. Molekulska masa polimera variira nekje med 10 000 in 600 000 g/mol (36).



Slika 6: Struktura alginske kisline.

**Hitosan** je naraven, biokompatibilen ter biorazgradljiv polisaharid, ki ga pridobivajo z N-deacetilacijo hitina, prisotnega v celični sten nekaterih gliv ter ogradju členonožcev. Hitosan je kopolimer glukozamina ter N-acetilglukozamina, naboj pa nosijo aminske skupine. Gre za šibko bazo, netopno v vodi ter organskih topilih, je pa hitosan topen v razredčenih vodnih raztopinah kislin (15, 19, 34, 37).

**Carbopol 941** je komercialno ime za vodotopen sintezni polimer akrilne kisline. Zanj je značilna nizka relativna viskoznost ter je primeren za pripravo losjonov in gelov (34, 38).

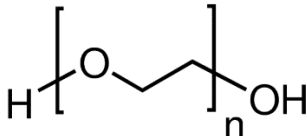
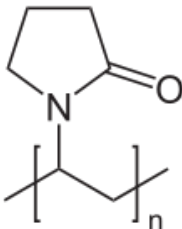
V večini poskusov smo uporabili 0,1 % (m/V) polimerne raztopine. Natančno smo zatehtali 200 mg polimera v 250 mL erlenmajerico z obrusom in dodali 200 mL visoko prečiščene vode. Polimerne disperzije smo pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo uravnali pH raztopin z 1 M HCl ali 2 M NaOH na približno 7,0-7,5 s pH metrom, ki smo ga predhodno

umerili z vnaprej pripravljenimi pufrskimi raztopinami. Nato smo izmerili viskoznost disperzij na viskozimetru, pri čemer smo najprej določili viskoznost prečiščene vode kot kontrolo. Ob vsaki meritvi smo zapisali temperaturo, izpisano na aparaturi. Pripravljene polielektrolitne disperzije smo pred dodatkom k celicam filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 5  $\mu\text{m}$ .

### Polimeri, uporabljeni za elektrostatsko sukanje

Za elektrostatsko sukanje celic smo testirali tri vodotopne polimere, poleg natrijevega alginata še polietilenoksid in polivinilpirolidon, ki sta predstavljena v Preglednici V.

*Preglednica V: Glavne fizikalno-kemijske značilnosti polietilenoksida (PEO) 900 000 ter polivinilpirolidona (PVP) F90 (34, 39, 40)*

	PEO 900 000	PVP 90F
<b>Biokompatibilnost</b>	da	da
<b>Molekulska formula</b>		
<b>Molekulska masa [g/mol]</b>	900 000	790 000-1 350 000
<b>Topnost</b>	voda; organska topila: etanol, toluen, acetonitril, kloroform, dimetilformamid,...	voda; organska topila: etanol, 1,2-propilenglikol, izopropanol,...
<b>Viskoznost</b>	8800-17 600 mPa $\times$ s (5 %, 25 °C)	300-700 mPa $\times$ s (10 %, 20 °C)

Pripravili smo naslednje polimerne disperzije (odvisno od poskusa): 4 % (m/m) PEO, 5 % (m/m), 10 % (m/m), 12 % (m/m) in 15 % (m/m) PVP ter kombinacijo ALG ter PEO v različnih masnih deležih (20/80, 40/60, 60/40, 80/20) v skupni polimerni koncentraciji v raztopini 5 % (m/m). Polimer smo raztopili bodisi v vodi (prazna nanovlakna) bodisi v disperziji celic (nanovlakna z vgrajenimi bakterijami). Glede na odmerjen volumen medija (brez ali s celicami) smo izračunali maso zelenega polimera, ga natehtali na tehtalni čolniciček ter dodali v vialo. Disperzijo smo mešali na magnetnem mešalu do popolne raztopitve polimera.



### 3.5.3 Oblaganje celic s polielektroliti s tehniko plastenja

Za tehniko plastenja bakterijskih celic smo uporabili naslednje kombinacije polielektrolitov v različnih koncentracijah ter volumnih: PEI 25 000 g/mol in alginat, PEI 25 000 g/mol in Carbopol 941, PEI 600 000 g/mol in alginat, hitosan in alginat ter PEI 25 000 g/mol, alginat in hitosan (preglednica VI). Protokol oblaganja *E. coli* ter *Bacillus* sp. smo pripravili z modificiranjem protokolov iz literature (14, 19, 41). Vzorcem s spranimi celicami *E. coli* (poglavje 3.5.1) smo dodali polielektrolitno disperzijo, izbrano za prvo plast obloge, ter vorteksirali 30 s. Sledila je 15-minutna inkubacija celic v polielektrolitni disperziji na 37 °C ob konstantnem mešanju. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali ter previdno odlili supernatant. Trikratno spiranje obloženih celic z 0,9 % NaCl je potekalo s pipeto brez vmesnega centrifugiranja. Celice smo na koncu redispergirali v 500 µL 0,9 % NaCl. Sledilo je oblaganje z nasprotno nabitim polielektrolitom. Inkubacija in spiranje celic sta potekala na enak način kot pri oblaganju s prvo polielektrolitno disperzijo (zgornji postopek), na koncu smo obložene celice redispergirali v 500 µL 0,9 % NaCl. Oblogo, ki je bila sestavljena iz zelenega števila plasti, smo izdelali s ponavljanjem zgornjih dveh postopkov oblaganja. Uspešnost plastenja smo določili z merjenjem zeta potenciala, pri čemer smo želeli doseči primerljivo spremembo zeta potenciala po adsorpciji kationa in aniona. Celice smo po oblaganju in končnem redispergiranju v 0,9 % NaCl uporabili za meritve metabolične aktivnosti, elektrostatsko sukanje, jih zamrznili na -80 °C za kasnejše določanje rasti z merjenjem OD<sub>600</sub> ali pa jih liofilizirali ter shranili v hladilniku pri 4-8 °C.

Oblaganje bakterij *Bacillus* sp. s PEI 25 000 g/mol je potekalo na enak način kot za *E. coli*, le da smo bakterije *Bacillus* sp. po oblaganju spirali s padajočo koncentracijo NaCl (0,9 %, 0,45 % ter 0,09 %) ter jih na koncu redispergirali v sterilizirani prečiščeni vodi ter jih uporabili za elektrostatsko sukanje.

#### Spore *Bacillus* sp.

Redčeno disperzijo spor (500 µL) smo odpipetirali v 1,5 mL epice, jih obložili s PEI 25 000 g/mol ter jih centrifugirali in sprali po zgoraj opisanem postopku za oblaganje bakterij *E. coli*. Na koncu smo obložene spore redispergirali v 500 µL sterilizirane prečiščene vode ter jih vgradili v nanovlakna.

### 3.5.4 Preživetje celic in spor v polimernih raztopinah

Preverili smo preživetje vegetativnih celic *E. coli* v vodnih disperzijah 4 % (m/m) PEO, 15 % (m/m) PVP ter 2 % (m/m) alginata in preživetje bakterij *Bacillus* sp. v vodni disperziji 4 % (m/m) PEO skozi 24-urno obdobje.

Celice smo najprej nagojili do  $OD_{600} \sim 0,8$ , nato pa smo v 50 mL falkonke odmerili 15 mL disperzije celic, ki smo jih centrifugirali 17 min na 650 g. Po odlitju supernatanta smo celice trikrat sprali s padajočo koncentracijo NaCl (0,9 %, 0,45 %, 0,09 %) z vmesnim centrifugiranjem ter vorteksiranjem disperzije. Na koncu smo pelet redispergirali v 3 mL sterilizirane prečiščene vode ter vsebine posameznih falkonk združili. V 20 mL stehtane vialo smo odmerili 4 mL disperzije celic ter v vsako vialo dodali določeno maso polimera. Odvzeli smo vzorec disperzije celic brez dodanega polimera (točka 0) ter vzorce polimerne disperzije s celicami v različnih časovnih točkah (po 1 h, 5 h, 9 h in 24 h). Za vsak odvzet vzorec smo pripravili redčitveno linijo z 0,9 % NaCl (od  $10^1$  do  $10^8$ -kratna redčitev), jo nanесли na trdna gojišča ter iz zraslih kolonij izračunali koncentracijo bakterij; izračun je opisan v nadaljevanju (poglavje 3.5.7, točka c).

### 3.5.5 Vgrajevanje celic v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem

Nanovlakna iz polimernih disperzij PEO, PVP in kombinacije alginat/PEO smo pripravili z dvema napravama: napravo Fluidnatek, ki ima klimatsko komoro, ter z napravo brez klimatske komore, ki je enostaven sestav črpalke, vira napetosti ter zbiralne površine, proces pa poteka pri sobnih pogojih.

Proces sukanja oziroma razprševanja v obeh napravah poteka po istem principu, le da je sestava v napravi Fluidnatek vertikalna in se nahaja v komori, kjer lahko uravnavamo temperaturo in relativno vlažnost zraka. Igla je vstavljena v kovinsko ogrodje, ki je preko kabla priključeno na pozitiven vir napetosti. Šoba z iglo je preko cevke povezana z napolnjeno brizgo, ki je vpeta v črpalke. Ogrodje šobe lahko premikamo, s čimer določimo željeno oddaljenost igle od zbirala. Zbiralo, oblečeno v alu folijo, je ozemljeno oz. priključeno na negativno napetost (42). Pred sukanjem disperzije bakterijskih celic v polimeru smo zbiralno folijo prebrisali s 70 % etanolom.

Izven komore v Fluidnatek napravi je krmilna enota, preko katere lahko spreminjamo različne parametre, kot so temperatura, relativna vlažnost, pretok zraka v komori, pretok iz

brizge, napetost ter premikanje ogrodja šobe z iglo po x in y osi, s čimer lahko dosežemo konstantne pogoje. V komori je prisotna tudi UV luč namenjena dezinfekciji prostora pred ali po sukanju.

Elektrostatsko sukanje večine vzorcev smo izvedli z napravo Fluidnatek pri 37 °C in 16 % relativne vlažnosti (27). Oddaljenost igle od zbirala je bila 15 cm. Napetost smo variirali med 10 in 15 kV, pretok pa med 500 in 1500  $\mu\text{L/h}$ , odvisno od poteka procesa (24).

Celice *E. coli* oziroma *Bacillus* sp. smo nagojili v svežem mediju do  $\text{OD}_{600} \sim 0,8$ . V dve 15 mL falkonki smo odmerili po 15 mL disperzije celic in trikrat spirali s 15 mL NaCl (0,9 %, 0,45 %, 0,09 %), z vmesnim 15-minutnim centrifugiranjem. Po spiranju smo redispergirali pelet v 5 mL sterilizirane prečiščene vode in združili vsebino obeh falkonk. V stehtano vialo smo prenesli pripravljeno disperzijo celic ter dodali ustrezno maso polimera, da smo pripravili naslednje polimerne disperzije: 4 % (m/m) PEO, 15 % (m/m) PVP ter ALG/PEO 20/80 s skupno koncentracijo polimerov 5 % (m/m). Ideje za izbrane koncentracije polimernih raztopin smo dobili iz literature (21, 26, 43, 44). Disperzijo smo nato počasi mešali na magnetnem mešalu do raztopitve polimera (približno 4 ure). Sledilo je elektrostatsko sukanje pripravljene disperzije polimera in celic. V polimerni disperziji celic pred elektrostatskim sukanjem ter v nanovlaknih po sukanju smo določili KE/mL oz. KE/mg celic z nanašanjem na agarne plošče (KE- kolonijske enote). Nanovlakna z vgrajenimi celicami smo do slikanja na SEM shranili v hladilniku pri 4-8 °C.

V nadaljevanju smo celice *E. coli* ter bakterije in spore *Bacillus* sp. najprej obložili z eno ali dvema plastema polielektrolitov po postopku, opisanem v poglavju 3.4.3 ("Oblaganje s plastenjem"). Obložene celice v 0,9 % NaCl oziroma sterilizirani vodi (10 mL) smo prenesli v stehtano vialo in dodali 400 mg PEO ter pustili mešati. Iz disperzije smo pripravili nanovlakna z elektrostatskim sukanjem, določili KE/mL oz. KE/mg celic v polimerni raztopini pred sukanjem ter v nanovlaknih po vgradnji z nanašanjem na agarne plošče ter nanovlakna shranili v hladilniku pri 4-8 °C.

### **3.5.6 Spremljanje imobilizacije celic**

#### **Priprava vzorcev za vrednotenje rasti in morfologije celic**

Opazovanje vzorcev pod optičnim mikroskopom ter merjenje zeta potenciala obloženim ter neobloženim celicam ne zahtevata posebne obdelave vzorcev, saj ju lahko izvedemo na enostaven način že med samim procesom oblaganja celic s polielektroliti oziroma med

procesom elektrostatskega sukanja. V večini primerov takojšnje vrednotenje mikrobioloških vzorcev z bolj zahtevnimi metodami ni možno, zato jih je potrebno ustrezno pripraviti za shranjevanje ter vrednotenje. Opazovanje pod SEM mikroskopom zahteva suh vzorec, kar ni težava v primeru nanovlaken, medtem ko je potrebno celice, obložene s plast-na-plast tehniko ustrezno posušiti ter ohraniti (30). To smo dosegli s procesom liofilizacije. Gre za tehniko sušenja, s katero iz zamrznjenega vzorca odstranimo topilo s pomočjo sublimacije. Sušenje poteka pri znižanem tlaku in nizki temperaturi, zato je tehnika primerna za termolabilne snovi (v našem primeru so to bakterijske celice), poleg tega je možna ohranitev kemijske stabilnosti ter biološke aktivnosti liofilizatov (45).

#### **a) Meritve zeta potenciala**

Oblaganje celic smo spremljali z merjenjem zeta potenciala neobloženim celicam ter celicam po vsaki plasti polimera na Zetasizer Nano z uporabo »dip cell« celice. Vzorec v plastični kiveti smo pripravili tako, da smo odvzeli 100  $\mu\text{L}$  vzorca disperzije celic in ga razredčili z 900  $\mu\text{L}$  visoko prečiščene vode (37). Rezultate meritev podajamo kot povprečje najmanj petih meritev. Uspešnost plastenja smo določili z merjenjem zeta potenciala, pri čemer smo želeli doseči primerljivo spremembo zeta potenciala po adsorpciji kationa in aniona.

#### **b) Optični mikroskop**

Oblaganje celic s polimeri smo spremljali z optičnim mikroskopom že med samimi postopki oblaganja in med shranjevanjem. Na objektno steklo smo kanili 8  $\mu\text{L}$  vzorca disperzije celic ter pokrili s krovnim steklom (46). Prav tako smo spremljali proces elektrostatskega sukanja, tako da smo objektno stekelce položili na zbiralo v komori in zbrali tanko plast vlaken za opazovanje pod mikroskopom. Neobložene celice smo opazovali pri enakih povečavah (100 $\times$  in 400 $\times$ ) kot imobilizirane celice. Plastenje celic je bilo uspešno, če je bila večina celic po oblaganju prostih, uspešnost pa je padala z nastankom skupkov, številom in velikostjo le-teh. Če so bili v vzorcu prisotni na videz večinoma veliki skupki, ki jih nismo uspeli razbiti z vorteksiranjem, oblaganje ni bilo uspešno. Izgubo celic po vsaki plasti smo okvirno ocenili s pregledom vzorca pod optičnim mikroskopom. Pri testu metabolične aktivnosti smo pod optičnim mikroskopom preverili aktivnost neobloženih in obloženih celic po 24-urni inkubaciji v raztopini resazurina na mikrotitrski plošči. Opazovali smo gibljivost bakterij ter prisotnost skupkov. Večja gibljivost je nakazovala na večjo celično

aktivnost. Vgradnjo celic v nanovlakna smo ocenili kot uspešno, če smo pod optičnim mikroskopom opazili celice, vzdolžno orientirane s potekom nanovlaken.

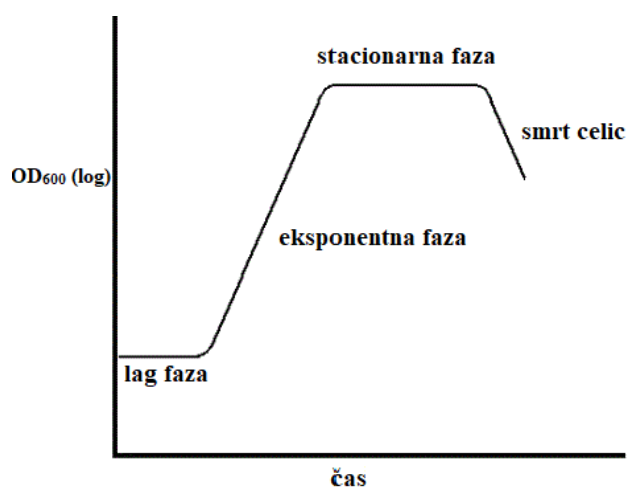
### c) Vrstični elektronski mikroskop (SEM mikroskop)

Vzorci neobloženih ter obloženih celic ter vzorce nanovlaken brez in z vgrajenimi celicami smo slikali na SEM mikroskopu na Kemijskem inštitutu. Obložene celice s polielektroliti smo liofilizirali ter tik pred slikanjem na obojestranski ogljikov lepilni trak nanесли liofilizat, ki smo ga fiksirali s pomočjo usmerjenega toka zraka pod visokim tlakom. Polielektrolitno oblogo na celicah na SEM slikah vidimo kot spremembo v morfologiji celic. Vzorce z nanovlakni smo pripravili tako, da smo skupaj z aluminijasto folijo izrezali koščke zbranih nanovlaken in jih položili na ogljikov lepilni trak na nosilcu. Slike smo posneli pri pospeševalni napetosti 1,00 kV in različnih povečavah. Za določanje velikosti premerov nanovlaken in celic smo uporabili program ImageJ (47). Povprečen premer vlaken za posamezen vzorec smo izračunali iz najmanj 60 izmerjenih premerov nanovlaken na SEM slikah. S primerjavo velikosti premerov nanovlaken in celic smo določili primernost nanovlaken za vgradnjo celic.

## 3.5.7 Testi viabilnosti

### a) Rast celic

Z merjenjem  $OD_{600}$  v disperziji celic, ki jih gojimo, lahko določimo njihovo rastno krivuljo. Slika 7 prikazuje običajno rastno krivuljo bakterij, ki je razdeljena v štiri faze: prilagoditvena, eksponentna, stacionarna ter faza odmiranja (48).



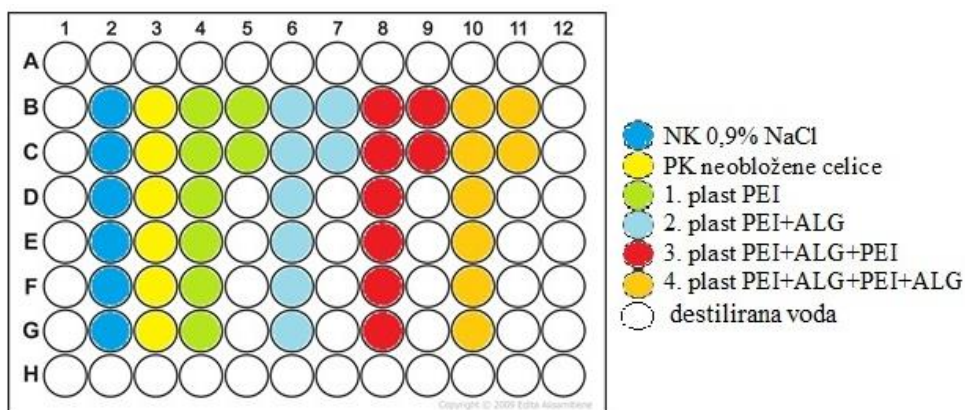
Slika 7: Običajna rastna krivulja bakterij.

S tehniko plastenja smo pripravili vzorce disperzij *E. coli*, brez obloge ter obloženimi z eno, dvema, tremi ter štirimi plastmi polielektrolitov ter jih zamrznili na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorce neobloženih ter obloženih celic smo po dveh tednih odmrznili na sobni temperaturi ter jih s pipeto prenesli v erlenmajerice s 50 mL rastnega medija, ki smo jih nato inkubirali na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V kiveto smo prenesli vzorec celic in v več časovnih točkah pomerili  $\text{OD}_{600}$  na UV-VIS spektrofotometru (17). Testa rasti celic nismo izvajali na bakterijah *Bacillus* sp.

#### **b) Metabolična aktivnost celic**

Resazurinska metoda omogoča spremljanje metabolične aktivnosti neobloženih ter obloženih celic *E. coli*. Reagent z 0,02 % vodno raztopino resazurina smo sterilizirali z membransko filtracijo skozi sterilni filter z velikostjo por  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ . Filtrirali smo jo v steriliziran zaprt vsebnik (15 mililitrska falkonka), ki smo ga ovili v aluminijasto folijo za zaščito pred svetlobo; končno raztopino smo do uporabe shranili v hladilniku na  $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (49). Resazurinskega testa nismo izvajali na bakterijah *Bacillus* sp.

Postopek za resazurinski test smo pripravili na podlagi že razvitega protokola (32). Resazurinski test smo izvajali na mikrotitrski plošči s 96 jamicami. V vsako smo napipetirali po  $100\text{ }\mu\text{L}$  vzorca disperzije *E. coli*, v obrobne pa po  $100\text{ }\mu\text{L}$  sterilizirane vode, s čimer smo preprečili preveliko izhlapevanje vzorca med inkubacijo. Po shemi na sliki 8 smo v 6 jamic kot negativno kontrolo nanegli 0,9 % NaCl, v sosednjih 6 jamic pa kot pozitivno kontrolo sprane, neobložene celice v 0,9 % NaCl. Naslednje vrstice so bile namenjene obloženim celicam (8 jamic za vsako polielektrolitno plast, vzorci z obloženimi celicami niso bili redčeni). Ploščo smo zavili s parafilmom ter inkubirali v inkubatorju na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 minut. Nato smo v vsako jamico odpipetirali  $20\text{ }\mu\text{L}$  0,02 % resazurina, ploščo ponovno ovili s parafilmom ter zaščitili z alu folijo, da ne prihaja do razgradnje resazurina na svetlobi in jo inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prve meritve smo opravili 10 minut po dodatku resazurina, na čitalcu mikrotitrskih plošč. Vzorce smo ekscitirali pri valovni dolžini 540 nm, emisijo fluorescence pa smo izmerili pri 590 nm. Izvedli smo tudi test na neobloženih celicah, iz katerih smo pripravili redčitveno linijo (od  $10^1$  do  $10^8$ -kratna redčitev). Negativna kontrola je bila 0,9 % NaCl, nanešena po  $100\text{ }\mu\text{L}$  v 6 jamic, v sosednjih 6 jamic smo za pozitivno kontrolo nanegli po  $100\text{ }\mu\text{L}$  sprane in neredčene suspenzije celic *E. coli*. Za vsako nadaljno redčitev (iz redčitvene linije) smo napolnili 6 jamic s  $100\text{ }\mu\text{L}$  vzorca.



Slika 8: Shema napolnjene mikrotitrne plošče s pozitivno in negativno kontrolo ter obloženimi celicami *Escherichia coli*; NK- negativna kontrola, PK- pozitivna kontrola, PEI- polietilenimin, ALG- alginat.

Z optičnim mikroskopom smo po približno 24 urah preverili aktivnost neobloženih in obloženih celic v jamicah na mikrotitrski plošči. Opazovali smo gibljivost celic in združevanje v skupke ter primerjali obložene celice z neobloženimi (postopek v poglavju 3.5.6, točka b).

### c) Preživetje celic po elektrostatskem sukanju

Z nanašanjem vzorcev na trdna gojišča smo preverili, ali celice *E. coli*, spore ter bakterije *Bacillus* sp. preživijo elektrostatsko sukanje. *E. coli* smo nanašali na trdno gojišče z rastnim medijem, spore in bakterije *Bacillus* sp. pa na trdno gojišče z obogatenim rastnim medijem.

S tem poskusom smo določili število preživelih bakterij, izraženo kot KE/mL oziroma KE/mg. Kolonijske enote ali krajše KE je mera za viabilnost bakterijskih ali glivnih celic. Poda nam število živih celic, ki so sposobne tvoriti kolonije na trdnem gojišču. Izračun KE/mL ter KE/mg smo pripravili na podlagi literaturnih podatkov (48, 50, 51).

$$\text{Izračun: } \frac{KE}{ml} = \frac{\overline{\text{št.kolonij v eni kaplji}}}{V \text{ kaplje}/1000} \times \text{redčitev}$$

Kadar smo določali KE/mL za celice v raztopljenem polimeru, je bilo treba upoštevati faktor

$$\text{redčenja (fr): } \frac{KE}{ml} = \frac{\overline{\text{št.kolonij}}}{V \text{ kaplje}/1000} \times \text{redčitev} \times \frac{fr}{10}$$

Volumen kaplje je znašal 10  $\mu$ L; redčitev je bila izražena kot  $10^n$  ( $n$ =število redčitev; če je šlo za 100-kratno redčitev:  $10^2$ ). Končna vrednost KE/mL je bilo povprečje vseh določenih KE/mL pri posameznih redčitvah.

$$\text{Izračun KE/mg vlaken: } \frac{KE}{mg} = \frac{\overline{\text{št.kolonij v eni kaplji}}}{V \text{ kaplje}/1000} \times \frac{\text{redčitev}}{m \text{ vlaken}}$$

Število viabilnih bakterij smo določili vzorcem z neobloženimi ali obloženimi celicami v polimerni disperziji PEO pred elektrostatskim sukanjem ter tudi neobloženim celicam *E. coli* in *Bacillus* sp., ki smo jih uporabili za plastenje. Iz teh polimernih celičnih disperzij smo pripravili redčitvene linije, pri čemer smo v vsakem koraku vzorec desetkratno redčili z 0,9 % NaCl (od 10<sup>1</sup> do 10<sup>8</sup>- kratna redčitev). Redčitveno linijo smo nanесли na agarne plošče s kapljično metodo, tj. nanos 5 kapljic po 10 μL vzorca določene redčitve. Po vpitju kapljic v agar smo plošče obrnili ter zavili s parafilmom ter jih inkubirali na sobni temperaturi ali v inkubatorju na 37 °C. Po koncu sukanja smo natehtali vsaj 5 mg nanovlaken s celicami in jih raztopili v 1000 μL fiziološke raztopine ter iz te raztopine pripravili redčitveno linijo (od 10<sup>1</sup> do 10<sup>8</sup>- kratna redčitev). Nanos redčitvene linije nanovlaken s celicami je potekal na enak način kot nanos redčitvene linije polimernih disperzij s celicami pred elektrostatskim sukanjem.

Vrednotenje kolonij je potekalo s štetjem le-teh en ali dva dni po nanosu. Viabilnost bakterij smo ocenili kot ničelno, če na agarnih ploščah ni zrasla nobena kolonija. Če so kolonije celic zrasle, jih je moralo za posamezno redčitev zrasti med 30 in 100, da je bil izračun KE/mL oz. KE/mg relevanten. Iz KE/mL oz. KE/mg smo določili teoretično in eksperimentalno vgradnjo celic *E. coli* in *Bacillus* sp. v nanovlakna (50). Rezultati so podani v poglavju 4.3.

Pri interpretaciji KE/mL oz. KE/mg se je potrebno zavedati, da so možne napake pri izvedbi poskusa: napake med redčenjem pri pipetiranju, pri nanašanju na plošče, pri določanju oziroma štetju kolonij, možnost okužbe gojišča z morfološko podobnimi kolonijami ter vpliv statističnega odstopanja, saj gre za biološke vzorce. Odstopanjem in napakam smo se izognili z natančnim delom pri pipetiranju, redčenju vzorcev ter nanašanju na plošče in z ustreznimi ukrepi zmanjšali možnost okužb na najmanjšo možno mero (delo ob gorilniku, razkuževanje rok, delovnih površin ter pripomočkov) (46).



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Oblaganje celic s polielektroliti s tehniko plastenja

Tehniko oblaganja s polimeri lahko apliciramo na žive celice. V člankih smo zasledili predvsem delo s celicami, ki so jih ohranili oz. zaščitili z glicerolom, dehidrirali z natrijevim hipokloritom ali utrdili z glutaraldehidom (2, 6, 19, 52). Izvedba poskusov na živih celicah daje bolj aplikativne rezultate, vendar pa delo z njimi zahteva več pozornosti, namenjene zagotavljanju njihovega preživetja. Uporabiti je treba vrsto in koncentracijo polimerov, ki nista toksični za celice, prav tako se je potrebno izogibati preveč hipertoničnemu oziroma hipotoničnemu mediju.

Tehniko plastenja smo najprej preizkusili na vegetativnih bakterijah *E. coli*, nato pa smo postopek oblaganja z 0,1 % (m/V) PEI 25 000 g/mol uporabili tudi na bakterijah in sporah *Bacillus* sp. V Preglednici VI so predstavljene kombinacije različnih vrst kationskih in anionskih polimerov, ki smo jih preizkusili v procesu razvoja postopkov oblaganja. Kombinacije polielektrolitov, označene s križcem, se niso izkazale kot optimalne za oblaganje celic, medtem ko kljukica pri poskusu oblaganja OB1 označuje protokol, ki se je izkazal za najustreznejšega.

*Preglednica VI: Predhodna testiranja različnih vrst kationskih (PEI- polietilenimin, hitosan) in anionskih (alginat, Carbopol) polimerov, v različnih koncentracijah in volumnih za plast-na-plast oblaganje živih Escherichia coli. V- volumen, OB-oblaganje.*

Poskus oblaganja	1. plast	V1 [μl]	2. plast	V2 [μl]	3. plast	V3 [μl]	4. plast	V4 [μl]
OB 1	0,1% PEI 25 000	200	0,1% alginat	200	0,1% PEI 25 000	200	0,1% alginat	200✓
OB 2	0,1% PEI 25 000	200	0,1% alginat	200	0,1% hitosan	200✘		
OB 3	0,1% PEI 25 000	200	0,05% Carbopol 941	200✘				
OB 4	0,1% PEI 600 000	200	0,1% alginat	200	0,1% PEI 600 000	200✘		
OB 5	0,1% PEI 600 000	100	0,1% alginat	200	0,1% PEI 600 000	100✘		
OB 6	0,1% hitosan	200	0,1% alginat	200✘				
OB7	0,1% alginat	10	0,1% PEI 25 000	200✘				

Poskus oblaganja	1. plast	V1 [ $\mu$ l]	2. plast	V2 [ $\mu$ l]	3. plast	V3 [ $\mu$ l]	4. plast	V4 [ $\mu$ l]
OB 8	0,1% alginat	20	0,1% PEI 25 000	200*				
OB 9	0,1% alginat	50	0,1% PEI 25 000	200*				
OB 10	0,1% alginat	100	0,1% PEI 25 000	200*				

Postopki gojenja, spiranja in oblaganja celic *E. coli* in *Bacillus* sp. so opisani v poglavjih 3.5.1 in 3.5.3. OD<sub>600</sub> nagojenih vzorcev je pred oblaganjem znašal približno 0,8 v primeru obeh celičnih vrst, kar je pomenilo, da je koncentracija celic v primeru *E. coli* znašala med približno 7 in 8 logKE/mL ter v primeru bakterij *Bacillus* sp. med 5 in 6 logKE/mL.

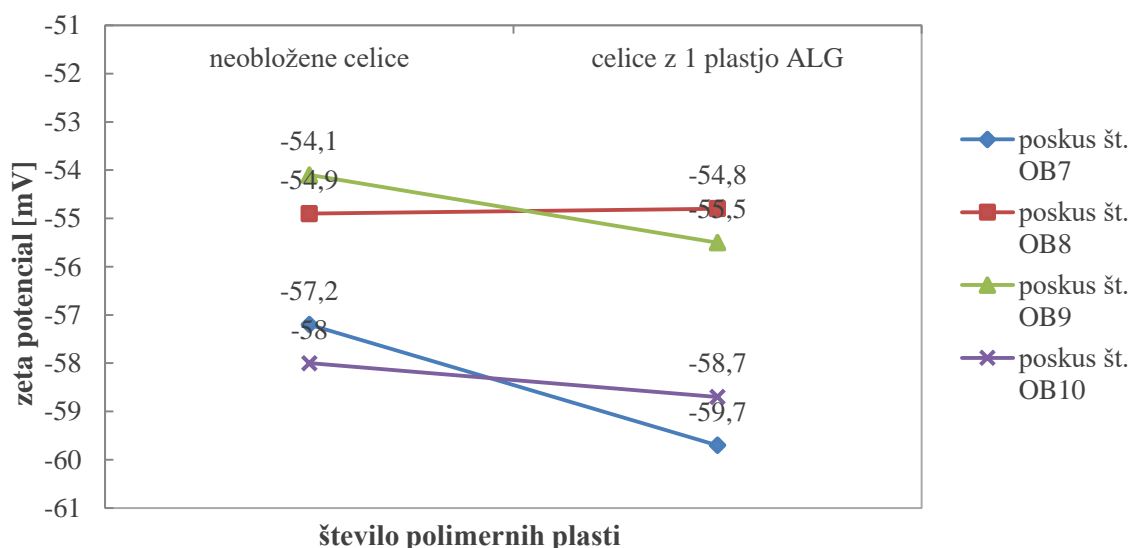
Kot polimer prve in tretje plasti smo uporabili razvejan PEI z molekulsko maso 25 000 g/mol (Poskus št. OB 1-3). Kljub razvejani strukturi nismo imeli težav z redispergiranjem celic po inkubaciji v PEI, ko smo ga uporabili kot polimer prve plasti. Uspešnost nadaljnega oblaganja celic z negativno nabitim polimerom je bila odvisna od uporabljenega polianiona. V primeru inkubiranja celic, prvotno obloženih s PEI, v Carbopolu 941, nismo prišli dlje kot do druge plasti, saj so se celice združile v skupke ter oprijele stene epice, kar nam je otežilo redispergiranje celic.

Hitosan je naraven ter biokompatibilen polimer, ki smo ga preizkusili kot polimer prve in tretje plasti. Težavo pri oblaganju s hitosanom je po prvi stopnji oblaganja predstavljal nastanek večjega agregata, ki ga z vorteksiranjem nismo uspeli razbiti na manjše kose (Poskus št. OB 6). Pri ponovnem oblaganju vzorca bi tvegali veliko izgubo celic, prav tako ni bilo smiselno oblagati le enega velikega skupka celic in polimera. Rastopina hitosana je bila pripravljena v 1 % očetni kislini, saj je pri pH 7 netopen. Rastopino hitosana smo prilagodili na pH 5,5, ki je še vedno omogočal njegovo raztapljanje.

Uporaba visokomolekularnega polietilenimina z molekulsko maso 600 000 g/mol ni izboljšala procesa oblaganja (Poskus št. OB 4). Predvidevamo, da dolge verige PEI motijo redispergiranje celic po oblaganju z njim, v naslednjem koraku pa je ovirano oblaganje z negativno nabitim polimerom. Največjo težavo so nam tako predstavljali agregati celic in polimera. Za ustrežnejši polimer se je tako izkazal PEI 25 000 g/mol.

Lederer je s sodelavci objavil, da so celice, utrjene z glutaraldehydom, agregirale v raztopini polikationa, za kar naj bi bile krive proste pozitivne skupine na sicer negativno nabiti celični

površini, možen razlog za agregacijo pa je prisotnost močnih privlačnih sil med celicami. Rešitev za to naj bi bilo začetno oblaganje s polianionom, da se nasiti proste pozitivne skupine, čemur bi nato sledilo oblaganje s polikationom (6). V našem primeru smo celice *E. coli* najprej 15 minut inkubirali v 0,1 % (m/V) alginata, pri čemer smo v ločenih eksperimentih uporabili različne volumne le-tega (Poskus št. OB 7-10). Nato smo celice obložili z 200  $\mu$ L 0,1 % (m/V) PEI. Zeta potencial neobloženih celic se ni bistveno razlikoval od zeta potenciala celic, obloženih z alginatom (slika 9). Po plastenju s polietileniminom je zeta potencial sicer narastel, vendar smo imeli težave z agregiranjem ter izgubo celic. V nadaljnjih poskusih smo opustili predhodno oblaganje celic s polianionom.



Slika 9: Padec zeta potenciala bakterij *Escherichia coli* po začetnem oblaganju z različnimi volumni 0,1 % (m/V) alginata (ALG). OB-oblaganje.

Kot optimalen postopek oblaganja smo ocenili poskus OB 1 (Preglednica VI), pri katerem smo uporabili 0,1 % (m/V) alginat ter 0,1 % (m/V) PEI 25 000 g/mol; to kombinacijo smo uporabili na *E. coli* za poskus celične rasti z merjenjem OD<sub>600</sub>, za rezazurinsko metodo ter za vgradnjo v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem. Bakterije in spore iz rodu *Bacillus* sp., ki smo jih obložili z eno plastjo PEI 25 000 g/mol, smo uporabili za vgradnjo v nanovlakna.

Polimernima raztopinama smo po pripravi izmerili viskoznost ter pH, ki smo ga uravnali na približno 7,0-7,5 (preglednica VII). pH polimernih raztopin smo želeli čim bolj približati pH-ju medija, v katerem smo pripravili celice (fiziološka raztopina), da smo čim manj obremenjevali celice. Kljub temu da se je kombinacija PEI in alginata v izbrani koncentraciji

izkazala za optimalno, je potrebno omeniti, da pri oblaganju celic nismo prišli dlje kot do četrte plasti.

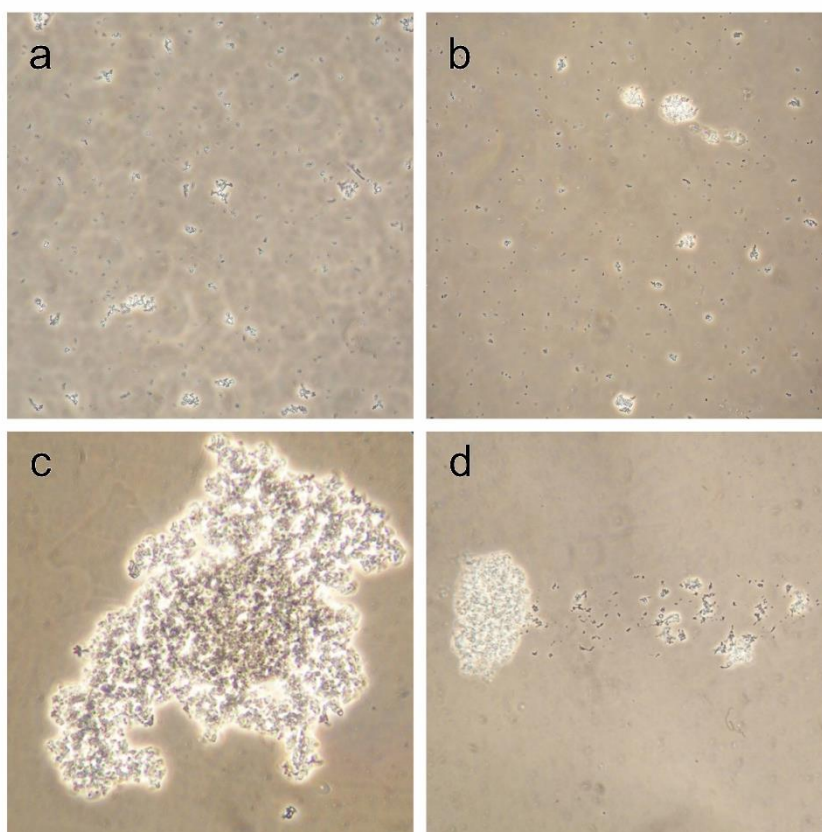
*Preglednica VII: Uporabljeni polielektroliti, pH pred in po prilagajanju in viskoznost raztopine; pH uravnan s 1M HCl.*

<b>Polimer</b>	<b>Koncentracija [% (m/V)]</b>	<b>pH pred prilagajanjem</b>	<b>pH po prilagajanju</b>	<b>Viskoznost [mPa*s]</b>
<b>PEI 25 000</b>	0,1	10,287	7,85	0,85
	0,1	10,250	7,715	1,00
<b>ALGINAT</b>	0,1	6,927	-	2,12
	0,1	6,994	-	2,37

Vegetativno obliko bakterij iz rodu *Bacillus* sp. ter njihove spore smo obložili le z eno plastjo 0,1 % (m/V) PEI in smo jih kasneje uporabili za vgradnjo v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem. Oblaganje s plastenjem je bilo v obeh primerih uspešno, saj pod optičnim mikroskopom nismo opazili veliko skupkov, prisotne so bile večinoma proste celice.

### 4.1.1 Oblaganje živih celic

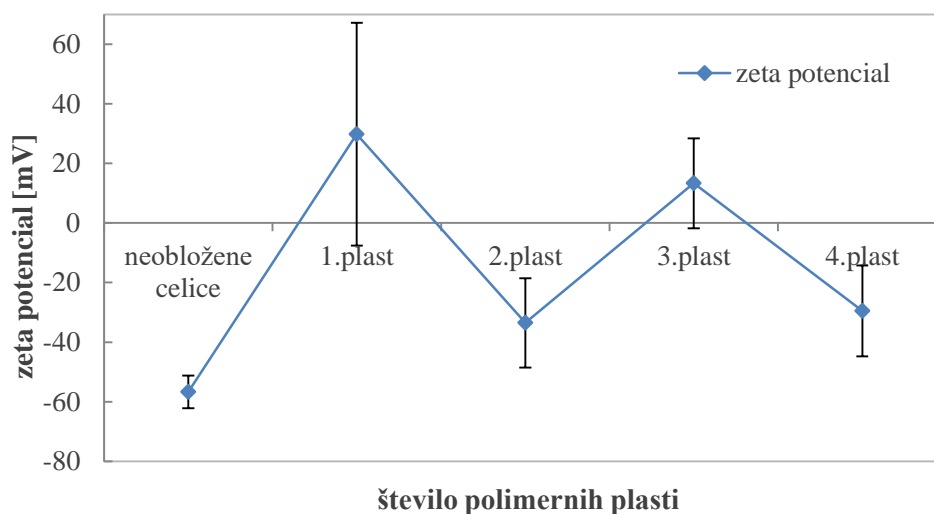
Obnašanje živih celic v vzorcih med oblaganjem smo najlažje opazovali pod optičnim mikroskopom. Z mikroskopom sicer ne vidimo, ali so celice *E. coli* dejansko obložene s polimerom, nam pa je omogočal opazovanje skupkov, če nastanejo med oblaganjem. Dejstvo je, da je bilo z naraščanjem števila plasti prisotnih vedno manj posameznih celic v vzorcih ter vedno več skupkov, saj na slikah 10b, 10c in 10d jasno vidimo čedalje večje skupke celic in polimera.



Slika 10: Posnetki bakterije *Escherichia coli* med oblaganjem z optičnim mikroskopom,  $400\times$  povečava: a) 1 plast PEI; b) 2 plasti PEI+ALG; c) 3 plasti PEI+ALG+PEI; d) 4 plasti PEI+ALG+PEI+ALG. PEI- polietilenimin, ALG- alginat.

Z merjenjem zeta potenciala smo spremljali nalaganje pozitivno in negativno nabitega polielektrolita na celične površine. V predhodnih poskusih so raziskovalci ugotovili, da imajo celice bakterij *E. coli* negativno nabito površino zaradi prisotnosti negativno nabitih polisaharidov, kar smo potrdili z izmerjenim zeta potencialom med  $-50,0$  in  $-60,0$  mV (53). Slika 11 predstavlja spreminjanje zeta potenciala med oblaganjem celic *E. coli* s PEI in alginatom (postopek št. OB 1). Vsaka točka je povprečje treh vrednosti zeta potenciala,

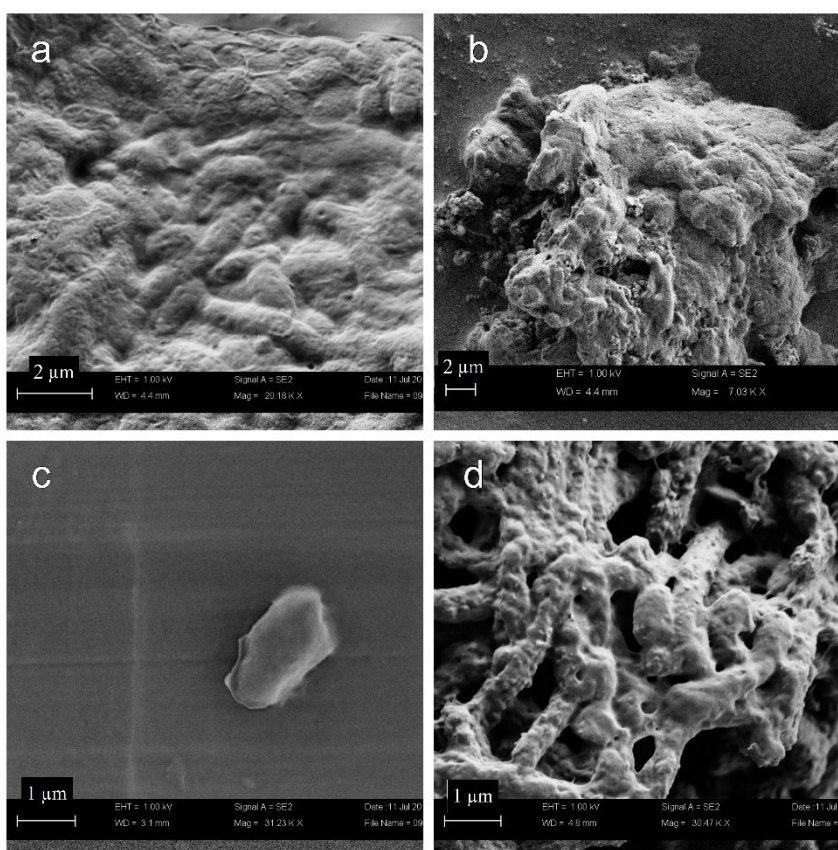
izmerjenih v treh ločenih poskusih oblaganja celic. Iz standardnih deviacij na sliki 11 je razvidno, da po oblaganju s pozitivnim polimerom v nekaterih primerih zeta potencial ni prešel na pozitivno stran. Možen vzrok za tak pojav je nepopolna obložitev celic s pozitivno nabitim polimerom. Poleg tega ne smemo izključiti možnosti, da je naprava v kakšnem primeru določila zeta potencial samega polielektrolita, ki ni bil dobro odstranjen med spiranjem celic. Nepopolni odstranitvi polielektrolita smo se v nadaljnjih poskusih izognili z bolj natančnim spiranjem vzorcev, predvsem po inkubaciji celic v polielektrolitu. Polielektrolitne molekule imajo visokomolekularno maso in jih naprava lahko zazna kot samostojne delce, saj zaradi svoje velikosti sipajo svetlobo podobno kot delci. Zaradi naboja, ki ga nosijo, se lahko odzovejo na aplicirano električno polje, posledično se da izračunati polielektrolitno mobilnost v mediju ter zeta potencial snovi (54). Določanje zeta potenciala celicam med oblaganjem je enostavna in priročna tehnika za spremljanje nalaganja polielektrolitnih molekul na površino celic, ker pa gre za biološke vzorce, so odstopanja od povprečne vrednosti velika.



Slika 11: Spreminjanje zeta potenciala celicam *Escherichia coli* glede na število polielektrolitnih plasti: 1. in 3. plast je 200  $\mu$ L 0,1 % (m/V) polietilenimin, 2. in 4. plast pa 200  $\mu$ L 0,1 % (m/V) alginata.

Z meritvijo zeta potenciala smo preverili uspešnost oblaganja bakterij *Bacillus* sp. in njihovih spor. V primeru vegetativne oblike je zeta potencial prešel iz začetnih -35,5 mV na +42,5 mV po plastenju s PEI. Zeta potencial spor je znašal pred oblaganjem -36,9 mV, po plastenju s PEI pa +23,3 mV. V obeh primerih je bil skok zeta potencial na pozitivno stran primerne velikosti, zato smo zaključili, da je bilo oblaganje s PEI uspešno.

SEM slike prikazujejo polielektrolitno oblogo na skupkih celic, kar opazimo kot spremembo v morfologiji površine, vendar ne moremo razlikovati med posameznimi plastmi (slike 12a-12d). Tako ne vidimo, kakšna je na primer razlika v debelini prve in četrte plasti. Težavno je bilo poiskati posamezno celico, ki bi bila obložena s polimerom, saj je šlo za majhno količino vzorca, ki smo ga pregledovali. Kljub temu lahko na podlagi merjenja zeta potenciala neobloženim in obloženim celicam ter SEM slik potrdimo hipotezo, da polielektroliti obložijo celice.



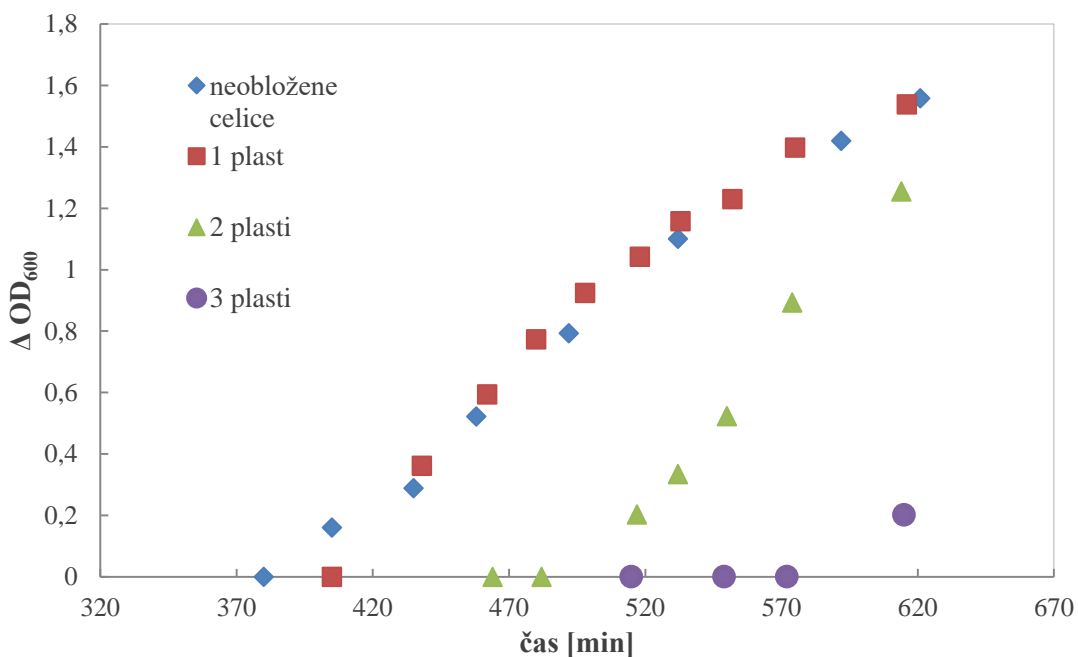
Slika 12: SEM slike obloženih *Escherichia coli*: a) 1 plast PEI; b) 2 plasti PEI+ALG; c) 3 plasti: PEI+ALG+PEI; d) 4 plasti PEI+ALG+PEI+ALG. PEI- polietilenimin, ALG- alginat.

#### 4.1.2 Vpliv števila plasti polielektrolitov na rast celic

Bistvena lastnost, v kateri se razlikujejo proste in s plastenjem imobilizirane celice, je njihova hitrost rasti oziroma čas, v katerem celice preidejo iz faze prilagajanja ("lag" faze) v eksponentno fazo. Dognanja različnih raziskovalcev glede spremembe hitrosti rasti (sprememba v generacijskem času ali konstanti hitrosti rasti celic) po imobilizaciji so si

nasprotujoča (55, 56). V nekaterih primerih pride do povečanja hitrosti, v drugih do zmanjšanja ali pa se hitrost sploh ne spremeni.

Rast celic smo spremljali z merjenjem  $OD_{600}$  v različnih časovnih točkah, s čimer smo lahko določili krivuljo rasti celic. Začetek motnitve medija je pomenil začetek rasti celic in naraščanje  $OD_{600}$ . Izvedba poskusa je opisana v poglavju 3.5.7, točka a. Na sliki 13 so prikazani rezultati spremljanja rasti celic po različnem številu polielektrolitnih oblog na celicah *E. coli*. Opazno je podaljšanje faze prilagajanja pred začetkom eksponentne rasti celic, kjer je graf  $OD_{600}$  naraščal najhitreje po 1. oblogi, sledilo je naraščanje po 2. oblogi in kasneje po 3. Na ta način smo dobili točke, ki predstavljajo časovni potek rasti neobloženih ter obloženih celic. Zakasnitveni čas in rastni krivulji neobloženih celic *E. coli* in obloženih le z eno plastjo sta zelo podobni. Na zakasnitev rasti je poleg prisotnosti polielektrolitne obloge na celicah vplivala tudi odmrznitev vzorca pred inokulacijo ter število inokuliranih celic. Celice so med zamrznitvijo mirovale, zato je čas prilagajanja po odmrznitvi daljši. Zakasnitev začetka rasti se vidi kot zamik začetka eksponentne faze v rastni krivulji (slika 13).



Slika 13: Zakasnitev začetka celične rasti (zamik lag faze) *Escherichie coli* glede na naraščajoče število polimernih plasti iz polietilenimina in alginata.  $\Delta OD_{600}$  je razlika med  $OD_{600}$  vzorca in  $OD_{600}$  sterilnega medija.  $OD_{600}$  - optična gostota pri 600 nm.

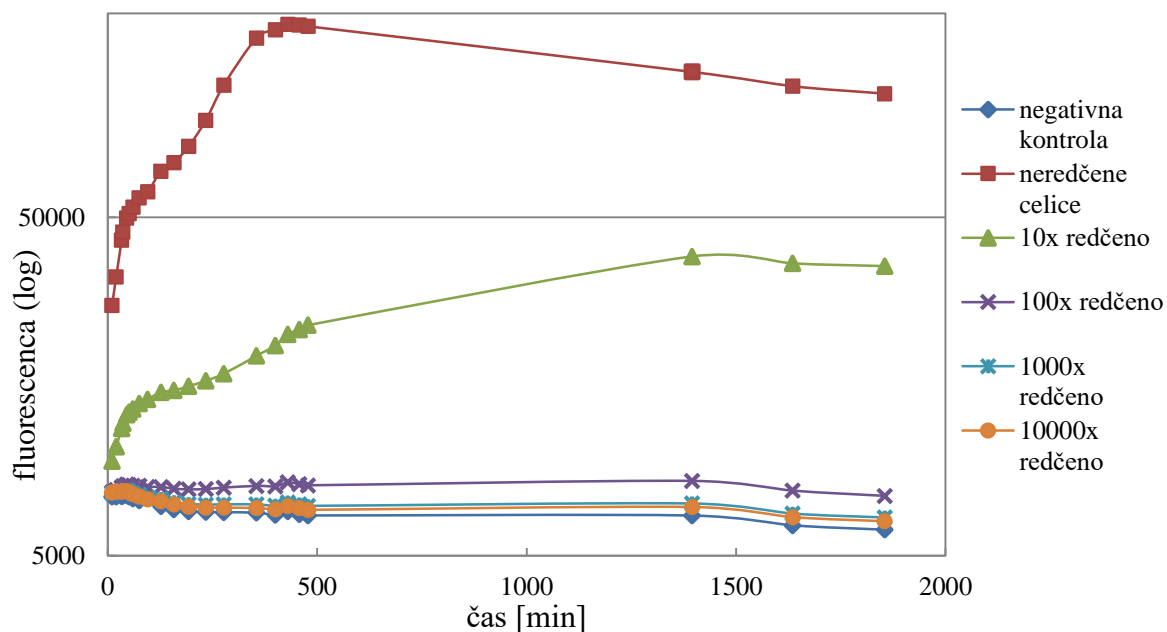


Iz grafa na sliki 13 je razvidno, da so neobložene celice začele rasti prve. Te bakterije niso bile omejene s plastmi polimera in so tako imele prost dostop do hranil, ki so prisotna v rastnem mediju gojišča, ter jim obloga ni omejevala delitev celic. Pri njih se začne eksponentna faza rasti po šestih urah. Celice, obložene z eno plastjo PEI, so začele izkazovati rast po dobrih sedmih urah. Zanimivo je, da so celice z eno plastjo polimera rastle malenkostno hitreje kot neobložene. Sklepamo lahko, da ena plast polimera dopušča nespremenjen dostop do hranil in kisika, kar omogoča podobno kinetiko rasti neobloženim celicam oziroma je možno, da so celice hitro pobegnile iz polimerne obloge in normalno rastle naprej. Optična gostota medija s celicami, obloženimi z dvema plastema (tj. PEI + ALG), je začela naraščati po približno 8 urah. Celicam s tremi plastmi (PEI + ALG + PEI) smo določili začetek rasti po 10 urah. Glede na rezultate sklepamo, da je z naraščanjem števila polimernih oblog prišlo do časovnega zamika faze prilagajanja. To lahko izvira iz omejitve difuzije snovi med zunanostjo (medij) in samo celico zaradi polimerov, naloženih na celico, ali pa je posledica omejevanja celic znotraj obloge, kar preprečuje njeno delitev (dokler ne »pobegne« iz obloge) (55). Podoben zamik faze prilagajanja sta pokazali Hillbergova in Tabrizianova na celicah *E. coli*, ki so jih obložili s hitosanom in alginatom oz. hitosanom in hialuronsko kislino (19). Zaradi zmanjšane ali pa zakasnjene difuzije hranil pride do kasnejše aktivacije celic in s tem počasnejše rasti bakterij.

Zagotovo je vedno manjše število celic v vzorcih vplivalo na zakasnitev rasti. Število celic, inokuliranih v gojišče, se je zmanjševalo z naraščanjem števila plasti, saj je med postopkom oblaganja prišlo pri izpiranju polielektrolitov do izgube celic. Določanje števila obloženih bakterij je možno z nanašanjem na plošče ali pa s štetjem s hemocitometrom. V obeh primerih je določitev nenatančna, saj se celice med oblaganjem združujejo v agregate. Tako ne moremo izračunati števila posameznih celic, temveč število posameznih in agregiranih celic skupaj, izločene pa niso morebiti prisotne mrtve celice. Glavni razlog za zakasnitev rasti obloženih celic v tekočem gojišču je torej manjše število celic glede na izhodiščno koncentracijo celic, k zakasnitvi pa pripomore tudi obloga iz polielektrolitov, ki omejuje celice.

### 4.1.3 Vpliv števila plasti polielektrolitov na metabolično aktivnost bakterij

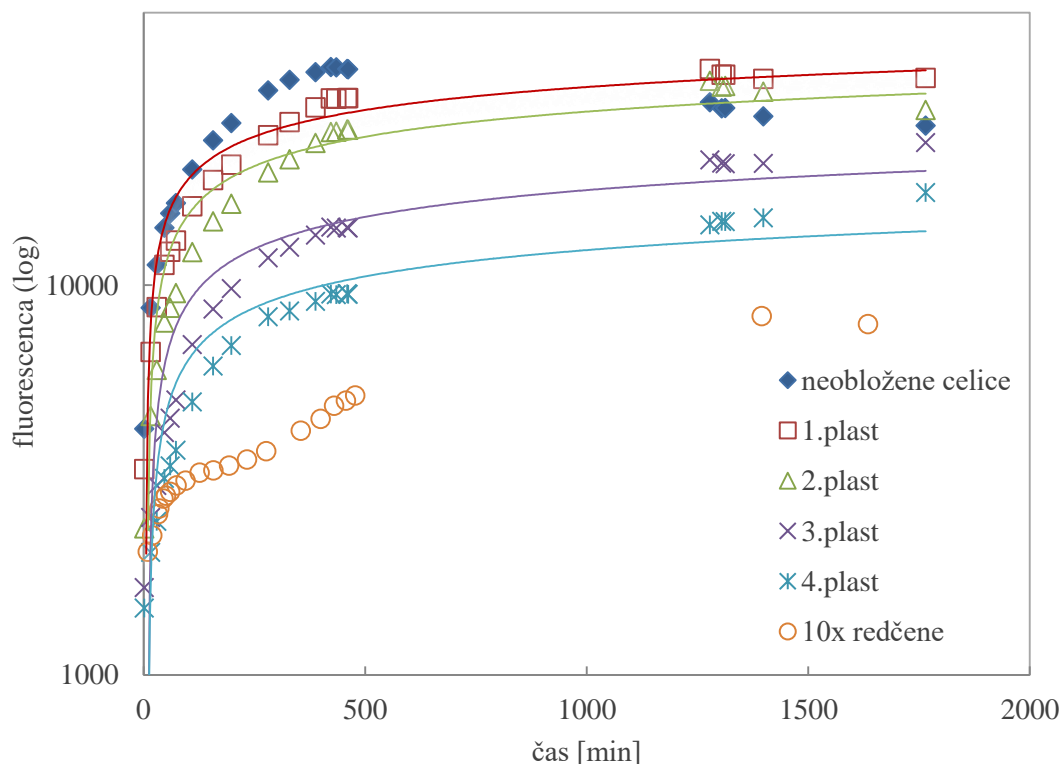
Polimerna obloga okrog bakterijskih celic predstavlja način imobilizacije, ki lahko spremeni metabolično aktivnost celic. Omenili smo, da poskus z resazurinom temelji na biokemični pretvorbi resazurina v resorufin v odvisnosti od aktivnosti celic. Eksperiment smo izvedli na neobloženih in obloženih celicah *E. coli*.



Slika 14: Metabolična aktivnost neobloženih bakterij *Escherichia coli* v redčenih vzorcih; aktivnost izražena kot fluorescenca.

Najprej smo testirali odziv večkratno redčenih neobloženih celic *E. coli* (slika 14), kjer je v primeru neredčenih celic (pozitivna kontrola) odziv približno sedem ur in pol strmo naraščal (kar kaže na metabolično aktivnost celic), nato je prišlo do upadanja fluorescence (slika 14). Možnih razlogov za upad fluorescence je več. Celice so se nahajale v 0,9 % NaCl, ki ni optimalen medij za rast bakterij, iztrošile so vsa hranila oziroma pretvorile ves resazurin v resorufin. Resorufin začne s časom razpadati, kar vodi do upada fluorescence. V primeru 10× redčitve odziv rahlo narašča tekom poskusa, po 23 urah inkubacije pa smo zaznali upadanje odziva. Do nižje aktivnosti je prišlo zaradi nižjega števila bakterij pa tudi dejstva, da so bili redčeni vzorci s fiziološko raztopino in ne z rastnim medijem. Pri večjih redčitvah ni prišlo do porasta fluorescence, odziv je bil podoben negativni kontroli, tj. 0,9 % NaCl.

Vzrok za to je padajoče število celic v vsaki redčitvi, ki se niso bile sposobne deliti v 0,9 % NaCl.



Slika 15: Metabolična aktivnost neobloženih celic *Escherichie coli* v primerjavi z obloženimi celicami *Escherichie coli* s polietileniminom in alginatom.

Slika 15 prikazuje krivulje vrednosti fluorescence obloženih celic v primerjavi z neobloženimi in 10× redčenimi celicami. Neobložene ter neredčene celice z  $OD_{600}$  0,8 so imele najbolj strmo naraščajoče vrednosti fluorescence, ki je po približno 24 urah pričela padati. Obložene celice so imele nižjo začetno aktivnost kot neobložene celice, in sicer se je aktivnost zmanjševala obratnosorazmerno z naraščanjem števila plasti, kar je med drugim tudi posledica vedno manjšega števila celic v vzorcih. Zanimivo je, da so celice z eno ter dvema plastema po 20 urah presegle vrednosti fluorescence neobloženih celic, ki jih nismo redčili. Sklepamo, da so obložene celice postale aktivne z zamikom zaradi polimerne obloge, ki je vir hranil, neobložene celice pa so postale neaktivne zaradi odsotnosti hranil. Obloga je celice verjetno ščitila pred neugodnim okoljem ter jim omogočala nadaljnjo metabolično aktivnost. Težko določimo, ali je prišlo do delitve celic znotraj ali zunaj polimerne ovojnice. Z opazovanjem pod optičnim mikroskopom smo drugi dan meritev preverili, kaj se dogaja v vzorcih z obloženimi celicami na mikrotitrski plošči. Opazovali smo koncentracijo ter

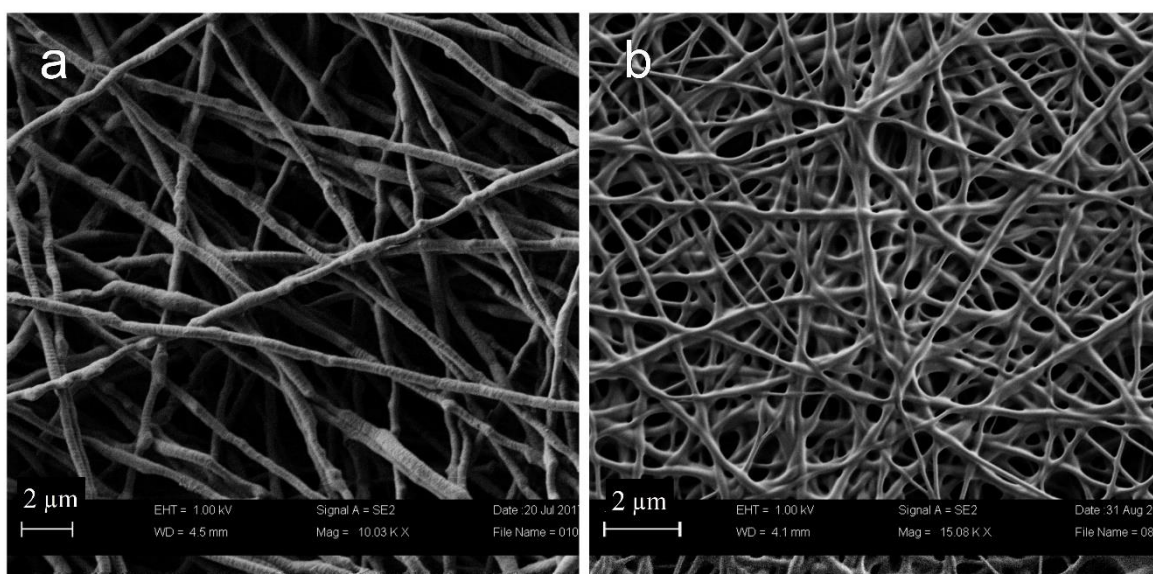
giblјivost celic, ki je nakazovala na okvirno stopnjo živosti. Opazili smo, da so neobložene celice več ali manj neaktivne oziroma nežive. Celice, obložene z eno plastjo, so bile prisotne bodisi v agregatih bodisi proste, ter še vedno aktivne. Ovojnica iz polietilenimina jih je očitno za določen čas zaščitila, nato pa se je polimer raztopil oziroma so celice pobegnile iz ovojnice ter se prosto gibale v mediju. Vzorec z bakterijami, obloženimi z eno plastjo polietilenimina ter eno plastjo alginata, je vseboval veliko majhnih, a aktivnih celic. Predpostavljamo, da so celice izrabile alginat iz obloge kot vir ogljika. Do slednjega razmisleka nas je pripeljala ugotovitev Hillbergove ter Tabrizianove, da so bakterijske celice *E. coli* v poskusu določanja hitrosti rasti verjetno koristile hitosan iz polielektrolitne ovojnice kot vir ogljika in dušika za preživetje (19). V vzorcih s celicami, obloženimi s tremi ter štirimi polimernimi plastmi, nismo opazili agregatov. Celic je bilo manj in so izkazovale nižjo fluorescenco oziroma stopnjo aktivnosti.

Rezultate poskusa z neobloženimi celicami smo povezali z rezultati obloženih celic. V obeh primerih se v vsakem koraku število celic zmanjša zaradi izgub med redčenjem oziroma oblaganjem. Ugotovili smo, da je aktivnost neobloženih celic z vsakim nadaljnjim redčenjem nižja (odziv se približa odzivu negativne kontrole) zaradi nižanja števila celic ter neugodnih pogojev okolja za rast in delitev celic (raztopina 0,9 % NaCl). Obložene celice so izkazale metabolično aktivnost na daljši rok v primerjavi z neobloženimi celicami kljub zmanjševanju števila celic. K temu je pripomogla polielektrolitna ovojnica, saj predstavlja vir hranil ter do neke mere zaščito celicam pred manj ugodnim okoljem za rast, tj. fiziološko raztopino.

## 4.2 Imobilizacija bakterij z elektrostatskim sukanjem

### 4.2.1 Vrednotenje nanovlaken brez vgrajenih celic

Pripravili smo nanovlakna iz PEO, PVP in kombinacijo alginata in PEO. Elektrostatsko sukanje 4 % (m/m) PEO raztopine je potekalo kontinuirano pri optimiziranih procesnih parametrih, tj. električni napetosti 15 kV in pretoku 1000  $\mu\text{L/h}$ . Pri teh pogojih smo pripravili nanovlakna brez vgrajenih celic s povprečnim premerom  $344 \pm 70$  nm. Nanovlakna so bila strukturno razgibana, vidne so rahle zožitve in zadebelitve, ki so manjše od običajnih vozlov (slika 16a) in so predstavljala osnovo za vgrajevanje bakterij.



Slika 16: SEM slike nanovlaken iz izdelanih iz: a) 4 % (m/m) polietilenoksida, b) 15 % (m/m) polivinilpirolidona.

Za pripravo nanovlaken iz PVP smo elektrostatsko sukali polimerne raztopine z različno koncentracijo [5, 10, 12, 15 % (m/m)] in molekulo maso polimera (preglednica VIII). Iz PVP 90F, visokomolekularnega polimera, smo s 5 in 10 % (m/m) raztopino izdelali delce, z 12 % (m/m) raztopino pa smo izdelali nanovlakna z ujetimi delci. S 15 % (m/m) raztopino PVP 30K, ki ima nižjo molsko maso, smo izdelali delce. Razlike v produktih sukanja nastanejo zaradi molekulske mase polimerov ter uporabljene koncentracije. V primeru PVP 90F se je z večanjem koncentracije večala viskoznost raztopine; pri nizkih koncentracijah so tako nastali delci, pri večjih pa nanovlakna. Vpliv molekulske mase na rezultat sukanja opazimo, če primerjamo nanovlakna, pripravljena z enako koncentracijo [15 % (m/m)], vendar različno molekulo maso polimera (PVP 90F in 30K) (preglednica VIII). Podobne

rezultate so dobili raziskovalci, ki so iz nizko- in visoko-molekularnega PVP podobnih koncentracij, kot so bile naše, pripravili delce in nanovlakna (43, 44).

*Preglednica VIII: Koncentracije preizkušenih polimerov ter procesni parametri elektrostatskega sukanja; oddaljenost igle od zbirala: 15 cm.*

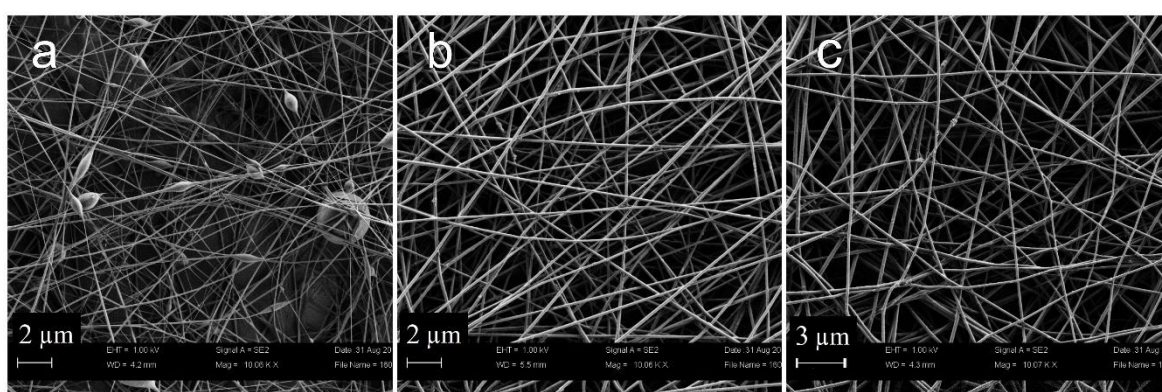
<b>Polimer</b>	<b>Molekulska masa [g/mol]</b>	<b>Koncentracija [% (m/m)]</b>	<b>Pretok [<math>\mu</math>l/h]</b>	<b><math>\Delta</math> napetosti [kV]</b>	<b>Uspešnost</b>
<b>PVP 90F</b>	790 000 – 1 350 000	5	2000 in manj	~20	Delci
<b>PVP 90F</b>	790 000 – 1 350 000	10	700-500	15,2	Delci
<b>PVP 90F</b>	790 000 – 1 350 000	12	2000-1000, na koncu 500	15,2	Delci na nanovlaknih
<b>PVP 90F</b>	790 000 – 1 350 000	15	500	15,2	Nanovlakna
<b>PVP 30K</b>	31 7000 – 51 400	15	500-250	15,2	Delci

Kot najoptimalnejša polimerna raztopina se je izkazala 15 % (m/m) PVP 90F (preglednica VIII), saj smo iz te raztopine uspešno izdelali nanovlakna s povprečnim premerom  $153 \pm 43$  nm (slika 16b) in jih uporabili za imobilizacijo celic *E. coli*.

Alginat je hidrofilen in biokompatibilen polimer, ki ga pogosto uporabljajo za oblaganje celic, vendar sam po sebi ni primeren za elektrostatsko sukanje zaradi izrazite ionske narave ter neustreznih viskoelastičnih lastnosti raztopin. Posledično smo za uspešno izdelavo nanovlaken alginat kombinirali z neionogenim PEO (26). Pri izdelavi nanovlaken iz kombinacije alginata in PEO smo variirali razmerje med njima in določili njihovo morfologijo in debelino nanovlaken (preglednici IX). S kombinacijami, v katerih je prevladoval alginat (80 %, 60 %), smo izdelali nanovlakna z vozli in posameznimi mikrodenci (slika 17a), medtem ko so iz kombinacije ALG/PEO 40/60 in 20/80 nastala gladka nanovlakna brez zadebelitev (slika 17b in 17c). Nanovlakna na sliki 17a v literaturi opisujejo kot “beads-on-strings”, ki pa opisuje nestabilne pogoje, vpliv visoke površinske napetosti ter prevodnosti raztopine in posledično nastanek neustreznih nanovlaken (23).

*Preglednica IX: Razmerje alginata in polietilenoksida (PEO) v 5 % (m/m) vodni raztopini, procesni parametri elektrostatskega sukanja pri 15 cm razdalji med iglo in zbiralom, nastali produkti elektrostatskega sukanja ter povprečni premeri nanovlaken s standardno deviacijo (SD).*

Alginat/PEO [%/%]	Pretok [ $\mu\text{L/h}$ ]	Napetost [kV]	Produkt	Povprečni premer nanovlaken + SD [nm]
<b>80:20</b>	1500	15	Nanovlakna+ delci	$75 \pm 35$
<b>60:40</b>	500	10	Nanovlakna+ delci	-
<b>40:60</b>	750	10	Nanovlakna	$134 \pm 35$
<b>20:80</b>	750	15	Nanovlakna	$142 \pm 35$



*Slika 17: SEM slike nanovlaken s kompozicijo a) ALG/PEO 80/20, b) ALG/PEO 40/60, in c) ALG/PEO 20/80. ALG- alginat, PEO- polietilenoksid.*

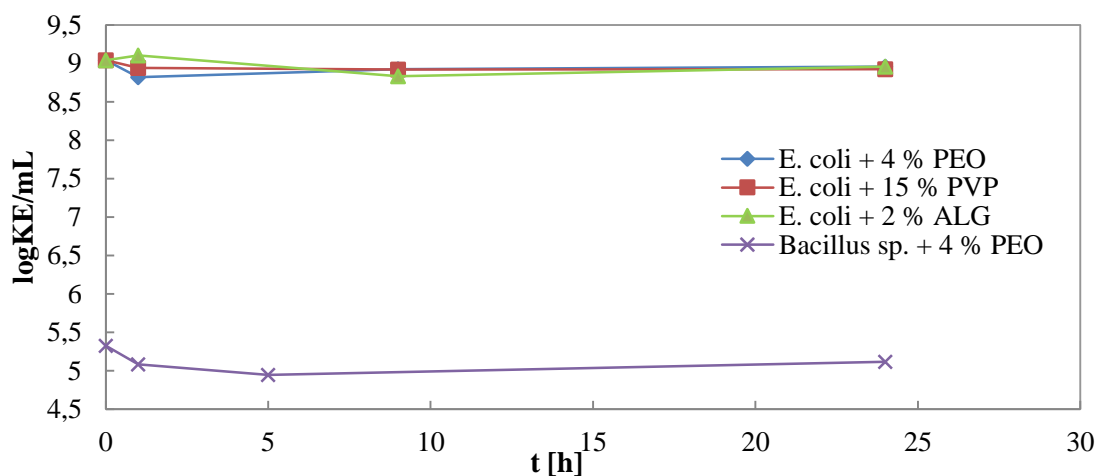
Povprečni premer nanovlaken narašča z naraščajočo količino PEO in padajočo količino alginata (preglednica IX). Pri kombinaciji ALG/PEO 80/20 so nastala tanka nanovlakna z vozli, medtem ko so iz kombinacije ALG/PEO 40/60 nastala nanovlakna z gladko površino (slika 17a). Podobno povezavo med vsebnostjo alginata v mešanici s polietilenoksidom, prevodnostjo raztopine ter njenim elektrostatskim sukanjem so dokazali Rošic in sodelavci (26). Tako z višanjem deleža alginata narašča prevodnost raztopine, ki vodi do večje gostote naboja na curku, pri tem pa nastanejo tanjša nanovlakna kljub temu, da gre za raztopine z višjo viskoznostjo. Za vgradnjo bakterij *E. coli* smo izbrali kombinacijo ALG/PEO 20/80.

## 4.2.2 Viabilnost bakterij v polimernih raztopinah

Bakterije *E. coli* so ne-halotolerantni mikroorganizmi, ki določen čas lahko preživijo v 0,9 % NaCl, medtem ko se z nižanjem koncentracije soli povečuje pritisk znotraj celic, ki lahko privede do propada celic. Polimerne disperzije za elektrostatsko sukanje so bile pripravljene v sterilizirani prečiščeni vodi in so predstavljale stresne okoliščine za celice, zato smo preverili viabilnost bakterij *E. coli* v 4 % (m/m) PEO, 15 % (m/m) PVP in 2 (m/m) % ALG ter viabilnost vegetativnih bakterij *Bacillus* sp. v 4 % (m/m) PEO skozi 24-urno obdobje. Postopek je opisan v poglavju 3.5.4.

Na sliki 18 je prikazano spreminjanje števila celic (v logKE/mL) v treh različnih polimernih raztopinah skozi čas. Ugotovili smo, da celice *E. coli* preživijo v vseh treh polimernih raztopinah vsaj 24 ur in pri tem ne pride do drastičnega upada števila le-teh, ampak je vmes prišlo celo do rahlega porasta preko obdobja 24 ur, verjetno zaradi zaloge hranil. Začetna koncentracija *E. coli* v PEO je znašala 9,04 logKE/mL. Število celic v polimerni disperziji se je po 24 urah zmanjšalo za 0,833 logKE/mL. Podobne rezultate smo dobili tudi v disperziji PVP in ALG/PEO.

Bakterije *Bacillus* sp. so preživele 24 ur v raztopini PEO. Začetno število celic je bilo 5,32 logKE/mL. V začetnih petih urah je prišlo do padca za 0,376 logKE/mL, ki je po 24 urah rahlo narastlo (slika 18). Po 24 urah je bilo v polimerni disperziji prisotnih 5,11 logKE/mL celic; padec števila je tako znašal 0,208 logKE/mL. S tem poskusom smo dokazali, da celice *E. coli* in *Bacillus* sp. preživijo ustrezno dolgo v vodnem mediju z dodanim polimerom (slika 18). To je bila pomembna ugotovitev za nadaljnje eksperimente povezane z elektrostatskim sukanjem.



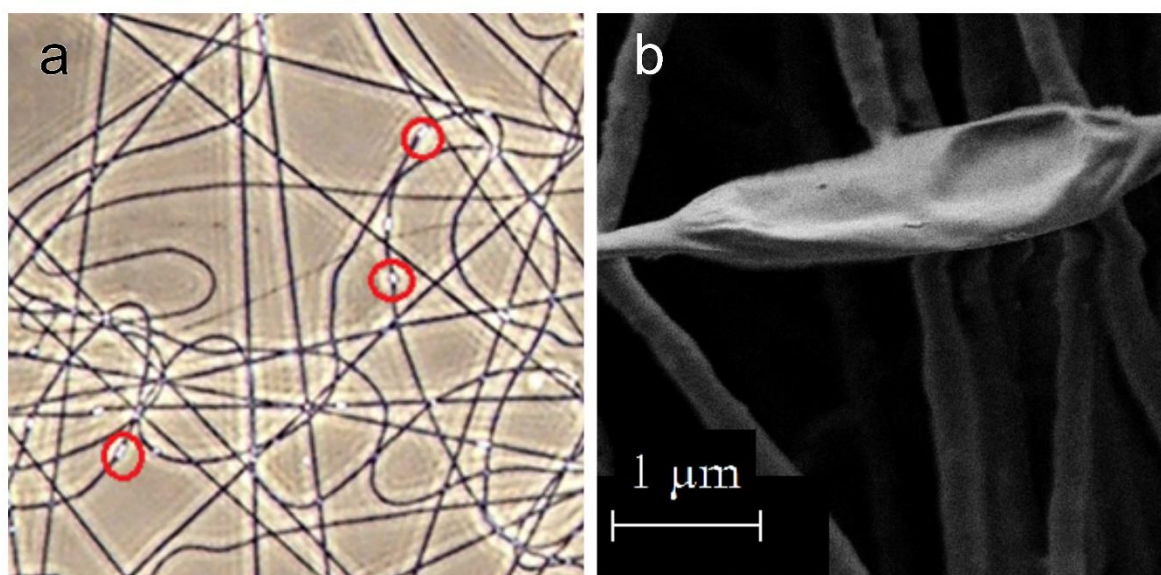
Slika 18: Viabilnost bakterij *Escherichia coli* in bakterij *Bacillus* sp. med 24-urno inkubacijo v različnih polimernih raztopinah. PEO- polietilenoksid, PVP- polivinilpirolidon, ALG- alginat.



### 4.2.3 Prikaz nanovlaken z vgrajenimi neobloženimi bakterijami

#### PEO nanovlakna z neobloženimi *E. coli*

PEO nanovlakna z neobloženimi *E. coli* smo izdelali pri enakih pogojih kot prazna nanovlakna. Premer nanovlaken v povprečju meri  $269 \pm 77$  nm in je v primerjavi s praznimi PEO nanovlakni občutno manjši, morfologija obojih pa se ni razlikovala. Vzrok za zmanjšanje premera je lahko sprememba v prevodnosti polimerne raztopine po dodatku negativno nabitih celic (26). Pri nanovlaknih z vgrajenimi bakterijami smo opazili, da so se celice *E. coli* med sukanjem orientirale vzdolžno glede na potek nanovlaken, kar se vidi na sliki 19a, ki smo jo posneli z optičnim mikroskopom. Podobno postavitev celic v nanovlaknih so ugotovili Salalha in sodelavci (2).



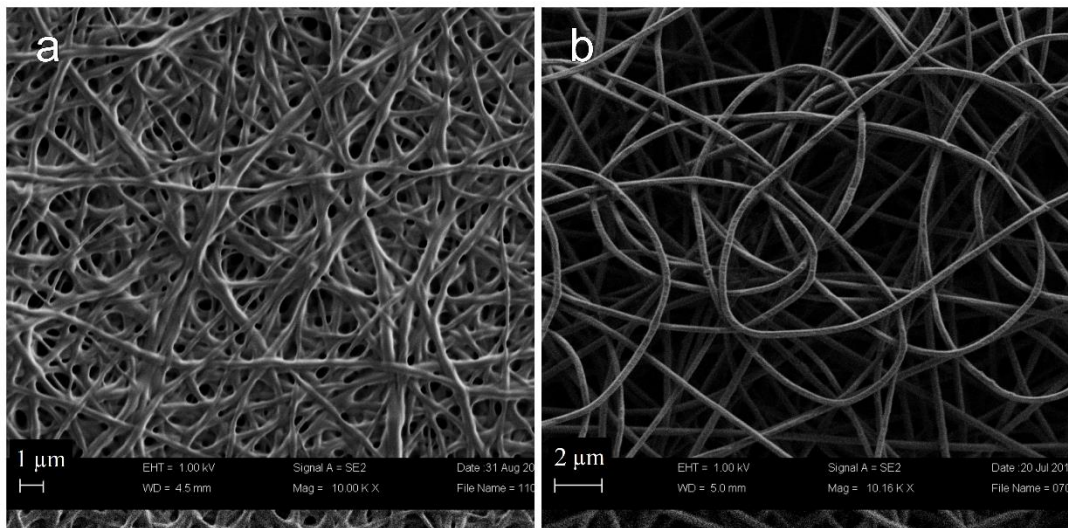
Slika 19: a) Slika nanovlaken pod optičnim mikroskopom z vgrajenimi celicami *E. coli*, označene z rdečo; vidna longitudinalna postavitev celic ( $400\times$  povečava), b) vzdolžno glede na nanovlakno vgrajena celica *E. coli* (SEM slika).

Na sliki 19b je predstavljena vgrajena celica *E. coli* v nanovlakno. Opazovana bakterijska celica meri  $3,02 \mu\text{m}$  in je orientirana longitudinalno glede na nanovlakno. Iz mikroskopskih slik je razvidno, da je premer nanovlaken ustrezen za vgradnjo *E. coli* kljub temu, da je manjši od  $1 \mu\text{m}$ . Celica je na zgornji strani rahlo sploščena oziroma udrt. Sprememba morfologije verjetno izvira iz dehidracije celice zaradi relativno hitrega izhlapevanja topila med elektrostatskim sukanjem (57).

### **PVP nanovlakna z neobloženimi *E. coli***

Povprečen premer PVP nanovlaken, v katera smo vgradili *E. coli*, je znašal  $217 \pm 63$  nm in je večji od premera praznih nanovlaken iz PVP. Nanovlakna ob pristanku na zbiralno folijo niso bila suha, kar se vidi kot zlitje vlaken na presečiščih le-teh (slika 20a). Rešitev za to težavo bi bilo povečanje razdalje od konca igle do zbirala. S tem bi podaljšali čas izhlapevanja vode ter posledično dobili bolj suh produkt.

Velika težava pri elektrostatskem sukanju PVP-ja je bila, da napetost na trenutke ni popolnoma raztegnila kapljice v curek tekočine in posledično se je kapljica tekom sukanja počasi povečevala, potem pa odtrgala in padla na zbiralo. To je povzročilo nabiranje mokrih sledi na zbiralni foliji. Vseeno smo lahko naredili nanovlakna, vendar za nadaljnjo analizo ni bil primeren celoten zbran vzorec.



Slika 20: Vgrajene celice *Escherichie coli* v nanovlakna iz: a) 15 % (m/m) polivinilpirolidona ter b) alginat/polietilenoksid 20/80.

### **ALG in PEO (20/80) nanovlakna z neobloženimi *E. coli***

Elektrostatsko sukanje polimerne disperzije z 20 % ALG in 80 % PEO s celicami je potekalo na napravi s klimatsko komoro pri napetosti 15 kV ter pretoku  $600 \mu\text{L/h}$ . Podobne pogoje smo uporabili pri elektrostatskem sukanju praznih nanovlaken. Celokupna koncentracija polimera v disperziji celic je bila 5 % (m/m).

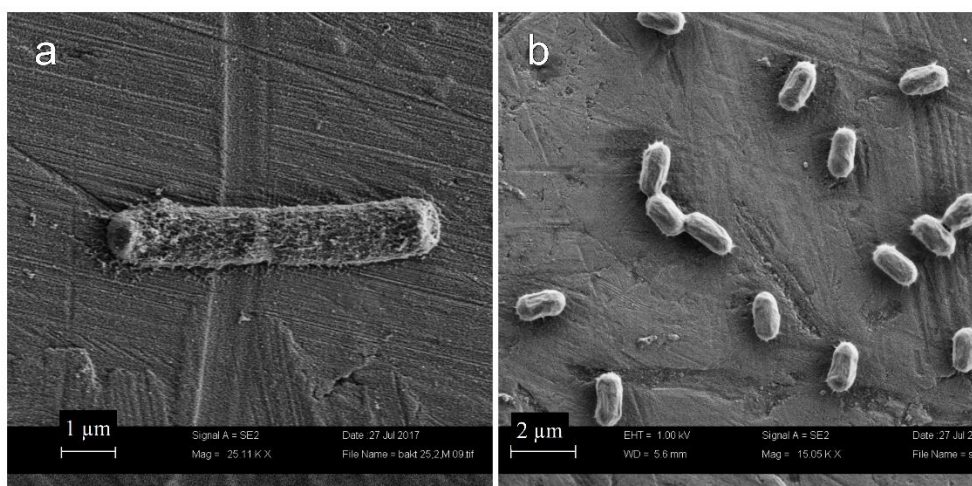
Povprečen premer nanovlaken z vgrajenimi bakterijami *E. coli* je znašal  $284 \pm 71$  nm (Slika 20b). Premer nanovlaken z *E. coli* je bil tako večji od premera praznih nanovlaken z

isto sestavo. Glede na prisotnost bakterij in s tem večje gostote naboja bi moralo biti obratno.

Na slikah 20a in 20b ni vidne nobene bakterijske celice *E. coli*, ki se je vgradila v nanovlakna. S SEM pregledom večje površine vzorca nanovlaknen so van Aalst in sodelavci ugotovili, da je razporeditev vgrajenih celic v nekaterih predelih enakomerna, v drugih pa ne (58). Glede na to, da smo pregledali manjši del našega zbranega vzorca, je možen razlog za odsotnost celic na SEM slikah neenakomerna razporeditev le-teh v vzorcu ter relativno malo vgrajenih celic glede na količino nanovlaknen in jih je zato težje najti. Kljub težavam pri slikanju celic s SEM mikroskopom lahko vgradnjo celic enostavno spremljamo z optičnim mikroskopom, kar se vidi na sliki 19a.

### **PEO nanovlakna z vgrajenimi neobloženimi grampozitivnimi bakterijami in spori *Bacillus sp.***

Bakterije *Bacillus sp.* 25.2.M po dolžini merijo okoli 7  $\mu\text{m}$ , medtem ko je povprečna velikost spor  $1419 \pm 132$  nm. Slika 21a predstavlja vegetativno bakterijo *Bacillus sp.*, na sliki 20b pa vidimo spore *Bacillus sp.*

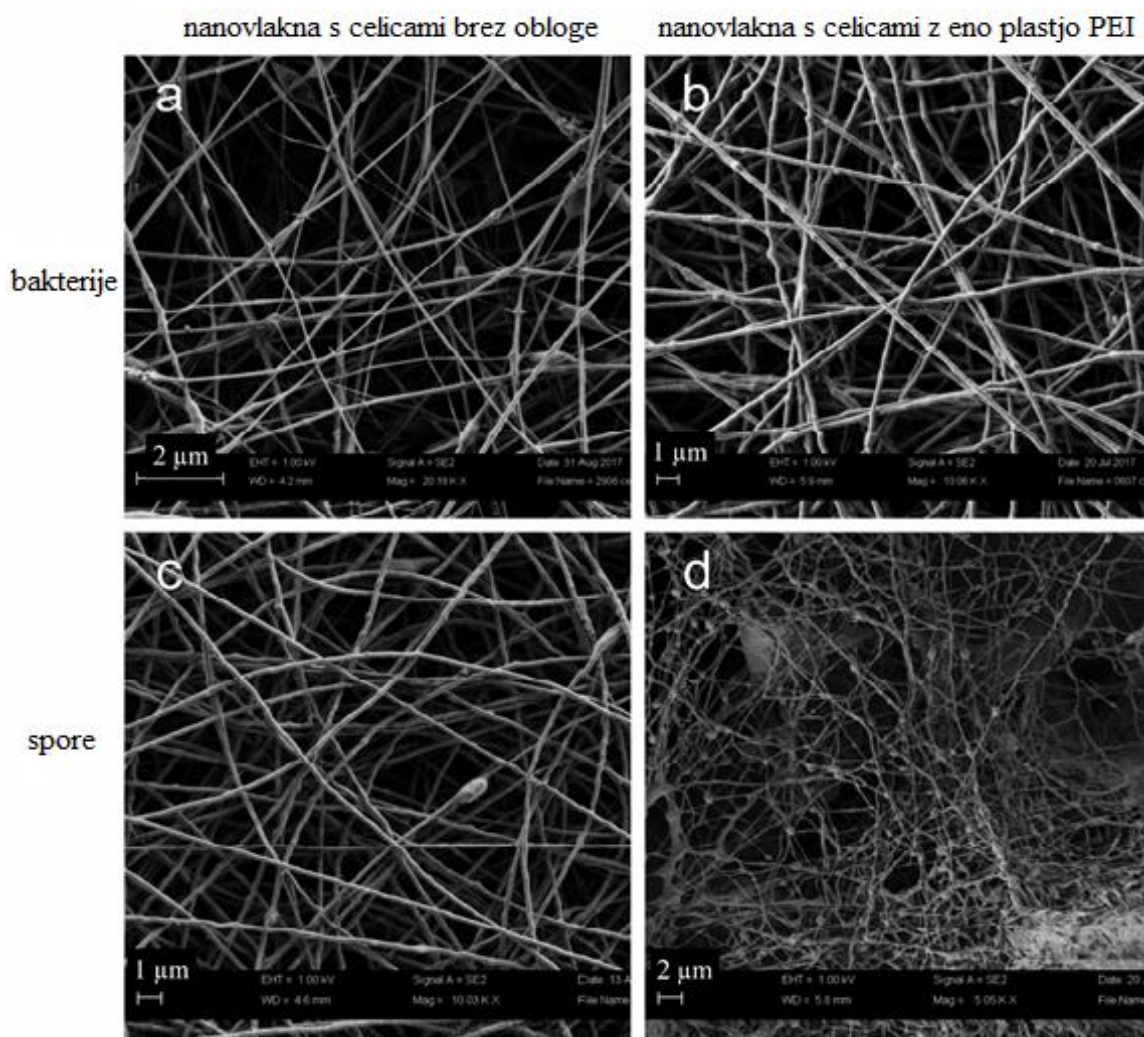


*Slika 21: a) SEM slika vegetativnih bakterij Bacillus sp. 25.2.M; b) SEM slika spor Bacillus sp. 25.2.M*

Nanovlakna iz 4 % (m/m) disperzije PEO in bakterij oz. spor *Bacillus sp.* smo pripravili na napravi brez klimatske komore, s pretokom 555  $\mu\text{L/h}$  ter pri napetosti 15 kV.

Povprečen premer nastalih nanovlaknen z vgrajenimi vegetativnimi celicami *Bacillus sp.* je bil  $111 \pm 40$  nm, povprečen premer nanovlaknen s spori pa je znašal  $217 \pm 50$  nm. Na sliki

22a opazimo več zadebelitev, dolgih med 0,5 in 1  $\mu\text{m}$ , vzdolž poteka vlaken. Razgibanost vlaken je posledica visoke relativne vlažnosti v zraku. Kljub zadebelitvam imajo nanovlakna gladko površino. Za izdelavo vlaken s sporami na napravi, ki nima klimatske komore, smo se odločili iz praktičnega vidika. Proces je manj potraten s časovnega in finančnega vidika, delo s samo napravo pa je bolj enostavno. Na nanovlaknih opazimo rahle zadebelitve, ki so posledica sobnih pogojev ter neenakomernega izhlapevanja topila (slika 22c).



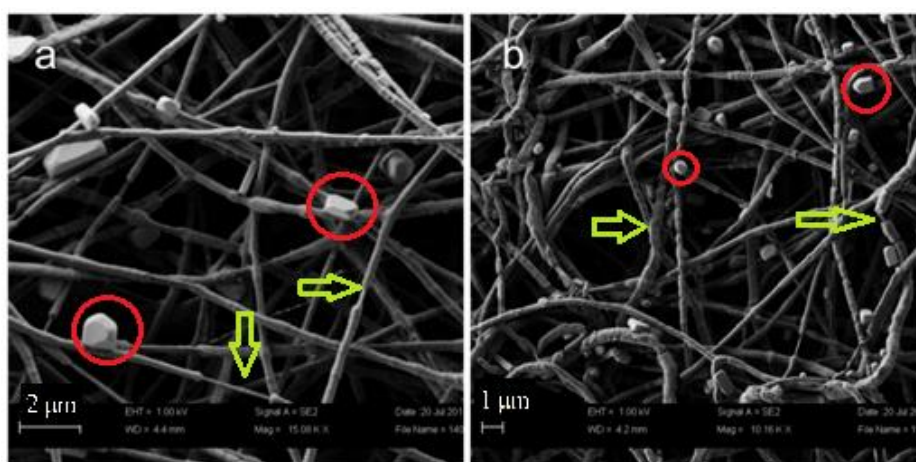
Slika 22: Nanovlakna iz 4 % (m/m) polietilenoksida z vgrajenimi: a) neobloženimi bakterijami *Bacillus sp.*; b) obloženimi bakterijami *Bacillus sp.* z eno plastjo polietilenimina (PEI); c) neobloženimi sporami *Bacillus sp.*; d) obloženimi sporami *Bacillus sp.* z eno plastjo PEI.

## 4.2.4 Morfologija nanovlaken z obloženimi celicami

### PEO nanovlakna z obloženimi *E. coli*

Celice *E. coli* smo obložili z eno ali dvema plastema polielektrolitov s tehniko plastenja ter le-te vgradili v nanovlakna, izdelana s sukanjem. Premer PEO nanovlaken z vgrajenimi *E. coli*, obloženimi z eno plastjo PEI, je bil  $286 \pm 68$  nm; povprečen premer nanovlaken z vgrajenimi *E. coli*, obloženimi z dvema plastema (PEI in ALG), je bil  $344 \pm 96$  nm. Sliki 23a in 23b prikazujeta nanovlakna, v katera smo vgradili celice *E. coli*, obložene z eno ter dvema plastema polielektrolitov. Elektrostatsko sukanje je v obeh primerih potekalo pri električni napetosti 20 kV in pretoku 700  $\mu$ L/h. Pri nanovlaknih s celicami z eno plastjo polielektrolita opazimo zmanjšanje premera v primerjavi s praznimi nanovlakni, medtem ko je premer vlaken s celicami z dvojno plastjo podoben premeru praznih nanovlaken iz 4 % (m/m) PEO.

Polimerna disperzija PEO z obloženimi celicami *E. coli* je bila pripravljena v 0,9 % NaCl (namesto v sterilizirani prečiščeni vodi), saj smo celice oblagali v 0,9 % NaCl. Na nanovlaknih je tako vidna izkristalizirana sol (obkrožena z rdečo na sliki 23a in 23b). Sol moti elektrostatsko sukanje, saj poveča prevodnost raztopine zaradi ionske narave, kar se je odražalo kot nestabilnost procesa, saj smo imeli težave s pretokom in električno napetostjo. Posledica nestabilnosti sukanja so bila nanovlakna neenakomernih velikosti. Prisotnih je veliko zažemkov in odebelitev različnih velikosti, opazne so prekinitve na nanovlaknih oziroma povezovanje s tankimi polimernimi nitmi (označeno z zeleno puščico na sliki 23a in 23b).



Slika 23: Nanovlakna iz 4% polietilenoksida z bakterijami *Escherichia coli*, obloženimi z: a) eno plastjo polietilenimina (PEI); b) eno plastjo PEI ter eno plastjo alginata. Zelena puščica kaže na zažemke in odebelitve nanovlaken, z rdečo je obkrožena izkristalizirana sol.

## PEO nanovlakna z obloženimi bakterijami in sporami *Bacillus* sp. 25.2.M

Vegetativne bakterije *Bacillus* sp. smo predhodno obložili z eno plastjo polietilenimina (postopek oblaganja v poglavju 3.5.3). Iz 4 % (m/m) PEO polimerne disperzije celic smo izdelali nanovlakna s povprečnim premerom  $259 \pm 57$  nm (slika 22b). Napetost sukanja je bila 15 kV, pretok pa 700  $\mu$ L/h. Premer nanovlaken je večji kot v primeru neobloženih bakterij *Bacillus* sp., pri katerih je znašal  $111 \pm 40$  nm (načeloma bi moral biti premer manjši zaradi dodatnega naboja, ki ga je doprinesel PEI), površina nanovlaken pa je bolj razgibana. Opazimo več manjših zadebelitev na nanovlaknih (slika 22b). Strukturno so nanovlakna z obloženimi bakterijami *Bacillus* sp. podobna nanovlaknam z vgrajenimi obloženimi bakterijami *E. coli*.

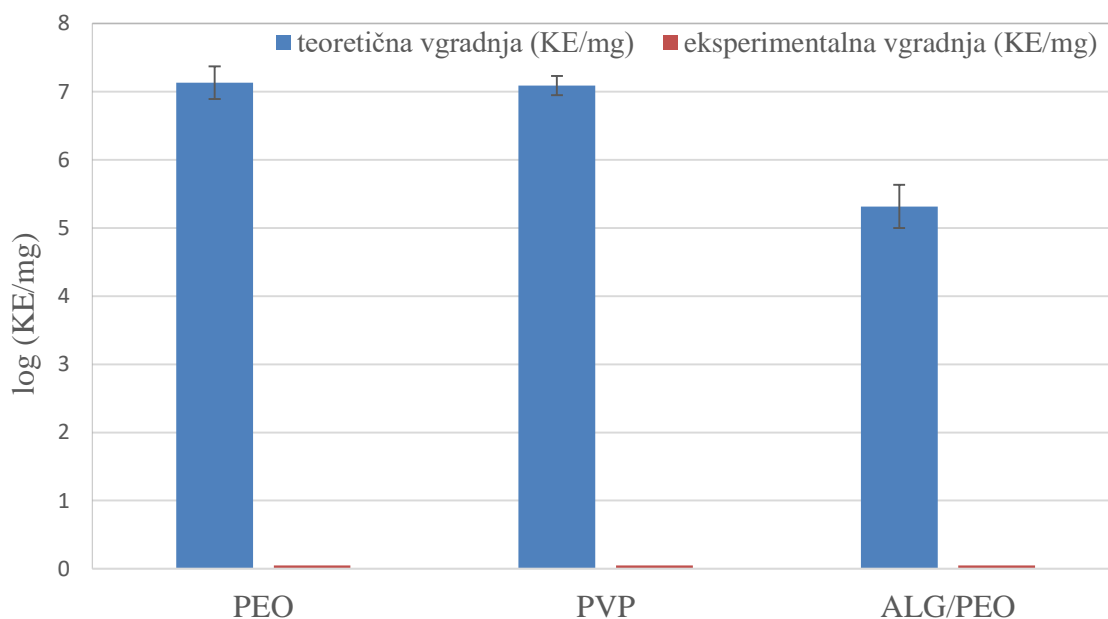
Spore smo obložili z eno plastjo PEI-ja s tehniko platenja. Pripravljeno 4 % (m/m) disperzijo PEO in obloženih spor smo sukali na napravi brez klimatske komore (slika 22d). Zaradi prisotnosti dodatnega naboja v disperziji s strani spor je proces potekal bolj nestabilno kot pri sukanju neobloženih spor v 4 % (m/m) PEO. To je vidno tudi na sliki 22d, ki se po izgledu razlikuje od slik 22a-22c. Film iz nanovlaken, ki smo ga ustvarili, je bil tanek, nanovlakna pa so bila različne debeline. Premer nanovlaken je bil manjši od premera nanovlaken z neobloženimi sporami, na SEM sliki so vidni tudi delci, ki so nastali med procesom (slika 22d). Težava je bila visoka vlažnost v okolju. Obložene bakterije in spore *Bacillus* sp. so se ujele v nanovlakna, kar smo pokazali s testom viabilnosti spor po elektrostatskem sukanju z nanosom vzorca na trdno gojišče (rezultati v poglavju 4.3).

Slike optičnega in SEM mikroskopa kažejo na uporabnost elektrostatskega sukanja za vgradnjo gramnegativnih ter grampozitivnih bakterijskih celic v nanovlakna. Testirane polimerne disperzije v izbranih koncentracijah so bile primerne za elektrostatsko sukanje, med njimi pa je najboljša polimerna disperzija 4 % (m/m) PEO. Lastnosti slednjega omogočajo enostavno izdelavo nanovlaken v smislu poteka procesa sukanja ter nastanek nanovlaken primerne velikosti ter mehanske moči.

### 4.3 Viabilnost gramnegativnih in grampozitivnih bakterij po elektrostatskem sukanju

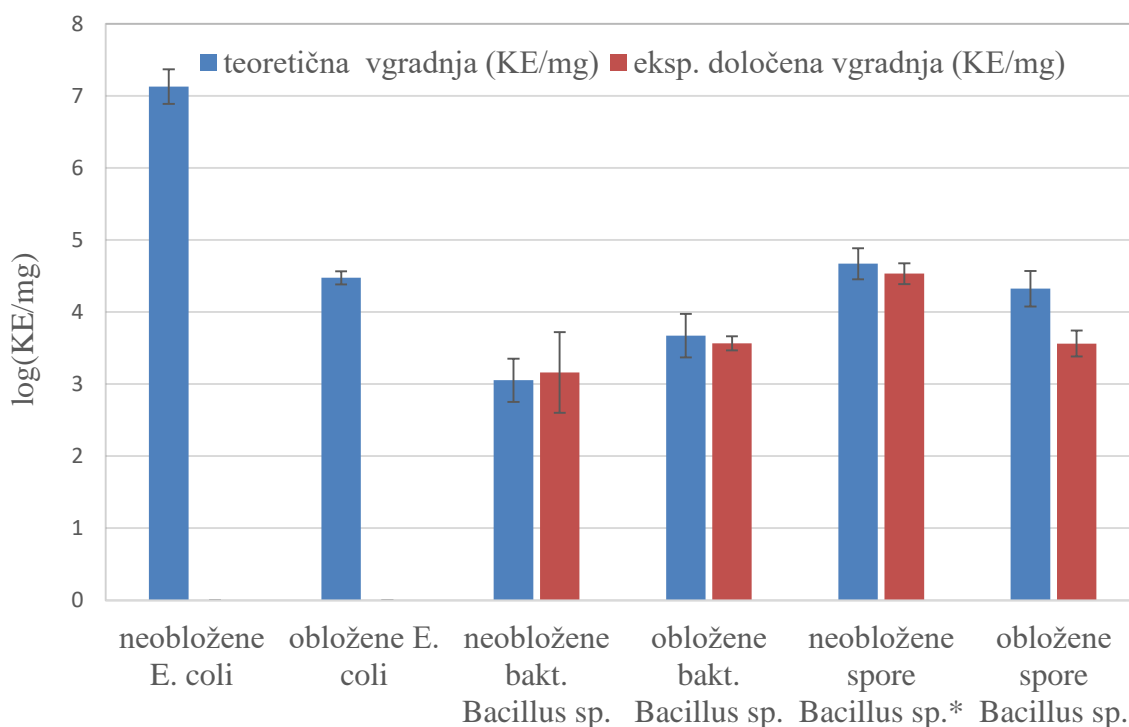
Bakterijske celice so različnih oblik in velikosti. Pred mehanskim stresom jih ščiti predvsem njihova celična stena. Viabilnost celic pred in po elektrostatskem sukanju smo določili bakterijam *E. coli* in *Bacillus* sp. ter njihovim sporam s preverjanjem rasti na agarnih ploščah (postopek opisan v poglavju 3.5.7, točka c).

Ugotovili smo, da elektrostatsko sukanje ne vpliva ugodno na preživelost bakterije *E. coli*, saj ni nobena bakterija preživela vgradnje v PEO nanovlakna (slika 24). Na histogramu je prikazano le teoretično število celic (določeno iz števila celic v polimerni disperziji pred elektrostatskim sukanjem), ki bi zraslo iz nanovlaken. Eksperimentalno nismo uspeli dokazati viabilnosti *E. coli* iz nanovlaken po elektrostatskem sukanju, saj niso začele rasti na trdnih agarnih gojiščih, ta rezultat pa je na histogramu prikazan kot odsotnost stolpcev eksperimentalno določene vsebnosti celic v nanovlaknih. Tudi zamenjava polimera za PVP oz. kombinacijo alginat/PEO ni izboljšala preživelosti (slika 24).



Slika 24: Stolpci prikazujejo teoretične vgradnje neobloženih celic *Escherichie coli* v različnih nanovlaknih; manjkajo pa stolpci za eksperimentalno določeno število celic, ki bi iz teh nanovlaken zrasle. PEO- polietilenoksid, PVP- polivinilpirolidon, ALG- alginat.

V poglavju 4.2.2 smo pokazali, da so bakterije *E. coli* ter *Bacillus* sp. viabilne v vodni polimerni raztopini preko obdobja 24 ur (slika 18). Celice *E. coli* so ohranile metabolično aktivnost tudi po oblaganju s polielektroliti, kar smo preverili z resazurinsko metodo (slika 15). Z namenom izboljšanja preživelosti oz. povečanja odpornosti na elektrostatsko sukanje smo celice *E. coli* obložili s polielektrolitom (PEI) ter jih vgradili v nanovlakna. Viabilnost se z oblogo ni povečala, kar vidimo na histogramu na sliki 25. V primeru sukanih obloženih *E. coli* sta odsotna stolpca eksperimentalno določene vsebnosti celic v nanovlaknih.



Slika 25: Teoretično in eksperimentalno določene vgradnje neobloženih in obloženih *Escherichie coli* ter bakterij in spor *Bacillus* sp. 25.2.M po elektrostatskem sukanju v polietilenoksidni disperziji. \*Rezultati neobloženih spor so iz doktorske naloge dr. Špele Zupančič, mag. farm. (50).

V primerjavi z *E. coli* so bakterije in spore *Bacillus* sp. preživele elektrostatsko sukanje med vgradnjo v nanovlakna (slika 25). Razlika med teoretično in eksperimentalno določeno vsebnostjo celic je za neobložene bakterije znašala le 0,11 logKE/mg, za neobložene spore pa 0,14 logKE/mg. Porast oz. padec logaritemske enote je v obeh primerih majhen, v območju eksperimentalnih napak in kaže na uspešno vgradnjo celic v nanovlakna. Vgradnjo smo ocenili kot uspešno, če je razlika med teoretično in eksperimentalno vgradnjo znašala manj kot 1 logKE/mg.



Pri primerjavi neobloženih in obloženih bakterij *Bacillus* sp. smo ugotovili, da je bila vgradnja obloženih celic prav tako uspešna kot vgradnja neobloženih. Pri obloženih bakterijah je bila sicer eksperimentalno določena vsebnost malenkost nižja od teoretično določene. Razlika je lahko posledica negativnega vpliva polielektrolitne obloge na celice ter združevanja bakterij v skupke med oblaganjem s polielektrolitom, poleg tega ne smemo zanemariti možnih napak pri določanju KE/mg, vendar iz dobljenih rezultatov ne moremo določiti, kaj je glavni razlog za razliko med teoretično in eksperimentalno določeno vsebnostjo bakterij *Bacillus* sp. v nanovlaknih.

Kot smo omenili, je bila viabilnost neobloženih spor kot odporne oblike celic skoraj popolnoma ohranjena, vgradnja pa uspešna (slika 25). Vsebnost obloženih spor v nanovlaknih je bila nekoliko nižja. Razlika med teoretično in eksperimentalno določeno vsebnostjo obloženih spor je znašala 0,76 logKE/mg, kar je lahko posledica združevanja in rast celic v skupkih. Padeč števila je v območju eksperimentalne napake, vgradnjo pa smo ocenili kot uspešno.

Naši poskusi so pokazali, da *E. coli* niso preživele elektrostatskega sukanja, vegetativne celice in spore *Bacillus* sp. 25.2.M pa so ohranile viabilnost, iz česar lahko sklepamo, da so različne bakterije različno odporne na stres. Med elektrostatskim sukanjem deluje na bakterije več stresnih faktorjev s potencialnim vplivom na viabilnost celic, npr. električni tok, dehidracija in mehanski stres.

Ena izmed možnih razlag za nizko viabilnost bakterij *E. coli* v nanovlaknih sloni na občutljivosti *E. coli* na električni tok ter generiranju le-tega med procesom elektrostatskega sukanja. V literaturi so opisani rezultati uporabe električnega toka različnih velikostnih razredov (od  $\mu\text{A}$  do mA) na bakterijah in kvasovkah, vendar do signifikantno zmanjšane aktivnosti celic pride šele po aplikaciji električnega toka nad 20 mA (59–61). Izsledki raziskav o generiranju električnega toka med elektrostatskim sukanjem kažejo na precej manjše vrednosti le-tega (1-3  $\mu\text{A}$ ) (62, 63). Glede na vrednosti električnega toka med elektrostatskim sukanjem, ki so jih raziskovalci določili, sklepamo, da naših celic *E. coli* najverjetneje ni uničil električni tok med elektrostatskim sukanjem, toda te možnosti ne smemo izključiti, saj je možno, da električni tok poškoduje celično membrano, kar privede do izhajanja za delovanje celice pomembnih snovi. Mureinska plast celične stene v grampozitivnih bakterijah pripomore k zmanjšanju vpliva električnega toka na celice. Celice *Bacillus* sp. so namreč za razliko od *E. coli* preživele sukanje, kar kaže na večjo odpornost

grampozitivnih bakterij, to pa lahko podkrepimo z izsledki raziskave, v kateri so dokazali manjšo občutljivost bakterij *Bacillus cereus* na električni tok v primerjavi z gramnegativnimi *E. coli* (59).

Mehanski stres, ki ga *E. coli* doživlja med sukanjem, naj bi bil glede na dosedanje raziskave manjši od sil, ki jih ta bakterija lahko prenese (2, 58). Ob tem je potreben razmislek o možnosti, da sam proces nepopravljivo poškoduje celično steno, kar bi bil lahko razlog za ničelno viabilnost *E. coli* po elektrostatskem sukanju.

Dehidracija celic med elektrostatskim sukanjem lahko vpliva na preživetje celic. Kot smo omenili v uvodu, električna napetost pri sukanju raztegne kapljo polimerne raztopine, ki izhaja iz igle. Nanovlakna torej nastajajo med raztegom oziroma potovanjem do zbirala, pri tem pa topilo izhlapeva in tako nastane suh produkt. V našem primeru smo kot topilo uporabili vodo, ki ima relativno visoko vrelišče glede na organska topila. Izhlapevanje vode smo olajšali z nižjo relativno zračno vlago v komori naprave za sukanje. Vsi ti dejavniki vodijo do velike obremenitve celic, ki jih sukamo skupaj s polimerom. Za bakterijo *E. coli* je sicer znano, da prenese visoke strižne sile med centrifugiranjem ter med elektrohidrodinamskimi procesi, vendar bi ta dejavnik lahko bil vzrok za nizko preživetje celic med elektrostatskim sukanjem (2). Velika ali prehitra dehidracija celic lahko povroči smrt celic zaradi poškodb membrane. Med sušenjem se celični volumen zmanjša zaradi povečanja osmotskega pritiska zunaj celice, pri tem pride do premika fosfolipidov v celični membrani in posledično do poškodbe le-te (57). To je razvidno tudi iz SEM slike vlaken z vgrajenimi *E. coli* (slika 19b), kjer je oblika celice spremenjena – celica ni več ovalna, temveč zgleda »udrta«, verjetno zaradi uničenja celične stene. Za sev Top10 bakterije *E. coli* ne smemo izključiti možnosti okrnjene celične stene zaradi prilagoditve celic za biotehnološko uporabo, tj. kloniranje, propagacijo plazmidov (64).

Pomembna razlika med uporabljenimi bakterijami je struktura celične stene, ki je sestavljena iz peptidoglikana tako pri gramnegativnih kot grampozitivnih bakterijah (65). V gramnegativnih bakterijah se največkrat pojavlja v enem sloju, medtem ko celično steno grampozitivnih bakterij predstavlja debel sloj peptidoglikana. Tako so *E. coli* bolj občutljive na razne okoljske dejavnike (mehanski stres, dehidracija celic) kot grampozitivne bakterije. Na podlagi omenjenih izsledkov raziskovalcev ter na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je različna viabilnost *E. coli* in *Bacillus* sp. po elektrostatskem sukanju posledica različne sestave celične stene pri gramnegativnih in grampozitivnih bakterijah. Izmed zgoraj naštetih

stresnih dejavnikov je najbolj verjetno, da celice *E. coli* niso preživele procesa elektrostatskega sukanja zaradi dehidracije celic med samo izdelavo nanovlaken. Poleg tega so raziskovalci pokazali, da je znižana viabilnost celic najverjetneje posledica samega procesa sukanja, ki vgrajuje celice v nanovlakna (58). Povezavo med strukturo celične stene in viabilnostjo celic po elektrostatskem sukanju bi bilo smiselno preveriti še na drugih grampozitivnih in gramnegativnih bakterijskih modelih.

## 5 SKLEPI

- a) Tehnika plastenja se je izkazala za primeren način imobilizacije bakterijskih celic, s katero lahko ustvarimo polielektrolitno oblogo na celični površini; sprejmemo hipotezo št. 1.
- b) Celice, obložene s tehniko plastenja, so bolj aktivne v daljšem časovnem obdobju v primerjavi z nebloženimi celicami. Razlika v aktivnosti izvira iz polielektrolitne obloge, ki predstavlja glavni vir hranil za celice, poleg tega polimerna obloga predstavlja bariero med celico in okoljem ter s tem zmanjša oziroma zakasni vpliv neugodnega okolja na same celice. Potrdimo hipotezo št. 2.
- c) Proces elektrostatskega sukanja in polimeri PEO, PVP ter kombinacija alginata in polietilenoksida v izbranih koncentracijah so primerni za izdelavo nanovlaken ter vgradnjo bakterijskih celic in njihovih spor v le-ta, vendar so nekatere celice bolj občutljive na proces kot druge. Tako na primer proces škoduje celicam *E. coli* Top10, saj je viabilnost teh celic po vgradnji v vlakna ničelna. Nasprotno pa smo lahko bakterije *Bacillus* sp. uspešno vgradili in pri tem zagotovili njihovo viabilnost. Polielektrolitna obloga, izdelana s plastenjem, ne izboljša odpornosti *E. coli* na elektrostatsko sukanje; viabilnost po elektrostatskem sukanju se ne izboljša. Na podlagi teh sklepov potrdimo hipotezo št. 3, hipotezo št. 4 pa delno potrdimo.
- d) Oblika ter morfologija *E. coli* se med elektrostatskim sukanjem spremeni zaradi dehidracije celic, ki pa najverjetneje povzroči tudi celično smrt. Hipotezo št. 5 potrdimo.
- e) Tehnika plastenja se je izkazala za primeren način imobilizacije *E. coli* in *Bacillus* sp., medtem ko je elektrostatsko sukanje primerno za grampozitivne bakterijske celice (pokazano na bakterijah *Bacillus* sp.), ne pa za gramnegativno *E. coli*.

## 6 VIRI

1. Liu Y, Rafailovich MH, Malal R, Cohn D, Chidambaram D. Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 (34): 14201–6.
2. Salalha W, Kuhn J, Dror Y, Zussman E. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology* 2006; 17 (18): 4675–81.
3. Brooks G, Butel J, Ornston L. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: Cell structure. 20. izd. 1995. 7–32.
4. Chubukov V, Sauer U. Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80 (9): 2901–9.
5. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* [Internet]. 17. april 2014. [citirano 20. maj 2017.]. Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/>
6. Lederer FL, Günther TJ, Weinert U, Raff J, Pollmann K. Development of functionalised polyelectrolyte capsules using filamentous *Escherichia coli* cells. *Microb Cell Factories* 2012; 11: 163.
7. Brooks G, Butel J, Ornston L. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: Enteric Gram-negative rods (Enterobacteriaceae). 20. izd. 1995. 206–212.
8. Bidovec B. Fiziološki odziv bakterije *Escherichia coli* v različno viskoznih gojiščih. [Ljubljana]: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2014.
9. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13 (10): 620–30.
10. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12 (2): 195–201.
11. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo 2007.
12. *Bacillus* sp. strain 25.2.M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 15. november 2017. [citirano 10. marec 2018.]; Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG461560.1>
13. Novak N. Izolacija in karakterizacija bakterij z antimikrobnim učinkom proti bakteriji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. [Ljubljana]: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2017.
14. Sato K, Takahashi S, Anzai J. Layer-by-layer thin films and microcapsules for biosensors and controlled release. *Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem* 2012; 28 (10): 929–38.

15. Kong Y, Xu R, Darabi MA, Zhong W, Luo G, Xing MM, in sod. Fast and safe fabrication of a free-standing chitosan/alginate nanomembrane to promote stem cell delivery and wound healing. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 2543–55.
16. Silva JM, García JR, Reis RL, García AJ, Mano JF. Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate. *Acta Biomater* 2017; 51: 279–93.
17. Fakhrullin RF, Zamaleeva AI, Minullina RT, Konnova SA, Paunov VN. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2012; 41 (11): 4189–206.
18. Han U, Seo Y, Hong J. Effect of pH on the structure and drug release profiles of layer-by-layer assembled films containing polyelectrolyte, micelles, and graphene oxide. *Sci Rep* 2016; 6: 24158.
19. Hillberg AL, Tabrizian M. Biorecognition through layer-by-layer polyelectrolyte assembly: in-situ hybridization on living cells. *Biomacromolecules* 2006; 7 (10): 2742–50.
20. Mirtič J, Kogej K, Gašperlin M, Lapanje A, Kristl J. Polielektrolitni kompleksi kot osnova za razvoj novih nanodelcev in nanooblog. *Farm Vestn* 2016: (67): 310-316.
21. Sarioglu OF, Keskin NOS, Celebioglu A, Tekinay T, Uyar T. Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 152: 245–51.
22. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29 (13): 1989–2006.
23. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm* 2015; 484 (1–2): 57–74.
24. Chakraborty S, Liao I-C, Adler A, Leong KW. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61 (12): 1043–54.
25. Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2014; 185: 12–21.
26. Rošic R, Pelipenko J, Kocbek P, Baumgartner S, Bešter-Rogač M, Kristl J. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *Eur Polym J* 2012; 48 (8): 1374–84.
27. Pelipenko J, Kristl J, Janković B, Baumgartner S, Kocbek P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int J Pharm* 2013; 456 (1): 125-34.
28. Smallwood IM. *Handbook of organic solvent properties*. Elsevier 1996.

29. Measuring zeta potencial: a new technique [Internet]. [citirano 29. september 2017] Dostopno na: [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk)
30. Swapp S. Scanning electron microscopy (SEM) [Internet]. 2017 [citirano 30. oktober 2017.]. Dostopno na: [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html)
31. Welch K, Cai Y, Strømme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. *J Funct Biomater* 2012; 3(2): 418–31.
32. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2017; 1601: 1–17.
33. von Harpe A, Petersen H, Li Y, Kissel T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2000; 69 (2): 309–22.
34. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M. Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu: spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije [Internet]. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2015. Dostopno na: <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>
35. Chuang J-J, Huang Y-Y, Lo S-H, Hsu T-F, Huang W-Y, Huang S-L, in sod. Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior [Internet]. *International Journal of Polymer Science*. 2017 [citirano 12. marec 2018.]. Dostopno na: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/3902704/>
36. Sigma Aldrich [Internet]. [citirano 12. avgust 2017.]. Dostopno na: <http://www.sigmaaldrich.com>
37. Yucel Falco C, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated  $\beta$ -glucan. *J Colloid Interface Sci* 2017; 487: 97–106.
38. Carbopol® 941 polymer - Lubrizol [Internet]. [citirano 28. december 2017.]. Dostopno na: <https://www.lubrizol.com/personal-care/products/product-finder/products-data/97?productname=Carbopol%C2%AE%20941%20polymer>
39. Bühler V. Kollidon: Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry [Internet]. 9. izd. BASF; 2008. Dostopno na: <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Kollidon-90-F.html>
40. Bailey FE, Koleske JV. *Poly(Ethylene Oxide)*. New York: Academic Press 1976.
41. Franz B, Balkundi SS, Dahl C, Lvov YM, Prange A. Layer-by-layer nano-encapsulation of microbes: controlled cell surface modification and investigation of substrate uptake in bacteria. *Macromol Biosci* 2010; 10 (2): 164–72.
42. Bioinicia Electrospinning & Electrospaying Equipment [Internet]. Bioinicia. [citirano 13. maj 2018.]. Dostopno na: <http://bioinicia.com/electrospinning-electrospaying-lab-equipment/>

43. Quirós J, Borges JP, Boltes K, Rodea-Palomares I, Rosal R. Antimicrobial electrospun silver-, copper- and zinc-doped polyvinylpyrrolidone nanofibers. *J Hazard Mater* 2015; 299: 298–305.
44. Quan J, Yu Y, Branford-White C, Williams GR, Yu D-G, Nie W, in sod. Preparation of ultrafine fast-dissolving feruloyl-oleyl-glycerol-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats via electrospinning. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 88 (1): 304–9.
45. Hickey AJ, Ganderton D. *Pharmaceutical Process Engineering: Freeze-drying*. 2. izd. Marcel Dekker, Inc. 2001. 102–105.
46. Cerar T, Ružič-Sabljić E. *Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, univerzitetni program*. 2. izd. Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2010. 147 str.
47. Zupančič Š, Potrč T, Baumgartner S, Kocbek P, Kristl J. Formulation and evaluation of chitosan/polyethylene oxide nanofibers loaded with metronidazole for local infections. *Eur J Pharm Sci* 2016; 95: 152–60.
48. Brooks G, Butel J, Ornston L. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: The growth and survival and death of microorganisms*. 20. izd. 1995. 44–48.
49. Kopinc R, Lapanje A. Antibiotic susceptibility profile of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* is altered in low-iron conditions. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (12): 2903–7.
50. Zupančič Š. *Razvoj dvoslojnih nanovlaken za inovativno zdravljenje parodontalne bolezni = Development of core-shell nanofibers for innovative periodontal disease treatment: doktorska disertacija*. [Ljubljana]: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2017.
51. Brooks G, Butel J, Ornston L. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: Cultivation of microorganisms*. 20. izd. 1995. 53–57.
52. Lyngberg OK, Thiagarajan V, Stemke DJ, Schottel JL, Scriven LE, Flickinger MC. A patch coating method for preparing biocatalytic films of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62 (1): 44–55.
53. Liang X, Liao C, Thompson ML, Soupir ML, Jarboe LR, Dixon PM. *E. coli* Surface properties differ between stream water and sediment environments. *Front Microbiol* [Internet]. 2016. [citirano 22. september 2017.]. Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088573/>
54. *Measuring zeta potential of charged polymers (polyelectrolytes)* [Internet]. AZoM.com. 2012 [citirano 11. april 2018.]. Dostopno na: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=7015>
55. Junter G-A, Coquet L, Vilain S, Jouenne T. Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics. *Enzyme Microb Technol* 2002; 31 (3): 201–12.



56. Żur J, Wojcieszynska D, Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization. *Mol Basel Switz* 2016; 21 (7).
57. Beney L, Mille Y, Gervais P. Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65 (4): 457–64.
58. van Aalst JA, Reed CR, Han L, Andrady T, Hromadka M, Bernacki S, in sod. Cellular incorporation into electrospun nanofibers: retained viability, proliferation, and function in fibroblasts. *Ann Plast Surg* 2008; 60 (5): 577–83.
59. Valle A, Zanardini E, Abbruscato P, Argenzio P, Lustrato G, Ranalli G, in sod. Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures. *J Appl Microbiol* 2007; 103 (5): 1376–85.
60. Hülshager H, Potel J, Niemann EG. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat Environ Biophys* 1981; 20 (1): 53–65.
61. Davis CP, Weinberg S, Anderson MD, Rao GM, Warren MM. Effects of microamperage, medium, and bacterial concentration on iontophoretic killing of bacteria in fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (4): 442–7.
62. Yalcinkaya F. Effect of current on polymer jet in electrospinning process. *Tekstil ve Konfeksiyon* 2015. 25 (3): 201-206.
63. Yalcinkaya B, Yener F, Jirsak O, Cengiz-Callioglu F. On the nature of electric current in the electrospinning process [Internet]. *Journal of Nanomaterials*. 2013 [citirano 10. september 2017.]. Dostopno na: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2013/538179/cta/>
64. One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [citirano 3. januar 2018.]. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>
65. Huang KC, Mukhopadhyay R, Wen B, Gitai Z, Wingreen NS. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (49): 19282–7.