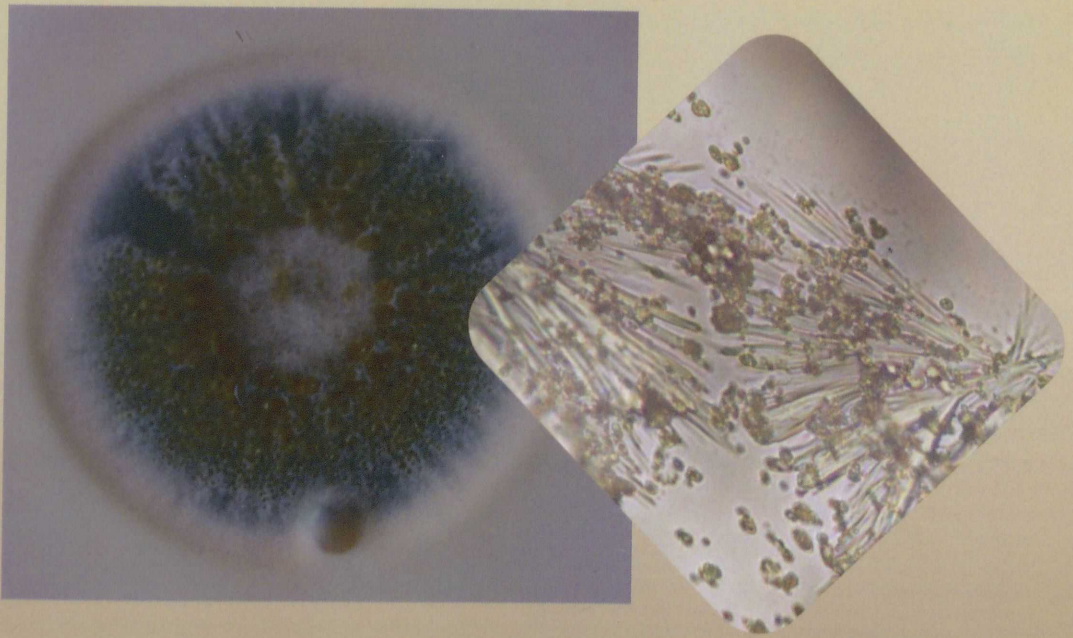


AGATA MARKOWSKA-SZCZUPAK

**WPŁYW AKTYWNOŚCI WODY I DITLENKU TYTANU
AKTYWOWANEGO ŚWIATŁEM NA WZROST, PRODUKCJĘ
BIOMASY I AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNĄ GRZYBÓW
*PENICILLIUM CHRYSOGENUM***



SZCZECIN 2013

Recenzenci
KATARZYNA CHOJNACKA
WOJCIECH WĄSOWICZ



Zdjęcie na okładce
AGATA MARKOWSKA-SZCZUPAK

12. 56535

Opracowanie redakcyjne
KATARZYNA MITAN

WYDANO ZA ZGODĄ
REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIwersYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr NN209 106439

ISBN 978-83-7663-167-7

WYDAWNICTWO UCZELNIANE ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIwersYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE
70-311 Szczecin, al. Piastów 48, tel. 91 449 47 60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl
Druk: PPH „Zapoli” Dmochowski, Sobczyk, Sp.j. 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel.: 91 434 10 21
e-mail: zarzad@zapol.com.pl

12/2014

Spis treści

Wykaz ważniejszych symboli i akronimów	5
Wstęp	7
CZĘŚĆ LITERATUROWA	
1. Grzyby w środowisku człowieka	9
1.1. Pozycja systematyczna grzybów	9
1.2. Grzyby izolowane z pomieszczeń zamkniętych	9
1.3. Czynniki wpływające na aktywność życiową grzybów pleśniowych	10
1.3.1. Skład podłoża	10
1.3.2. Dostępność wody	11
1.3.3. Wpływ temperatury, pH, ciśnienia i światła	13
1.4. Zagrożenia powodowane przez grzyby pleśniowe	14
1.5. Charakterystyka gatunku <i>Penicillium chrysogenum</i>	15
2. Metale i związki metali o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych	19
2.1. Historia zastosowań metali i ich związków w medycynie i życiu codziennym	19
2.2. Utleniające właściwości tlenków metali	22
2.2.1. Podstawy teoretyczne koncepcji zastosowania tlenków metali w procesach utleniania ...	22
2.3. Charakterystyka tlenku tytanu(IV)	23
2.3.1. Wiadomości ogólne	23
2.3.2. Mechanizm reakcji fotokatalitycznych zachodzących na cząsteczce tlenku tytanu(IV)	23
2.4. Wpływ ditlenku tytanu aktywowanego światłem na organizmy żywe	25
2.4.1. Bakterie	25
2.4.2. Wirusy i priony	27
2.4.3. Komórki eukariotyczne	27
3. Uzasadnienie i cel pracy	31
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	
4. Materiał i metody badań	33
4.1. Izolacja i identyfikacja grzybów	33
4.2. Charakterystyka parametrów fizykochemicznych ditlenków tytanu wykorzystywanych w badaniach	37
4.3. Sposoby przygotowania podłoży	40
4.4. Techniki wykonania posiewów	45
4.5. Charakterystyka światła wykorzystywanego do aktywacji tlenku tytanu(IV)	45
4.6. Sposoby wykonywania pomiarów	47
4.6.1. Pomiar średnicy kolonii	47
4.6.2. Pomiar biomasy grzybni	48
4.7. Określenie aktywności enzymatycznej	48
4.7.1. Określenie aktywności esteraz	48
4.7.2. Określenie aktywności katalazy	49
4.7.3. Określenie aktywności hydrolaz	49
4.8. Statystyczne opracowanie wyników	50
4.9. Schemat przeprowadzonych doświadczeń	50
WYNIKI BADAŃ I DYKUSJA	
5. Wpływ rodzaju podłoża i światła na wzrost grzybów <i>Penicillium chrysogenum</i>	51
6. Wpływ rodzaju podłoża i stężenia ditlenku tytanu P-25 na wzrost grzybów <i>Penicillium chrysogenum</i> ..	55

7. Wpływ rodzaju ditlenku tytanu na wzrost grzybów <i>Penicillium chrysogenum</i>	59
8. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UVA na wzrost grzybów <i>Penicillium chrysogenum</i>	63
9. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS i UVA na aktywność enzymatyczną grzybów <i>Penicillium chrysogenum</i>	67
10. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS i aktywności wody na wzrost, tworzoną biomasę i aktywność hydrolaz <i>Penicillium chrysogenum</i>	75
11. Podsumowanie i proponowany model oddziaływania ditlenku tytanu na grzyby	87
12. Wnioski	93
Literatura	95
Wykaz ważniejszych publikacji własnych związanych tematycznie z pracą	109
Summary	111
Zusammenfassung	113

Wykaz ważniejszych symboli i akronimów

Symbole

a_w	– aktywność wody
e	– ładunek elementarny
E_g	– przerwa energetyczna (ang. <i>Energy Band Gap</i>), eV
eV	– elektronowolt, J
h	– stała Plancka, J · s
m.m.	– mokra biomasa, g
n	– liczba moli
N_s	– liczba moli substancji
N_w	– liczba moli wody
p	– ciśnienie, Pa; poziom istotności
R	– uniwersalna stała gazowa, J · kmol ⁻¹ · K ⁻¹
s.m.	– sucha masa, g
V	– objętość, dm ³
V_m	– objętość molowa wody, m ³ · mol ⁻¹

Litery greckie

Θ	– kąt Bragga, rad
λ	– długość fali, nm
π	– ciśnienie osmotyczne, osmol

Akronimy

AFM	– mikroskop sił atomowych (ang. <i>atomic force microscope</i>)
AMS1	– szczep <i>Penicillium chrysogenum</i> wyizolowany z powietrza piwnicy budynku mieszkalnego
AOP	– zaawansowane procesy utleniania (ang. <i>advanced oxidation processes</i>)
AOTs	– zaawansowane technologie utleniania (ang. <i>advanced oxidation technologies</i>)
API ZYM	– test do określania aktywności hydrolaz firmy BIOMÈRIEUX (Francja)
BET	– metoda Brunauera, Emmetta i Tellera pozwalająca na określanie powierzchni właściwej ciał stałych za pomocą analizy izoterm adsorpcji
BSL	– stopnie biobezpieczeństwa (ang. <i>biosafety levels</i>)
BTL	– Zakład Enzymów i Peptonów Sp. z o.o.
CFU	– jednostki tworzące kolonię, JKT (ang. <i>colony forming units</i>)
CoA	– koenzym A
CREA	– agar keratynowo-sacharozowy (ang. <i>creatine sucrose agar</i>)
CYA	– agar Czapka wzbogacony ekstraktem drożdżowym (ang. <i>Czapek yeast agar</i>)
DDT	– dichlorodifenylotrichloroetan, znany pod nazwami handlowymi: Azotox, Ditox, Tritox
DMSO	– dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EC	– katalog enzymów (ang. <i>enzyme catalogue</i>)
EDX	– spektroskopia dyspersyj energii promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EPA	– Organizacja Ochrony Środowiska (Environmental Protection Agency)
FDA	– octan fluoresceiny (ang. <i>fluorescein diacetate</i>)
HeLa	– linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy

IEA	– Międzynarodowe Stowarzyszenie Epidemiologów (International Epidemiological Association)
IL13 αR2R	– linia komórkowa ludzkiego nowotworu mózgu
IUPAC	– Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry)
JCPDS	– Wspólny Komitet ds. Standardów Dyfrakcji (Joint Committee on Powder Diffraction Standards)
JTK	– jednostki tworzące kolonie
LoVo, Ls-174-t	– linie komórkowe ludzkiego nowotworu jelita grubego
MCF-7 i MDA-MB-468	– linia komórkowa nowotworu piersi
MEA	– agar z ekstraktem maltozy (ang. <i>malt extract agar</i>)
MIC	– minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MRSA	– gronkowiec złocisty odporny na metycylinę (ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
N/TiO ₂	– ditlenek tytanu domieszkowany azotem i kalcynowany w temperaturze 100°C (produkowany w Instytucie Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie)
P-25	– ditlenek tytanu produkowany przez niemiecką firmę Evonik
PC-3M	– linia komórkowa nowotworu prostaty
PCR	– reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	– agar ziemniaczany (ang. <i>Patato Dextrose Agar</i>)
POCH	– Polskie Odczynniki Chemiczne
PrPsc	– białko prionowe chorobotwórcze (ang. <i>pathological prion protein</i>)
RNA	– kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
SEM	– elektronowy mikroskop skaningowy (ang. <i>scanning electron microscope</i>)
SERS	– powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska (ang. <i>surface enhanced raman spectroscopy</i>)
SGA	– agar Sabourauda (ang. <i>Sabouraud agar</i>)
SODIS	– procesy solarnej dezynfekcji wody (ang. <i>solar water disinfection process</i>)
SP	– stopień polimeryzacji
TEM	– elektronowy mikroskop transmisyjny (ang. <i>transmission electron microscope</i>)
TiO ₂	– tlenek tytanu(IV), ditlenek tytanu
UV	– promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>ultrafiolet</i>)
UVA	– promieniowanie o długość fali 315–400 nm
VIS	– promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widzialnym (ang. <i>visible light</i>)
VRSA	– gronkowiec złocisty odporny na wankomycynę (ang. <i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WWP	– wilgotność względna powietrza
XRD	– dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>X-ray diffraction</i>)
ZCh	– ditlenek tytanu produkowany przez Grupę Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A.
ZUT11	– szczep <i>Penicillium chrysogenum</i> wyizolowany z powietrza fitness klubu
ZUT24a	– szczep <i>Penicillium chrysogenum</i> wyizolowany z powietrza fitness klubu

Wstęp

Mikroklimat pomieszczeń zamkniętych, takich jak: biura, przedszkola, szkoły i mieszkania prywatne, jest ważnym czynnikiem dobrego samopoczucia, zdrowia i produktywności użytkowników [1]. W zależności od aktywności życiowej i rodzaju wykonywanej pracy w pomieszczeniach tych spędzamy przynajmniej 18 godzin dziennie. Postęp cywilizacyjny i związane z tym przemiany kulturowe, prowadzące m.in. do wcześniejszego rozpoczynania edukacji przez dzieci oraz większego zaangażowania ludzi w pracę zawodową, sprawiają, że średni czas przebywania w pomieszczeniach zamkniętych z roku na rok ulega wydłużeniu [2].

Zagadnienia dotyczące właściwej jakości powietrza wewnętrznego (ang. *indoor environment*) w wielu krajach znajdują coraz większe zrozumienie i stanowią przedmiot wielokierunkowych działań takich organizacji, jak: WHO, EPA czy IEA, zarówno w aspekcie ochrony zdrowia, jak i poprawy warunków pracy [3–5]. Ponieważ odczucie komfortu ma charakter subiektywny i zależy od kilkudziesięciu różnych czynników środowiskowych (często nieuchwytnych dla urządzeń pomiarowych), polepszenie jakości pracy i życia wewnątrz pomieszczeń jest zadaniem bardzo trudnym.

Zapewnienie ludziom właściwej jakości powietrza w miejscach ich pracy i odpoczynku jest jednym z największych wyzwań, stojących przed technologami chemikami, odpowiedzialnymi m.in. za przygotowanie nowych receptur materiałów budowlanych, oraz specjalistami do spraw wentylacji i klimatyzacji. Opracowanie nowych technologii i zaprojektowanie bezpiecznych dla człowieka produktów jest niemożliwe bez badań podstawowych, obejmujących również sposoby testowania skuteczności wprowadzanych rozwiązań. Z przeglądu prac opublikowanych w ostatniej dekadzie wiadomo, że cząstki niektórych metali lub ich tlenków, o rozmiarach rzędu nanometrów (10^{-9}), mają silne właściwości biobójcze, dlatego mogą być stosowane jako dodatki do różnego rodzaju materiałów (np. budowlanych, kosmetycznych, plastikowych itp.) oraz jako element filtrów biologicznych używanych do oczyszczania powietrza lub wody [6–10]. Większość prezentowanych rozwiązań wykazuje możliwości aplikacyjne, ale nie przedstawiono danych niezbędnych do zrozumienia sposobu ich biologicznego działania. Szczególnie dotkliwy jest brak informacji na temat antygrzybowych właściwości tych materiałów. Grzyby mikroskopowe rosnące na powierzchni różnych materiałów technicznych i produktów żywnościowych oraz ich zarodniki obecne w bioaerozolu stanowią główny czynnik (70% ogólnej liczby mikroorganizmów) wpływający na jakość powietrza w budynkach użyteczności publicznej [11–13]. Grzyby pleśniowe mogą być przyczyną wielu groźnych chorób, np. dermatoz skórnych i głębokich, schorzeń układu oddechowego (np. astmy), mikotoksykoz i alergii [4, 14]. Innymi przejawami negatywnego wpływu grzybów jest pleśnienie żywności lub utrata właściwości mechanicznych, fizycznych i chemicznych materiałów, określane mianem biokorozji lub biodeterioracji. Korozji spowodowanej przez grzyby ulegają takie materiały, jak: drewno, wyroby papierowe, tworzywa sztuczne, materiały nieorganiczne (np. cegły, zaprawa, kamień, szkło), farby i lakiery [2, 13].

Niniejsza praca prezentuje wyniki badań nad antygrzybowymi właściwościami ditlenku, stosowanego m.in. jako dodatek pigmentowy do materiałów budowlanych. W pierwszych rozdziałach monografii dokonano przeglądu obecnego stanu wiedzy na temat grzybów występujących w środowisku człowieka oraz zastosowań ditlenku tytanu jako czynnika antymikrobiologicznego. Druga część pracy

przedstawia wyniki przeprowadzonych badań. Część tych wyników została również opublikowana we wcześniejszych pracach zespołowych, których pełen spis zawiera rozdział pt.: *Wykaz ważniejszych publikacji własnych związanych tematycznie z pracą*.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Grzyby w środowisku człowieka

1.1. Pozycja systematyczna grzybów

Wśród mikroorganizmów zajmujących to samo siedlisko co człowiek wyróżnia się kilka kategorii organizmów, odmiennych pod względem morfologicznym i fizjologicznym. Zaliczamy do nich bakterie właściwe (domena *Procaryota*); sinice, czyli *Cyanobacteria* (domena *Procaryota*); archeony, czyli *Archaea* (domena *Procaryota*); grzyby z wyjątkiem kapeluszowych (domena *Eucaryota*); glony (jednokomórkowe lub kolonijne z wyłączeniem glonów plechowych), czyli *Algae* (domena *Eucaryota*) oraz pierwotniaki (domena *Eucaryota*) i wirusy [15]. Spośród wymienionych kategorii organizmów najliczniejszą skatologowaną grupę stanowią grzyby. Według najnowszego, dziesiątego wydania *Dictionary of the Fungi* [16] liczba opisanych gatunków grzybów wynosi 97 330. Liczba ta szybko się zmienia, gdyż co roku charakteryzuje się średnio 1700 nowych form grzybów. Na podstawie danych uzyskanych z obszarów, na których rozpoznano większość organizmów żywych, można przypuszczać, że liczba gatunków grzybów wynosi około 1,5 mln. Jest ich 5 razy więcej niż roślin nasiennych i aż 17 razy więcej niż ssaków [17]. Grzyby stanowią ponad 25% biomasy [18]. Dla mikrobiologii pomieszczeń zamkniętych ważne są grzyby z gromad: workowce (*Ascomycota*), sprzężniaki (*Zygomycota*) oraz grzyby anamorficzne, rozmnażające się bezpłciowo, u których dotąd nie stwierdzono rozmnażania płciowego (*Fungi imperfecta*, *Deuteromycotina*, *Deuteromycetes*). Przedstawiciele wymienionych grup zwykle określa się mianem pleśni lub grzybów pleśniowych (ang. *mold* lub *mould fungi*). Nazwa ta pochodzi od zaobserwowanego zjawiska pleśnienia, czyli rozwoju puszystego nalotu na powierzchniach zaatakowanych przez grzyby [16]. Ze względu na rozmiary zarodników, rzędu mikrometrów, są one nazywane grzybami mikroskopowymi, a ze względu na wygląd grzybni przybierającej postać luźnych strzępek – grzybami strzępkowymi (ang. *filamentous fungi*) [19].

1.2. Grzyby izolowane z pomieszczeń zamkniętych

Wiedza na temat ilościowej i jakościowej charakterystyki mikroflory grzybowej występującej w budynkach użyteczności publicznej i w mieszkaniach jest wciąż niekompletna [18, 20]. Głównym powodem takiego stanu rzeczy jest brak uniwersalnych metod oceny zarówno unoszących się w powietrzu zarodników i strzępek, jak i komórek zdolnych do wytworzenia kolonii na powierzchni materiałów technicznych [21, 22].

W celu określenia składu bioaerozolu grzybowego stosuje się metody, które można podzielić na dwa typy: hodowlane i niehodowlane [23]. W metodach pierwszego typu używa się podłoży (pożywek) mikrobiologicznych przeznaczonych do hodowli grzybów (np. metoda sedymentacyjna Kocha, metoda pobornika Andersona, metoda „wymazowa”), w metodach niehodowlanych dokonuje się pomiarów metodą objętościową. Oba typy metod charakteryzują się wybiórczością (nie wszystkie grzyby mogą zostać zidentyfikowane) i są obciążone dużymi błędami pomiarowymi. Poziom wzrostu pleśni w powietrzu określa się najczęściej przez podanie wartości tzw. jednostek tworzących kolonie (JTK lub CFU) w m³ powietrza lub na 100 cm² materiału. Grzyby pleśniowe mogą stanowić 5–20% bioaerozolu występującego

go w pomieszczeniach mieszkalnych i biurowych [24, 25]. W licznych doniesieniach literaturowych udokumentowano, że powietrze budynków bywa często skażone zarodnikami grzybów w stężeniu przekraczającym $1000 \text{ JTK} \cdot \text{m}^{-3}$ [12, 20, 23, 26–28].

Skład gatunkowy grzybów występujących w budynkach i w bioaerozolu zewnętrznym jest podobny [12, 23]. Dzieje się tak dlatego, że zarodniki grzybów rozwijających się w środowisku zewnętrznym dostają się do pomieszczeń wraz z przemieszczającym się powietrzem lub są przenoszone przez ludzi i zwierzęta. Największym zewnętrznym siedliskiem grzybów jest gleba, w której saprofityują na resztkach roślinnych i zwierzęcych [26]. W okresie zimy, gdy ziemia pokryta jest śniegiem, z powietrza wewnątrz budynków izoluje się gatunki grzybów rdzenie „wewnątrzdomowe”. Obecność w domach roślin doniczkowych, klatek z ptakami, terrariów oraz rozbudowanych systemów klimatyzacyjnych znacznie zwiększa liczbę opisywanych gatunków grzybów mikroskopowych [18, 27].

Zmiany klimatyczne na różnych szerokościach geograficznych powodują, że poziom zarodników grzybowych w powietrzu wewnątrz i na zewnątrz budynków zmienia się. Z badań Miklaszewskiej i Grajewskiego [23] wynika, że w strefie klimatu umiarkowanego są dwa szczyty występowania grzybów w powietrzu: pierwszy wiosną (maj), a drugi jesienią (październik). W powietrzu budynków mieszkalnych na różnych szerokościach geograficznych spotka się grzyby należące do kilku taksonów. Dominują gatunki: *Aspergillus glaucus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. nidulans*, *Penicillium aurantio-griseum*, *P. chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Ulocladium* sp. Rzadziej spotyka się grzyby z rodzajów: *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. i *Memnoniella* sp. oraz gatunki z rodzaju *Penicillium*: *P. sublateritium*, *P. arenicola*, *P. verrucosum*, *P. citrinum*, *P. bilaiae*, *P. cyaneum*, *P. granulatum* oraz *Cladosporium sphaerospermum* i *C. herbariorum*. Niektóre gatunki grzybów występują w określonych porach roku (np. *Penicillia* – jesienią), inne (np. *Cladosporia*) są obecne w powietrzu przez cały rok [20, 27].

1.3. Czynniki wpływające na aktywność życiową grzybów pleśniowych

1.3.1. Skład podłoża

Grzyby pleśniowe nie zawierają chlorofilu, dlatego odżywiają się całkowicie heterotroficznie. Rosną wszędzie tam, gdzie w podłożu znajdują dostateczną ilość substancji odżywczych i odpowiednią wilgotność [19]. Duża różnorodność fizjologiczna (w tym bogaty aparat enzymatyczny) oraz znaczna plastyczność genetyczna tej grupy powodują jej dobre przystosowanie do rozwoju w różnych siedliskach w obrębie domów i budynków użyteczności publicznej [18]. Intensywny rozwój pleśni jest obserwowany na materiałach budowlanych [13]. Według Andersen i in. [12] kolonizację wspomnianych materiałów przez grzyby ułatwiają ich dobre wartości odżywcze i wysoka nasiąkliwość. W szczególności dotyczy to drewna, tapet i gipsu.

Stwierdzono, że grzyby zasiedlające powierzchnię materiałów o większej koncentracji związków organicznych charakteryzują się większą bioróżnorodnością [29]. Natomiast na materiałach o przewadze substancji nieorganicznych, takich jak: ceramiki, farby i kleje, stwierdza się istotnie mniejszą różnorodność grzybów pleśniowych [30]. Wyniki prezentowane w pracy Żukiewicz-Sobczak i in. [31] wskazują, że rozwój pleśni może nastąpić nawet na powierzchni czystego szkła, na której pozostawiono odciski palca. W większości przypadków rozwój grzybów prowadzi do niszczenia materiałów i biodeterioracji [13].

1.3.2. Dostępność wody

Decydujące znaczenie dla rozwoju grzybów pleśniowych ma względna wilgotność powietrza (WWP). Optymalne WWP w pomieszczeniach mieszkalnych powinno wynosić 50–60 ±5%. Z kolei optymalne warunki do wzrostu grzybów występują w pomieszczeniach o względnej wilgotności powietrza większej niż 76% [26]. Badania środowiska domowego przeprowadzone w Ameryce Północnej i Europie wskazują, że zauważalne uszkodzenia spowodowane przez pleśń i wodę występują w 23–98% wszystkich domów [13]. Bardzo często grzyby zasiedlają budynki i pomieszczenia zawilgocone na skutek np. powodzi, nieszczelności przewodów kanalizacyjnych, przeciekania pokryw dachowych, braku lub złej izolacji poziomej fundamentów (wilgoć podsiąkająca od gruntu), złego zabezpieczenia pomieszczeń o większym nagromadzeniu pary wodnej, jak kuchnie, pralnie czy łazienki [22, 27]. Przyczyną nadmiernego gromadzenia się wilgoci w pomieszczeniach zamkniętych są również plastikowe, szczelne okna z szybą zespoloną, które utrudniają przepływ świeżego powietrza [4, 18].

Do czynników stymulujących rozwój grzybów należy również wilgotność materiałów [12, 23]. Wilgotnością materiału określa się względną zawartość wody w materiale. Może ona być wynikiem stanu naturalnego lub też oddziaływania czynników zewnętrznych [32]. Woda występuje w materiałach budowlanych w kilku postaciach, jako: woda związana chemicznie (hydratacyjna), fizykochemicznie (woda sorpcyjna), swobodna para wodna i tzw. woda wolna [33]. Z całej wody zawartej w środowisku tylko woda wolna jest dostępna biologicznie dla grzybów pleśniowych. Badania zawartości wody w materiałach budowlanych wykonuje się metodami pośrednimi (np. metoda karbidowa) lub bezpośrednimi (np. laboratoryjna metoda wagowo-suszarkowa), z użyciem specjalistycznych urządzeń pomiarowych, takich jak wilgotnościomierze, higrometry itp. [32]. Materiały budowlane, w zależności od struktury wewnętrznej, różnią się wilgotnością oraz nasiąkliwością, czyli zdolnością wchłaniania i oddawania wody. Średnia wilgotność muru wynosi 16%, a maksymalna wilgotność, osiągana np. w czasie powodzi, aż 25% [33]. Zawilgocenie materiałów budowlanych jest cechą niekorzystną, ponieważ pogarsza ich właściwości fizyczne i mechaniczne oraz jak już wcześniej wspomniano, powoduje rozwój drobnoustrojów.

Dobrym wskaźnikiem określającym dostępność wody dla grzybów jest aktywność wody (a_w). Stan wody w materiale po raz pierwszy został wyrażony liczbowo w 1953 roku przez Scotta, który wprowadził pojęcie aktywności wody (a_w). Zdefiniował ją jako termodynamiczną miarę potencjału chemicznego wody w materiale, co umożliwiło powiązanie stanu wody z właściwościami chemicznymi, fizycznymi, biochemicznymi, mechanicznymi oraz sensorycznymi żywności. Znając wartość a_w , w łatwy sposób można wyznaczyć trwałość przechowalniczą produktu, a także określać przebieg reakcji biochemicznych i rozwój drobnoustrojów. Aktywność wody jest definiowana jako stosunek ciśnienia pary wodnej nad roztworem (p) do ciśnienia pary wodnej nad czystą wodą (p_0) w tej samej temperaturze lub jako stosunek liczby moli wody (N_w) do liczby moli roztworu ($N_w + N_s$). Zależność tę wyraża wzór (1):

$$a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{N_w}{N_w + N_s} \quad (1)$$

Czysta chemicznie woda ma aktywność wody równą 1,0. Ze wzrostem stężenia związków rozpuszczonych aktywność wody spada poniżej tej wartości [34].

Równanie (2) przedstawia zależność ciśnienia osmotycznego (π) od aktywności wody (a_w) [35]:

$$\pi = \frac{-R \cdot T \cdot \ln(a_w)}{V_w} \quad (2)$$

Zgodnie z równaniem (2) woda chemicznie czysta, o $a_w = 1,0$, ma ciśnienie osmotyczne π równe zeru. Dodanie substancji rozpuszczonej obniża aktywność wody, gdyż udział cząsteczek wody obniża się wraz ze wzrostem ilości substancji rozpuszczanej. W praktyce wzór ten pokazuje, jaka różnica ciśnień występuje pomiędzy środowiskiem i cytoplazmą komórki grzybów [35].

Stwierdzono, że chociaż względna wilgotność powietrza (WWP) pozostaje w równowadze z aktywnością wody (a_w) materiałów, w obrębie pomieszczenia powstają miejsca o specyficznym mikroklimacie. Oznacza to, że w pomieszczeniu o małej wartości WWP mogą się znaleźć miejsca charakteryzujące się wysokim a_w . Na przykład w pokoju o temperaturze powietrza wynoszącej 22°C i wilgotności względnej powietrza WWP równej 50% można znaleźć ścianę o temperaturze 15°C i wilgotności względnej 80% [36].

Grzyby wykorzystują wodę jako rozpuszczalnik ułatwiający transport substratu do enzymu (reakcje enzymatyczne) lub jako substrat (reakcje hydrolizy) [37]. Wpływ aktywności wody na przebieg reakcji chemicznych zależy od tego, czy reagenty mają charakter hydrofobowy czy hydrofilowy. W przypadku substancji hydrofilowych szybkość reakcji jest tym większa, im wyższa jest aktywność wody. Również reakcje hydrolizy przebiegają znacznie wolniej, gdy aktywność wody maleje [38–39]. Minimalna aktywność wody (tzw. krytyczna) określa wartość, przy której następuje zahamowanie wzrostu mikroorganizmów, a maksymalna aktywność wody to wartość odpowiadająca największemu ich wzrostowi. Według Lewickiego [40] większość pleśni nie rośnie przy $a_w \leq 0,7$, a drożdży przy $a_w \leq 0,8$. Grzyby rosnące w środowisku pomieszczeń zamkniętych można podzielić na trzy grupy, różniące się wymaganiami w stosunku do aktywności wody w środowisku [41]. W pierwszej grupie (tzw. kolonizatorów pierwotnych) znajdują się pleśnie, tolerujące wartości $a_w \leq 0,8$. Należą do nich gatunki: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. ustus*, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. palitans*, *Paecilomyces variotii* i *Wallemia sebi*. W drugiej grupie znajdują się grzyby pleśniowe tolerujące wartości a_w z przedziału 0,8–0,9. Należą do nich gatunki z rodzajów: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* i *Ulocladium*. Do ostatniej grupy zaliczono pleśnie o dużych wymaganiach względem aktywności wody ($a_w \geq 0,9$). Grzyby takie jak: *Chaetomium globulosum*, *Memmoniella echinata*, *Stachybotrys chartarum* oraz wiele gatunków z rodzaju *Trichoderma* znajdowane są w budynkach zniszczonych przez wodę.

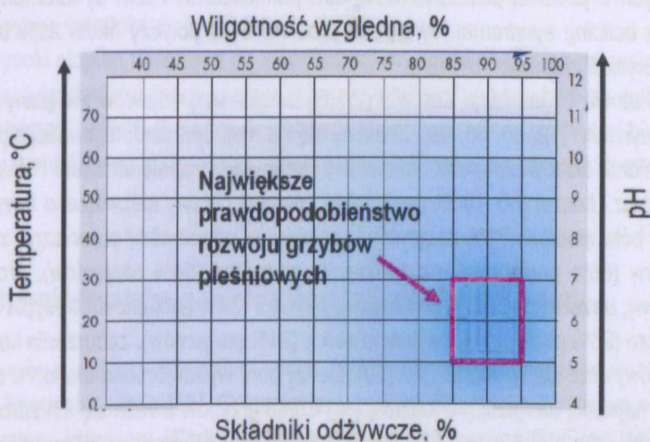
Nawet znaczne zmniejszenie aktywności wody nie musi oznaczać śmierci komórek, ponieważ niektóre grzyby, a zwłaszcza ich formy przetrwalnikowe mogą pozostawać w takich warunkach w stanie anabiozy nawet kilka lat [19]. Dostępność wody wpływa jednak na uwalnianie i kiełkowanie przetrwalników [35, 42]. Z badań Sorensona [28] wynika, że do uwalniania zarodników grzybów pleśniowych z powierzchni materiałów przyczynia się niska aktywność wody (im bardziej suchy materiał, tym szybciej uwalniane są zarodniki). Według Elberta i in. [42] zarodniki grzybów pleśniowych można podzielić na suche (ang. *dry spores*) oraz wilgotne (ang. *wet spores*). Uwalnianie do atmosfery zarodników wilgotnych ściśle zależy od obecności wody, dlatego ich stężenie w powietrzu zewnętrznym zwiększa się w czasie opadów deszczu, a w pomieszczeniach wewnętrznych — w okresach zwiększonej wilgotności (np. w nocy). Zarodniki suche są uwalniane do atmosfery pod wpływem podmuchu wiatru lub działania klimatyzacji. Ich stężenie w powietrzu wzrasta wraz ze zwiększonym ruchem powietrza i zmniejszoną

wilgotnością. W konsekwencji gatunki grzybów wytwarzające zarodniki suche reprezentowane są w powietrzu najobficiej w ciągu dnia, a więc w okresach dużego nasłonecznienia [42, 43].

1.3.3. Wpływ temperatury, pH, ciśnienia i światła

Zakres temperatur, w których możliwy jest wzrost grzybów pleśniowych, jest szeroki. Optymalne warunki wzrostowe to temperatury z przedziału 18–25°C, ale grzyby spotykane są również w temperaturach poniżej 0°C i powyżej 50°C [26]. Wpływ temperatury na wzrost grzybów jest funkcją wilgotności względnej. Wzajemną zależność obu parametrów można przedstawić za pomocą izoplei. Badania tego typu prowadzili Hofbauer i in. [44]. Autorzy stwierdzili, że dla większości grzybów pleśniowych wartościami krytycznymi, limitującymi ich wzrost, są temperatura 10°C i wilgotność względna powietrza 75%.

Optymalne dla rozwoju grzybów pleśniowych pH mieści się w zakresie 3,0–7,0 [26]. Niższe wartości (pH = 3,0) są preferowane przez grzyby rozkładające drewno [13]. Z badań Gutarowskiej [45] wynika, że rozwój grzybów na powierzchni materiałów budowlanych przyczynia się do obniżenia pH. Grzyby wytwarzają dużą ilość kwasów (np. kwasy: bursztynowy, jabłkowy, szczawiowy i fumarowy), łatwo dyfundujących do podłoża i zmieniających jego pH w szerokim zakresie [45]. Na rysunku 1 schematycznie przedstawiono warunki optymalne do wzrostu grzybów pleśniowych obecnych w środowisku człowieka.



Rys. 1. Ryzyko wystąpienia grzybów pleśniowych jako funkcja zawartości składników odżywczych, temperatury, pH i względnej wilgotności (%); na podstawie [46]

Zdania na temat wpływu światła na grzyby są podzielone. Światło może wpływać stymulująco, hamująco lub być bez znaczenia dla rozwoju grzybów [47]. Większość gatunków grzybów strzępkowych jest cieniolubna [41]. Światło ogranicza lub całkowicie hamuje germinację, czyli kiełkowanie zarodników. Według Willocquet i in. [48] jest to spowodowane wzrostem temperatury w czasie naświetlania. Efekt inhibicji jest tym silniejszy, im większa jest energia fali świetlnej użytej do irradacji. Najbardziej szkodliwe jest dla grzybów promieniowanie UVB (280–320 nm) i UVA (320–400 nm). Obecne w świetle widzialnym promieniowanie UV może odpowiadać za inhibicję produkcji niebezpiecznych mikotoksyn grzybów toksynotwórczych [49].

Ciśnienie to jeden z najmniej zbadanych parametrów środowiskowych mogących wpływać na wzrost grzybów pleśniowych [41].

1.4. Zagrożenia powodowane przez grzyby pleśniowe

Pośród poznanych gatunków grzybów mikroskopowych występujących w otoczeniu człowieka ponad 200 jest uznawanych za chorobotwórcze dla ludzi, zwierząt domowych oraz roślin [23, 26, 31, 50–56]. Zgodnie z przyjętą klasyfikacją większość gatunków grzybów spotykanych w pomieszczeniach zamkniętych należy do klasy BSL-1. Oznacza to, że są saprotrofami lub patogenami roślin albo grzybami utylizującymi produkty rozkładu nieżywych zwierząt. Grzyby z tej grupy wywołują nieinwazyjne lub łagodne zakażenia powierzchowne [56]. Nie określono, jakie stężenie zarodników grzybów pleśniowych powoduje ujemne skutki zdrowotne. Polskie, europejskie i światowe normy lub rozporządzenia podają jedynie zakresy wartości, jakie mają wpływ na zdrowie człowieka. Polska Norma [57] określa, że stężenie pleśni w przedziale $5 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^4$ JTK $\cdot$ m⁻³ może negatywnie oddziaływać na zdrowie człowieka. Stężenie powyżej 10^4 JTK $\cdot$ m⁻³ jest uważane za niebezpieczne [23, 56].

Grzyby pleśniowe mogą wywoływać infekcje, uczulenia (alergie), a nawet przyczyniać się do zwiększenia częstości występowania nowotworów [31, 58]. Z tego powodu uważa się je za główne źródło problemów związanych z jakością powietrza wewnątrz pomieszczeń i tzw. syndromem chorego budynku SBS (ang. *sick building syndrome*). W Polsce problem SCB dotyczy około 25% budynków, podczas gdy w Wielkiej Brytanii zaledwie 10% [31].

W 1987 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) ustaliła listę objawów związanych z przebywaniem w chorych budynkach [12, 26, 53, 59]. Znalazły się na niej, oprócz dolegliwości typowo alergicznych, takich jak zapalenie śluzówek, astma oskrzelowa, przewlekłe zapalenia krtani i oskrzeli (35% pacjentów), przewlekły katar i kaszel (80–100% pacjentów), również objawy niezwiązane z występowaniem uczuleń, takie jak: bóle stawów (71% pacjentów), osłabienie odporności, chroniczne zmęczenie (70% pacjentów), migreny (65% pacjentów), rozdrażnienie, zadyszka (54% pacjentów), problemy ze wzrokiem (42% pacjentów), bezsenność (40% pacjentów), mdłości (33% pacjentów), wysypki na skórze (27% pacjentów), dreszcze (25% pacjentów), palpacje serca (21% pacjentów), zaburzenia koncentracji i percepcji (54% pacjentów) oraz stany depresyjne [60]. Do tej pory wyodrębniono około 70 alergenów grzybowych [12, 52]. Za najsilniej alergizującą (uczulającą) część grzybów uważa się ich zarodniki oraz fragmenty grzybni o rozmiarach 1,6–5,0 μ m [28, 53, 61]. Najwięcej wiadomo o alergenach grzybów *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* i *Aspergillus fumigatus* [54, 60, 62, 63]. Większość uczulonych pacjentów wykazuje nadwrażliwość na różne alergeny, wytwarzane przez kilka gatunków grzybów pleśniowych. Osobami szczególnie narażonymi na alergię grzybową są niemowlęta i małe dzieci [52]. Ponieważ podstawowa diagnostyka chorób alergicznych uwzględnia tylko kilka najczęstszych alergenów, postuluje się wprowadzenie do zestawów testów skórnych większej liczby substancji wytwarzanych przez grzyby pleśniowe oraz prowadzenie tzw. testów krzyżowych [63].

Grzyby wytwarzają prawie 300 rodzajów związków chemicznych, określanych wspólną nazwą – mikotoksyny [50, 53, 55]. Największą ich liczbę wytwarzają grzyby pleśniowe porastające produkty spożywcze i pasze. Spożyte przez człowieka lub zwierzęta ulegają kumulacji w narządach wewnętrznych,

np. w wątrobie [50, 51]. Mikotoksyny mogą mieć potencjalne działanie kancerogenne¹, immunotoksyczne², neurotoksyczne³, mutagenne⁴, hepatotoksyczne⁵ i teratogenne⁶ [64]. Głównymi producentami toksyn grzybowych są gatunki grzybów mikroskopowych z rodzajów: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Stachybotrys* [23, 41, 53, 59]. Wyniki badań, prowadzonych z zastosowaniem najnowszych technik chromatograficznych, ujawniają, że znaczne ilości mikotoksyn (w tym ochratoksyny, aflatoksyny, trichotecen) można również stwierdzić w kurzu domowym i powietrzu [63, 65, 66]. Próbkę materiałów budowlanych porośniętych grzybami z rodzaju *Stachybotrys* mogą zawierać podwyższony poziom neurotoksycznego metabolitu — satratoksyny H [59].

Szereg danych literaturowych [27, 58, 67, 68] wskazuje, że ekspozycja na działanie zarodników grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*, unoszących się w atmosferze domowej, może powodować poważne problemy zdrowotne. Według Miklaszewskiej i Grajewskiego [23] w kurzu magazynów rolniczych może znajdować się nawet 200–400 ng aflatoksyn B₁ i B₂ na jeden gram składowanego ziarna. Taka dawka przy dłuższej ekspozycji (np. w czasie prac magazynowych) może prowadzić do uszkodzeń organów wewnętrznych oraz krwotoków w obrębie płuc, układu pokarmowego, pęcherza moczowego i mięśni itd. W skrajnych przypadkach obserwuje się zwiększoną zapadalność na raka płuc i wątroby [53]. Stwierdzono, że poziom ochratoksyn we krwi był znacznie wyższy u pracowników np. przemysłu spożywczego narażonych na działanie zarodników grzybowych zawieszonych w powietrzu niż u członków grupy kontrolnej [5]. We krwi pacjentów mających kontakt z grzybami z gatunku *Stachybotrys chartarum* (synonimy: *S. atra*, *S. alternans*) wykryto mierzalne poziomy wytwarzanych przez te grzyby toksyn — satratoksyny H i G [12, 61, 68].

Wysoki stopień narażenia na mikotoksyny produkowane przez mikroskopowe grzyby pleśniowe w powietrzu i środowisku pracy występuje w przypadku: rolników, lekarzy weterynarii, osób zatrudnionych w tartakach, zakładach segregacji odpadów komunalnych, szpitalach i biurach ze źle działającymi systemami wentylacyjnymi, a także u mieszkańców terenów popowodziowych oraz niedogranych budynków.

1.5. Charakterystyka gatunku *Penicillium chrysogenum*

Grzyby z rodzaju *Penicillium* zostały po raz pierwszy oznaczone w 1809 roku przez Johanna Heinricha Friedricha Linka [13]. Teleomorfami rozmnażającymi się płciowo są rodzaje *Eupenicillium*, *Talaromyces* i *Humigera*. Według dziesiątej edycji *Dictionary of the Fungi* [16] jest to rodzaj obejmujący ponad 300 gatunków. Nielsen [36] podaje, że liczba uznanych gatunków wynosi tylko 225. Według wcześniejszych badań Pitta [69] duża zmienność w obrębie rodzaju *Penicillium* wskazuje, że liczba podtypów fenotypowych może przekraczać 1000. Faktem niezaprzeczalnym są trudności, jakich przysparza

¹ Czynniki kancerogenne — ogół czynników zwiększających ryzyko rozwoju nowotworu.

² Czynniki immunotoksyczne — ogół czynników odpowiedzialnych za nadmierne pobudzenie lub obniżenie aktywności układu odpornościowego.

³ Czynniki neurotoksyczne — ogół czynników uszkadzających trwale lub przejściowo układ nerwowy.

⁴ Czynniki mutagenne — ogół czynników wywołujących zmiany w DNA (mutacje).

⁵ Czynniki hepatotoksyczne — ogół czynników wywołujących zaburzenia funkcjonowania komórek wątroby lub ich uszkodzenia.

⁶ Czynniki teratogenne — ogół czynników wpływających na rozwój płodu.

dokładna identyfikacja gatunków. W opisach taksonomicznych, opartych na morfologii rozgałęzień konidioforów⁷, w obrębie rodzaju *Penicillium* wyróżnia się następujące podrodzaje: *Monoverticillate*, *Biverticillata*, *Divaricata* oraz *Terverticillata*. Grzyby należące do ostatniego z wymienionych podgatunków są uważane za *Penicillium* typowe [13]. W ciągu ostatnich 10–15 lat przedstawiono profile genetyczne, enzymatyczne oraz metabolitów wtórnych wytwarzanych przez ten rodzaj [70–75]. Uproszczony klucz do oznaczania 58 gatunków *Penicillium* z podgatunku *Terverticillata* opublikowali w 2004 roku Frisvad i Samson [72].

Grzyby z rodzaju *Penicillium* są powszechnie izolowane z materiałów technicznych i budowlanych, gleby, produktów spożywczych, pasz, kurzu i powietrza wewnątrz i na zewnątrz budynków, a także samochodów [12, 20, 23–25, 27, 74–77]. Spośród znanych gatunków 85 jest uznawanych za toksynotwórcze [13, 53, 75].

Gatunek *Penicillium chrysogenum*, Thom został po raz pierwszy opisany przez amerykańskiego mikologa Charlsa Toma w 1910 roku [16]. Nazwa pochodzi od greckiego χρυσος (*chrysos*), co oznacza złoto. Gatunek ten tworzy charakterystyczne złote „wysięki” na powierzchni grzybni [72, 75].

Z przeglądu literatury wiadomo, że aż 16 podgatunków *Penicillium chrysogenum* można uznać za gatunki synonimiczne [36, 75]. Są to: *P. griseoreseum* Dierckx., *P. brunneorubrum* Dierckx., *P. citreoreseum* Dierckx., *P. chlorophaeum* Biourge, *P. camerunense* Heim, *P. baculatum* Westling, *P. notatum* Westling, *P. meleagrimum* Biourge, *P. flavidomarginatum* Biourge, *P. cyaneofulvum* Biourge, *P. roseocitreum* Biourge, *P. rubens* Biourge, *P. chrysogenum* var. *brevisterigma* Romankova, *P. hermonense* Baghdati, *P. chrysogenum aromaticum* f. *Microsporium* Romankova, *P. verrucosum* var. *cyclopium* szczep *ananas-olens* Ramirez.

Gatunek *Penicillium chrysogenum* jest izolowany z środowisk suchych, charakteryzujących się aktywnością wody w przedziale 0,78–0,81 [16, 41]. Najczęściej spotykany jest w kurzu, glebie, wodzie i powietrzu, na powierzchni roślin (głównie ziaren zbóż), owoców, serów i chleba, tekstyliów, skór zwierzęcych, drewna i jego pochodnych, malowideł ściennych, fresków, papieru i pergaminu, farb oraz gumy [13, 73, 76]. Materiały wykończeniowe stosowane przez człowieka powodują zwiększenie częstości pojawów tego grzyba. Dla przykładu w pokojach, w których na podłogach znajdowały się dywany, wykrywano 2–3-krotnie wyższe stężenia grzybów z rodzaju *Penicillium* niż w pomieszczeniach pozbawionych wykładzin [31]. Zarodniki *Penicillium chrysogenum* są najczęściej izolowane z powietrza atmosferycznego w okresie zimy i wiosny. W zagrzybionych pomieszczeniach grzyb ten może stanowić do 90% wszystkich pleśni [23].

P. chrysogenum należy do grzybów mezofilnych, co oznacza, że temperatury optymalne do jego wzrostu mieszczą się w przedziale 5–37°C (optimum w 23°C), a najlepsze temperatury kiełkowania zarodków w przedziale 20–30°C [78].

Penicillium chrysogenum nie jest uważane za patogen człowieka i zwierząt [36]. Pomimo to z opisów zawartych w pracach pochodzących z XIX wieku wynika, że istnieje powiązanie pomiędzy bezgłosem i napadami tzw. kataru oskrzelowego po ekspozycji chorego na grzyby z rodzaju *Penicillium* [58]. Gatunek ten wytwarza szereg alergenów, spośród których za najważniejsze uważa się alkaliczną proteazę serynową *Aspf 13* i wakuolarną proteazę serynową *Aspf 18*. Oba białka mają masę około 34 kDa [79, 80]. Dodatkowo próby z wyciągiem *Penicillium* są statystycznie istotnie częstsze u dzieci

⁷ Konidiofor – strzępka zarodnikonośna, od której odrywają się konidia.

chorych na astmę i u dorosłych o obniżonej odporności. Ponieważ *Penicillium chrysogenum* obficie występuje w saunach, może wywoływać (rzadko) zmiany nazywane „płucem użytkowników sauny”. Alergie wywołane przez *P. chrysogenum*, określane jako alergie typu I, wzmagają odpowiedź immunologiczną, związaną z podniesieniem poziomu IgE w krwi [52, 63].

Penicillium chrysogenum należy do gatunków toksynotwórczych. Najsilniejsze toksyny, które wytwarza, to: rokwefortyna C, meleagryna, kwas sekalonowy D (SAD), cytrynina, kwas cyklopiazonowy, sorbicilina i PR-toksyna [36, 72, 75, 81]. Według Miklaszewskiej i Grajewskiego [23] najgroźniejsza spośród nich jest neurotoksyna – rokwefortyna C. Jej wytwarzanie w ilości 17–23 ng na 107 konidiów stwierdzono tylko na pożywkach syntetycznych (nie powstaje w stanie naturalnym).

Kilka metabolitów tego gatunku należy do antybiotyków β -laktamowych. Najważniejszym z nich jest penicylina, odkryta w 1928 roku przez Aleksandra Fleminga, który zaobserwował hamujący wpływ *Penicillium notatum* na bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* [51]. Oprócz penicyliny gatunki *Penicillium chrysogenum* były wykorzystywane przemysłowo do produkcji enzymów, takich jak: oksydaza poliaminowa POA, oksydaza glukozowa GAG, dehydrogenaza fosfoglukonianowa PGD [82].



2. Metale i związki metali o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych

2.1. Historia zastosowania metali i ich związków w medycynie i życiu codziennym

Mikroorganizmy towarzyszyły człowiekowi od chwili jego pojawienia na Ziemi. Przejawami ich obecności w środowisku były dwie kategorie zjawisk: psucie się żywności i procesy fermentacji oraz choroby zakaźne ludzi i zwierząt. Z powodu nieznamośności technik mikrobiologicznych do połowy XX wieku uważano, że wszystkie choroby oraz rozkład substancji organicznych są wywołane formami bytowania jednego zmiennego gatunku mikroorganizmu [19]. Dopiero postęp w dziedzinie mikroskopii umożliwił badaczom rozróżnienie poszczególnych grup drobnoustrojów.

Niezależnie od stopnia rozwoju wiedzy na temat mikroorganizmów człowiek podejmował próby ochrony przed chorobami. Wiele z nich opierało się na wierzeniach (np. uważano, że spożywanie kału jest sposobem na odpędzenie demonów) lub obserwacjach i doświadczeniach praktycznych [83]. Leczenie metalami określano mianem metaloterapii. Historia tej dziedziny medycyny rozpoczęła się na terenie Indii (medycyna ajurwedyjska) i Egiptu około 4–5 tysiąclecia p.n.e. Szczególne właściwości przypisywano takim metalom jak: złoto (symbol boga Słońca), srebro (symbol boga Księżyca), rtęć (symbol boga Merkurego), żelazo (symbol boga Marsa), cyna (symbol boga Jowisza), ołów (symbol boga Saturna) i miedź (symbol bogini Wenus). Z dostępnych źródeł wiadomo, że w Egipcie w okresie Starego Państwa używano miedzianych pałeczek w leczeniu jaglicy¹. Starożytni Grecy i Rzymianie, aby zapobiec szerzeniu się chorób, pokrywali srebrem naczynia, których używali do jedzenia i picia [84]. W średniowieczu, podczas epidemii dżumy w Europie, dzieciom podawano do ssania srebrne łyżeczki, wierząc, że tym sposobem uchronią się przed zarazą. W II wieku n.e. w Indiach łatwo psujące się pożywienie przechowywano owinięte w srebrne arkusze. Natomiast osadnicy przybywający do USA w XVII wieku n.e. sterylizowali mleko, wrzucając srebrną monetę do naczyń, w których je przechowywano [85, 86]. Również Paracelsus, nazywany ojcem medycyny nowożytnej, wierzył w leczniczą moc złota. Stosował je m.in. do leczenia grzybic, odry, trądu i usuwania przykrego zapachu z ust [85].

Równie powszechne wykorzystywano związki metali. Siarczan miedzi był używany do leczenia chorób oczu już w II wieku p.n.e. na terenie obecnych Chin. Z kolei azotan srebra stosowano w czasie I wojny światowej do leczenia infekcji bakteryjnych oraz w oparzeniach i zakażeniach grzybiczych. Związki srebra wykorzystywano do pokrywania narzędzi chirurgicznych i przyrządów służących do dializy (np. cewników) [84, 86, 87]. Sole srebrne kwasu alginowego lub kwasu sulfanilowego stosowano jako środek zapobiegawczy przed infekcjami ran i oparzeń. Srebra, stapianego z rtęcią i ołowiem lub innymi metalami w temperaturze pokojowej (jako amalgamaty), używano do wypełnień zębów w dentyście. Podobne zastosowanie znalazły sole złota. Maria Medycejska używała ich do łagodzenia bólu zębów. Inna przedstawicielka rodu królewskiego, Izabela Bawarska, odchudzała się, jedząc powidlą z solami złota [85]. W 1890 roku niemiecki bakteriolog Robert Koch odkrył, że cyjanek złota (AuCN) działa jako środek bakteriobójczy przeciwko prątkom gruźlicy [86].

¹ Jaglica (łac. *trachoma*, synonimy: egipskie zapalenie spojówek, przewlekłe pęcherzykowe zapalenie rogówki) – choroba oczu wywołana przez bakterie *Chlamydia trachomatis*.

Wiedza o leczniczej mocy związków metali przetrwała do czasów współczesnych. Związki srebra i złota są stosowane jako środki przeciwpalne w chorobach skóry oraz do odkażania ran, jako np. element opatrunków [88]. Miedzi, w postaci stopu Muntza (60% miedzi i 40% cynku), używa się jako biostatyka, którym można zabezpieczyć przed korozją mikrobiologiczną m.in. pokrycia statków, rury, dachy budynków oraz klamki [89–91].

Ogromnym postępem w zastosowaniu metali i ich związków w medycynie był rozwój nanotechnologii [8, 87, 92, 93]. Cechą charakterystyczną nanometali jest nanometryczny rozmiar ziaren, który przynajmniej w jednym kierunku nie przekracza 100 nm. Nanometryczne uziarnienie metali powoduje, że charakteryzują się one unikatowymi właściwościami, których nie mają ich odpowiedniki w skali mikrometrycznej. Zwiększa się wytrzymałość materiałów, a także ich aktywność biobójcza. Dla przykładu nanosrebro nie płami² i jest skutecznym specyfikiem bakteriobójczym już przy stężeniu 0,1–1,0 ppm, tj. około 1000–10 000 razy mniejszym niż w przypadku srebra koloidalnego [87]. Z kolei nanocząstki tlenków miedzi mają szersze, w stosunku do miedzi koloidalnej, spektrum antybakteryjne [90, 91]. Zniszczeniu ulega 97% wszystkich patogenów, w tym odporny na metycylinę gronkowiec złocisty MRSA.

Zastosowanie nanocząstek obejmuje wiele dziedzin naszego życia [87, 92, 93]. Nanocząstkami srebra, złota, miedzi, platyny, irydu, rodu, palladu oraz ich stopów pokrywa się powierzchnię różnych materiałów, m.in. tekstyliów, metali, papieru, tworzyw sztucznych itp. Dodaje się je również do farb, lakierów, kosmetyków i preparatów leczniczych.

W urządzeniach powszechnego użytku (np. w sprzęcie AGD), a także badawczych i produkcyjnych zachodzą procesy fizyczne w nanoskali [88]. Przykładem może być zastosowanie technologii SilverNanoHealth w pralkach firmy Samsung. W procesie elektrolizy z dwóch płytek srebra ($\text{Ag} = 99,9\%$), umieszczonych wewnątrz pralki, są wytwarzane miliony nanocząstek srebra. Cząstki te wraz z wodą dostają się do pranych i płukanych rzeczy, co pozwala na ich częściową dezynfekcję oraz utworzenie antybakteryjnej i antywirusowej powłoki ochronnej. Oprócz mikroorganizmów system SilverNanoHealth usuwa również nieprzyjemne zapachy pranych rzeczy. Przez około 30 dni rzeczy uprane w pralce w znacznie mniejszym stopniu absorbują mikroorganizmy oraz nieprzyjemne zapachy. Pralki z systemem SilverNanoHealth są rozwiązaniem ekonomicznym, ponieważ zużywają mniej energii elektrycznej dzięki wykluczeniu programów wysokotemperaturowych [87]. Szkodliwy wpływ nanocząstek tlenków metali na mikroorganizmy został potwierdzony w wielu badaniach. Silne właściwości antybakteryjne w stosunku do różnych grup mikroorganizmów wykazują tlenki metali, takie jak: ZnO [94–97], Fe_3O_4 [98], MgO [96], CaO [96], CeO_2 [99], WO_3 [88] i TiO_2 [100].

Ze względu na różnorodność budowy chemicznej i właściwości nanocząstek metali i ich tlenków oraz szerokie spektrum organizmów (bakterie, grzyby), na które mogą one oddziaływać, podanie jednego mechanizmu biobójczego jest niemożliwe [93, 96, 101]. Do zdecydowanej większości nanomateriałów nie można zastosować metodyk badania skuteczności oraz toksyczności, opracowanych dla antybiotyków czy dezynfektantów. Wydaje się wątpliwe, aby za pomocą metod referencyjnych stosowanych obecnie (np. metody najmniejszego stężenia hamującego, tzw. MIC) można było ocenić skuteczność działania przeciwbakteryjnego lub przeciugrzybiczego nanomateriałów.

Wiadomo, że antybakteryjne właściwości nanocząstek srebra wynikają przede wszystkim z ich wielkości i ładunku. W pierwszej fazie dodatnio naładowane nanocząstki srebra Ag^+ oddziałują elektro-

² Srebro koloidalne w świetle jest silnie redukowane do czystego metalu, co powoduje efekt płamienia (czernienia) powierzchni naskórka, bielizny osobistej czy szpitalnej, mebli oraz aparatury.

statycznie z ujemnie naładowanymi strukturami osłaniającymi komórki bakterii. W wyniku tego ładunek ściany komórkowej bakterii ulega zmianie na przeciwny. W drugiej fazie „ataku” następuje związanie nanocząstek z białkami strukturalnymi błony komórkowej. W zależności od rodzaju nanocząstki następuje przyłączenie do odpowiedniej grupy funkcyjnej aminokwasu. Nanosrebro łączy się z grupą tiolową $-SH$ aminokwasu cysteiny [102, 104–105]. Wśród grup funkcyjnych o największej aktywności w tworzeniu wiązań wymienia się również grupy: aminowe ($-NH_2$), karboksylowe ($-COOH$), imidazolowe ($-C_3H_4N_2$) oraz fosforanowe ($-PO_4$). W wyniku powstania kompleksów białka strukturalne tracą swoją aktywność lub ulegają trwałej denaturacji [104]. Podczas trzeciego etapu reakcji nanocząstki, które przedostaną się przez zewnętrzne osłony do wnętrza komórki bakterii, reagują z enzymami cytozolu oraz kwasami nukleinowymi [88, 99, 105, 106]. Podczas każdego z wymienionych etapów nanocząstki metali o właściwościach fotokatalitycznych inicjują reakcje oksyredukcyjne. W ich wyniku następuje degradacja do ditlenku węgla i wody większości bakteryjnych struktur komórkowych [94–98].

Badania prowadzone w ostatnich latach potwierdziły, że nanocząstki metali i ich tlenków działają na szerokie spektrum mikroorganizmów chorobotwórczych [8, 102, 106]. Nanosrebro wykazuje antibakteryjne właściwości zarówno wobec komórek bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym gatunków tlenowych oraz beztlenowych. Łącznie udowodniono jego działanie w stosunku do 650 szczepów bakterii. Dla kontrastu, najskuteczniejsze antybiotyki działają na dwa, trzy, maksymalnie sześć organizmów chorobotwórczych [107]. Nieselektywne działanie preparatów jest szczególnie ważne, gdy podejrzewamy zakażenie florą mieszaną, np. w przypadku sepsy.

Stosowanie nanocząstek w terapii chorób bakteryjnych nie wymaga spełnienia dodatkowych warunków, inaczej niż w przypadku wielu antybiotyków. Antybiotyki działają wybiórczo, głównie na bakterie Gram-dodatnie i nieliczne Gram-ujemne. Ponadto np. zastosowanie penicyliny i jej pochodnych ogranicza się do działania na komórki „młode” i dzielące się intensywnie [107].

Zagrożenie nabyciem odporności na nanocząstki („nanoodpornością”) przez bakterie jest kilkadziesiąt razy mniejsze od ryzyka wytworzenia odporności na antybiotyki. Wytlumaczeniem tego faktu są różnice w mechanizmie działania obu bakteriostatyków, częstości ich stosowania, a co za tym idzie – w mechanizmie powstania odporności. Według Larsona [108] główną przyczyną pojawienia się odporności bakterii na antybiotyki jest nabycie zdolności do generowania specjalnych białek, rozkładających dany związek. Nowa cecha może powstać na skutek mutacji *de novo* (odporność pierwotna) lub może zostać nabyta od innych bakterii na drodze koniugacji, transformacji lub transdukcji [109]. Odporność bakterii na antybiotyki wiąże się również z nieracjonalną antybiotykoterapią oraz zbyt częstym użyciem antybiotyków w przemyśle spożywczym i żywieniu zwierząt [107, 110]. Również powszechne wykorzystywanie nanocząstek, np. srebra, stwarza pewne obawy dotyczące pojawienia się cechy odporności u bakterii. Z teoretycznego punktu widzenia uzyskanie odporności w stosunku do nanocząstek wydaje się niemożliwe lub prawie niemożliwe [102, 110–112]. Zdolność do szybkiego utleniania wszystkich organicznych związków budujących osłony komórek bakteryjnych (białek, cukrów i tłuszczów), duża dynamika przemieszczania się w głąb komórek, łatwość degradowania kwasów nukleinowych (DNA i RNA) oraz enzymów niezbędnych do prawidłowego działania mechanizmów samonaprawy i powstawanie mutacji odwrotnych wykluczają tworzenie mechanizmów obronnych. Z kolei uszkodzenia plazmidów, kodujących większość genów odporności na antybiotyki i biorących udział w transferze genów pomiędzy bakteriami, uniemożliwia rozprzestrzenianie się odporności nabytej [108, 110–115]. W pracach kilku autorów [102, 112, 114] można znaleźć doniesienia o pojedynczych przypadkach odporności

(kliniczne szczepy bakterii) na kationy srebrowe, uwalniane z sulfadiazyny srebra, jako skutek jej długoterminowego stosowania. Szacuje się, że prawdopodobieństwo pojawienia się odporności na nanocząstki jest jak 1 do 1012 [113].

Cząstki nanometali, podobnie jak i antybiotyki, należy uznać za leki względnie mało toksyczne. Oznacza to, że ich właściwości toksyczne są znacznie większe w stosunku do drobnoustrojów niż do organizmu gospodarza [111, 115–120]. Z drugiej strony zdefiniowanie rodzaju zagrożeń, jakie niesie ze sobą stosowanie nanocząstek metali i tlenków metali, jest znacznie trudniejsze [101]. Wynika to przede wszystkim z indywidualnych właściwości nanocząstek (szlak toksyczności metali), ilości dostępnych rozwiązań ich stosowania oraz różnych mechanizmów ich oddziaływania. Można przypuszczać, że im mniej wybiórczo w stosunku do różnych organizmów żywych będą działały wprowadzone nanomateriały, tym mniejsze będzie ich wykorzystanie przez człowieka [88, 118, 120].

2.2. Utleniające właściwości tlenków metali

2.2.1. Podstawy teoretyczne koncepcji zastosowania tlenków metali w procesach utleniania

Rosnące zanieczyszczenie powietrza, wody i gleby stanowi obecnie problem międzynarodowy. Zaostrzające się normy emisji zanieczyszczeń i wprowadzane postępowanie dotyczące racjonalnego kształtowania środowiska skutkują koniecznością poszukiwania wysoce efektywnych i wysokosprawnych technologii oczyszczania.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się metodom tzw. zaawansowanego utleniania AOP (ang. *Advanced Oxidation Processes*) lub AOTs (ang. *Advanced Oxidation Technologies*). Jest to duża grupa technik pozwalających na zwiększenie stopnia utleniania związków trudno degradowanych. W procesach tych są generowane wysoce reaktywne rodniki hydroksylowe $\text{OH}^\bullet$, które wchodzą w nieselektywne reakcje rodnikowe ze związkami organicznymi, prowadząc do ich szybkiego utleniania do nieszkodliwego ditlenku węgla i wody [121–124]. Rodniki hydroksylowe można otrzymać metodami: chemicznymi (np. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$, O_3/OH^- , Fe^{2+} lub $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$), fotochemicznymi (np. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV) i fotokatalitycznymi z użyciem katalizatorów aktywowanych światłem ultrafioletowym (np. TiO_2/UV , ZnO/UV) lub widzialnym [123–128]. Zgodnie z definicją przyjętą przez IUPAC substancje wywołujące reakcje utleniania pod wpływem światła nazywa się fotokatalizatorami [124, 129]. Do najczęściej używanych fotokatalizatorów należą półprzewodniki: ZnO , Fe_3O_4 , MgO , CaO oraz TiO_2 [125, 128]. Procesy fotokatalitycznego utleniania mogą przebiegać w układach homogenicznych (tzw. fotokataliza homogeniczna) lub heterogenicznych (tzw. fotokataliza heterogeniczna). W procesach homogenicznych katalizator i reagenty znajdują się w tej samej fazie [127]. Zgodnie z definicją podaną przez Ohtaniego [129] można przyjąć, że są to reakcje chemiczne zainicjowane adsorpcją światła przez katalizator (lub ciało stałe), który pozostaje w niezmienionym stanie podczas i po zakończeniu reakcji. Natomiast w procesach heterogenicznych katalizator znajduje się w innej fazie niż reagenty [127].

Fotokatalityczne metody usuwania zanieczyszczeń budzą zainteresowanie od początku lat 70., kiedy ukazały się pierwsze prace na temat procesów utleniania aktywowanych światłem [9, 122, 125, 126, 130]. Najszybciej zastosowano te metody do usuwania zanieczyszczeń z wody i powietrza [10, 122, 131–134]. Następna aplikacja była związana z produkcją materiałów samoczyszczących nowej generacji (ang. *self-cleaning*). Materiały samoczyszczące (np. tkaniny, polimery, metale, szkło) są po-

krywane warstwą zawierającą aktywne fotokatalitycznie tlenki metali i niemetalu. Nanocząstki fotokatalizatorów są również dodawane bezpośrednio do farb i lakierów pokrywających elementy, które chcemy ochronić przed niszczącym działaniem zanieczyszczeń lub mikroorganizmów [7, 135, 139].

2.3. Charakterystyka tlenku tytanu(IV)

2.3.1. Wiadomości ogólne

Ditlenek tytanu (TiO_2) jest najpowszechniejszym i najtrwalszym naturalnie występującym tlenkiem tytanu. W przyrodzie występuje w skałach magmowych i metamorficznych w postaci minerałów: rutylu (95% TiO_2), ilmenitu (FeTiO_2), tytanitu (CaTiSiO_5) oraz perowskitu (CaTiO_3) [140, 139].

Ditlenek tytanu w warunkach normalnych jest drobnokrystalicznym, białym proszkiem. Tworzy trzy odmiany polimorficzne (w tym dwie krystalograficzne): tetragonalny rutyl i tetragonalny anataz oraz rombowy brookit. Wszystkie wymienione odmiany mają właściwości amfoteryczne i cechuje je wysoka odporność chemiczna. Anataz i rutyl nie rozpuszczają się w wodzie, rozpuszczalnikach organicznych oraz alkaliach [139]. Rutyl, w stosunku do anatazu, ma większą gęstość właściwą, jest twardszy, ma wyższy współczynnik załamania światła (efektywniej rozprasza światło), lepszą stabilność chemiczną i odporność na czynniki środowiskowe. Rutyl jest najtrwalszą termodynamicznie odmianą ditlenku tytanu. Przejście fazowe anatazu w rutyl jest nieodwracalne i zachodzi w temperaturze 600–700°C [140].

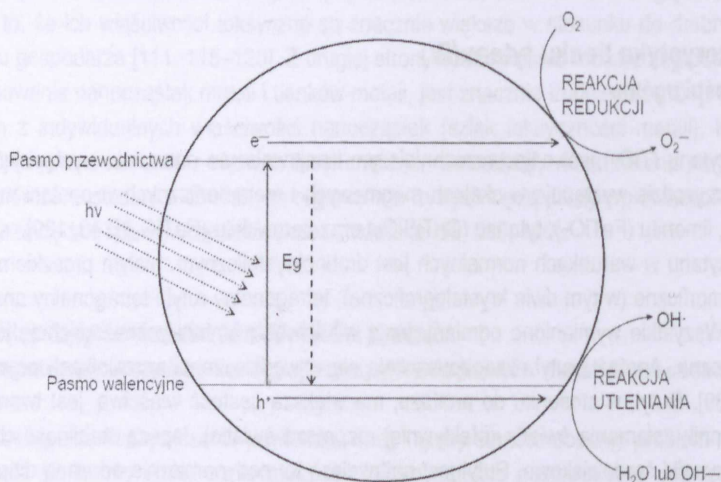
W przemysłowej produkcji TiO_2 stosuje się rudy naturalne (głównie ilmenitowe), koncentraty, syntetyczne rutyle, szlaki tytanowe oraz mieszaniny tych surowców [142]. Na świecie do wytwarzania ditlenku tytanu wykorzystuje się dwie technologie: siarczanową, w której następuje strącenie ditlenku tytanu z roztworu siarczanu tytanu, oraz chlorkową, polegającą na wysokotemperaturowym utlenieniu gazowego chlorku tytanu do ditlenku tytanu z użyciem czystego tlenu [143]. Produkt finalny, nazywany białą tytanową, wykorzystuje się jako pigment w przemysłach: farb i lakierów (58% światowej produkcji), tworzyw sztucznych (20% światowej produkcji), papierniczym (13% światowej produkcji), gumowym, ceramicznym, skórzanym, kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym [142]. W Unii Europejskiej ditlenek tytanu jako E171 jest wpisany na listę barwników artykułów spożywczych, zamieszczoną w załączniku 1 do dyrektywy 94/36/EEC [139].

2.3.2. Mechanizm reakcji fotokatalitycznych zachodzących na cząsteczce tlenku tytanu(IV)

Ditlenek tytanu należy do grupy materiałów półprzewodnikowych, w których występują dwa pasma energetyczne oddzielone tzw. pasmem wzbronionym. Pasma walencyjne, podstawowe, jest wypełnione elektronami i położone niżej, wyżej zaś leży pasmo niezawierające elektronów, zwane pasmem przewodnictwa. W celu wybicia elektronu z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa potrzebna jest energia równa (bądź wyższa) energii pasma wzbronionego (E_g). Energia ta jest dostarczana za pomocą światła $h\nu$ [125]. Elektron wybity (wzbudzony) z pasma walencyjnego przechodzi do pasma przewodnictwa (rys. 2).

Najmniejsza ilość energii, jaka potrzebna jest do wzbudzenia elektronów pasma walencyjnego, wynosi dla anatazu 3,29 eV, dla rutylu 3,05 eV. Odpowiada to promieniowaniu o długości fali 385 nm dla anatazu i 415 nm dla rutylu [125, 128, 139, 144]. W procesach fotokatalitycznych wykorzystywane są obie

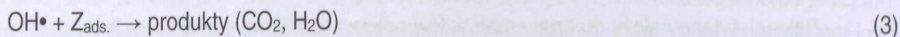
odmiany alotropowe TiO_2 , ale powszechnie za formę bardziej aktywną fotokatalitycznie uważa się anataz [127, 129, 136, 139]. Według niektórych źródeł najwyższą aktywnością odznacza się mieszanina anatazu-rutylowa. Jak dotąd nie znaleziono jednoznacznego wytłumaczenia tych rozbieżności [124].



Rys. 2. Mechanizm reakcji fotokatalitycznej, na podstawie [128]

Wyniki badań fotokatalitycznej aktywności TiO_2 , uzyskiwane przez różne zespoły badawcze, często są odnoszone do standardu, za jaki uważa się ditlenek tytanu P-25, produkowany przez niemiecką firmę Evonik, dawniej Degussa [100, 138, 143–147]. Charakteryzuje się on następującymi parametrami: około 70% anatazu i około 30% rutylu. Średnica krystalitów wynosi, odpowiednio, 25 i 85 nm. Faza amorficzna (bezpостaciowa) stanowi około 1% i charakteryzuje się krystalitami o wielkości 50 nm. Zarówno anataz, jak i rutyl mogą tworzyć aglomeraty o średnicy nieprzekraczającej 300 nm [144]. Powierzchnia właściwa P-25 wynosi około $50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ [145].

Reaktywne formy tlenu ROS ($\cdot\text{O}^{2-}$ i H_2O_2) i rodniki hydroksylowe $\text{OH}\cdot$ (rys. 2), powstające w czasie reakcji fotokatalitycznej, są bardzo aktywne chemicznie i utleniają substraty zaadsorbowane na fotokatalizatorze [125]. Proces ten można opisać następującym wyrażeniem:



gdzie: Z_{ads} – substrat zaadsorbowany na powierzchni fotokatalizatora (degradowane zanieczyszczenie).

W środowisku wodnym utleniającemu działaniu TiO_2 ulegają: alkeny, alkany i ich chlorowcopochodne (np. izobutan, pentan, heptan, cykloheksan, trichloroetan, tetrachloroetan), kwasy, alkohole alifatyczne (np. metanol, etanol, propanol), aldehydy (np. formaldehyd, aldehyd salicylowy), ketony, amidy, węglowodory aromatyczne (np. benzen, toluen, naftalen, fenol), leki (np. paracetamol, diklofenak), herbicydy i pestycydy (np. prometron, propetryn, bentazon, DDT), barwniki (np. błękit metylenowy, oranż metylowy, fluoresceina), barwniki azowe, surfaktanty (np. glikol polietylenowy) i hormony [126, 130, 133, 139, 148–156]. Fotokatalitycznej degradacji zanieczyszczeń w fazie gazowej ulegają takie

związki, jak: tlenki azotu (NO_x , NO^{3-}), węgla (CO), siarki (SO_x), NH_3 (gaz), alkany i alkeny oraz ich chlorowcopochodne (np. propan, butan, oktan, izooktan, dichlorometan, chloroform, trichloroetan, eten, 1-buten, tetrachloroeten), ketony (aceton, metyloetyloketon, metyloizopropylketon), związki aromatyczne (np. benzen, toluen, kumen), aminy (np. propyloamina, dietyloamina, pirydyna) oraz inne związki z grupy lotnych związków organicznych, tzw. VOC (ang. *Volatile Organic Compounds*) [123, 136, 137, 157–160]. Udowodniono, że ditlenek tytanu modyfikowany metalami szlachetnymi (Ag, Ni, Pt, Au, Ag, Cu, Rh, Pd), metalami przejściowymi (Co, Cr, Cu, Fe, Mo, V, W, Y), tlenkami metali (ZnO , WO_3 , SiO_2 , CrO_3) lub niemetalami (C, N, S, P) ma wyższą aktywność fotokatalityczną [138, 139, 153, 161–165]. Z powodu swoich doskonałych właściwości utleniających tlenek tytanu(IV) w postaci czystej i modyfikowanej stał się jednym z najpopularniejszych fotokatalizatorów używanych zarówno w procesach oczyszczania wody, jak i tworzenia materiałów samoczyszczących [121, 123, 126, 132, 133, 135, 142, 148, 158, 165].

2.4. Wpływ ditlenku tytanu aktywowanego światłem na organizmy żywe

2.4.1. Bakterie

Przeciwdrobnoustrojowe działanie ditlenku tytanu aktywowanego światłem UV opisano już w 1985 roku. Za pomocą fotokatalizatora immobilizowanego na katodzie usunięto z wody komórki bakterii *Escherichia coli* oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [166]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że czynnikiem destruktywnym są głównie rodniki hydroksylowe $\text{OH}^\bullet$, tworzące się w czasie reakcji fotokatalitycznej. W celu określenia podatności poszczególnych elementów strukturalnych żywych komórek na proces fotodegradacji konieczne było badanie produktów powstających w reakcjach utleniania liposacharydów, aminokwasów, białek i in. [167–171]. U Gram-ujemnych bakterii *Escherichia coli* najbardziej wrażliwa okazała się liposacharydowa błona zewnętrzna (LPS), a najmniej jednowarstwowa ściana komórkowa zbudowana z peptydoglikanu, zwanego mureiną [172, 173]. W wyniku uszkodzenia błon białkowo-lipidowych otaczających organelle komórkowe następuje uwolnienie enzymów proteolitycznych oraz toksyn. Powoduje to lawinowe reakcje denaturacji, hydrolizy oraz utleniania. Śmierć komórki następuje na skutek autolizy.

Desai i Kowshik [174] wykazali, że dezaktywacja komórek bakteryjnych następuje podczas dwóch etapów. W pierwszych 10 min naświetlania światłem UV bakterie nie zostają znacznie uszkodzone, co można wytłumaczyć tworzeniem zlepeków komórek bakteryjnych i fotokatalizatora w środowisku wodnym. Ich powstanie utrudnia aktywację fotokatalizatora przez światło UV i jest ochroną dla samych bakterii. W kolejnych minutach śmierć bakterii następuje z szybkością logarytmiczną. Krzywe przetrwania różnych gatunków bakterii hodowanych w obecności katalizatora TiO_2 i światła UV wskazują, że całkowite zniszczenie komórek bakterii zostaje osiągnięte po około 50 min [175–176].

Według Chenga i in. [177], jeśli cząsteczki TiO_2 są wystarczająco małe (≤ 20 nm), mogą pene-trować wnętrze komórki, inicjując wewnątrz reakcje fotokatalityczne. Śmierć komórki bakteryjnej następuje na skutek albo zniszczenia wewnątrzkomórkowego koenzymu A (CoA) i upośledzenia aktywności oddechowej *Escherichia coli*, albo mechanicznego uszkodzenia błon tworzących mikrokompartmenty (mikroprzedziały) wewnątrz komórki bakteryjnej. Potwierdziły to obserwacje powierzchni błon, prowadzone z użyciem mikroskopów SEM i TEM [178]. Dostanie się fotokatalizatora do wnętrza komórki powoduje również uszkodzenia w obrębie kwasu nukleinowego DNA i RNA oraz plazmidów [168, 172, 179].

W wyniku procesu fotokatalitycznego, prowadzonego w obecności ditlenku tytanu i światła UV, uzyskuje się nie tylko uśmiercenie komórek bakterii, ale również ich całkowitą degradację do ditlenku węgla i wody [172, 180, 181]. Pełna mineralizacja komórek i toksycznych związków, powstających po fotodegradacji, następuje po około 75 h [182]. Niszczącemu działaniu ditlenku tytanu ulegają zarówno bakterie „młode”, jak i „stare”, dzielące się i pozostające w stanie spoczynku, ułożone pojedynczo i w warstwach. Właściwości TiO_2 aktywowanego światłem nie pogarszają się w miarę upływu czasu i wykazuje on długotrwałe działanie antybakteryjne [168, 171, 177, 182–185]. Dezynfekcja z wykorzystaniem ditlenku tytanu aktywowanego światłem może być trzy razy skuteczniejsza niż przeprowadzana chlorem i 1,5 razy skuteczniejsza niż ozonem [139, 148].

Podobne efekty daje zastąpienie światła UV tańszym źródłem promieniowania, np. promieniowaniem słonecznym [9, 130, 184, 186]. Z badań Bossharda i in. [186] wiadomo, że w procesach SODIS światło, nawet bez obecności ditlenku tytanu, indukuje procesy niszczenia błony białkowo-lipidowej. Utrudnia to bakteriom prawidłowe funkcjonowanie (np. powoduje spadek żyzności), reprodukcję i eliminuje zjawisko „ponownego wzrostu” (ang. *regrowth*). Wprowadzenie do wody aktywnego ditlenku tytanu znacząco przyspiesza reakcję. Malato i in. [9] udowodnili, że cząsteczki TiO_2 wprowadzone do komórek bakterii zawieszonych w wodzie i wystawionych na działanie światła słonecznego na 20 min powodują zmniejszenie o 99% liczby komórek bakteryjnych *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Proces prowadzony tych samych warunkach naświetlenia, ale bez użycia ditlenku tytanu musiałby trwać kilka dni.

Pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*), razem z innymi bakteriami typu *coli*, jest używana jako wskaźnik skażenia mikrobiologicznego wód. Jest również organizmem modelowym najczęściej stosowanym do określania skuteczności dezynfekcyjnych właściwości ditlenku tytanu aktywowanego światłem [148, 185–191]. Z prac przeglądowych powstałych w ostatnich latach [100, 133, 171] wiadomo, że TiO_2 aktywowany światłem UV lub słonecznym jest wykorzystywany do inaktywowania bakterii Gram-ujemnych, takich jak: *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexnerii*, *S. dysenteriae*, *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Salmonella typhimurium*, *S. enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Serratia marcescens*, *Bacteroides fragilis*, *Legionella pneumophila*, i niektórych bakterii Gram-dodatnich, m.in. *Deinococcus radiophilus*, *Streptococcus faecalis*, *S. mutans*, *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Micrococcus luteus*, *M. lylae* i *Clostridium perfringens*.

Na uwagę zasługuje fakt, że antybakteryjne właściwości ditlenku tytanu aktywowanego światłem zostały potwierdzone w stosunku do najbardziej odpornych na antybiotyki szczepów gronkowca złocistego: MRSA i VRSA [190–193].

Przyczyną objawów chorobowych występujących w przebiegu bakteryjnych zatruc pokarmowych są często toksyny produkowane przez bakterie. Niektóre z nich są wydzielane do środowiska zewnętrznego jako egzotoksyny (np. enterotoksyna *Shiga*), inne występują w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych (tzw. endotoksyny). W środowisku wodnym źródłem egzotoksyny mogą być również sinice i glony. Wszystkie toksyny są grupą związków zróżnicowaną pod względem chemicznym. W wodzie toksyny występują w bardzo małych stężeniach, w formie rozpuszczonej lub słabo rozpuszczonej. Charakteryzuje je duża trwałość, stabilność chemiczna oraz wysoka toksyczność dla ludzi i zwierząt [196]. Z badań Makowskiego i Wardasa [197] wynika, że fotokatalityczne właściwości ditlenku tytanu można również wykorzystać do rozkładu toksyn wytwarzanych przez glony i sinice.

2.4.2. Wirusy i priony

Wirusy są dużo mniejsze od bakterii (rozmiary 0,01–0,3 μm). Zdecydowana ich większość przedostaje się przez filtry mikrobiologiczne zatrzymujące bakterie. Wirusy nie są zdolne do samodzielnego rozmnażania się. Aby powielić własne geny, namnażają się, wykorzystując do tego celu aparat kopiujący, zawarty w żywych komórkach. Wirusy zakażają wszystkie typy organizmów: zwierzęta, rośliny, bakterie (bakteriofagi lub fagi) [19]. Trudno usunąć je za pomocą klasycznych metod uzdatniania wody i znanych dezynfektantów [198, 199].

Wielu autorów badało wpływ ditlenku tytanu, aktywowanego światłem UV i widzialnym, na niszczenie wirusów. Badania prowadzono na bakteriofagach T4, MS2 i PL-1 [187, 198, 200], wirusach: Norwalk [201, 202], opryszczki *Herpes HSV-1* [200], polio [189], grypy, w tym A/H5N2 [203, 204], zapalenia wątroby *Hepatitis B* oraz rotawirusach [199, 205]. W większości badanych przypadków podatność wirusów na proces fotokatalityczny jest większa niż bakterii *Escherichia coli* [198]. Dowiedziono, że na początku uszkodzeniu ulega białkowy kapsyd, a następnie kwas nukleinowy (DNA lub RNA), znajdujący się w środku [199]. Kato i in. [202] potwierdzili, że dezynfekcja wody prowadzona z użyciem ditlenku aktywowanego światłem jest efektywniejsza niż chlorowanie lub odkażanie promieniami UVC. Wynika to z faktu, że po użyciu klasycznych metod dezynfekcji w wodzie pozostają elementy wirusów (najczęściej kwasy nukleinowe), które mogą być akumulowane w ciele ryb, małży i wielu innych organizmów wodnych. Środowisko wodne, w którym wykrywa się obecność wirusów, określane jest jako „pozytywne” (ang. *positive*), a pochodzące z niego organizmy nie mogą być przeznaczone do konsumpcji. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie procesu fotokatalitycznego, który powoduje pełną mineralizację kwasów nukleinowych wirusów. Została ona potwierdzona na podstawie analizy produktów reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym PCR (ang. *real-time*) [202].

Z badań Zana i in. [205] wynika, że do zniszczenia wirusów nie jest wymagane środowisko wodne. Autorzy pokryli zawiesziną TiO_2 ($0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) ceramiczne płyty, na które następnie naniesiono antygen powierzchniowy HbsAg. Płyty naświetlano przez kilka godzin lampą rtęciową. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskano 100-procentową redukcję antygenu wirusa zapalenia wątroby typu B.

Ditlenek tytanu aktywowany promieniowaniem UVA wykazuje działanie utleniające wobec białkowych cząstek zakaźnych, czyli prionów. Całkowity rozkład patologicznego białka prionowego PrPsc uzyskano po 12 h naświetlania lampą rtęciową (emitującą światło UVA) w obecności TiO_2 w stężeniu $4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [206]. Mimo dużej dawki zastosowanego fotokatalizatora wynik ten należy uznać za satysfakcjonujący. Chorobotwórcze priony charakteryzują się bowiem wyjątkową odpornością na środki dezynfekcyjne, promieniowanie UV oraz spalanie w wysokich temperaturach (powyżej 3600°C). Pozytywne wyniki daje dopiero długotrwałe (24 h i dłużej) stosowanie sody żrącej lub inaktywacja w warunkach podwyższonego ciśnienia (30 atmosfer) i temperatury (1400°C) co najmniej przez 1 h [207].

2.4.3. Komórki eukariotyczne

Pierwsze prace nad wpływem fotokatalizy na komórki eukariotyczne przeprowadzili Matsunaga i in. [166, 208]. Autorzy do swoich badań wybrali niechorobotwórczy gatunek drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*), szeroko wykorzystywany jako modelowy obiekt badań. Drożdże pod względem budowy komórki, jak i przebiegu szlaków metabolicznych w dużej mierze przypominają orga-

nizmy wielokomórkowe z człowiekiem włącznie [209]. DITLENEK tytanu (P-25), immobilizowany na membranie lub zwieszony w roztworze, powodował całkowite zniszczenie komórek drożdży podczas 60–120 min naświetlania. Podobną wrażliwością na fotokatalityczne działanie ditlenku tytanu charakteryzują się drożdżaki z rodzaju *Candida*, odpowiedzialne za zakażenia oportunistyczne u chorych z obniżoną odpornością [210–214].

Wpływ ditlenku tytanu, aktywowanego światłem UV, na wzrost i rozwój grzybów strzępkowych (o bardziej złożonej budowie) jest słabo poznany, o czym świadczy mała liczba gatunków opisanych w dostępnej literaturze. Zbadane grzyby należały do gatunków: *Penicillium expansum* [215], *Daporthia actinidiae* [216], *Aspergillus niger* [212, 213, 217], *Fusarium solani* [211, 218], *F. equiseti* [218], *F. oxysporum* [218], *F. verticillioides* [218], *Penicillium chrysogenum* [219] i *Helminthosporium maydis* [220].

W literaturze światowej zdania na temat wpływu nanocząstek ditlenku tytanu na zdrowie ludzi i zwierząt są podzielone [6, 88, 104, 117, 120, 221–226]. Wynika to z faktu, że ocena toksyczności nie jest prosta i należy przy jej prowadzeniu określać wpływ TiO_2 zarówno na cały organizm, jak i na jego poszczególne elementy (np. układy, tkanki czy komórki).

Do identyfikacji zagrożeń, które mogą powodować nanocząstki ditlenku tytanu, wykorzystywano badania *in vitro* lub *in vivo* (głównie na gryzoniach i rybach) oraz badania kliniczne pacjentów, którzy ze względu na wykonywaną pracę lub kontakt z produktami nanotechnologii, byli narażeni na ekspozycję na TiO_2 [118, 223, 224]. Przy ocenie toksyczności wzięto pod uwagę nie tylko ilość (dawkę) substancji podanej lub wchłoniętej, lecz także drogę jej podawania (np. wdychanie, podanie doustne, wstrzyknięcie itp.), częstość podawania (jednorazowo, kilkakrotnie itd.), czas potrzebny do wystąpienia zmian niekorzystnych oraz zakres i stopień uszkodzenia [225]. Na podstawie analizy wyników stwierdzono, że najważniejsze czynniki, od których zależy toksyczność nanocząstek ditlenku tytanu, to ich rozmiar, kształt, zdolność do agregacji, rozpuszczalność, pole powierzchni i ładunek powierzchniowy oraz sposób aktywacji (światłem czy nie) [226].

Nanocząsteczki ditlenku tytanu, o wielkości około 20 nm, okazały się niebezpieczne dla pierwotniaka *Giardia lamblia* [225] oraz dla komórek ryb w warunkach *in vitro* [223]. Stwierdzono, że w przypadku organizmów wyższych (w tym człowieka) najwięcej nanocząstek ditlenku tytanu wnika do organizmu drogą oddechową. W zależności od średnicy są one zatrzymywane w różnych odcinkach układu oddechowego: nosowym, gardłowym, tchawicy, oskrzelach i płucach. Nos człowieka zatrzymuje nawet 50% całkowitej ilości nanocząstek obecnych w atmosferze. Ilość nanocząstek wnikających przez usta zależy natomiast od prędkości i kierunku ruchu powietrza w otoczeniu człowieka oraz od szybkości oddychania [118]. Z analizy przeprowadzonej przez Davis i in. [118] wynika, że nanocząstki tlenu tytanu(IV) mogą wykazywać właściwości karcinogenne, gdy w postaci pyłu dostaną się do pęcherzyków płucnych człowieka. Z kolei Larsen i in. [227] stwierdzili, że nanocząstki ditlenku tytanu (o średnicy < 30 nm), które dostaną się do pęcherzyków płucnych, mogą potęgować objawy reakcji uczuleniowej (alergiczej). Jest to związane ze zwiększoną adsorpcją antygenów³ na nanocząstkach TiO_2 . Indukowane przez światło reakcje utleniania, zachodzące na powierzchni cząstek ditlenku tytanu, powodują powstanie licznych stanów zapalnych w obrębie pęcherzyków płucnych. Podobny efekt obserwowali Long i in. w komórkach mikrogleju⁴ BV2 u myszy [228].

³ Antygen – substancja, która wzbudza przeciwko sobie odpowiedź odpornościową swoistą.

⁴ Mikroglej – komórki nieneuronalne centralnego układu nerwowego, tkankowo specyficzne, kontrolujące homeostazę i biorące udział w odpowiedzi immunologicznej.

Nanocząstki ditlenku tytanu o średnicy mniejszej niż 10 nm są wystarczająco małe, by przedostać się przez odstępy naturalnie występujące pomiędzy komórkami skóry. Według Dunforda i in. [229] nanocząstki ditlenku tytanu pochodzące z kremów do opalania z filtrem mogą przedostawać się w głąb ludzkiej skóry. Rodniki ROS tworzące się w reakcji fotokatalitycznej (pod wpływem słońca) mogą indukować mutacje oraz uszkodzenia DNA (tzw. genotoksyczność). Nie potwierdzają tego najnowsze badania Fujity i in. [230]. Autorzy uważają, że toksyczność ditlenku tytanu na poziomie komórkowym jest mała.

W literaturze światowej można znaleźć doniesienia dotyczące wykorzystania zjawiska fotokatalizy w leczeniu nowotworów ludzi [100, 139, 231–234]. Każda komórka nowotworowa to komórka eukariotyczna, której cykl komórkowy został zmieniony na skutek mutacji. Komórka nowotworowa dzieli się nieustannie i bez ograniczeń (proliferuje), gdyż utraciła zdolność usuwania zużytych lub uszkodzonych komórek, czyli apoptozy. Prowadzi to do powstania guzów [233]. Fotokatalitycznie aktywny ditlenek tytanu może uniemożliwić formowanie guza przez zniszczenie pierwotnej komórki nowotworowej. Według Zhanga i Suna [235] proces ma charakter dwuetapowy. W trakcie pierwszego etapu aktywowany światłem UV ditlenek tytanu wywołuje zmiany w przepuszczalności plazmolemy otaczającej komórkę nowotworową. Podczas drugiego etapu następuje dyfuzja nanocząstek ditlenku tytanu do środka komórki nowotworowej. W obecności TiO_2 aktywowanego światłem UV w komórkach są inicjowane reakcje fotochemiczne, prowadzące do wytworzenia rodników i reaktywnych form tlenu. Dochodzi do uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych i zaburzenia metabolizmu komórek nowotworowych. Według Xu i in. [236] istotnym momentem procesu jest przerwanie cyklu oddychania komórkowego przez utlenienie substancji potrzebnych do syntezy głównego nośnika energii – adenozynotrifosforanu (ATP). Linie komórek nowotworowych, u których fotokatalitycznie powstrzymano proliferację, to m.in.: Ls-174-t, LoVo [235, 236], IL13aR2R [234], HeLa [237], MCF-7, MDA-MB-468 [231] i PC-3M [238, 239]. Większość opracowanych i opisanych terapii antynowotworowych nie została wdrożona do tzw. fazy klinicznej u ludzi [232, 233].

3. Uzasadnienie i cel pracy

Ditlenek tytanu aktywowany światłem UV może być wykorzystany w procesach oczyszczania wody i powietrza oraz szeroko pojętej dezynfekcji powierzchni [7, 123, 132, 135–141]. Właściwości antibakteryjne, antywirusowe i antyprionowe fotokatalitycznie aktywnego TiO_2 zostały już stosunkowo dobrze poznane [100, 136, 148, 166–185, 199–206]. Niewiele jednak wiadomo na temat właściwości przeciwegzystowowych [166, 212–220].

Na uwagę zasługuje fakt, że większość prezentowanych prac dotyczy inaktywacji grzybów należących do rzędu drożdżaków (Saccharomycetales), głównie *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* [166, 208, 210, 214]. Drożdże piekarnicze (*Saccharomyces cerevisiae*) są naturalnym elementem mikroflory wosków, pokrywających skórkę winogron i śliw. Nie stanowią zagrożenia zdrowotnego dla człowieka. Od starożytności wykorzystuje się ich zdolności fermentacyjne w piekarnictwie, browarnictwie i gorzelnictwie. Są jednym z najpowszechniejszych modeli w biologii molekularnej i cytologii, stąd pewnie wynika ich szerokie zastosowanie w badaniach określających skuteczność fotokatalizy [210]. Z kolei *Candida albicans* stanowi naturalny składnik flory przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt. U ludzi z obniżoną odpornością wywołuje zakażenie oportunistyczne [240]. Oba gatunki należą do grzybów bezotoczkowych, co oznacza, że mają ścianę komórkową zbudowaną z hemicelulozy. Związek ten charakteryzuje się mniejszym stopniem polimeryzacji niż celuloza ($\text{SP} < 300$), mniejszą regularnością budowy i poziomem uporządkowania struktury, co sprawia, że jest mniej odporny na degradację i niszczące działanie czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych [19]. Żaden z prezentowanych gatunków nie występuje na powierzchni materiałów budowlanych. Wydaje się więc, że ich przeznaczenie jako gatunków modelowych w określaniu skuteczności np. farb fotokatalitycznych lub preparatów do pokrywania powierzchni jest zupełnie niezasadne.

Niniejsze badania podjęto z powodu braku prac na temat działania ditlenku tytanu aktywowanego światłem na wzrost grzybów pleśniowych, występujących w powietrzu budynków mieszkalnych.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu ditlenku tytanu, aktywowanego różnymi rodzajami światła, na wzrost, tworzoną biomasę oraz aktywność enzymatyczną grzybów pleśniowych z gatunku *Penicillium chrysogenum*. W badaniach wykorzystano grzyby wyizolowane z powietrza piwnicy budynku mieszkalnego oraz fitness klubu. Odmienne niż w metodykach prezentowanych w innych pracach dotyczących grzybów, w niniejszych badaniach zastosowano metodę płytkową. Zdecydowano, że interesujące będą badania nad wpływem różnych rodzajów ditlenku tytanu oraz sposobami zwiększenia jego aktywności (np. przez zastosowanie różnych podłoży, rodzajów światła itp.). Za szczególnie ważne uznano zbadanie antygrzybowych właściwości TiO_2 , aktywowanego światłem widzialnym. Dla osiągnięcia celów zaplanowano doświadczenia, w których wykorzystywano różne:

- podłoża mikrobiologiczne, przeznaczone do hodowli grzybów,
- rodzaje ditlenku tytanu,
- sposoby aktywacji ditlenku tytanu.

Zbadano również łączny wpływ aktywności wody i ditlenku tytanu na grzyby.

Do realizacji zamierzeń wykorzystano własne modyfikacje technik badawczych stosowanych w badaniach bakterii i drożdży. Określono m.in. ilość tworzonej biomasy i aktywność enzymów z grupy hydrolaz i oksyoreduktaz. Na podstawie uzyskanych wyników podjęto próbę sformułowania mechanizmu działania ditlenku tytanu aktywowanego światłem na grzyby pleśniowe.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4. Materiał i metody badań

4.1. Izolacja i identyfikacja grzybów

W doświadczeniach wykorzystano trzy szczepy grzybów pleśniowych, wyodrębnione z bioaerolu obecnego na wysokości 1–1,5 m nad podłożem, czyli ze strefy oddechowej człowieka. Były to szczepy ZUT24a i ZUT11 wyizolowane z powietrza fitness klubu w Katowicach oraz AMS1 wyizolowany z powietrza piwnicy około 80-letniego budynku mieszkalnego w Szczecinie.

Grzyby z fitness klubu izolowano za pomocą sześciostopniowego impaktora kaskadowego Andersena (model 10-710, Andersen Instruments, Atlanta, GA, USA). Szczep AMS1 wyselekcjonowano metodą sedymentacyjną Kocha. Do pobrania próbek bioaerolu wykorzystano pożywkę MEA (tabela 1) wzbogaconą w dodatek chloramfenikolu (POCH) w stężeniu $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ podłoża. Płytki pozostawiano otwarte na 5, 10 i 15 min. Szczep AMS1 pochodził z płytek eksponowanych w powietrzu piwnicy przez 10 min.

Czyste hodowle grzybów przypisano do gatunku, wykorzystując wybrane piśmiennictwo taksonomiczne [72–73, 75, 240, 241] oraz wybrane cechy morfologiczne i fizjologiczne, w tym: zdolność do wzrostu, barwę (rewers i awers), teksturę i zapach grzybni na podłożach MEA, CYA, YES i CREA, stopień zarodnikowania na pożywce YES (tabela 1).

Tabela 1. Skład podłoży stosowanych w badaniach [na podstawie 73]

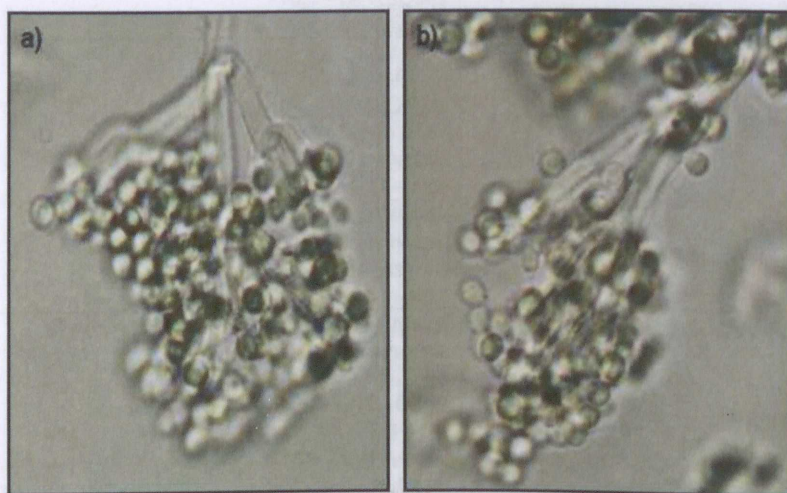
Pożywka	Składniki i ich stężenie, $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ wody destylowanej
Pożywka CYA (ang. <i>Czapek Yeast Agar</i>), $\text{pH } 6,2 \pm 0,2$	ekstrakt drożdżowy (Difco) – 5,0 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 agar Czapka – 50,0
Agar Czapka (ang. <i>Czapek Agar</i>), $\text{pH } 5,8 \pm 0,2$	KCl – 0,5 NaNO_3 – 3,0 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 sacharoza – 30,0 agar – 15,0
Pożywka MEA (ang. <i>Melt Extrat Agar</i> , MERCK), $\text{pH } 5,6 \pm 0,2$	ekstrakt słodowy – 30,0 pepton sojowy – 3,0 glukoza – 20,0 agar – 15,0
Pożywka CREA (ang. <i>Creatine sucrose</i>), $\text{pH } 8,0 \pm 0,2$	kreatyna (kwas β -metyloguanidynooctowy) – 3 sacharoza – 30,0 $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 KCl – 0,5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 czerwień bromokrezolowa – 0,05 agar bakteriologiczny (BTL) – 15

Tabela 1. Skład podłoży stosowanych w badaniach [na podstawie 73] (cd.)

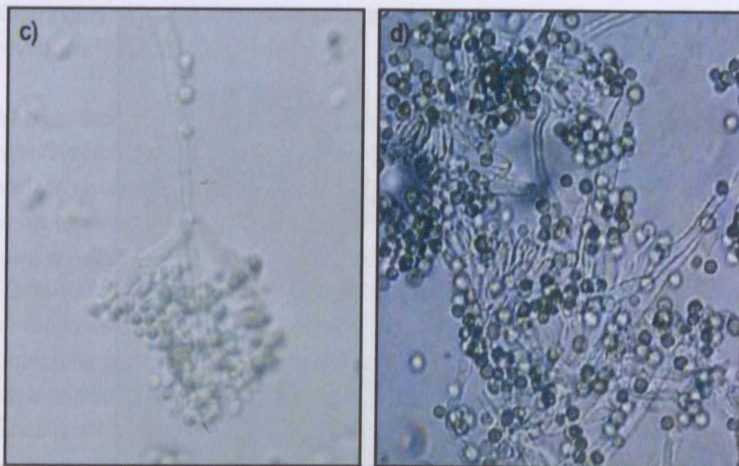
Pożywka	Składniki i ich stężenie, g · dm ⁻³ wody destylowanej
Pożywka YES (ang. <i>Yeast extract sucrose agar</i>), pH 8,0 ± 0,2	ekstrakt drożdżowy (Difco) – 20,0 sacharoza – 150,0 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5 CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,005 ZnSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01 agar bakteriologiczny (BTL) – 20,0
Pożywka PDA (ang. <i>Potato Dextrose Agar</i> , Scharlau), pH 5,9 ± 0,2	pepton ziemniaczany – 4,0 glukoza – 20,0 agar – 15,0
Pożywka SGA (ang. <i>Sabouraud Agar</i>), pH 5,9 ± 0,2	pepton – 0,5 pepton K – 0,5 glukoza – 40,0 agar – 15,0
Sól fizjologiczna	NaCl – 8,5

Opis cech morfologicznych strzępek, zarodni i zarodników wykonano na podstawie obserwacji mikroskopowych, prowadzonych z użyciem mikroskopu Nikon ECLIPSE 80i. Na fotografii 1 przedstawiono wygląd strzępek zarodnionośnych (konidioforów) oraz zarodników *Penicillium chrysogenum*. Zarodniki *Penicillium chrysogenum* miały średnicę około 2,5 µm, a przeciętna średnica strzępki wynosiła 1,5–5 µm.

Dla badanych grzybów wykonano również test Ehrlicha. Wytwarzane przez grzyby pleśniowe metabolity, takie jak kwas cyklopiazonowy i alkaloidy indolowe, w reakcji z odczynnikiem Ehrlicha (4-dwumetyloaminobenzaldehyd w 96-procentowym alkoholu etylowym) powodują powstanie kolorowych (fioletowych, czerwonych lub żółtych) pierścieni wokół grzybni. Wszystkie oznaczenia wykonano w siódmym i w czternastym dniu hodowli.



Fot. 1. Obraz mikroskopowy konidioforów *Penicillium chrysogenum*: a) szczep AMS1; b) szczep ZUT24a



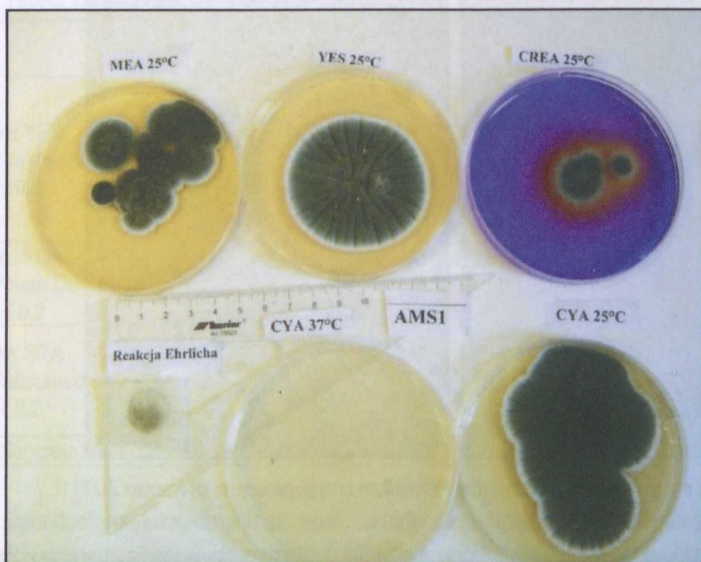
Fot. 1. Obraz mikroskopowy konidioforów *Penicillium chrysogenum*: c, d) szczep ZUT11

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 2 oraz na fot. 2 i 3. Na podstawie analizy danych potwierdzono przynależność szczepów ZUT24a, ZUT11 i AMS1 do gatunku *Penicillium chrysogenum*, Thom. (1910).

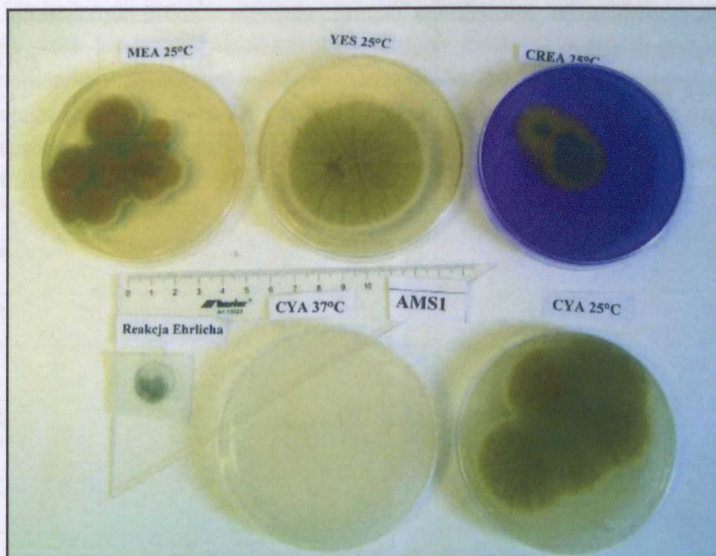
Tabela 2. Charakterystyka wybranych cech morfologicznych i fizjologicznych szczepów AMS1, ZUT11 i ZUT24 na podłożach identyfikacyjnych

Cechy fizjologiczne i morfologiczne	Szczep		
	AMS1	ZUT11	ZUT24
Wzrost na pożywce MEA, temp. 25°C (7 dzień)	+++	+++	+++
Wzrost na pożywce MEA, temp. 37°C (14 dzień)	0	0	0
Kolor awersu na pożywce MEA, temp. 25°C (7 dzień)	zielono-niebieski (żółte „wysięki”)	zielono-niebieski (żółte „wysięki”)	zielono-niebieski (żółte „wysięki”)
Wzrost na pożywce CYA, temp. 25°C (7 dzień)	+++	+++	+++
Wzrost na pożywce CYA, temp. 37°C (14 dzień)	0	0	0
Kolor rewersu na pożywce CYA, temp. 25°C, po 7 dniach	cytrynowy	cytrynowy	cytrynowy
Wzrost na pożywce YES, temp. 25°C (7 dzień)	+++	+++	+++
Wzrost na pożywce YES, temp. 37°C (14 dzień)	0	0	0
Stopień zarodnikowania na pożywce YES, temp. 25°C (7 dzień)	2	2	2
Kolor rewersu na pożywce YES, temp. 25°C (7 dzień)	żółty	żółty	żółty
Wzrost na pożywce SGA, temp. 25°C (7 dzień)	+++	+++	+++
Wzrost na pożywce SGA, temp. 37°C (14 dzień)	0	0	0
Wzrost na pożywce CRE, temp. 25°C (7 dzień)	++	++	++
Wzrost na pożywce CREA, temp. 37°C (14 dzień)	0	0	0
Zdolności kwasotwórcze (stopień odbarwienia pożywki CREA)	++	++	++
Test Ehrlicha	–	–	–
Zapach	owocowy	owocowy	owocowy

Symbole: wzrost na pożywkach MEA, CYA, YES, CREA: (0) – brak wzrostu, (+) – słaby wzrost, (++) – wzrost średni, (+++) – intensywny wzrost; stopień zarodnikowania: (0) – bardzo ubogie zarodnikowanie, (1) – zarodnikowanie ograniczone do środka kolonii, (2) – silne zarodnikowanie > 90% kolonii; zdolności kwasotwórcze: (0) – brak, (+) – małe, (++) – średnie, (+++) – mocne; test Ehrlicha: (+++) – barwny pierścień pojawił się po upływie 2–6 min, (+) – barwny pierścień pojawił się po upływie 7–10 min, (–) brak reakcji barwnej po upływie 10 min.



Fot. 2. Wyniki identyfikacji (awers) *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1) na różnych rodzajach podłoża mikrobiologicznych (MEA, YES, CREA, CYA) po siedmiu dniach inkubacji w temperaturze 25°C; testu na ciepłolubność (temperatura 37°C) na pożywce CYA oraz reakcji Ehrlicha

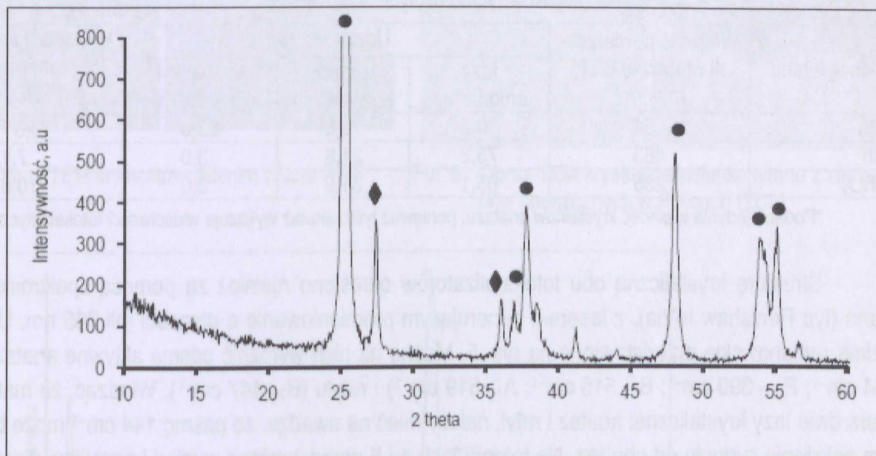


Fot. 3. Wyniki identyfikacji (rewers) *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1) na różnych rodzajach podłoża mikrobiologicznych (MEA, YES, CREA, CYA) po siedmiu dniach inkubacji w temperaturze 25°C; testu na ciepłolubność (temperatura 37°C) na pożywce CYA oraz reakcji Ehrlicha

4.2. Charakterystyka parametrów fizykochemicznych ditlenków tytanu wykorzystywanych w badaniach

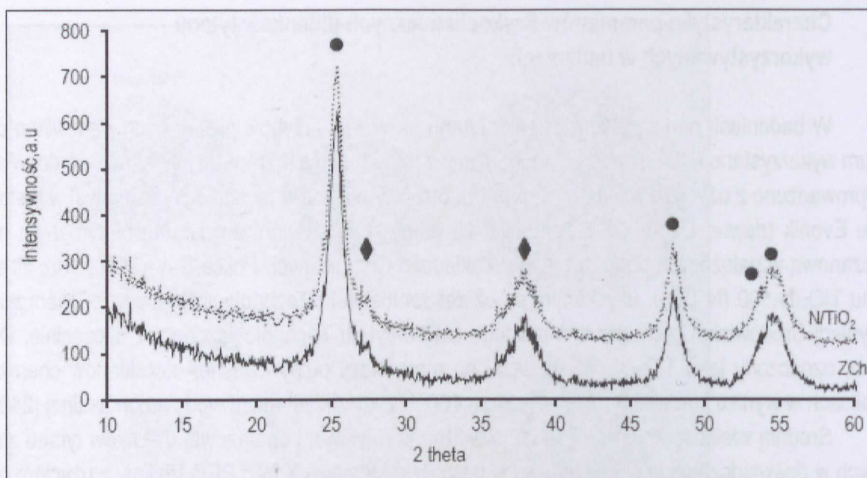
W badaniach nad wpływem ditlenku tytanu na wzrost grzybów pleśniowych *Penicillium chrysogenum* wykorzystano ditlenek tytanu, pochodzący z trzech różnych źródeł. Większą część doświadczeń przeprowadzono z użyciem ditlenku tytanu P-25, otrzymywanego w technologii chlorkowej w niemieckiej firmie Evonik (dawna Degussa). Działanie P-25 porównano z ditlenkiem tytanu, otrzymanym metodą siarczanową w należących do Grupy Azoty Zakładach Chemicznych Police S.A. (ZCh), oraz ditlenkiem tytanu $\text{TiO}_2/\text{N-100}$ (N/TiO_2), uzyskany przez zespół Instytutu Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Ditlenek tytanu, oznaczony jako $\text{TiO}_2/\text{N-100}$, powstał po modyfikacji pulpy kwaśnej¹ z zakładów chemicznych w Policach w wyniku kalcynacji w temperaturze 100°C z wykorzystaniem wody amoniakalnej [243].

Średnią wielkość kryształitów oraz udział formy rutylowej i anatazowej ditlenków tytanu zastosowanych w doświadczeniach określono za pomocą dyfraktometru X'Pert PRO Philips, z użyciem promieniowania $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 0,154056 \text{ nm}$). Próbkę proszkową skanowano w zakresie kątowym 2θ : $10\text{--}80^\circ$, z krokiem skanu 0,05. Interpretację uzyskanych dyfraktogramów przeprowadzono na podstawie bazy danych zawierającej karty wzorców JCPDS, uwzględniając wyznaczoną doświadczalnie pełną poprawkę aparaturową. Na rysunkach 3 i 4 przedstawiono wyniki analizy rentgenograficznej (XRD) ditlenku tytanu P-25. Piki przy kącie Bragga 2θ równym około 25, 38, 48, 54 i 55 odpowiadają fazie krystalicznej anatazu, a obserwowany wzrost intensywności sygnału przy 28 i 37 przypisuje się fazie krystalicznej rutyli.



Rys. 3. Dyfraktogramy XRD ditlenku tytanu P-25: ◆ – rutil, ● – anataz

¹ Pulpa kwaśna – uwodniony ditlenek tytanu zawierający kwas siarkowy(VI).



Rys. 4. Dyfraktogramy XRD ditlenku tytanu: ZCh (Grupa Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A.) i $\text{TiO}_2/\text{N}-100$ (N/TiO_2): $\blacklozenge$ – rutyl, $\bullet$ – anataz

Powierzchnia właściwa fotokatalizatorów została wyznaczona aparatem Quadrasorb SI (Quantachrome Instruments), z zastosowaniem metody BET. Analizy wykonano na podstawie izoterm adsorpcji-desorpcji par azotu w temperaturze -196°C . Pomiary poprzedzono odgazowaniem próbek w próżni w temperaturze 80°C przez 24 h. Uzyskane wyniki XRD i BET zestawiono w tabeli 3.

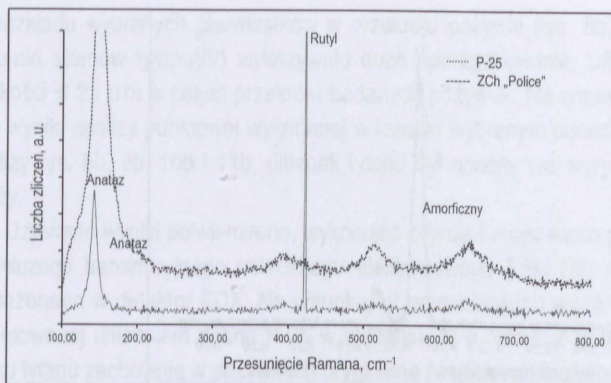
Tabela 3. Charakterystyka ditlenków tytanu użytych w badaniach

Ditlenek tytanu	Wielkość powierzchni właściwej BET, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	Udział faz, %			Wielkość kryształitów anatazu wg XRD, nm*
		faza amorficzna	anataz krystaliczny	rutyl krystaliczny	
P-25	54	0,0	75,0	25,0	25
ZCh	483	75,2	21,8	3,0	7,1
N/TiO_2	235	65,1	31,9	3,0	10,8

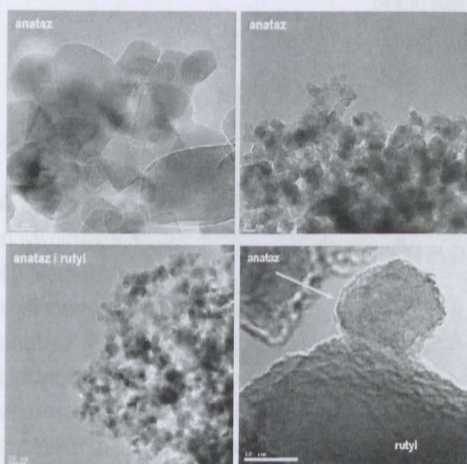
*Podano jedynie wielkość kryształitów anatazu, ponieważ tylko anataz wykazuje właściwości fotokatalityczne.

Strukturę krystaliczną obu fotokatalizatorów określono również za pomocą spektroskopu Ramana (typ Renishaw InVia), z laserem generującym promieniowanie o długości fali 785 nm. Uzyskane widma ramanowskie przedstawiono na rys. 5. Można na nich wyróżnić pasma aktywne anatazu ($E_{g(1)}$ 144 cm^{-1} ; $E_{g(2)}$ 399 cm^{-1} ; B_{1g} 515 cm^{-1} ; A_{1g} 519 cm^{-1}) i rutylu (B_{1g} 447 cm^{-1}). Wiedząc, że materiał zawiera dwie fazy krystaliczne: anataz i rutyl, należy mieć na uwadze, że pasmo 144 cm^{-1} może być efektem nałożenia sygnału od obu faz. Na fotografiach 4 i 5 przedstawiono wygląd kryształitów ditlenku tytanu P-25 i ditlenku tytanu z zakładów chemicznych w Policach (ZCh), uzyskane z wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM FEI (model Tecnai G2 F20 S-Twin), który został wyposażony w detektor EDX. Na rysunkach 6 i 7 przedstawiono mapę rozkładu pierwiastków dla obu fotokatalizatorów.

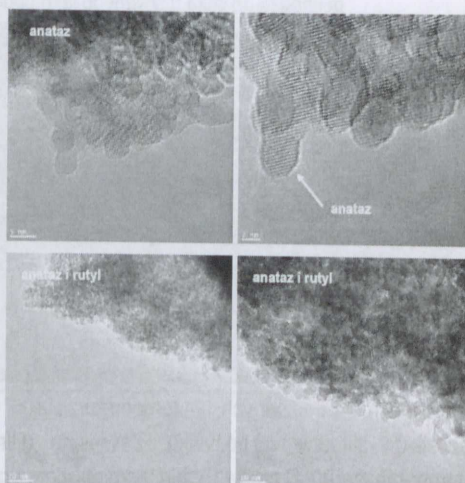
² $E_{g(n)}$ – oznaczenia modów w spektroskopii Ramana.



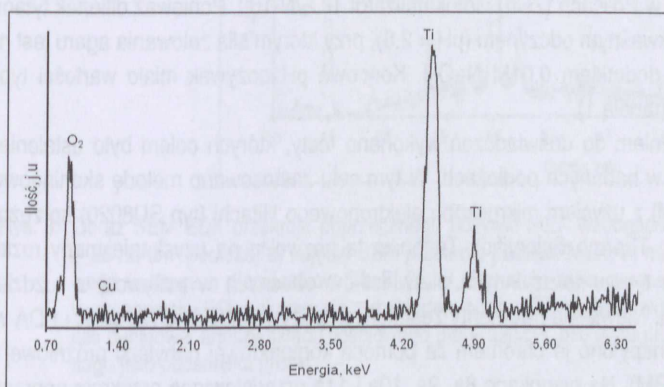
Rys. 5. Widmo Ramana dla P-25 i ZCh



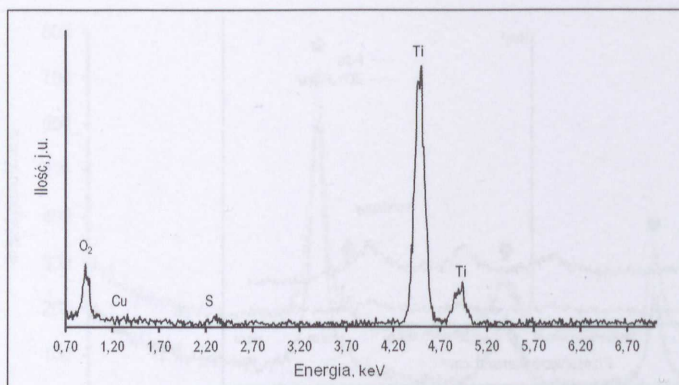
Fot. 4. Obraz TEM krystalitów ditlenku tytanu P-25



Fot. 5. Obraz TEM krystalitów ditlenku tytanu z zakładów chemicznych w Policach (ZCh)



Rys. 6. Mapa rozkładu pierwiastków w fotokatalizatorze P-25; piki Cu(II) pochodzą od sitka używanego jako podstawa próbki



Rys. 7. Mapa rozkładu pierwiastków w fotokatalizatorze z zakładów chemicznych w Policach; piki Cu(II) pochodzą od sitka używanego jako podstawa próbki

4.3. Sposoby przygotowania podłoży

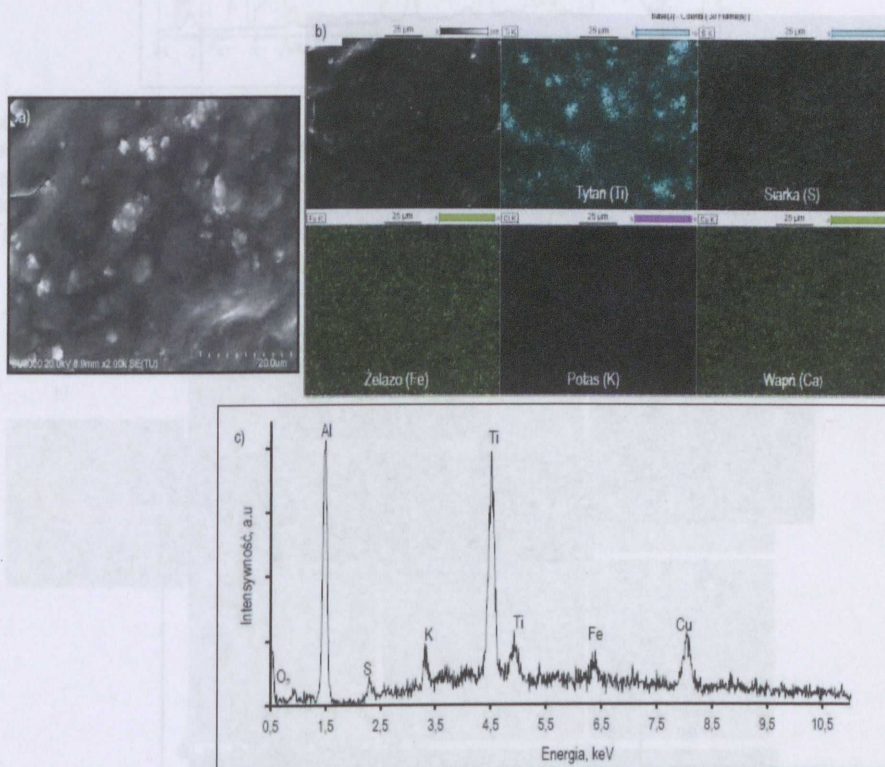
We wstępnej fazie prowadzonych doświadczeń określono przydatność czterech pożywek mikrobiologicznych do badań nad wpływem ditlenku tytanu na wzrost grzybów pleśniowych. W eksperymencie wykorzystano następujące podłoża (pożywki): MEA, CYA, SGA i PDA (tabela 1). Podłoża te przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta i po rozpuszczeniu wszystkich składników wzbogacano w ditlenek tytanu P-25. Dla każdej z badanych pożywek przygotowano trzy stężenia ditlenku tytanu: 5, 10 i 20 g na każdy dm^3 podłoża. Pożywki poddawano trzykrotnej pasteryzacji w odstępach 24-godzinnych, w temperaturze 100°C przez około 45 min (od momentu rozpuszczenia wszystkich składników pożywki). Zawiesinę ditlenku tytanu w podłożu mieszano ultradźwiękami w temperaturze 90°C przez 15 min bezpośrednio przed rozlaniem na sterylne płytki Petriego o rozmiarach $90\text{ mm} \cdot 15\text{ mm}$. Pożywkę rozlewano na grubość około 5 mm i pozostawiano do zastygnięcia agaru.

W identyczny sposób przygotowywano podłoża wzbogacone w $20\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu z zakładów chemicznych w Policach (ZCh) i fotokatalizator $\text{TiO}_2/\text{N}-100$. Ponieważ ditlenek tytanu z Polic charakteryzuje się silnie kwaśnym odczynem ($\text{pH} = 2,8$), przy którym siła żelowania agaru jest niska, pH pożywek modyfikowano dodatkiem $0,01\text{M}$ NaOH. Końcowe pH pożywek miało wartości typowe dla danego rodzaju podłoża (tabela 1).

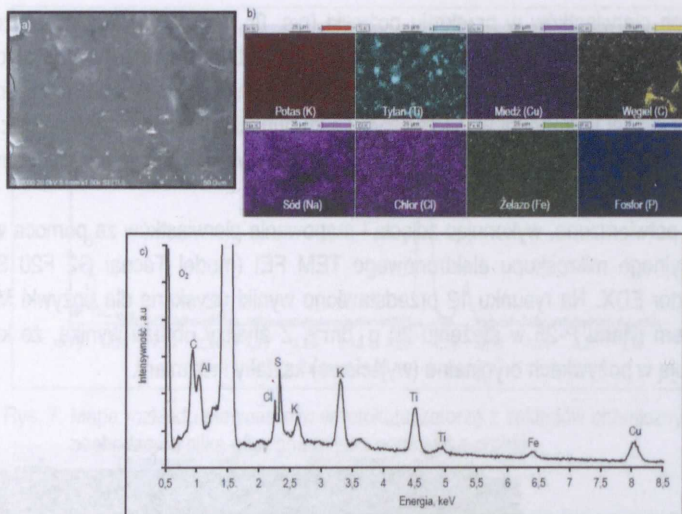
Przed przystąpieniem do doświadczeń wykonano testy, których celem było ustalenie stopnia dyspersji ditlenku tytanu w badanych podłożach. W tym celu zastosowano metodę skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) z użyciem mikroskopu elektronowego Hitachi (typ SU8020) sprzężonego ze spektrometrem EDX (typ Thermo Scientific). Technika ta pozwoliła na uzyskanie mapy rozkładu powierzchniowego ditlenku tytanu (oraz innych pierwiastków obecnych w pożywce) z rozdzielczością przestrzenną około $1\text{ }\mu\text{m}$. Niewielkie fragmenty zestalonych pożywek MEA, CYA, SGA i PDA wysuszo-no w próżni. Następnie napylono je chromem za pomocą kompaktowej napylarki próżniowej Quorum Technologies (typ Q150RM). Na rysunkach 8a, 9a, 10a i 11a przedstawiono przekroje poprzeczne pożywek: MEA, CYA, SGA i PDA wzbogaconych w 20 g ditlenku tytanu na dm^3 podłoża. Na podstawie

map rozkładu wybranych pierwiastków w przekroju pożywki (rys. 8b, 9b, 10b i 11b) stwierdzono, że rozłożenie atomów tytanu(IV) wykazywało duże uporządkowanie. DITLENEK tytanu tworzył aglomeraty o wielkości $\leq 25 \mu\text{m}$ w całym przekroju badanych pożywek. Na rysunkach 8c, 9c, 10c i 11c przedstawiono wyniki analizy punktowej wykonanej w losowo wybranym punkcie przekroju pożywki. Jak wynika z analizy rys. 8b, 9b, 10b i 11b, ditlenek tytanu był obecny we wszystkich rodzajach zastosowanych podłoży.

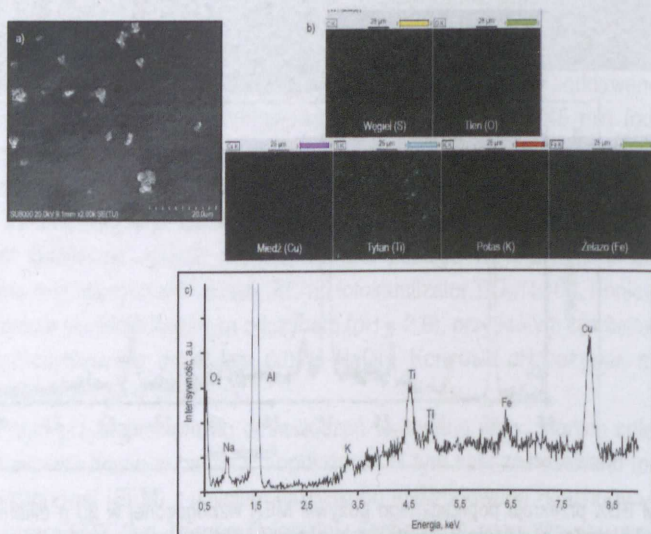
Uzyskane wyniki potwierdzono, wykonując zdjęcia i mapowanie pierwiastków za pomocą wysoko-rozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM FEI (model Tecnai G2 F20 S-Twin), wyposażonego w detektor EDX. Na rysunku 12 przedstawiono wyniki uzyskane dla pożywki MEA suplementowanej ditlenkiem tytanu P-25 w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z analizy obrazu wynika, że krystalicity ditlenku tytanu zachowują w pożywkach oryginalne (wyjściowe) kształty i rozmiary.



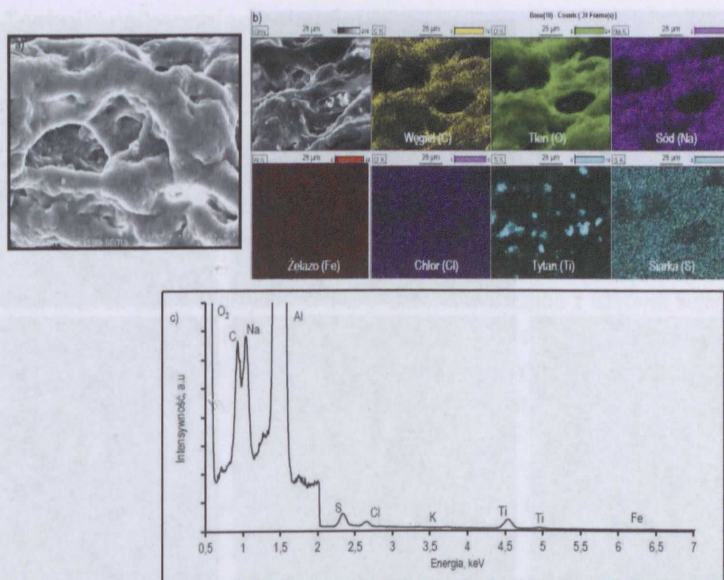
Rys. 8. Obraz SEM EDX przekroju poprzecznego pożywki MEA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm^3 podłoża: a) zdjęcie SEM przekroju pożywki MEA; b) mapa rozkładu powierzchniowego wybranych pierwiastków (Ti, S, Fe, K, Ca) wchodzących w skład pożywki MEA, obszar występowania TiO_2 pokrywa się z rozkładem tytanu (Ti) oznaczonym kolorem błękitnym; c) wyniki punktowej analizy składu ilościowego pierwiastków, piki glinu(III) pochodzą od sitka używanego jako podstawka próbki



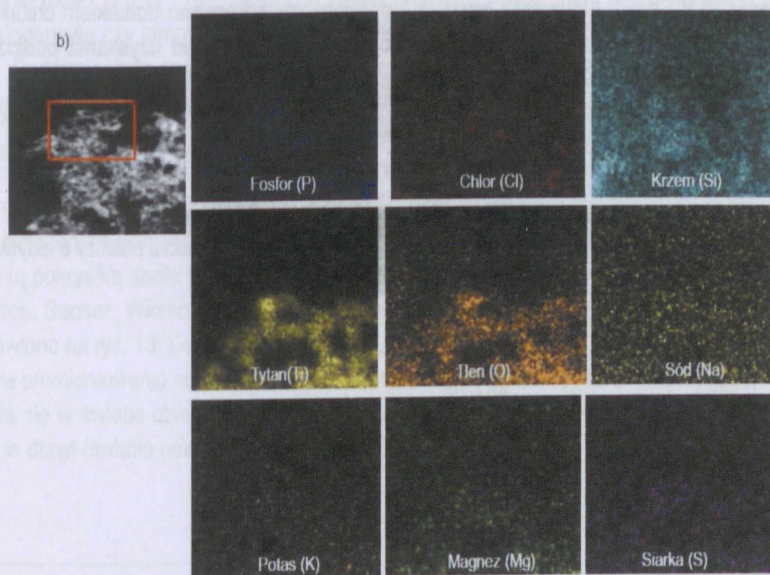
Rys. 9. Obraz SEM EDX przekroju poprzecznego pożywki CYA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm³ podłoża: a) zdjęcie SEM przekroju pożywki CYA; b) mapa rozkładu powierzchniowego wybranych pierwiastków (K, Ti, Cu, C, Na, Cl, Fe, P), wchodzących w skład pożywki CYA, obszar występowania TiO₂ pokrywa się z rozkładem tytanu (Ti) oznaczonym kolorem błękitnym; c) wyniki punktowej analizy składu ilościowego pierwiastków, piki glinu(III) pochodzą od sitka używanego jako podstawka próbek



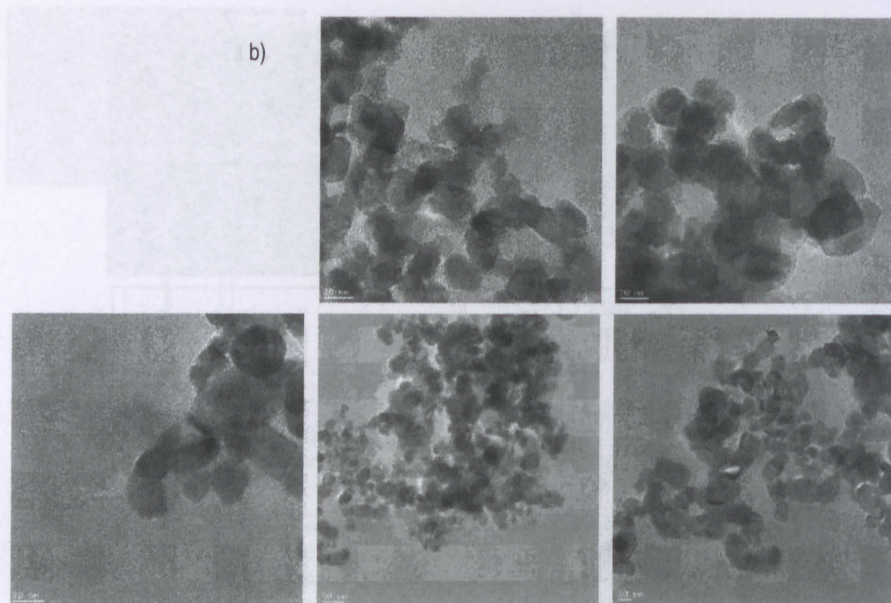
Rys. 10. Obraz SEM EDX przekroju poprzecznego pożywki SGA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm³ podłoża: a) zdjęcie SEM przekroju pożywki SGA; b) mapa rozkładu powierzchniowego wybranych pierwiastków (C, O, Cu, Ti, K, Fe), wchodzących w skład pożywki SGA, obszar występowania TiO₂ pokrywa się z rozkładem tytanu (Ti) oznaczonym kolorem błękitnym; c) wyniki punktowej analizy składu ilościowego pierwiastków, piki glinu(III) pochodzą od sitka używanego jako podstawka próbek



Rys. 11. Obraz SEM EDX przekroju poprzecznego pożywki PDA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm^3 podłoża: a) zdjęcie SEM przekroju pożywki PDA; b) mapa rozkładu powierzchniowego wybranych pierwiastków (C, O, Na, Fe, Cl, Ti, S), wchodzących w skład pożywki PDA, obszar występowania TiO_2 pokrywa się z rozkładem tytanu (Ti) oznaczonym kolorem błękitnym; c) wyniki punktowej analizy składu ilościowego pierwiastków, piki glinu(III) pochodzą od sitka używanego jako podstawka próbek



Rys. 12. Obraz TEM EDX przekroju poprzecznego pożywki MEA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm^3 podłoża: a) mapa rozkładu powierzchniowego wybranych pierwiastków (P, Cl, Si, Ti, O, Na, K, Mg, S), wchodzących w skład pożywki MEA, obszar występowania TiO_2 pokrywa się z warstwą tytanu (Ti) – kolor żółty



Rys. 12. Obraz TEM przekroju poprzecznego pożywki MEA wzbogaconej w 20 g ditlenku tytanu P-25 na dm^3 podłoża: b) przekrój pożywki MEA (cd.)

Wpływ aktywności wody na wzrost grzybów pleśniowych *Penicillium chrysogenum* badano w hodowlach na pożywkach kontrolnych CYA (tabela 1) i pożywkach suplementowanych ditlenkiem tytanu w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Aktywność wody (a_w) pożywek modyfikowano dodatkiem chlorku sodu. W tabeli 4 zestawiono ilości chlorku sodu dodane do pożywki CYA w celu uzyskania podłoży o a_w : 0,999; 0,997; 0,975; 0,950; 0,900 oraz 0,850. Ilość chlorku sodu dodanego do podłoży została wyliczona na podstawie pracy Mazurkiewicz i in. [244]. Rzeczywista aktywność wody pożywek została zmierzona za pomocą wskaźnika DE 202 Aqua Lite. Stwierdzono, że błąd pomiędzy prognozowaną a odnotowaną aktywnością wody wyniósł 0,5–0,75%.

Tabela 4. Masa chlorku sodu dodana do dm^3 pożywki CYA w celu uzyskania podłoży o aktywnościach wody (a_w): 0,999; 0,997; 0,975; 0,950; 0,900 i 0,850

a_w	NaCl, g
0,999	0,100
0,997	5,750
0,975	46,075
0,950	92,150
0,900	172,780
0,850	230,370

4.4. Techniki wykonania posiewów

Posiewy grzybów *Penicillium chrysogenum* na płytki wykonano, umieszczając na środku płytek Petriego z podłożem 5 μ l zawiesiny zarodników. Do przygotowania zawiesiny używano 10-dniowych czystych kultur grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczone AMS1, ZUT11 i ZUT24a) zaszczonejonych w próbkach mikrobiologicznych na skosach MEA (tabela 1). Hodowlę grzybów na skosach prowadzono w temperaturze 25°C. Do próbek (ze skosem) dodawano 8 ml sterylnej soli fizjologicznej o składzie podanym w tabeli 1. Powstałą mieszaninę wytrząsano intensywnie (wytrząsarka Vortex) przez 3 min. Ilość zarodników grzybów w 1 cm^3 zawiesiny zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu optycznego Nikon ECLIPSE 80i. Uzyskany wynik skorelowano ze zmętnieniem zawiesiny według skali McFarlanda³ (BIOMÈRIEUX). Do posiewu wykorzystywano zawiesiny o gęstości zarodników 10^6 – $10^7 \cdot \text{cm}^{-3}$. Odpowiadało to wartości 5 w skali McFarlanda.

4.5. Charakterystyka światła wykorzystywanego do aktywacji tlenu tytanu(IV)

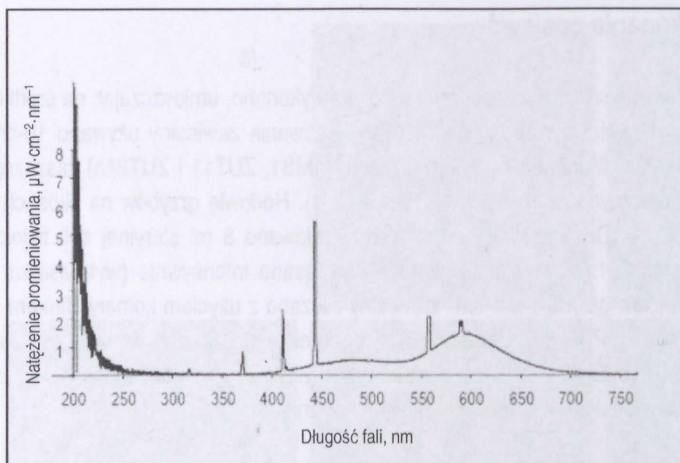
W badaniach nad wpływem ditlenu tytanu aktywowanego światłem używano dwóch rodzajów światła: światła widzialnego⁴ i światła ultrafioletowego UVA.

Badania nad wpływem światła widzialnego na aktywację ditlenu tytanu prowadzono w cieplarni wyposażonej w źródło światła sztucznego i szklaną szybę, wbudowaną w drzwi zewnętrzne. Źródłem światła były cztery żarówki halogenowe o mocy 50 W każda, które emitowały światło widzialne (VIS) o natężeniu około $120 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Sztuczne źródła promieniowania, takie jak: elektryczne świetlówki, żarówki halogenowe czy lampy ksenonowe, emitują oprócz światła widzialnego niskie ilości promieniowania UV. Podobnie było w przypadku zastosowanego oświetlenia. Natężenie światła UV (obecnego w świetle widzialnym emitowanym przez zastosowane żarówki halogenowe) wynosiło około $0,2 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Zgodnie z normami ISO [245] pasmo promieniowania elektrycznego o długości fali między 315 a 400 nm jest zaliczane do promieniowania UVA. W związku z tym promieniowanie widzialne zastosowane w doświadczeniach określano jako promieniowanie UV-VIS.

Natężenie światła dochodzącego do pożywk i rosnących na niej grzybów zostało określone pod powierzchnią pokrywką szalki Petriego za pomocą miernika Radiation Intensity Meter LB901/WCM3 & PD 204AB cos. Sensor. Widmo emisyjne światła transmitowanego przez zastosowane żarówki halogenowe przedstawiono na rys. 13. Doświetlanie światłem sztucznym prowadzono przez 8 h dziennie. Największe natężenia promieniowania obserwowano w zakresie długości fali 350–750 nm (rys. 13). Dalsza inkubacja odbywała się w świetle dziennym, które dochodziło do inkubowanych płytek przez szklaną szybę wbudowaną w drzwi (światło naturalne).

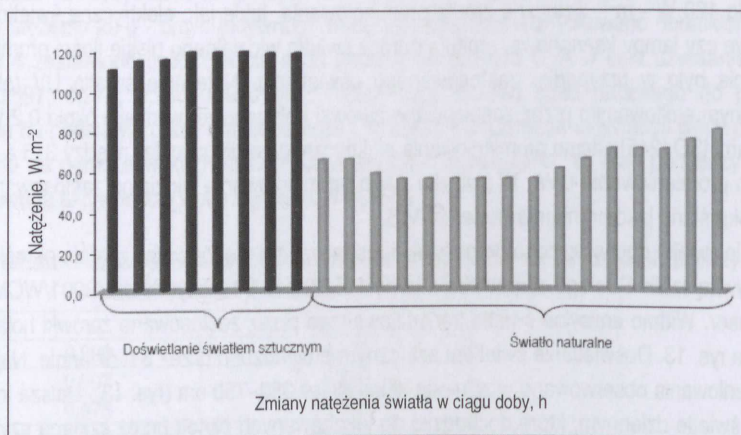
³ Skala McFarlanda pozwala na określenie ilości mikroorganizmów w 1 cm^3 na podstawie zmętnienia próbki. Zmętnienie roztworów w skali powstaje wskutek zmieszania chlorku baru i kwasu siarkowego (tworzy się osad siarczanu baru).

⁴ Światłem widzialnym potocznie nazywa się widzialną część promieniowania elektromagnetycznego, która jest odbierana przez siatkówkę oka ludzkiego. Za wartości graniczne przyjmuje się promieniowanie o długości fali pomiędzy 380–780 nm. W naukach ścisłych (fizyka, optyka) pojęcie światła widzialnego obejmuje zakres między 400–700 nm [245].



Rys. 13. Widmo zastosowanego źródła promieniowania widzialnego UV-VIS

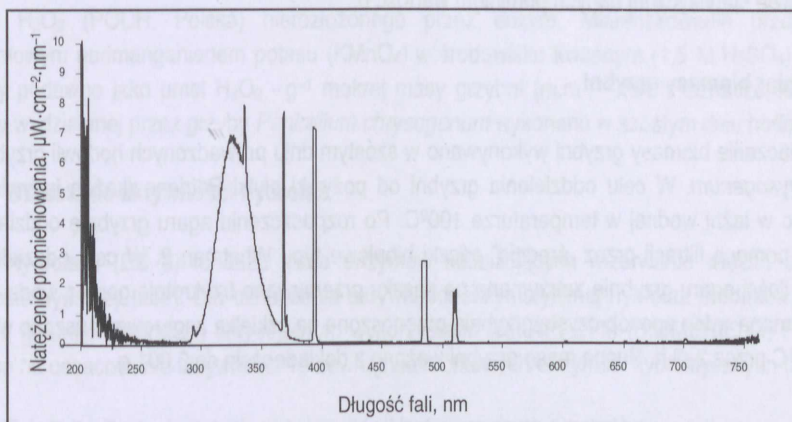
Laboratorium Biotechnologii, w którym prowadzono badania, jest wyposażone w okna połaciowe. Natężenie światła UV, mierzone w słoneczny dzień przy szybie okiennej laboratorium, wynosiło około $0,2 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Doświetlanie płytek światłem sztucznym, a następnie ich inkubacja w świetle dziennym miały na celu symulację naturalnego cyklu dobowego w standardowym pomieszczeniu mieszkalnym. Cykl dobowy średnich zmian natężenia światła w różnych porach roku przedstawiono na rys. 14. Temperaturę w cieplarni utrzymywano na poziomie 25°C .



Rys. 14. Uśrednione (dla pór roku) dobowe zmiany natężenia światła pod górną warstwą płytki Petriego

Uzyskane wyniki porównano z wartościami otrzymanymi w ciemności. Dlatego część płytek Petriego z zarodnikami grzybów zaszczerpiętymi na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych ditenkiem tytanu inkubowano w temperaturze 25°C , w termostacie pozbawionym źródła światła.

W celu określenia wpływu działania światła na aktywację ditlenku tytanu przeprowadzono również serię doświadczeń z wykorzystaniem promieniowania UVA. Jako źródło światła UVA wykorzystano lampę Phillips wyposażoną w cztery żarówki o mocy 20 W każda. Płytki Petriego z rosnącymi na nich grzybami znajdowały się w odległości 0,3 m. Widmo emisyjne zastosowanego źródła światła promieniowania przedstawiono na rys. 15. Największe natężenia promieniowania obserwowano w zakresie długości fali 300–400 nm (rys. 15).



Rys. 15. Widmo zastosowanego źródła promieniowania UVA

W pierwszej serii doświadczeń zastosowano jednorazowe naświetlanie przez 10 min, a w drugiej serii – trzykrotne naświetlanie (w odstępach dwudniowych), trwające 30 min. Aktywację ditlenku tytanu światłem UVA przeprowadzono w dniach: wykonania posiewu (dzień 0), po drugim i po czwartym dniu hodowli. Na czas iluminacji światłem UVA płytki Petriego pozostawały otwarte. Odlegość płytek od źródła promieniowania wynosiła 0,3 m. Jak wynika z literatury, 99% promieniowania UV jest zatrzymywane przez szkło sodowo-potasowe, z którego są wykonane szalki Petriego [246]. Po zakończeniu naświetlania płytki zamykano i umieszczano w cieplarni (w ciemności, w temperaturze 25°C).

4.6. Sposoby wykonywania pomiarów

4.6.1. Pomiar średnicy kolonii

Doświadczenia nad wpływem ditlenku tytanu i aktywności wody na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum* prowadzono w okresie 8–10 dni w temperaturze 25°C. W drugim, czwartym, szóstym, ósmym i dziesiątym dniu hodowli mierzono średnicę kolonii. Do pomiarów wykorzystywano licznik automatyczny wraz z oprogramowaniem umożliwiającym pomiar średnicy kolonii grzybnicy (aCOLyte 7500, Symbios, USA) z dokładnością 0,5 mm.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczano wskaźnik dziennego przyrostu promienia kolonii (mm · dzień⁻¹). W tym celu wykorzystywano równanie regresji liniowej:

$$r = a \cdot t + b$$

(4)

gdzie: r – promień kolonii (mm);

t – czas inkubacji (dzień);

a – wskaźnik dziennego przyrostu promienia kolonii;

b – wskaźnik opóźnienia wzrostu (lag faza; λ).

Jak wykazali Dantigny i in. [247] na podstawie prowadzonych obserwacji mikroskopowych rosnącej grzybni, lag faza nie ma istotnego wpływu na wskaźnik dziennego przyrostu grzybni. Z tego powodu w analizie statystycznej danych pominięto wartość b .

4.6.2. Pomiar biomasy grzybni

Oznaczenie biomasy grzybni wykonywano w szóstym dniu prowadzonych hodowli grzybów *Penicillium chrysogenum*. W celu oddzielenia grzybni od pożywki płytki Petriego (każdą indywidualnie) umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 100°C. Po rozpuszczeniu agaru grzybnię oddzielano od pożywki za pomocą filtracji przez „średnie” sączki bibułowe typu Whatman 2. W celu oddzielenia jak największej ilości agaru grzybnię zatrzymaną na sączku przemywano trzykrotnie gorącą wodą destylowaną. Otrzymaną w ten sposób czystą grzybnię przenoszono na szkiełka zegarowe i suszono w temperaturze 105°C przez 2–3 h. Suchą masę grzybni ważono z dokładnością do 0,001 g.

4.7. Określenie aktywności enzymatycznej

4.7.1. Określenie aktywności esteraz

Esterazy (EC 3.1) to ogólne określenie enzymów z grupy hydrolaz rozkładających wiązania estrowe w cząsteczkach tłuszczów z udziałem wody. Są enzymami niespecyficznymi substratowo, wydzielanymi zewnątrzkomórkowo [248]. Dla oznaczenia całkowitej aktywności enzymatycznej esteraz produkowanych przez grzyby z gatunku *Penicillium chrysogenum* zmodyfikowano metodę opisaną przez Leštana i in. [249]. Jej zasada opiera się na założeniu, że aktywność enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy jest wprost proporcjonalna do ilości wytworzonej fluoresceiny. W oznaczeniach wykorzystywano bezbarwny octan fluoresceiny (FDA, Sigma Aldrich), który ulegał hydrolizie do fluoresceiny – związku wykazującego właściwości fluoryzujące. Ilość fluoresceiny po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze 25°C oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm (spektrofotometr Jasco V-650PC). Aktywność enzymatyczną grzybów wyznaczano z krzywych kalibracyjnych wykonanych dla pożywek kontrolnych i pożywek wzbogaconych ditlenkiem tytanu (co miało na celu eliminację błędów związanych z możliwością reakcji pomiędzy ditlenkiem tytanu i octanem fluoresceiny). Krzywe wzorcowe wyznaczono dla standardów zawierających 0, 20, 50, 70 i 150 µg czystej fluoresceiny. Wartość aktywności enzymatycznej podawano w mikrogramach fluoresceiny uwolnionej w ciągu godziny, przeliczonej na gram mokrej biomasy grzybni *Penicillium chrysogenum*. Oznaczenia aktywności esteraz wydzielanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* przeprowadzono w szóstym dniu hodowli.

4.7.2. Określenie aktywności katalazy

Katalaza (EC 1.11.1.6) to enzym z grupy oksyreduktaz, który katalizuje proces rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu [248]. Dla oznaczenia aktywności enzymatycznej katalazy produkowanej przez grzyby z gatunku *Penicillium chrysogenum* zmodyfikowano metodę opisaną przez Brzezińską i Włodarczyk [251].

W celu określenia aktywności katalazy wydzielanej przez grzyby wyznaczono ilość nadtlenu wodoru H_2O_2 (POCH, Polska) nierozłożonego przez enzym. Miareczkowanie przeprowadzano 0,02-molowym nadmanganianem potasu ($KMnO_4$) w środowisku kwaśnym (1,5 M H_2SO_4). Aktywność katalazy podawano jako $\mu mol\ H_2O_2 \cdot g^{-1}$ mokrej masy grzybni (m.m.) $\cdot min^{-1}$. Oznaczenie aktywności katalazy wydzielanej przez grzyby *Penicillium chrysogenum* wykonano w szóstym dniu hodowli.

4.7.3. Określenie aktywności hydrolaz

Hydrolazy (EC 3) to duża klasa enzymów katalizujących rozerwanie wiązań chemicznych w procesie hydrolizy [252]. Dla oznaczenia aktywności enzymatycznej hydrolaz produkowanych przez grzyby z gatunku *Penicillium chrysogenum* wykorzystano test API ZYM (BIOMÈRIEUX, Francja). Pozwala on na oszacowanie aktywności 19 zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych (tabela 5).

Tabela 5. Zestawienie badanych enzymów i hydrolizowanych substratów

Numer studzienki	Nazwa enzymu	Hydrolizowany substrat
1	kontrola	—
2	fosfataza zasadowa	2-naftylofosforan
3	esteraza (C4)	2-naftylomaślan
4	lipaza esterazowa (C8)	2-naftylokapronian
5	lipaza (C14)	2-naftylomirystylan
6	arylamidaza leucynowa	L-leucylo-2-naftyloamid
7	arylamidaza walinowa	L-walinylo-2-naftyloamid
8	arylamidaza cystynowa	L-cystynylo-2-naftyloamid
9	trypsyna	N-benzylo-DL-arginino-2-naftyloamid
10	chymotrypsyna	N-glutarylo-fenylalanino-2-nanaftyloamid
11	fosfataza kwaśna	2-naftylofosforan
12	fosfohydrolaza naftolu-AS-BI	fosforan naftolu-AS-BI
13	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α -D-galaktopiranoza
14	β -galaktozydaza	2-naftylo- β -D-galaktopiranoza
15	β -glukuronidaza	naftolu-AS-BI- β -D-glukuronid
16	α -glukozydaza	2-naftylo- α -D-glukopiranoza
17	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β -D-glukopiranoza
18	N-acetylo- β -glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetylo- β -D-glukozyloamid
19	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α -D-mannopiranoza
20	α -fukozydaza	2-naftylo- α -L-fukopiranoza

Testy API ZYM wykonywano w szóstym dniu hodowli, pobierając zarodniki ze środka grzybni. Sporządzano z nich zawiesinę o gęstości 5 w skali McFarlanda (BIOMÈRIEUX, Francja). W każdej studzience na pasku testowym umieszczano 65 μl zawiesiny. Paski inkubowano przez 4 h w temperaturze

rze 37°C. Po zakończeniu inkubacji do każdej studzienki na pasku testowym dodawano po kropli odczynnika ZYM A, a następnie po kropli odczynnika ZYM B. Odczytu dokonywano wizualnie, porównując paski ze skalą barwną dostarczoną przez producenta. Wyniki przedstawiano w 6-punktowej skali porównawczej (0–5). W zależności od intensywności reakcji przyjęto, że: 0 – oznacza brak aktywności enzymu, 1 – oznacza aktywność 5 nmoli, 2 – 10 nmoli, 3 – 20 nmoli, 4 – 30 nmoli, 5 – 40 i więcej nmoli hydrolizowanego substratu.

4.8. Statystyczne opracowanie wyników

Wszystkie doświadczenia dotyczące wpływu ditlenku tytanu aktywowanego światłem na wzrost i przyrost biomasy grzybów z gatunku *Penicillium chrysogenum* oraz analizy aktywności produkowanych przez nie esteraz i katalaz wykonano w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna obejmowała analizę wariancji wykonaną testem ANOVA na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Różnice istotne statystycznie pomiędzy wzrostem grzybów w ciemności i świetle UV-VIS na poziomie istotności $p \leq 0,05$ oznaczano na rysunkach czarnymi strzałkami. Do obliczeń zastosowano program Excel i Statistica (wersja 8,0).

4.9. Schemat przeprowadzonych doświadczeń

W celu zwiększenia przejrzystości opracowania w tabeli 6 zestawiono w kolejności chronologicznej przeprowadzone doświadczenia oraz krótki opis analiz i oznaczeń.

Tabela 6. Kolejność przeprowadzonych doświadczeń oraz zestawienie wykonanych w czasie ich trwania analiz i oznaczeń

Cel doświadczenia	Wykonane analizy i oznaczenia
Określenie wpływu rodzaju podłoża i światła UV-VIS na wzrost grzybów z gatunku <i>Penicillium chrysogenum</i>	analiza średnich dziennych przyrostów kolonii, mm · dzień ⁻¹
Określenie wpływu stężenia ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS oraz rodzaju podłoża na wzrost grzybów z gatunku <i>P. chrysogenum</i>	analiza średnich dziennych przyrostów kolonii, mm · dzień ⁻¹
Określenie wpływu 20 g · dm ⁻³ ditlenku tytanu (P-25, ZCh i TiO ₂ /N-100) aktywowanego światłem UV-VIS na wzrost grzybów z gatunku <i>P. chrysogenum</i> na podłożach MEA, CYA, SGA i PDA	analiza średnich dziennych przyrostów kolonii, mm · dzień ⁻¹
Określenie wpływu 20 g · dm ⁻³ ditlenku tytanu P-25, aktywowanego jednorazowo światłem UV w czasie 10 min i 3 · 30 min, na wzrost grzybów z gatunku <i>P. chrysogenum</i> na podłożu CYA	analiza średnich dziennych przyrostów kolonii, mm · dzień ⁻¹ ; określenie aktywności esteraz, katalaz i hydrolaz
Określenie wpływu 20 g · dm ⁻³ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS i aktywności wody na wzrost grzybów z gatunku <i>P. chrysogenum</i> na podłożu CYA	analiza średnich dziennych przyrostów kolonii, mm · dzień ⁻¹ ; przyrost biomasy, określenie aktywności esteraz i hydrolaz

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

5. Wpływ rodzaju podłoża i światła na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum*

Podczas pierwszego etapu badań określono znaczenie rodzaju podłoża mikrobiologicznego oraz dawki ditlenku tytanu P-25, aktywowanego światłem UV-VIS, na wzrost grzybów z rodzaju *Penicillium chrysogenum*.

Stwierdzono, że w trakcie ósmiodniowej inkubacji w ciemności na pożywkach kontrolnych (bez ditlenku tytanu P-25) grzyby charakteryzowały się zróżnicowanym tempem wzrostu. Do badań wybrano pożywki różniące się pod względem składu. Pożywka CYA zawierała sacharozę, MEA – ekstrakt słodowy, SGA – glukozę, a PDA skrobię (tabela 1). Dla rosnących grzybów związki te stanowiły źródło węgla lub energii albo węgla i energii jednocześnie. Najstabszy wzrost grzybów AMS1 i ZUT11 obserwowano na podłożu MEA (tabela 7). Z kolei szczep ZUT24a najmniejsze dzienne przyrosty kolonii osiągnął na pożywce SGA. Na pożywkach PDA, CYA i SGA największymi dziennymi przyrostami kolonii charakteryzował się szczep ZUT11, wyizolowany z powietrza fitness klubu. Na wszystkich rodzajach zastosowanych podłoży najmniejsze dzienne przyrosty kolonii odnotowano dla szczepu AMS1, wyizolowanego z piwnicy budynku mieszkalnego. Nie zaobserwowano podobieństw w tempie wzrostu pomiędzy szczepami ZUT11 i ZUT24a pochodzącymi z tego samego środowiska (tabela 7).

Tabela 7. Wpływ rodzaju podłoża na średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane w czasie ośmiu dni hodowli prowadzonej w ciemności

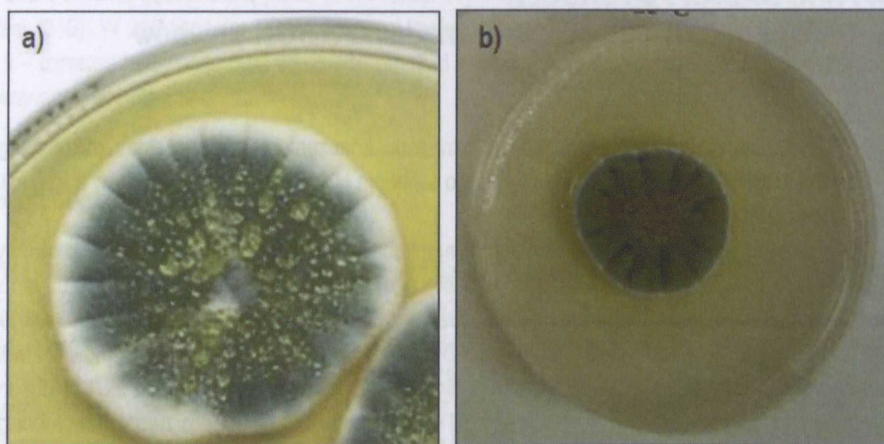
Szczep	Średnie dobowe przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹			
	rodzaj pożywki			
	MEA	CYA	SGA	PDA
AMS1	1,71 $\pm$ 0,14	3,75 $\pm$ 0,17	4,03 $\pm$ 0,96	3,17 $\pm$ 0,94
ZUT11	2,72 $\pm$ 0,02	5,50 $\pm$ 1,30	6,64 $\pm$ 0,05	4,28 $\pm$ 0,64
ZUT24a	4,58 $\pm$ 0,43	3,83 $\pm$ 0,00	3,81 $\pm$ 0,46	4,25 $\pm$ 0,38

W trakcie trwania doświadczenia prowadzono również obserwacje makroskopowe, m.in. zmiany barwy kolonii i pożywki (rewers i awers), wytwarzanych „wysieków” (ang. *exudate*¹) na podłożu MEA itp. (fot. 6). Stwierdzono, że pomimo wyraźnego zróżnicowania pod względem tempa wzrostu, badane szczepy charakteryzowały się małą zmiennością morfologii kolonii.

Grzyby *Penicillium chrysogenum* rosnące na pożywkach kontrolnych charakteryzowały się zmienną reakcją na światło UV-VIS. Światło wpływało hamująco lub stymulująco na średnie dzienne przyrosty kolonii. Rodzaj efektu zależał od zastosowanej pożywki i szczepu. Porównując wyniki otrzymane podczas inkubacji w świetle z danymi uzyskanymi dla hodowli w ciemności (tabela 7), stwierdzono, że szybkość wzrostu większości badanych szczepów *P. chrysogenum* była hamowana przez światło UV-VIS. W tabeli 8 strzałkami zaznaczono rodzaj obserwowanego efektu działania światła. Przeprowa-

¹ Za Frisvad [72].

dzona analiza wariancji wykazała, że w hodowlach na pożywce MEA wpływ światła na tempo wzrostu grzybów był istotny przy $p \leq 0,05$.



Fot. 6. Cechy morfologiczne charakterystyczne dla grzybów *Penicillium chrysogenum*, obserwowane w czasie prowadzenia hodowli na podłożach MEA i CYA (awers): a) żółte „wysięki” *P. chrysogenum* (ZUT24a) na podłożu MEA; b) żółte zabarwienie podłoża CYA obserwowane wokół grzybni (ZUT24a)

Tabela 8. Wpływ rodzaju podłoża na średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane w czasie ośmiu dni hodowli prowadzonej w świetle UV-VIS

Szczep	Średnie dobowe przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹			
	rodzaj pożywki			
	MEA	CYA	SGA	PDA
AMS1	3,36 $\pm$ 0,25* $\uparrow$	3,00 $\pm$ 0,00 $\downarrow$	3,00 $\pm$ 0,33 $\downarrow$	3,50 $\pm$ 0,72 $\uparrow$
ZUT11	4,86 $\pm$ 0,54* $\uparrow$	3,11 $\pm$ 0,38* $\downarrow$	2,97 $\pm$ 0,34* $\downarrow$	1,75 $\pm$ 0,14* $\downarrow$
ZUT24a	2,47 $\pm$ 0,21* $\downarrow$	3,08 $\pm$ 0,30 $\downarrow$	3,25 $\pm$ 0,43 $\downarrow$	3,56 $\pm$ 0,73 $\downarrow$

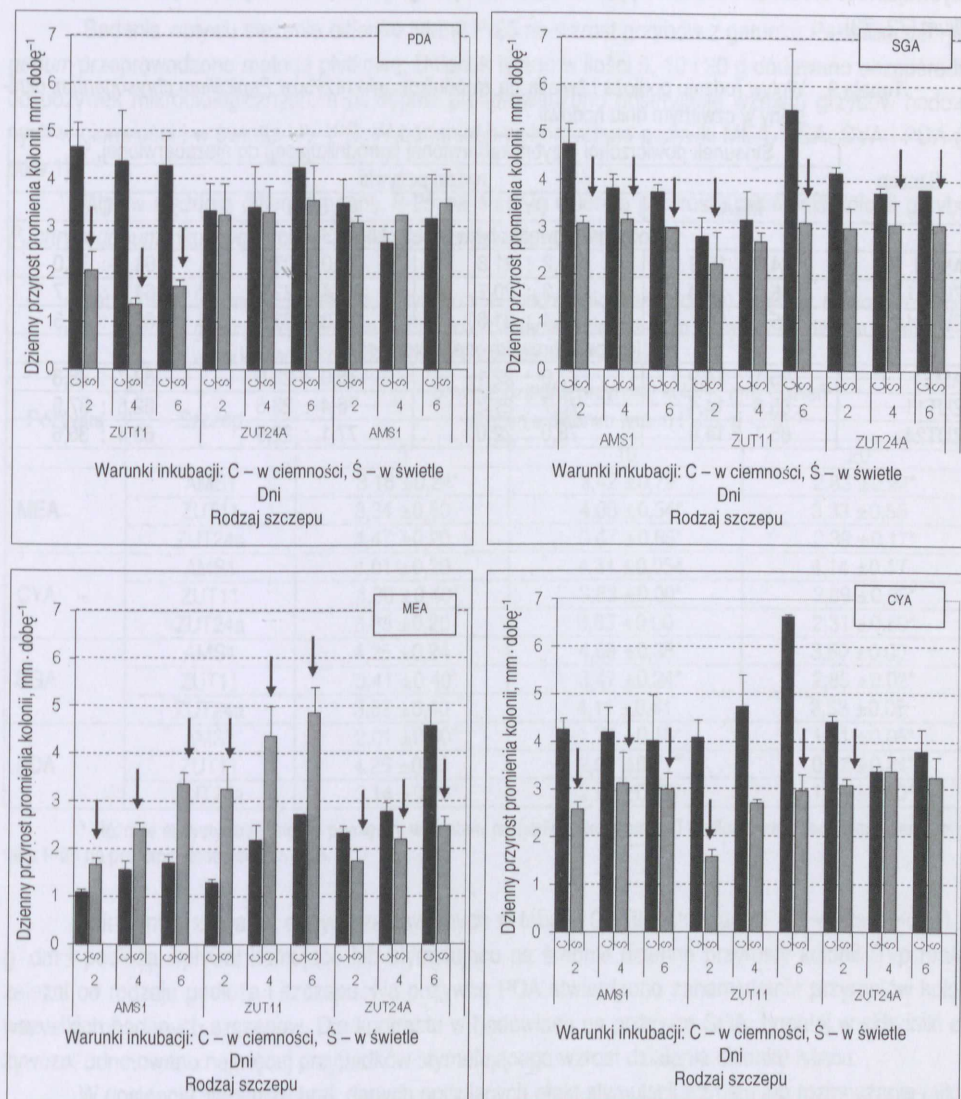
$\uparrow$ – stymulacja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle; $\downarrow$ – inhibicja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle.

* Różnice istotne statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Obserwacje zmienności cech morfologicznych prowadzone w czasie trwania doświadczenia wskazują, że wpływ światła na wzrost grzybów był silniejszy w pierwszych dniach prowadzenia hodowli (rys. 16). Wydaje się, że od szóstego dnia inkubacji następowała adaptacja grzybów do warunków hodowli, co skutkowało stopniowym zmniejszeniem różnic pomiędzy średnimi dziennymi przyrostami kolonii.

Światło widzialne stosowane w doświadczeniu w małym stopniu wpływało na zmiany morfologii i koloru kolonii badanych grzybów. Grzybnia *Penicillium chrysogenum* jest jasno zabarwiona, a charakterystyczny dla tego gatunku zielononiebieski lub szary kolor (zależnie od podłoża) pochodzi od zabarwienia komórek zarodnikonośnych i zarodników. Zabarwienie grzybni pojawia się około trzeciego dnia hodowli, a jego intensywność zwiększa się w miarę upływu czasu. W ósmym dniu hodowli zarodnikująca grzybnia obejmowała całą płytę Petriego. Z tego powodu średni poziom zarodnikowania, wyrażony jako stosunek powierzchni grzybni zabarwionej do niezabarwionej, oznaczono w czwartym dniu hodow-

li. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 9. Jak wynika z analizy danych otrzymanych w hodowlach prowadzonych na podłożach kontrolnych: MEA, CYA, SGA i PDA światło w niewielkim stopniu (0,2–2,0%) wpływało na poziom zarodnikowania grzybów *Penicillium chrysogenum*. Natomiast poziom zarodnikowania na różnych pożywkach można uszereżować następująco: MEA > CYA ≈ SGA > PDA.



Rys. 16. Zmiany dziennych przyrostów promienia kolonii szczepów AMS1, ZUT11, ZUT241 ($\pm$ odchylenie standardowe) w drugim, czwartym i szóstym dniu hodowli na pożywkach MEA, CYA, SGA i PDA w warunkach inkubacji w ciemności i w świetle UV-VIS

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że grzyby *Penicillium chrysogenum* charakteryzowały się zróżnicowanym poziomem aktywności życiowej. Zależał on ściśle od zastosowanego pod-

łoża. Na podłożach SGA i CYA, bogatych w cukry proste (glukozę i sacharozę), osiągnięto największe średnie dzienne przyrosty i dobry poziom zarodnikowania. Z kolei na podłożach PDA i MEA, zawierających ekstrakt słodowy i skrobię ziemniaczaną, ich wzrost był słabszy. W przypadku pożywki PDA obserwowano również najniższy poziom zarodnikowania. Przyczyną tego zjawiska może być słabsza przyswajalność skrobi ziemniaczanej przez wiele rodzajów grzybów pleśniowych, w tym z rodzaju *Penicillium* [72, 73].

Tabela 9. Wpływ rodzaju podłoża i światła na zarodnikowanie grzybów *Penicillium chrysogenum*, określony w czwartym dniu hodowli

Szczep	Stosunek powierzchni grzybni zabarwionej (zarodnikującej) do niezabarwionej, %			
	rodzaj pożywki			
	MEA	CYA	SGA	PDA
Hodowle prowadzone w świetle UV-VIS				
AMS1	84,2 : 15,8	78,2 : 21,8	77,0 : 23,0	64,0 : 36,0
ZUT11	85,0 : 15,0	79,3 : 20,7	77,4 : 22,6	64,3 : 35,7
ZUT24a	85,3 : 14,7	78,4 : 21,6	77,3 : 22,7	65,5 : 34,5
Hodowle prowadzone w ciemności				
AMS1	85,1 : 14,9	77,9 : 22,1	75,0 : 23,0	63,7 : 36,3
ZUT11	85,6 : 14,4	78,7 : 21,3	76,4 : 23,6	62,5 : 37,5
ZUT24a	85,1 : 14,9	78,0 : 22,0	77,1 : 22,9	63,4 : 36,6

6. Wpływ rodzaju podłoża i stężenia ditlenku tytanu P-25 na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum*

Badania wpływu stężenia ditlenku tytanu P-25 na wzrost grzybów z gatunku *Penicillium chrysogenum* przeprowadzono metodą płytkową. Ditlenek tytanu w ilości 5, 10 i 20 g dodawano bezpośrednio do pożywek mikrobiologicznych, a następnie przeprowadzono obserwacje wzrostu grzybów hodowanych w ciemności i w świetle UV-VIS. W badaniach wykorzystano pożywki MEA, SGA, CYA i PDA (tabela 1).

Wpływ stężenia ditlenku tytanu P-25 na średnie dzienne przyrosty promienia kolonii grzybów *P. chrysogenum* inkubowanych w ciemności przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach różniących się składem i stężeniem ditlenku tytanu P-25 w hodowlach prowadzonych w warunkach ciemności

Pożywka	Szczep	Średnie dzienne przyrosty kolonii, mm $\cdot$ dzień ⁻¹		
		stężenie ditlenku tytanu P-25, g $\cdot$ dm ⁻³		
		5	10	20
MEA	AMS1	3,16 $\pm$ 0,24*	3,42 $\pm$ 0,79*	2,83 $\pm$ 0,22*
	ZUT11	3,34 $\pm$ 0,50	4,86 $\pm$ 0,54*	3,33 $\pm$ 0,55
	ZUT24a	4,47 $\pm$ 0,20	3,47 $\pm$ 0,65*	2,39 $\pm$ 0,17*
CYA	AMS1	4,01 $\pm$ 0,20	4,31 $\pm$ 0,054	4,14 $\pm$ 0,17
	ZUT11	4,30 $\pm$ 0,40*	3,83 $\pm$ 0,00*	2,89 $\pm$ 0,05*
	ZUT24a	3,83 $\pm$ 0,20	3,83 $\pm$ 0,00	2,31 $\pm$ 0,89*
SGA	AMS1	4,25 $\pm$ 0,24	4,69 $\pm$ 0,38*	3,50 $\pm$ 0,00
	ZUT11	3,41 $\pm$ 0,40*	3,47 $\pm$ 0,24*	2,85 $\pm$ 0,02*
	ZUT24a	3,82 $\pm$ 0,40	4,11 $\pm$ 0,41	3,53 $\pm$ 0,05
PDA	AMS1	2,01 $\pm$ 0,50*	1,72 $\pm$ 0,13*	1,11 $\pm$ 0,05*
	ZUT11	4,25 $\pm$ 0,50	2,92 $\pm$ 0,71*	0,97 $\pm$ 0,24*
	ZUT24a	3,14 $\pm$ 0,20*	2,92 $\pm$ 0,73*	1,67 $\pm$ 0,30*

* Różnice statystycznie istotne pomiędzy wzrostem na podłożu kontrolnym i podłożu wzbogaconym ditlenkiem tytanu P-25 na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Jak wynika z analizy danych zestawionych w tabeli 10, ditlenek tytanu P-25 w stężeniu 5 i 10 g $\cdot$ dm⁻³ podłoża wpływał hamująco lub stymulująco na średnie dzienne przyrosty kolonii. Typ reakcji zależał od rodzaju podłoża i szczepu. Na pożywce PDA stwierdzono zahamowanie przyrostów kolonii wszystkich badanych szczepów. Dla kontrastu w hodowlach na pożywce SGA, bogatej w składniki odżywcze, odnotowano najwięcej przypadków stymulującego wzrost działania ditlenku tytanu.

W dostępnej literaturze brak danych opisujących efekt stymulacji wzrostu lub rozmnażania mikroorganizmów pod wpływem TiO₂. Poszukując wytłumaczenia, wysunięto jednak pewną hipotezę. Nieznacznie zwiększona zawartość tytanu w pożywkach (5 i 10 g $\cdot$ dm⁻³) mogła przyczynić się do pobudzenia wzrostu grzybów, podobnie jak dzieje się to w przypadku roślin. Efekt stymulacji wzrostu roślin wyższych wywołany przez czysty tytan jest dobrze opisany przez autorów polskich i zagranicznych [253–255]. Tytan, dostarczany w postaci preparatów dolistnych, przyczynia się m.in. do zwiększenia efek-

tywności fotosyntezy oraz pobierania składników pokarmowych. Grzyby stanowią odrębne królestwo, a z roślinami łączy je jedynie tryb życia i brak zdolności do poruszania się. Jak jednak powszechnie wiadomo, zarówno grzyby, jak i rośliny należą do domeny *Eukarya*, która wywodzi się od wspólnego przodka [15].

Dodatek ditlenku tytanu w ilości 20 g na litr podłoża wywoływał znaczącą inhibicję wzrostu grzybni wszystkich badanych szczepów *Penicillium chrysogenum*, nawet wtedy gdy hodowle prowadzono w ciemności. Większość różnic była istotna statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Nie dotyczyło to szczepu AMS1, wyizolowanego z powietrza fitness klubu. Na pożywce CYA z dodatkiem ditlenku tytanu wzrost wymienionego szczepu był lepszy niż na podłożu kontrolnym.

Wpływ stężenia ditlenku tytanu P-25 na średnie dzienne przyrosty promienia kolonii grzybów *P. chrysogenum* w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach różniących się składem i stężeniem ditlenku tytanu P-25 w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS

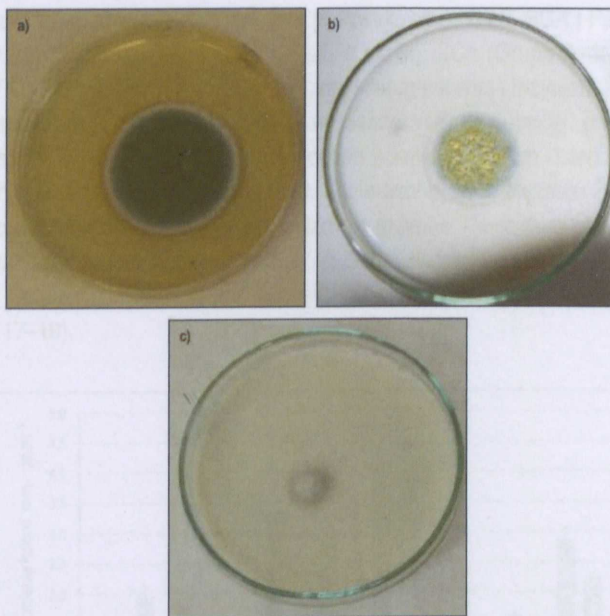
Pożywka	Szczep	Średnie dzienne przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹		
		stężenie ditlenku tytanu P-25, g · dm ⁻³		
		5	10	20
MEA	AMS1	2,92 $\pm$ 0,29	2,31 $\pm$ 0,48*	2,23 $\pm$ 0,05
	ZUT11	3,01 $\pm$ 0,20*	2,72 $\pm$ 0,32*	1,83 $\pm$ 0,00*
	ZUT24a	2,47 $\pm$ 0,00	2,47 $\pm$ 0,21	2,08 $\pm$ 0,14
CYA	AMS1	3,83 $\pm$ 0,72	3,33 $\pm$ 0,42	3,97 $\pm$ 0,41*
	ZUT11	3,11 $\pm$ 0,90	3,11 $\pm$ 0,38	2,36 $\pm$ 0,05*
	ZUT24a	3,08 $\pm$ 0,30	3,08 $\pm$ 0,30	2,17 $\pm$ 0,08*
SGA	AMS1	3,33 $\pm$ 0,17	3,61 $\pm$ 0,17	2,50 $\pm$ 0,41
	ZUT11	2,97 $\pm$ 0,30	2,97 $\pm$ 0,34	2,72 $\pm$ 0,24
	ZUT24a	3,33 $\pm$ 0,80	3,25 $\pm$ 0,43	2,83 $\pm$ 0,52
PDA	AMS1	3,01 $\pm$ 0,24	1,94 $\pm$ 0,55*	1,00 $\pm$ 0,00*
	ZUT11	1,75 $\pm$ 0,30	1,75 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,17*
	ZUT24a	3,57 $\pm$ 0,10	3,56 $\pm$ 0,73	1,56 $\pm$ 0,19*

* Różnice statystycznie istotne pomiędzy pożywkami o różnej zawartości ditlenku tytanu na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Ditlenek tytanu P-25, aktywowany światłem UV-VIS, w stężeniach 5, 10 i 20 g nie spowodował całkowitego zahamowania wzrostu grzybów *Penicillium chrysogenum* na żadnym z zastosowanych podłoży. Nie stwierdzono ponadto, by istniała zależność pomiędzy wielkością dodatku TiO₂ a obserwowanym efektem inhibicji wzrostu grzybów *Penicillium chrysogenum*. Wpływ ditlenku tytanu aktywowanego światłem jest najlepiej widoczny przy zastosowaniu stężenia 20 g na dm³ podłoża. W większości przypadków dodatek ditlenku tytanu (w wymienionym stężeniu) powodował zmniejszenie średnich dziennych przyrostów kolonii, co jest widoczne przy porównaniu z wynikami uzyskanymi w hodowlach na podłożach kontrolnych. Stwierdzono ponadto, że dobowe przyrosty kolonii wszystkich badanych grzybów na pożywkach z TiO₂ aktywowanym światłem były mniejsze od dobowych przyrostów kolonii uzyskanych na podłożach z TiO₂ inkubowanych w ciemności.

Suplementacja pożywek ditlenkiem tytanu P-25, który aktywowano światłem UV-VIS, powodowała znaczące zmiany w morfologii i barwie kolonii. TiO₂ w stężeniach 5 i 10 g · dm⁻³ zwiększał ilość

tworzonych „wysięków” (na pożywce MEA), a także zmniejszał ilość zarodników (jaśniejsza grzybnia). Grzyby z gatunku *P. chrysogenum* rosnące na pożywkach zawierających TiO_2 w stężeniu 20 g na dm^3 wykształcały jedynie tzw. grzybnie pożywkową. Efektem tego była zmiana koloru grzybni z zielonoszarego na białoszary. Na pożywkach tych nie obserwowano „wysięków” charakterystycznych dla gatunku *Penicillium chrysogenum* (fot. 7).

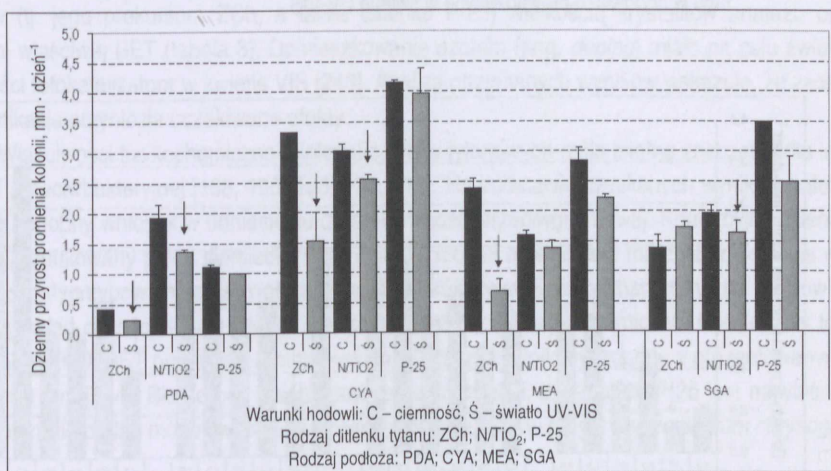


Fot. 7. Wygląd grzybni *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11) na pożywkach MEA: a) kontrolnej; b) z dodatkiem $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ P-25; c) z dodatkiem $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ P-25

W większości prac dotyczących wpływu fotokatalitycznie aktywnego ditlenku tytanu na mikroorganizmy podkreśla się jego działanie jako dezynfektanta lub biostatyka [154, 171, 177, 198, 211, 212]. Stąd wyniki świadczące o jego hamującym działaniu na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum* nie budzą zdziwienia. Analiza statystyczna wpływu TiO_2 aktywowanego światłem na wzrost grzybów z gatunku *Penicillium chrysogenum* wykazała, że najwięcej istotnych statystycznie różnic można odnotować w hodowlach na podłożu wzbogaconym 20 g ditlenku tytanu P-25, i to niezależnie od tego, czy hodowle prowadzi się w ciemności, czy w świetle UV-VIS (tabele 10 i 11). Z tego powodu kolejne doświadczenia przeprowadzono tylko dla wybranego stężenia.

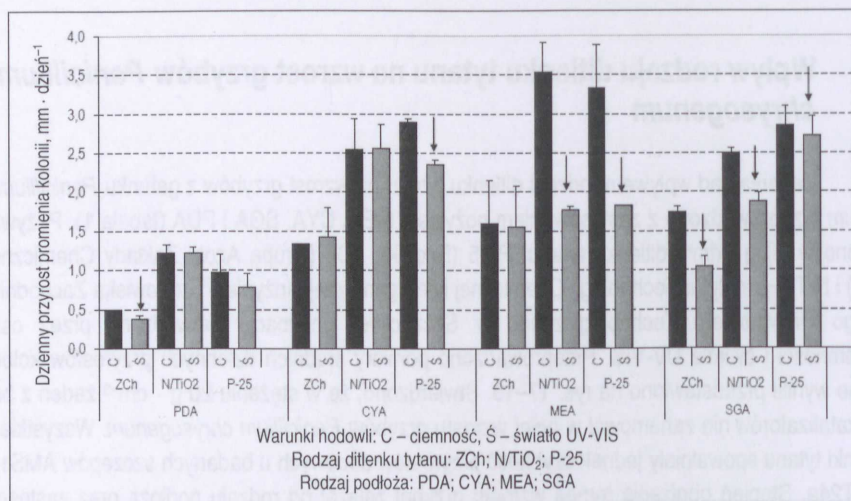
7. Wpływ rodzaju ditlenku tytanu na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum*

Badania nad wpływem rodzaju ditlenku tytanu na wzrost grzybów z gatunku *Penicillium chrysogenum* przeprowadzono z zastosowaniem pożywek: MEA, CYA, SGA i PDA (tabela 1). Pożywki wzbogacono w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu: P-25 (Evonik), ZCh (Grupa Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A.) i N/TiO_2 (Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie). Inkubację prowadzono przez osiem dni w ciemności i świetle UV-VIS. Przeprowadzono pomiary średnich dziennych przyrostów kolonii. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 17–19. Stwierdzono, że w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ żaden z badanych fotokatalizatorów nie zahamował w pełni wzrostu grzybów *Penicillium chrysogenum*. Wszystkie badane ditlenki tytanu spowalniały jednak szybkość przyrostów dobowych u badanych szczepów AMS1, ZUT11 i ZUT24a. Stopień obniżenia tempa wzrostu grzybnii zależał od rodzaju podłoża oraz zastosowanego TiO_2 (rys. 17–19).

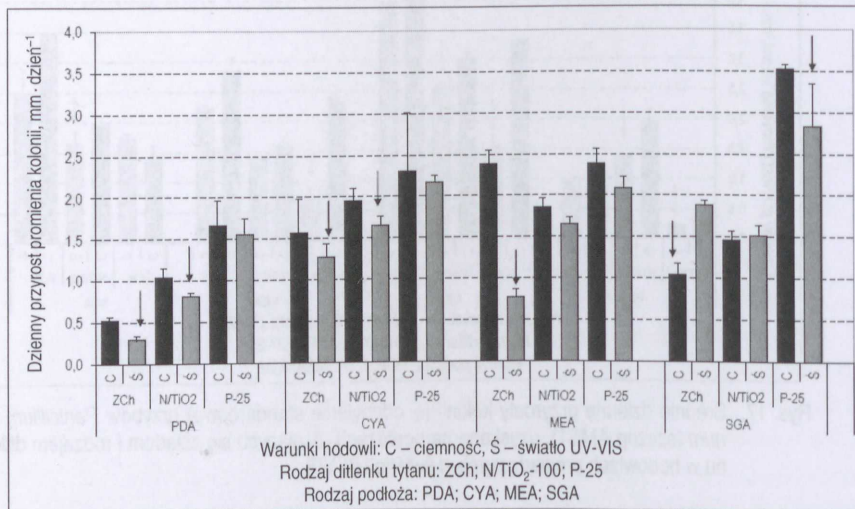


Rys. 17. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), uzyskane na podłożach różniących się składem i rodzajem ditlenku tytanu w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS

Najsilniejsze właściwości przeciugrzybowe badane fotokatalizatory wykazywały w hodowlach na podłożu PDA, zawierającym skrobię ziemniaczaną. Z kolei najslabsze ich właściwości obserwowano w doświadczeniach z pożywkami bogatymi w związki odżywcze, tj. SGA i CYA. Większość opisanych różnic była istotna statystycznie przy $p \leq 0,05$ (rys. 17–19).



Rys. 18. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szcepek ZUT11), uzyskane na podłożach różniących się składem i rodzajem ditlenku tytanu w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS



Rys. 19. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szcepek ZUT24a), uzyskane na podłożach różniących się składem i rodzajem ditlenku tytanu w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że optymalne warunki wzrostu grzybów zmieniły się po dodaniu do pożywek ditlenku tytanu. Wszystkie badane grzyby charakteryzowały się słabszym wzrostem na pożywce PDA. Na podstawie prowadzonych obserwacji morfologii kolonii, poziomu zarodnikowania itp. uznano, że najbardziej przydatna do dalszych badań będzie pożywka CYA. Pożyw-

kę PDA można jednak polecić do modelowania wpływu ditlenku tytanu na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum* oraz do doświadczeń prowadzonych dłużej niż dziesięć dni.

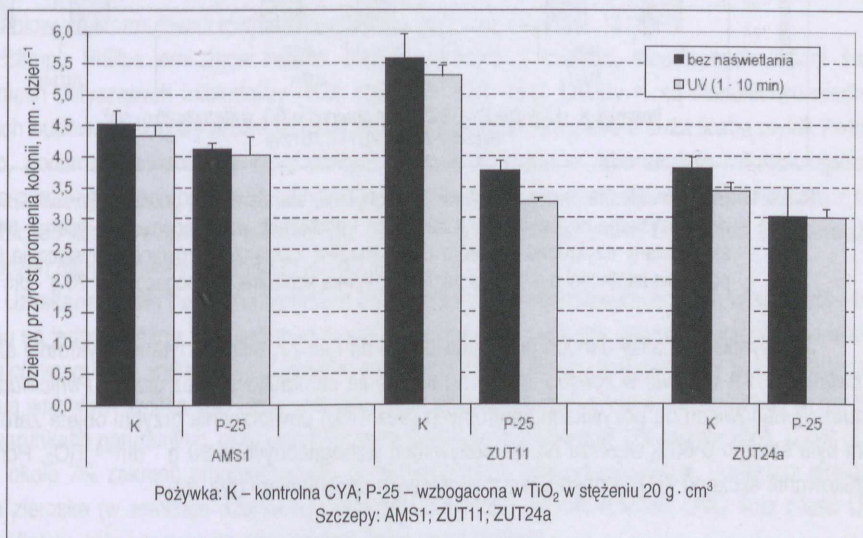
W warunkach inkubacji w świetle we wszystkich doświadczeniach, bez względu na rodzaj pożywki, najlepszymi właściwościami przeciwwgrzybowymi odznaczał się ditlenek tytanu ZCh, wyprodukowany przez zakłady chemiczne w Policach. Wykazywał on większą efektywność inhibicji wzrostu grzybów w stosunku do komercyjnego fotokatalizatora P-25 – średnio o 69,39% w hodowlach na pożywce PDA, o 49,1% na pożywce CYA, o 45,51% na pożywce MEA i o 41,87% na pożywce SGA. Obserwacja ta jest dość zaskakująca. Ditlenek tytanu ZCh charakteryzuje się bowiem najwyższym udziałem nieaktywnej fotokatalitycznej fazy amorficznej i najniższym udziałem fazy anatazowej (uważanej za najbardziej fotoaktywną). W skład katalizatora wchodzi drobne kryształy, które tworzą dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą BET (tabela 3). I to właśnie tym można wytłumaczyć jego dobre właściwości przeciwwgrzybowe.

Również drugi badany fotokatalizator, N/TiO₂, charakteryzowała dobra efektywność inhibicji względem grzybów *Penicillium chrysogenum*. Pod tym względem przewyższał on komercyjny katalizator P-25 o, odpowiednio, 47,32% w hodowlach na pożywce PDA (tylko szczep ZUT24a), 29,68% na pożywce CYA (szczepy AMS1 i ZUT24a), 20,47% na pożywce MEA i 37,37% na pożywce SGA (rys. 17–19). Ditlenek tytanu N/TiO₂ charakteryzuje się pośrednią w stosunku do pozostałych badanych katalizatorów (tj. jego prekursora ZCh, a także ditlenku P-25) wielkością kryształów anatazu oraz powierzchnią właściwą BET (tabela 3). Domieszkowanie azotem (ang. *doping*) miało na celu zwiększenie aktywności fotokatalizatora w świetle VIS [243]. Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że zastosowana modyfikacja przyniosła oczekiwane efekty.

Właściwości fizykochemiczne fotokatalizatorów tytanowych mają istotne znaczenie dla ich efektywności przeciwbakteryjnej [188, 190, 193, 195, 212]. Na podstawie uzyskanych wyników należy sformułować podobny wniosek w odniesieniu do efektywności przeciwwgrzybowej. Komercyjny ditlenek tytanu P-25, produkowany przez niemiecką firmę Evonik, można polecić jako materiał odniesienia w badaniach nad antygrzybowymi właściwościami katalizatorów tytanowych. Charakteryzuje go bowiem nie tylko stały skład chemiczny, ale i ściśle określone właściwości fizykochemiczne. Potwierdziły to wykonane analizy XRD, BET oraz widm ramanowskich. Uzyskane wyniki były zgodne z prezentowanymi m.in. przez Ohno i in. [144]. Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, uznano, że P-25 jest najwłaściwszym katalizatorem do badań modelowych nad wpływem ditlenku tytanu na grzyby *Penicillium chrysogenum*.

8. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UVA na wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum*

Stwierdzono, że zastosowanie światła UVA w czasie jednorazowej serii naświetlania nie wpływa znacząco na zmiany średnich dziennych przyrostów kolonii. Na pożywce CYA były one tylko o 4,5–9,6% niższe od uzyskanych na pożywce CYA niepoddanej naświetlaniu UVA (rys. 20).

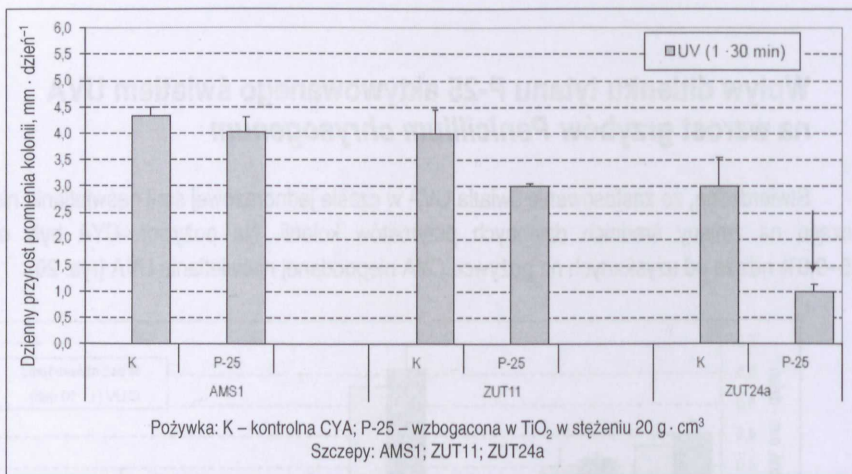


Rys. 20. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 aktywowany jednokrotnie światłem UVA

Ponadto jednorazowa, trwająca 10 min, aktywacja ditlenku tytanu P-25 nie wpływała istotnie na jego właściwości przeciwwgrzybowe. Średnie dzienne przyrosty kolonii grzybni uzyskane na pożywce CYA wzbogaconej w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ P-25 i naświetlanej UVA były o 0,6–13,27% niższe od otrzymanych w hodowlach nieaktywowanych promieniowaniem UVA. Podobny efekt stwierdzono dla wszystkich badanych szczepów (rys. 20).

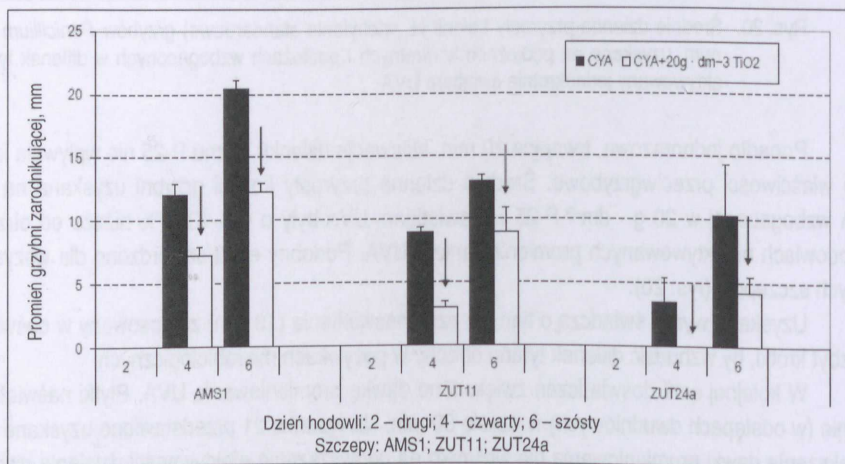
Uzyskane wyniki świadczą o tym, że czas naświetlania (10 min) zastosowany w doświadczeniu był zbyt krótki, by wzbudzić ditlenek tytanu obecny w pożywkach mikrobiologicznych.

W kolejnej serii doświadczeń zwiększono dawkę promieniowania UVA. Płytki naświetlano trzykrotnie (w odstępach dwudniowych) w czasie 30 min. Na rysunku 21 przedstawiono uzyskane rezultaty. Zwiększenie dawki promieniowania nie wpłynęło na podwyższenie efektywności działania ditlenku tytanu P-25 względem szczepów AMS1 i ZUT11. Trzykrotnie przeprowadzona aktywacja P-25 światłem UVA nie spowodowała obniżenia tempa wzrostu szczepu ZUT24 (rys. 21).



Rys. 21. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 aktywowany trzykrotnie światłem UVA; strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w 20 g · dm⁻³ TiO₂

Jak wynika z analizy danych przedstawionych na rys. 22, ditlenek tytanu trzykrotnie aktywowany światłem UVA wpływał w sposób istotny na tworzenie zarodników przez grzyby *Penicillium chrysogenum*. W hodowlach na pożywkach kontrolnych (bez TiO₂) powierzchnia grzybni objęta zarodnikowaniem była średnio o 60% większa niż na pożywkach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ TiO₂. Ponadto zarodnikowanie szczepu ZUT24 nastąpiło z dwudniowym opóźnieniem (rys. 22).



Rys. 22. Średnia wielkość promienia kolonii zarodnikującej ($\pm$ odchylenie standardowe) *Penicillium chrysogenum* na podłożu kontrolnym i podłożach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25 po trzykrotnej aktywacji światłem UVA; strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w 20 g · dm⁻³ TiO₂

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że ditlenek tytanu aktywowany światłem UVA może jedynie ograniczyć wzrost i zarodnikowanie grzybów *Penicillium chrysogenum*. Skuteczność przeciwgrzybowa fotokatalitycznie aktywnego ditlenku tytanu jest zależna od: czasu ekspozycji grzybów na oba czynniki, natężenia i długości fali stosowanego światła, a także indywidualnych predyspozycji genetycznych grzybów.

Najtrudniejszym zadaniem była dekontaminacja zarodników *Penicillium chrysogenum*. Okazały się one odporniejsze zarówno na światło UVA, jak i na fotokatalitycznie aktywny ditlenek tytanu. Zatrzymanie naświetlania powodowało gwałtowne przyspieszenie ich kiełkowania. Zjawisko to jest określane jako regres wzrostu (ang. *regrowth*). Podobny wniosek w odniesieniu do innych gatunków grzybów pleśniowych sformułowali również Fargues i in. [47] oraz Chen i in. [217].

Lampy Philips emitujące światło UVA są jednym z częściej stosowanych źródeł światła w badaniach dotyczących fotokatalizy [153, 155, 156, 160, 161]. Lampy te są stosunkowo niedrogie, jednak ich budowa i rozmiary uniemożliwiają prowadzenie doświadczenia z dużą liczbą płytek Petriego. Ponadto, pomimo zastosowania aseptycznych warunków pracy w laboratorium mikrobiologicznym, w czasie przebiegającego przy otwartych szalkach Petriego aktywowania ditlenku tytanu światłem UVA, dochodziło do licznych zakażeń zarodnikami „obcych” gatunków grzybów. Utrudniało to prowadzenie doświadczeń długoterminowych (dłuższych niż 0,5 h).

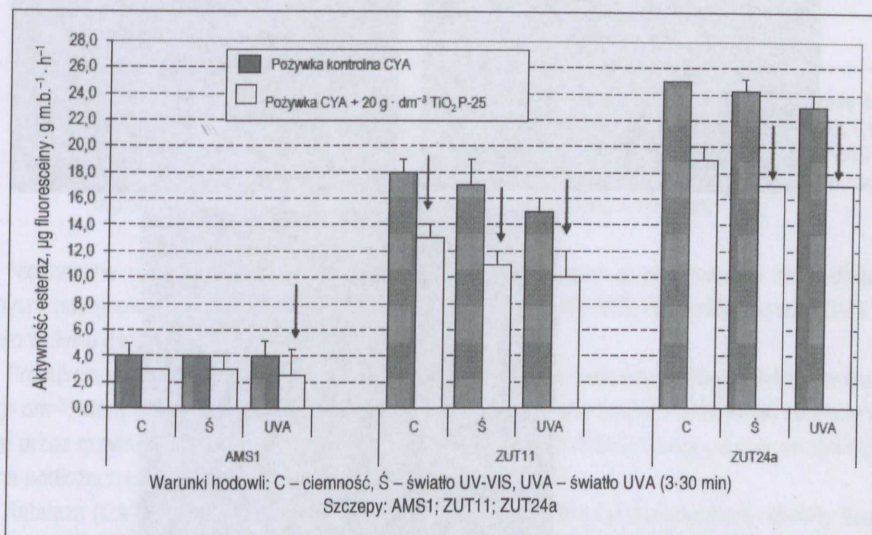
Uzyskane wyniki badań na wpływem UVA na aktywację przeciwgrzybowych właściwości ditlenku tytanu są jednak ważne z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze grzyby pleśniowe, również *Penicillium chrysogenum*, występują powszechnie w środowisku zewnątrzdomowym. W tym siedlisku życia podlegają wpływowi światła UV, które jest obecne w widmie promieniowania emitowanego przez Słońce. W warunkach naturalnych, przy bezchmurnym niebie promieniowanie UV (w tym UVA, UV-B i UVC) stanowi około 7% zakresu promieniowania docierającego do powierzchni Ziemi. Ponieważ jednak atmosfera ziemska (w warstwie ozonowej) pochłania całkowicie promieniowanie UVC oraz część UV-B, 97% ultrafioletu, który dociera do powierzchni Ziemi, to UVA [246].

Drugi powód wynika z właściwości samego ditlenku tytanu P-25. Ditlenek tytanu produkowany przez niemiecką firmę Evonik należy do fotokatalizatorów tzw. pierwszej generacji, co oznacza, że jego aktywność jest największa w zakresie promieniowania o długości fali λ pomiędzy 250 a 400 nm [126]. Na podstawie przeglądu literatury wiadomo, że ilość promieniowania UVA, która dociera do powierzchni Ziemi, jest wystarczająca do jego fotoaktywacji [126, 129, 136, 138].

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki i uzyskane wyniki badań, można stwierdzić, że w warunkach stałej ekspozycji na światło słoneczne będzie możliwe wyeliminowanie grzybów pleśniowych, porastających materiały budowlane. Wyniki te są szczególnie ważne dla technologów chemików, pracujących nad stworzeniem powłok fotokatalitycznych do zastosowań zewnętrznych.

9. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS i UVA na aktywność enzymatyczną grzybów *Penicillium chrysogenum*

Na rysunku 23 przedstawiono dane dotyczące aktywności esteraz, oznaczonych metodą z dwu-octanem fluoresceiny (FDA). Najniższą ogólną aktywnością esteraz w szóstym dniu hodowli charakteryzował się szczep AMS1, wyizolowany z powietrza piwnicy budynku mieszkalnego, a najwyższą ZUT24a, wyizolowany z powietrza fitness klubu. Podobny profil aktywności opisano dla pożywek kontrolnych CYA i pożywek wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$, inkubowanych w ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (rys. 23).



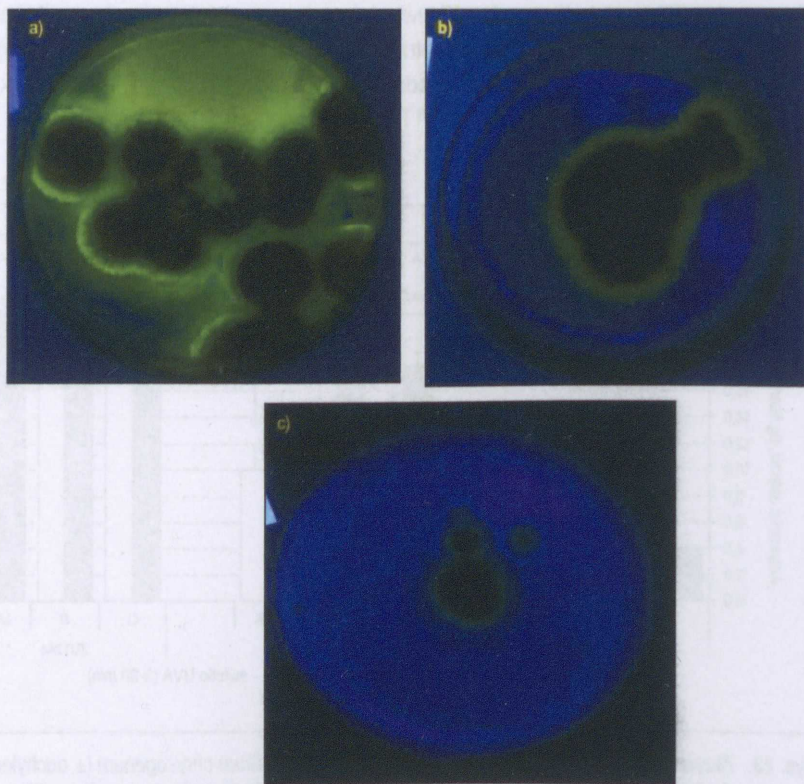
Rys. 23. Aktywność esteraz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* ($\pm$ odchylenie standardowe), rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (aktywacja $3 \cdot 30 \text{ min}$); strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$

Stwierdzono, że ditlenek tytanu P-25 dodany do pożywki i aktywowany światłem UVA ($3 \cdot 30 \text{ min}$), spowodował istotne zahamowanie aktywności esteraz u wszystkich badanych szczepów *Penicillium chrysogenum* (rys. 23). Obniżenie aktywności enzymów wynosiło od 26,09% (ZUT24a) do 37,50% (AMS1). Różnice w aktywności esteraz wydzielanych przez grzyby na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu były istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$ (rys. 24).

Ditlenek tytanu aktywowany światłem UV-VIS w ciągu sześciu dni trwania doświadczenia spowodował istotną inhibicję esteraz u szczepów ZUT11 i ZUT24a. Obniżenie aktywności wynosiło, odpowiednio, 35,29 i 29,80%. Produkcja esteraz przez szczep AMS1 była mniejsza na podłożach,

wzbogaconych w ditlenek tytanu, a następnie aktywowanych światłem UV-VIS. Obserwowane zmiany nie były istotne statystycznie (rys. 23).

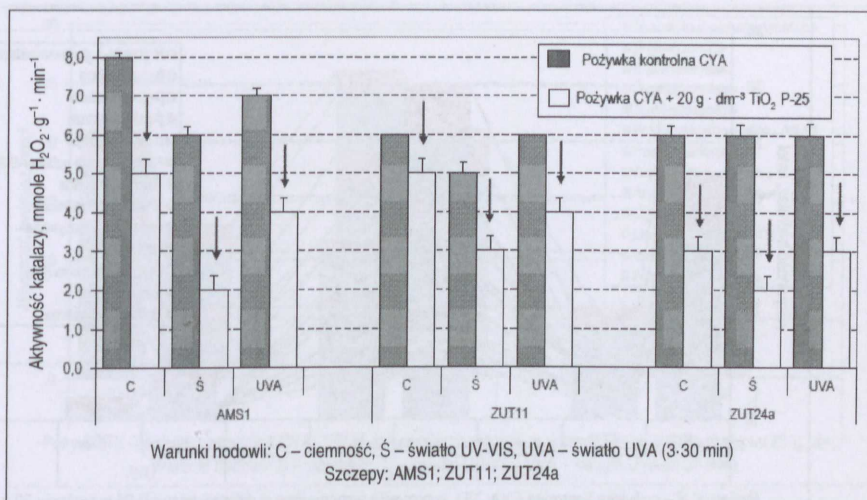
Analizę zdjęć dokumentujących reakcję grzybni z roztworem fluoresceiny potwierdziły wyniki przeprowadzonych oznaczeń biochemicznych. Esterazy wydzielane zewnątrzkomórkowo przez grzyby katalizują hydrolizę enzymatyczną dwuocianu fluoresceiny (FDA). Powoduje to uwolnienie do środowiska wokół grzybni reakcji silnie fluorescencyjnego barwnika. Reakcja jest słabsza, gdy w pożywce znajduje się ditlenek tytanu (fot. 8).



Fot. 8. Wygląd grzybni *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT24a) na pożywkach: a) kontrolnej CYA, inkubowanej w ciemności; b) CYA wzbogaconej w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$ aktywowany światłem UV-VIS; c) CYA wzbogaconej w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$ aktywowany światłem UVA ($3 \cdot 30 \text{ min}$)

Na uwagę zasługuje fakt, że grzyby *Penicillium chrysogenum* rosnące na pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ charakteryzowała mniejsza aktywność esteraz, nawet wówczas, gdy nie występowała aktywacja światłem (rys. 23).

Ogólna aktywność katalazy, oznaczana zmodyfikowaną metodą Brzezińskiej i Włodarczyk [251], była u wszystkich badanych szczepów *Penicillium chrysogenum* na podobnym poziomie czynnościowym. Stwierdzono, że zarówno ditlenek tytanu nieaktywowany światłem, jak i aktywowany światłem UVA lub UV-VIS spowodował zahamowanie aktywności katalazy u wszystkich badanych szczepów. Wszystkie różnice były istotne statystycznie na poziomie istotności $p \leq 0,05$ (rys. 24).



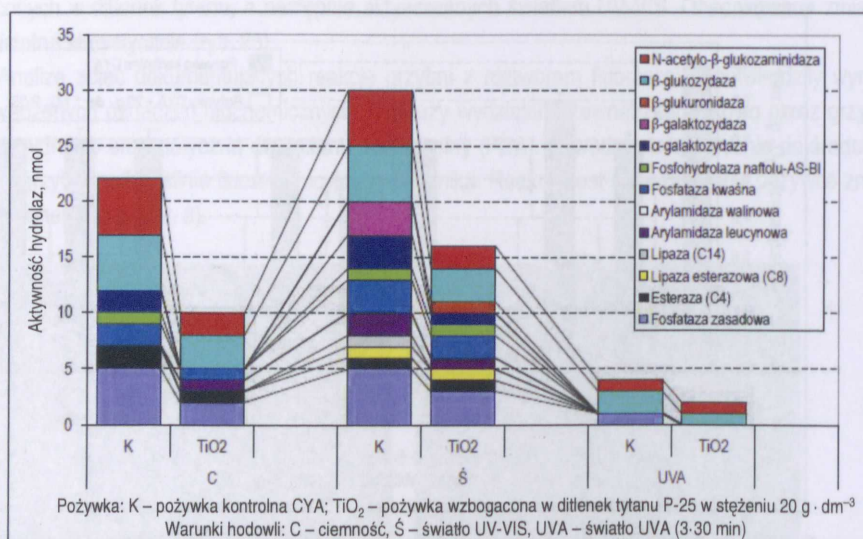
Rys. 24. Aktywność katalazy produkowanej przez grzyby *Penicillium chrysogenum* ($\pm$ odchylenie standardowe), rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (aktywacja $3 \cdot 30 \text{ min}$); strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$

Nieznaczne obniżenie aktywności katalazy, wydzielanej przez grzyby rosnące na podłożach kontrolnych, następowało również pod wpływem samego światła UV-VIS. Natomiast światło UVA nie wywierało wpływu na poziom wydzielanej katalazy (rys. 24).

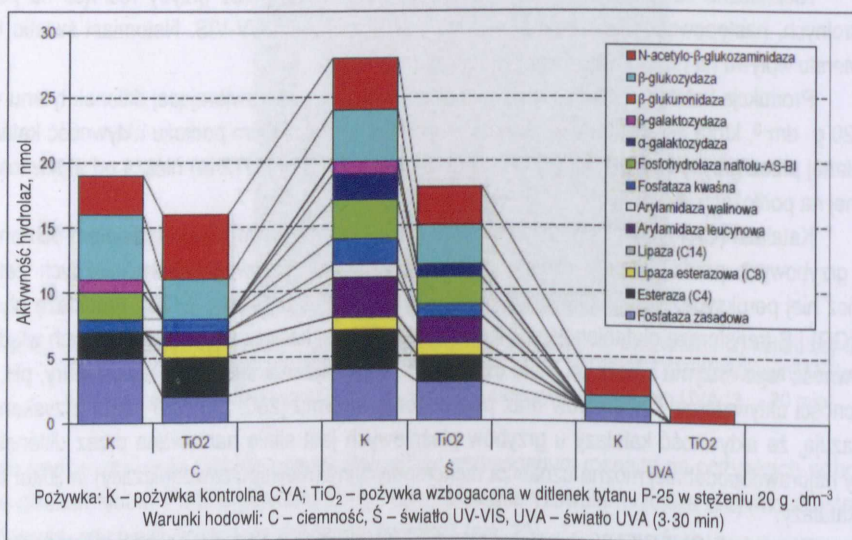
Produkcja katalazy była najsilniej inhibowana na pożywce zawierającej ditlenek tytanu w stężeniu $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, którą aktywowano światłem UV-VIS. Na wymienionym podłożu aktywność katalazy wydzielanej przez grzyby była od 40% (ZUT11) do 66,67% (AMS1 i ZUT24a) niższa od aktywności oznaczonej na podłożach kontrolnych.

Katalaza (CAT) należy do enzymów tzw. ścieżki glutationowej i jest elementem ochrony komórek grzybowych przed stresem oksydacyjnym [256]. Do enzymów glutationozależnych zalicza się oprócz niej peroksydazę glutationową (GPx), dysmutazę ponadtlenkową (SOD), reduktazę glutanionową (GR) i S-transferazę glutanionową. Z literatury dotyczącej katalaz organizmów żywych wiadomo, że aktywność tego enzymu zależy od wielu czynników, m.in. stężenia substratu, temperatury, pH, światła, obecności aktywatorów i inhibitorów oraz pochodzenia enzymu [250, 251, 257, 258]. Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność katalazy u grzybów pleśniowych jest silnie hamowana przez ditlenek tytanu, który najprawdopodobniej można uznać za niekompetycyjny (niewspółzawodniczący) inhibitor aktywności katalazy.

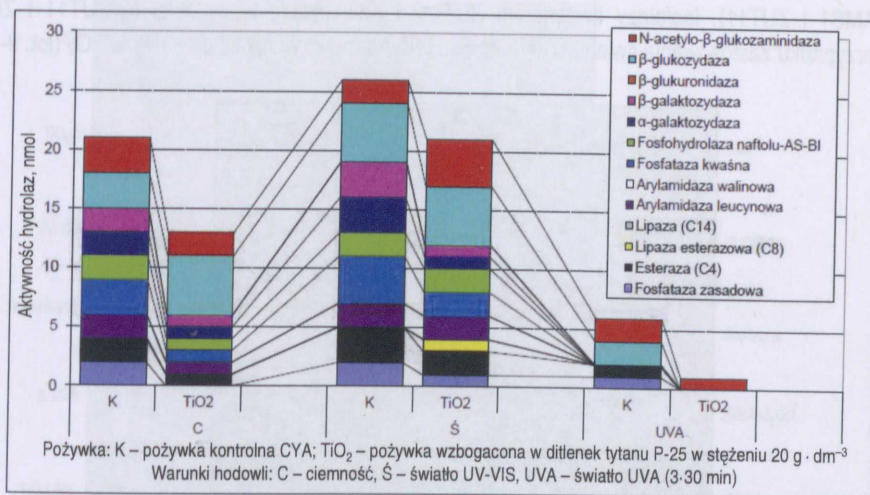
W teście BIOMÈRIEUX określono aktywność 19 hydrolaz (tabela 5) u badanych szczepów *Penicillium chrysogenum*. Spośród badanych grzybów rosnących na podłożach kontrolnych CYA największą ilością i aktywnością wytwarzanych egzoenzymów charakteryzowały się grzyby należące do szczepów AMS1 i ZUT11 (rys. 25–27).



Rys. 25. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu 20 g · dm⁻³, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (aktywność 3 · 30 min)



Rys. 26. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11), rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu 20 g · dm⁻³, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (aktywność 3 · 30 min)



Rys. 27. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT24a), rosące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu 20 g · dm⁻³, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS lub w UVA (aktywacja 3 · 30 min)

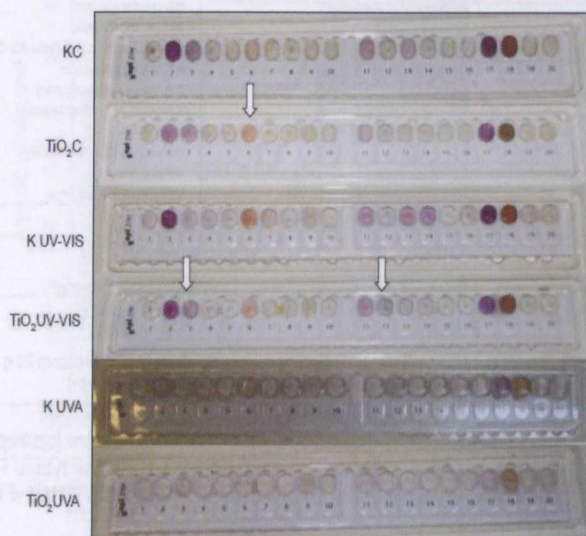
W hodowlach na podłożach kontrolnych naświetlanych światłem UV-VIS stwierdzono aktywność 11 hydrolaz. Wśród oznaczanych enzymów wysoką aktywnością charakteryzowały się: N-acetylo-β-glukozaminidaza, β-glukozydaza i fosfataza zasadowa. Niska aktywność cechowała: lipazy (C14, C8), esterazę C4 oraz fosfohydrolazę naftolu-AS-BI.

Naświetlanie podłoży kontrolnych promieniowaniem UVA (3 · 30 min) wywoływało istotne obniżenie ogólnej aktywności hydrolaz. Zakres obserwowanych zmian wynosił od 71,4% (ZUT24a) do 81,8% (AMS1). Obserwowano również spadek różnorodności hydrolaz wydzielanych przez grzyby. Podczas gdy w warunkach inkubacji w ciemności grzyby wydzielają od siedmiu (ZUT11 i AMS1) do dziewięciu (ZUT24a) hydrolaz, to po aktywacji światłem UVA już maksymalnie trzy (rys. 25–27).

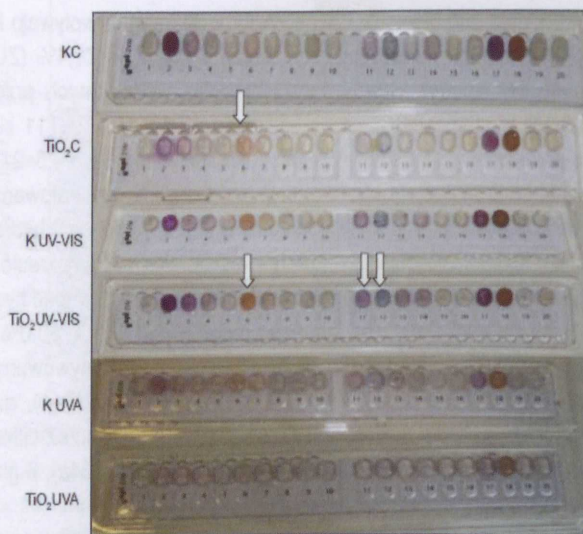
W porównaniu z podłożami kontrolnymi w hodowlach na podłożach suplementowanych ditlenkiem tytanu w stężeniu 20 g · dm⁻³ obserwowano istotne obniżenie ogólnej aktywności hydrolaz. Ditlenek tytanu nieaktywowany światłem spowodował obniżenie aktywności enzymów w zakresie od 15,8% (ZUT11) do 54,5% (AMS1). Aktywacja TiO₂ światłem UV-VIS spowodowała, że aktywność hydrolaz była mniejsza o 19,2% dla ZUT24a i o 35,7% dla ZUT11, natomiast po naświetlaniu UVA o 50,0% dla AMS1 i o 83,3% dla ZUT24a. Enzymami najsilniej hamowanymi przez ditlenek tytanu aktywowany światłem widzialnym UV-VIS były: lipaza C14 (szczep AMS1), β-galaktozydaza (AMS1, ZUT11), arylamidaza walinowa (ZUT11) i lipaza esterazowa (ZUT24a). Z kolei enzymami inhibowanymi przez ditlenek tytanu aktywowany światłem UVA były: fosfataza zasadowa (szczepy AMS1, ZUT11, ZUT24a), β-glukozydaza (ZUT11 i ZUT24a) i esteraza C4 (ZUT24a).

W kilku przypadkach stwierdzono wyraźną stymulację aktywności enzymatycznej pod wpływem dodatku ditlenku tytanu. Ditlenek tytanu nieaktywowany światłem wywoływał pobudzenie aktywności arylamidazy leucynowej (u AMS1 i ZUT11) oraz N-acetylo-β-glukozaminidazy (u ZUT24a). Natomiast ditlenek tytanu aktywowany światłem UV-VIS: esterazy C4 (u AMS1), fosfohydrolazy naftolu-AS-BI

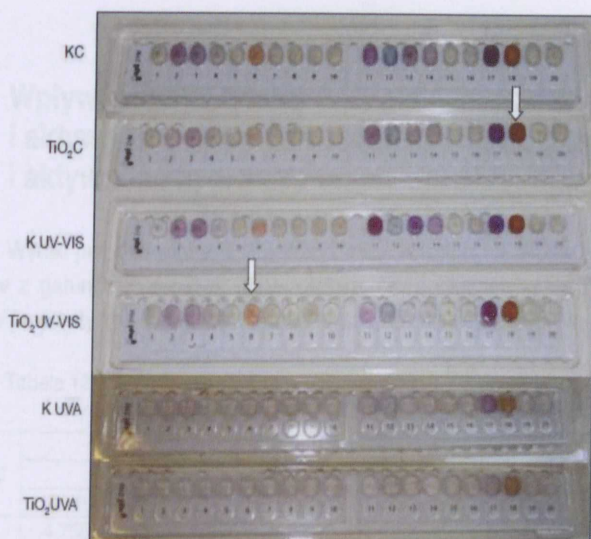
(u AMS1 i ZUT11), fosfatazy kwasnej (u ZUT11) i aryamidazy leucynowej (u ZUT11 i ZUT24a). W przypadku zastosowania światła UVA nie zaobserwowano stymulacyjnego efektu TiO_2 (fot. 9–11).



Fot. 9. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), rosnące na podłożach kontrolnych (K) i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, inkubowanych w ciemności, w świetle UV-VIS lub UVA ($3 \cdot 30 \text{ min}$); strzałkami wskazano enzymy, których aktywność została pobudzona przez dodatek ditlenku tytanu



Fot. 10. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11), rosnące na podłożach kontrolnych (K) i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, inkubowanych w ciemności, w świetle UV-VIS lub UVA ($3 \cdot 30 \text{ min}$); strzałkami wskazano enzymy, których aktywność została pobudzona przez dodatek ditlenku tytanu



Fot. 11. Aktywność hydrolaz produkowanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), rosnące na podłożach kontrolnych (K) i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, inkubowanych w ciemności, w świetle UV-VIS lub UVA ($3 \cdot 30 \text{ min}$); strzałkami wskazano enzymy, których aktywność została pobudzona przez dodatek ditlenku tytanu

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień dotyczących wpływu ditlenku tytanu aktywowanego światłem na aktywność enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez grzyby pleśniowe. Niniejsza publikacja jest pierwszą pracą na ten temat. Hydrolazy katalizujące m.in. reakcje hydrolizy wiązań C–O, C–N i C–N są ważnym ogniwem szlaków biochemicznych zachodzących w żywych komórkach. Upośledzenie funkcji niektórych z nich w wyniku procesu fotokatalitycznego mogło prowadzić do zmniejszonej asymilacji źródeł węgla i energii (podobnie jak aktywacja mogła ją zwiększać). Bezpośrednim tego efektem mogły być zmiany obserwowane w tempie wzrostu i przyrostach biomasy grzybów *Penicillium chrysogenum*. Uzyskane dane pozwalają stwierdzić, że badania ogólnej aktywności enzymatycznej są przydatnym parametrem w określaniu skuteczności przeciugrzybowej fotokatalizatorów tytanowych. Liczba uwalnianych enzymów oraz ich profil czynnościowy zmieniały się w zależności od tego, czy w pożywce był obecny TiO_2 . Istotny okazał się również wpływ naświetlania zastosowanego do aktywacji ditlenku tytanu.

10. Wpływ ditlenku tytanu P-25 aktywowanego światłem UV-VIS i aktywności wody na wzrost, tworzoną biomasę i aktywność hydrolaz *Penicillium chrysogenum*

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na istotny wpływ aktywności wody na wzrost grzybów z gatunku *Penicillium chrysogenum*. Na podłożach kontrolnych inkubowanych w ciemności dzienne przyrosty kolonii grzybów malały wraz z obniżającą się aktywnością wody a_w (tabela 12).

Tabela 12. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych CYA w hodowlach prowadzonych w ciemności

Szczep	Średnie dzienne przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹					
	aktywność wody					
	0,999	0,997	0,975	0,950	0,900	0,850
AMS1	4,750 $\pm$ 0,665	5,670 $\pm$ 1,114	3,917 $\pm$ 0,204	2,722 $\pm$ 0,188	0,972 $\pm$ 0,136	0,278 $\pm$ 0,101*
ZUT11	3,986 $\pm$ 0,260	4,097 $\pm$ 0,214	4,067 $\pm$ 0,455	2,722 $\pm$ 0,552	0,931 $\pm$ 0,034	0,333 $\pm$ 0,139*
ZUT24a	4,972 $\pm$ 0,306	4,736 $\pm$ 0,271	3,931 $\pm$ 0,957	2,722 $\pm$ 0,552	0,778 $\pm$ 0,228	0,083 $\pm$ 0,075*

* Różnice statystycznie istotne pomiędzy wariantami pożywek kontrolnych o różnej aktywności wody na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Badane szczepy *Penicillium chrysogenum* charakteryzowała różna reakcja na dodatek chlorku sodu, który zastosowano do modyfikacji a_w podłoży. Optymalna do wzrostu grzybów aktywność wody wynosiła 0,997 dla szczepów AMS1 i ZUT11 oraz 0,999 dla szczepu ZUT24a. Przy najniższej badanej aktywności wody w podłożu, równej 0,850, kolonie grzybów rozwijały się najwolniej (tabela 12).

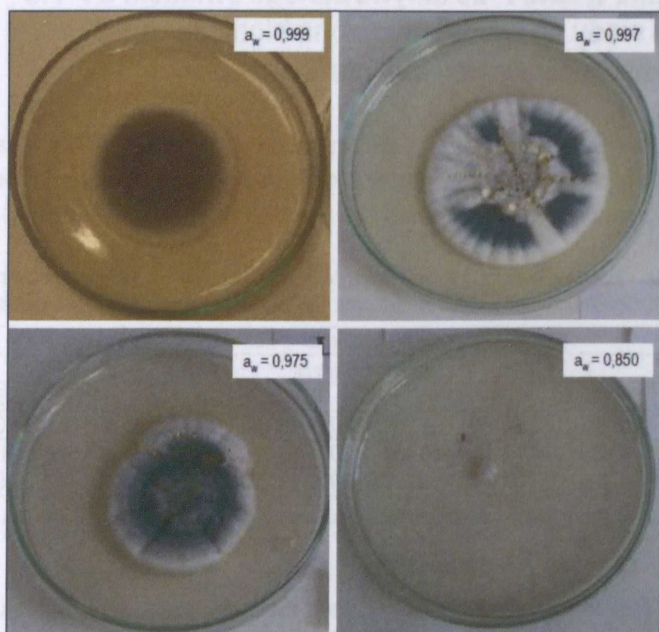
Im wyższe było a_w pożywki, tym większe były dobowe przyrosty kolonii (tabela 12). Badane grzyby charakteryzowała podobna reakcja na aktywność wody w zakresie 0,999–0,975. Zmiany tempa wzrostu były niewielkie i stopniowe. Wszystkie badane szczepy rosnące na pożywkach kontrolnych o $a_w = 0,950$ charakteryzowały się takim samym dziennym przyrostem kolonii (2,722 mm · dzień⁻¹). Dalsze obniżanie a_w spowodowało gwałtowne obniżenie tempa przyrostów dobowych (tabela 12).

Obserwacje i pomiary prowadzone w czasie trwania doświadczenia wykazały, że obniżenie aktywności wody w pożywkach powodowało opóźnienie zarodnikowania, zmniejszenie jego intensywności oraz tworzenie grzybni powierzchniowych, o dość zwartej konsystencji i mocno pofałdowanych. Przykład takiej grzybni przedstawiono na fot. 12.

Z powodu różnic w wyglądzie grzybni przeprowadzono również analizę wpływu aktywności wody na wielkość biomasy wytwarzanej przez grzyby *Penicillium chrysogenum*. Wyniki zestawiono w tabeli 13. Biomasa grzybów (niezależnie od szczepu) rosnących na pożywkach o $a_w \leq 0,900$ była zbyt mała ($\geq 0,0001$ g) i nie została oznaczona.

Należy zwrócić uwagę, że obniżenie aktywności wody w podłożach kontrolnych (hodowle prowadzone w ciemności) wywoływało silniejszy wpływ na ilość wytwarzanej biomasy niż na średnie dzienne przyrosty kolonii. Przy wszystkich badanych a_w największą biomasę grzybni wytwarzał szczep AMS1, a najmniejszą ZUT24a. Zauważono, że inaczej niż w przypadku przyrostów dobowych, stopniowe obniżanie aktywności wody spowodowało znaczący spadek suchej masy grzybni wszystkich bada-

nych grzybów. Zmiana aktywności wody w pożywce z 0,999 do 0,950 prowadziła do obniżenia wytwarzanej biomasy z 1,3841 g do 0,122 g (tabela 13).



Fot. 12. Zmiana morfologii grzybni *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11) rosnącej na pożywkach o różnej aktywności wody

Tabela 13. Wartości suchej biomasy grzybni ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych CYA w hodowlach prowadzonych w ciemności

Szczip	Sucha biomasa grzybni, g					
	aktywność wody					
	0,999	0,997	0,975	0,950	0,900	0,850
AMS1	1,384 $\pm$ 0,106	1,215 $\pm$ 0,115	0,463 $\pm$ 0,087*	0,153 $\pm$ 0,007*	n.o.	n.o.
ZUT11	1,207 $\pm$ 0,007	1,011 $\pm$ 0,018	0,385 $\pm$ 0,145*	0,151 $\pm$ 0,007*	n.o.	n.o.
ZUT24	1,325 $\pm$ 0,283	1,221 $\pm$ 0,023	0,167 $\pm$ 0,013*	0,122 $\pm$ 0,018*	n.o.	n.o.

* Różnice statystycznie istotne pomiędzy wariantami pożywek kontrolnych o różnej aktywności wody na poziomie istotności $p \leq 0,05$; n.o. – nie oznaczono.

Naświetlanie podłoży kontrolnych różniących się aktywnością wody światłem UV-VIS oddziaływało na tempo wzrostu grzybów. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach, światło miało różny (pozytywny lub negatywny) wpływ na wzrost grzybów. Stymulowało wzrost grzybni szczepu ZUT11 rosnących na podłożach o $a_w \geq 0,997$ i 0,950. Z kolei wzrost grzybni szczepu AMS1 był hamowany przez naświetlanie UV-VIS w hodowlach na podłożach o wysokiej aktywności wody ($a_w = 0,999$ i 0,997), a stymulowany w hodowlach na podłożach o $a_w = 0,950$. Szczep ZUT24a reagował negatywnie na światło w całym badanym zakresie aktywności wody. Stwierdzono, że inhibujący efekt światła widział-

nego był wzmacniany przez mniejszą dostępność wody. Świadczy o tym brak wzrostu grzybów na pożywkach o $a_w = 0,850$ (tabela 14).

Tabela 14. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych CYA w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS

Szczep	Średnie dzienne przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹					
	aktywność wody					
	0,999	0,997	0,975	0,950	0,900	0,850
AMS1	4,444 $\pm$ 0,744 ↓	4,544 $\pm$ 0,743 ↓	3,920 $\pm$ 0,553	2,861 $\pm$ 0,209 ↑*	0,667 $\pm$ 0,053 ↓*	0,000 $\pm$ 0,000 ↓*
ZUT11	4,972 $\pm$ 0,634 ↑	4,750 $\pm$ 0,699 ↑	3,920 $\pm$ 0,553 ↓	3,653 $\pm$ 0,509	0,528 $\pm$ 0,172 ↓*	0,000 $\pm$ 0,000 ↓*
ZUT24a	3,556 $\pm$ 0,375 ↓	3,986 $\pm$ 0,309 ↓	3,300 $\pm$ 0,726 ↓	2,208 $\pm$ 0,446 ↓*	0,529 $\pm$ 0,043 ↓*	0,000 $\pm$ 0,000 ↓*

↑ – stymulacja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle; ↓ – inhibicja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle.

* Różnice statystycznie istotne pomiędzy wariantami pożywek o różnej aktywności wody na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki pomiarów biomasy. W całym zakresie a_w światło wywierało istotny wpływ na zmniejszenie suchej masy grzybni u badanych szczepów *Penicillium chrysogenum*. Wyjątkiem był szczep ZUT11, którego biomasa w hodowli na pożywce o $a_w = 0,999$ zwiększyła się, gdy inkubację prowadzono w świetle widzialnym (tabela 15).

Tabela 15. Wartości suchej biomasy grzybni ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum*, uzyskane na podłożach kontrolnych CYA w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS

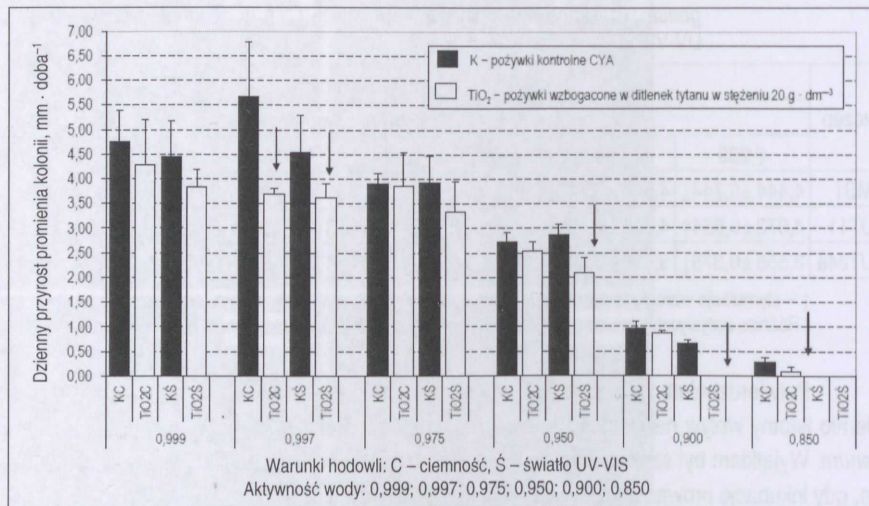
Szczep	Sucha biomasa grzybni, g					
	aktywność wody					
	0,999	0,997	0,975	0,950	0,900	0,850
AMS1	1,152 $\pm$ 0,081 ↓	0,422 $\pm$ 0,060 ↓*	0,324 $\pm$ 0,095 ↓	0,123 $\pm$ 0,056 ↓	n.o.	n.o.
ZUT11	1,345 $\pm$ 0,054 ↑	0,373 $\pm$ 0,106 ↓	0,358 $\pm$ 0,250 ↓	0,121 $\pm$ 0,109 ↓	n.o.	n.o.
ZUT24a	1,277 $\pm$ 0,092 ↓	0,403 $\pm$ 0,204 ↓	0,164 $\pm$ 0,052 ↓	0,086 $\pm$ 0,012 ↓	n.o.	n.o.

↑ – stymulacja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle; ↓ – inhibicja wzrostu w warunkach inkubacji w świetle, n.o. – nie oznaczono.

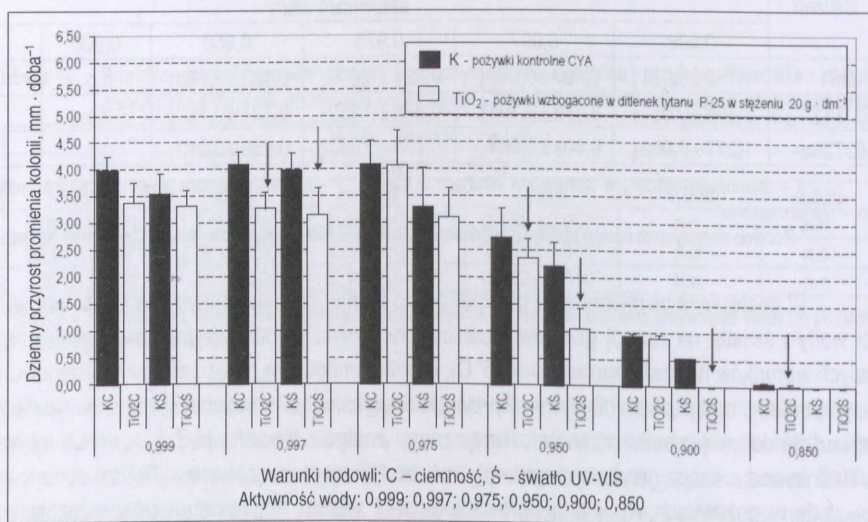
* Różnice statystycznie istotne pomiędzy wariantami pożywek o różnej aktywności wody na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono jednak żadnych danych na temat wpływu aktywności wody i światła na rozwój grzybów pleśniowych. Można jednak przyjąć, że pomimo utrzymywania stałych warunków hodowli (temperatura 25°C), światło emitowane przez żarówki halogenowe zwiększało temperaturę nad płytkami Petriego. Sprzyjało to szybszemu parowaniu wody z pożywek, co z kolei prowadziło do zwiększenia ciśnienia osmotycznego podłoża. Ponadto podwyższenie temperatury bezpośrednio nad rosnącą grzybnią mogło wpływać modyfikująco na jej wzrost. Dalsze obniżanie zawartości wody w pożywkach wywołane parowaniem oraz wyższa temperatura przyspieszały wysuszenie grzybni. Wniosek ten znalazł częściowe potwierdzenie w rezultatach otrzymanych przez Sautoura i in. [259]. Autorzy stwierdzili, że podwyższenie temperatury już o 1°C powoduje istotne zmiany w tolerancji grzybów pleśniowych na obniżoną aktywność wody.

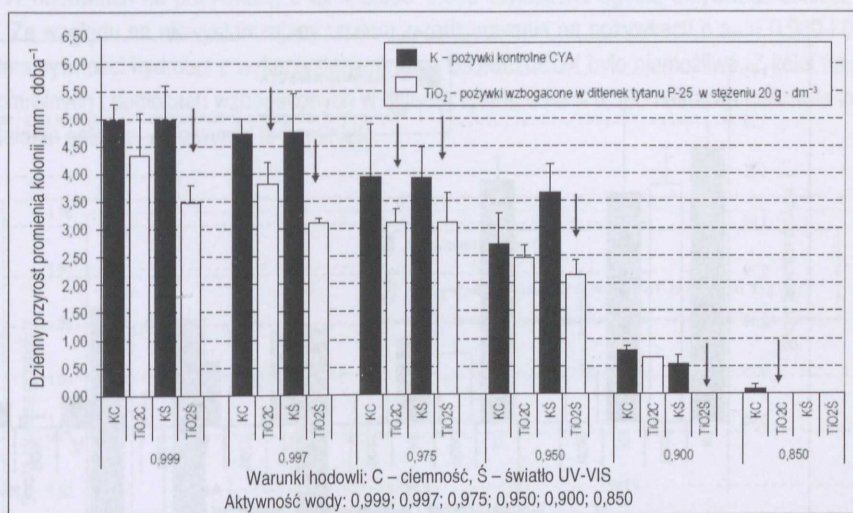
Dodatek $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu do pożywek o a_w w zakresie 0,850–0,999 spowodował dalsze obniżenie szybkości wzrostu grzybów *Penicillium chrysogenum*, rosnących zarówno w hodowlach prowadzonych w ciemności, jak i w świetle widzialnym (rys. 28–30).



Rys. 28. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), uzyskane na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)



Rys. 29. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11), uzyskane na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)

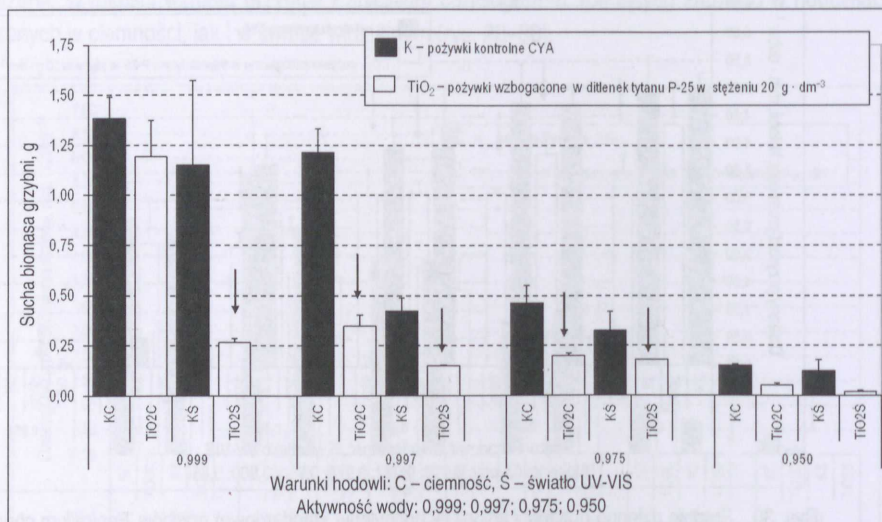


Rys. 30. Średnie dzienne przyrosty kolonii ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT24a), uzyskane na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)

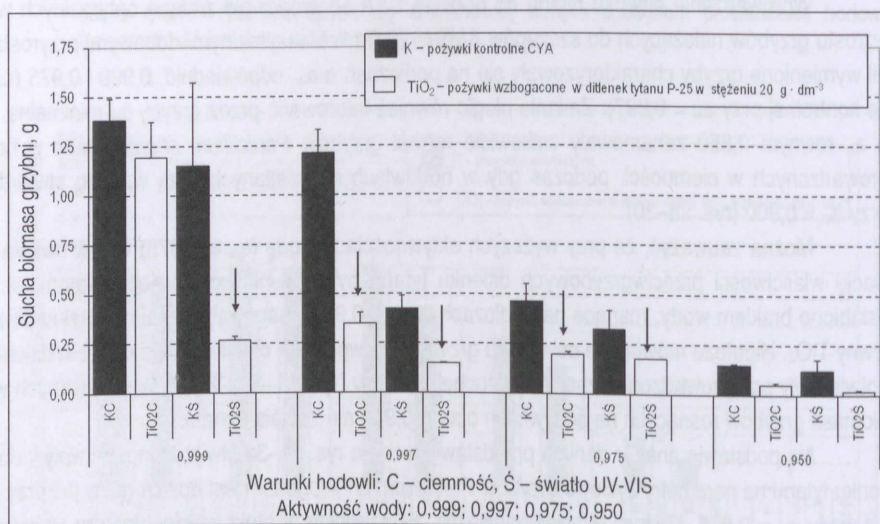
Wprowadzenie ditlenku tytanu do podłoża CYA spowodowało zmianę optymalnych warunków wzrostu grzybów należących do szczepów AMS1 i ZUT11. Maksymalnymi dobowymi przyrostami kolonii wymienione grzyby charakteryzowały się na podłożach o a_w , odpowiednio, 0,999 i 0,975 (na pożywce kontrolnej przy $a_w = 0,997$). Zmianie uległo również tolerowane przez grzyby a_w minimalne. Pożywki o a_w równym 0,850 zahamowały całkowicie wzrost grzybów *Penicillium chrysogenum* w hodowlach prowadzonych w ciemności, podczas gdy w hodowlach naświetlanych brak wzrostu stwierdzono już przy $a_w = 0,900$ (rys. 28–30).

Można zauważyć, że przy wyższych aktywnościach wody ($a_w \geq 0,975$) wpływ światła na aktywność właściwości przeciwgrzybowych ditlenku tytanu był stosunkowo niewielki. Natomiast grzybnie osłabione brakiem wody, rosnące na podłożach o $a_w \leq 0,950$, reagowały silniej na fotokatalitycznie aktywny TiO₂. Hipotezę mówiącą o osłabieniu grzybni pod wpływem chlorku sodu i dodatku ditlenku tytanu potwierdziły przeprowadzone oznaczenia suchej biomasy (rys. 31–33). Z przyczyn opisanych wcześniej biomasa grzybów rosnących na pożywkach o $a_w \leq 0,900$ nie została oznaczona.

Na podstawie analizy danych przedstawionych na rys. 31–33 stwierdzono, że wpływ dodatku ditlenku tytanu na parametry życiowe grzybów *Penicillium chrysogenum* jest dostrzegalny już przy aktywności wody $a_w = 0,975$. Można również zauważyć, że najsilniejszy efekt inhibicji dotyczy pożywek o $a_w = 0,999$, suplementowanych 20 g TiO₂ na dm³ podłoża, a następnie aktywowanych światłem UV-VIS. W stosunku do podłoża kontrolnych spadek wytworzonej biomasy wynosił: 76,82% dla szczepu AMS1, 68,55% dla szczepu ZUT11 i 67% dla szczepu ZUT24a.



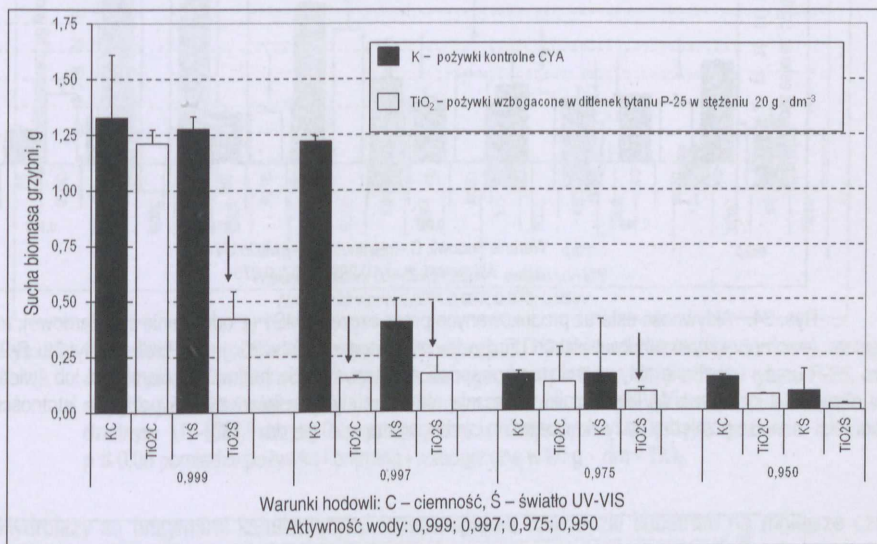
Rys. 31. Sucha biomasa ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep AMS1), uzyskana na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)



Rys. 32. Sucha biomasa ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT11), uzyskana na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)

W celu jednoznacznego potwierdzenia, czy sam ditlenek tytanu może hamować procesy życiowe grzybów rosnących na pożywkach o obniżonym a_w , zbadano aktywność wybranych enzymów grzy-

bowych. W hodowlach na pożywkach o $a_w = 0,900$ – $0,999$ oznaczono ogólną aktywność esteraz i 19 hydrolaz. Ze względu na niewystarczający poziom zarodnikowania na pożywkach o $a_w = 0,900$ i $0,950$ określenie aktywności hydrolaz z wykorzystaniem testu BIOMÈRIEUX było niemożliwe. Z kolei na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu o $a_w \leq 0,900$ nastąpiła całkowita inhibicja wydzielania esteraz, więc wyniki te pominięto.

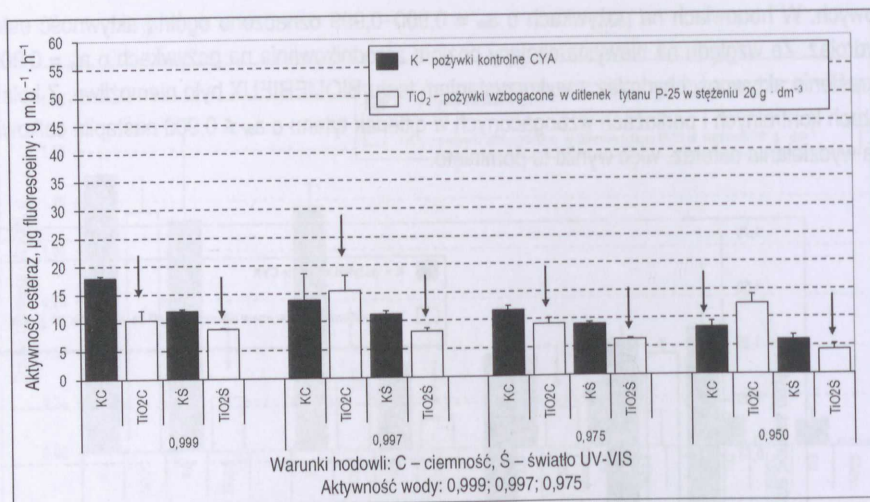


Rys. 33. Sucha biomasa ($\pm$ odchylenie standardowe) grzybów *Penicillium chrysogenum* (szczep ZUT24a), uzyskana na podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)

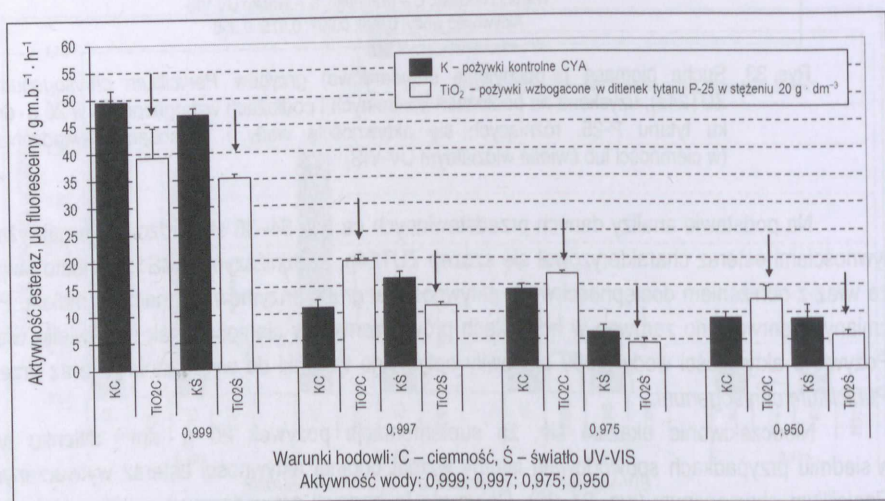
Na podstawie analizy danych przedstawionych na rys. 34–36 stwierdzono, że najwyższymi aktywnościami esteraz charakteryzował się szczep ZUT24a, a najniższymi AMS1. Ponadto stwierdzono, że wraz z obniżaniem dostępności wody aktywność tej grupy enzymów nieznacznie malała. Powyższe zmiany obserwowano zarówno w hodowlach prowadzonych w ciemności, jak i w świetle widzialnym. Pożywki o aktywności wody 0,999 stanowiły optymalne warunki do wydzielania esteraz przez grzyby *Penicillium chrysogenum*.

Nieoczekiwanie okazało się, że suplementacja pożywek $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu aż w siedmiu przypadkach spowodowała istotny wzrost ogólnej aktywności esteraz wytwarzanych przez *Penicillium chrysogenum* (rys. 34–36). Dotyczyło to hodowli prowadzonych w ciemności i szczepów AMS1 ($a_w = 0,997$ i $0,950$), ZUT11 ($a_w = 0,997$; $0,975$ i $0,950$) i ZUT24a ($a_w = 0,975$ i $0,950$).

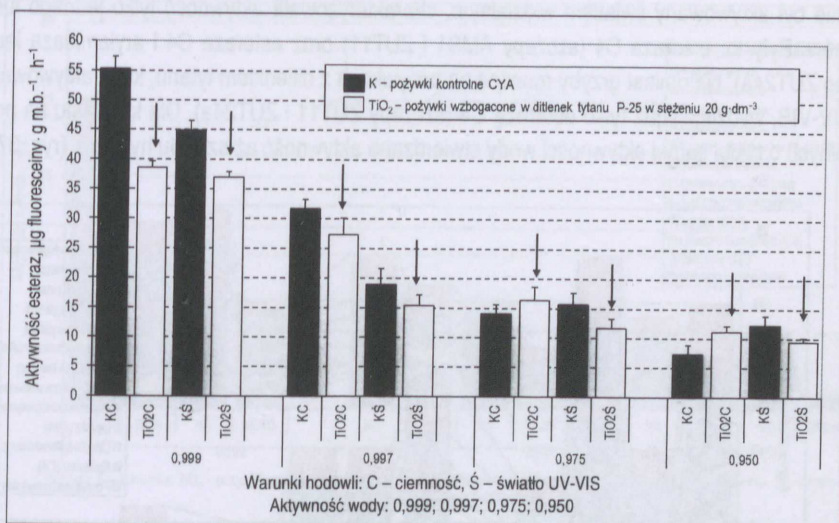
Natomiast w hodowlach prowadzonych w świetle UV-VIS dodatek do pożywek ditlenku tytanu wpłynął hamująco na wydzielanie esteraz. W stosunku do pożywek kontrolnych obserwowane obniżenie aktywności esteraz wynosiło od 17,62% (ZUT24a przy $a_w = 0,999$) do 30,95% (AMS1 przy $a_w = 0,975$). Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie opisane różnice były istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.



Rys. 34. Aktywność esteraż produkowanych przez szczep AMS1 ($\pm$ odchylenie standardowe), rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS); strzałki oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{TiO}_2$



Rys. 35. Aktywność esteraż produkowanych przez szczep ZUT11 ($\pm$ odchylenie standardowe), rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS); strzałki oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{TiO}_2$



Rys. 36. Aktywność esteraz produkowanych przez szczep ZUT 24a ($\pm$ odchylenie standardowe), rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS); strzałki oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w 20 g · dm⁻³ TiO₂

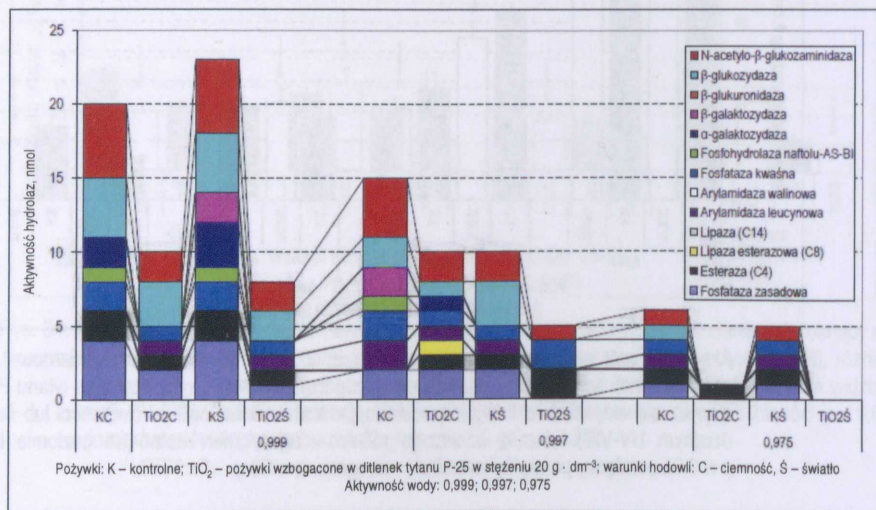
Hydrolazy są enzymami katalizującymi rozszczepienie cząsteczki substratu na mniejsze cząsteczki przez przyłączenie wody. Założono więc, że ich aktywność będzie zależała od dostępności wody w podłożu. Zgodnie z przyjętą hipotezą stwierdzono, że niedostatek wody w pożywce hamował aktywność hydrolaz wydzielanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum*, rosnące na podłożach kontrolnych (rys. 37–39). Obniżenie aktywności tych enzymów, spowodowane zmniejszeniem wskaźnika dostępnej wody, wynosiło od 25% dla szczepu ZUT11 do 70% dla szczepów ZUT24a i AMS1. Enzymami najsilniej hamowanymi przez pogarszające się warunki uwodnienia pożywek były: fosfohydrolaza naftolu-AS-BI (u AMS1 i ZUT11), α -galaktozydaza (u AMS1 i ZUT24a) i β -galaktozydaza (u ZUT11 i ZUT24a).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że każdy spośród 19 badanych enzymów charakteryzował się inną wrażliwością na obniżającą się aktywność wody pożywek kontrolnych. W wielu przypadkach a_w optymalne do zwiększenia aktywności poszczególnych enzymów nie pokrywało się z aktywnością wody optymalną do wzrostu grzybów *Penicillium chrysogenum*. Ten ostatni wniosek potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia, zawarte w pracach własnych dotyczących aktywności celulaz, ksylanaz i lipaz [260, 261, 262].

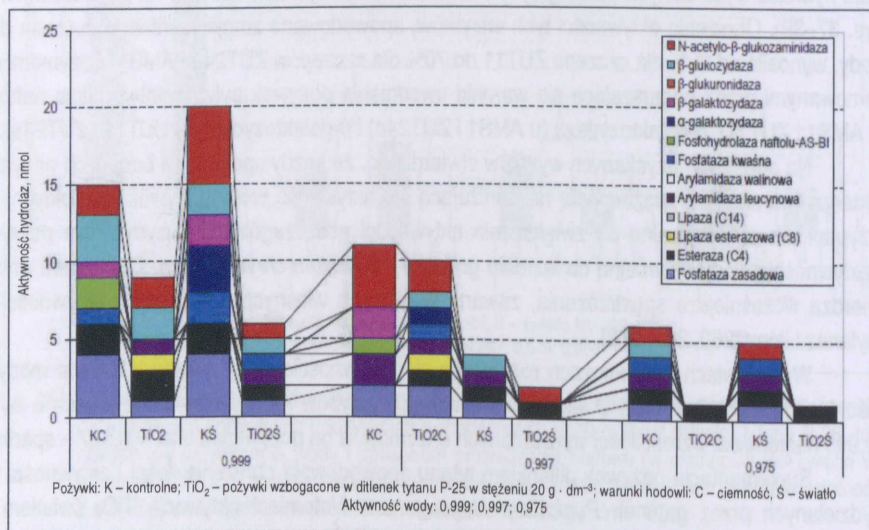
W hodowlach na podłożach różniących się aktywnością wody światło widzialne modyfikowało ilość wydzielanych hydrolaz. U wszystkich badanych grzybów rosnących na pożywkach o $a_w = 0,975$ i 0,999 następował wzrost ilości wytwarzanych enzymów, a na pożywkach o $a_w = 0,997$ – spadek.

Suplementacja pożywek ditlenkiem tytanu spowodowała obniżenie ilości i aktywności hydrolaz wydzielanych przez gatunek *Penicillium chrysogenum*. Natomiast aktywacja TiO₂ światłem UV-VIS skutkowała dalszą redukcją ich wydzielania (rys. 37–39). Zauważono ponadto, że w hodowlach na pożywkach o $a_w = 0,975$, inkubowanych w ciemności lub świetle, ditlenek tytanu powodował znaczące zubożenie różnorodności wydzielanych enzymów. Grzyby rosnące na podłożach wzbogaconych w TiO₂,

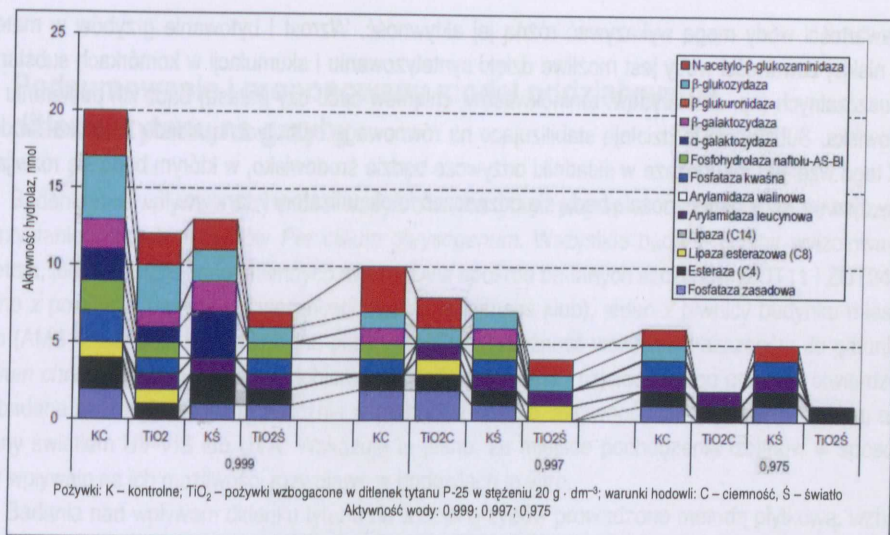
który nie był aktywowany światłem widzialnym, charakteryzowała aktywność tylko jednego lub dwóch enzymów. Były to: esteraza C4 (szczone AMS1 i ZUT11) oraz esteraza C4 i arylamidaza leucynowa (szczone ZUT24a). Natomiast grzyby rosnące na pożywkach z ditlenkiem tytanu, który aktywowano światłem UV-VIS, wydzielaly już tylko esterazę C4 (szczone ZUT11 i ZUT24a). Dla kontrastu na podłożach kontrolnych o takiej samej aktywności wody stwierdzano aktywność aż sześciu hydrolaz (rys. 37–39).



Rys. 37. Aktywność hydrolaz produkowanych przez szczep AMS1, rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)



Rys. 38. Aktywność hydrolaz produkowanych przez szczep ZUT11, rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)



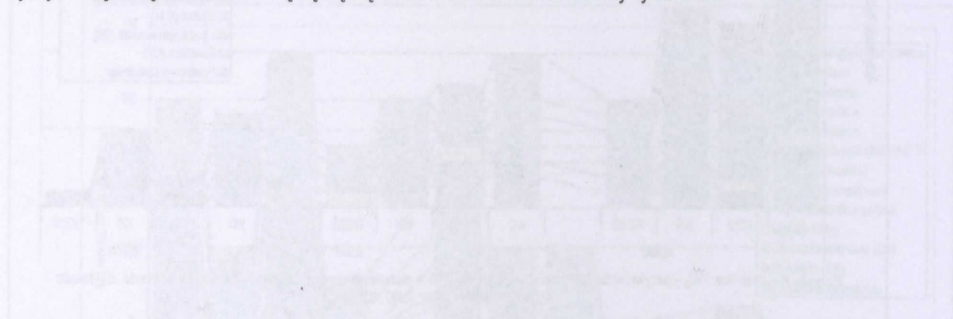
Rys. 39. Aktywność hydrolaz produkowanych przez szczep ZUT11, rosnący na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w 20 g · dm⁻³ ditlenku tytanu P-25, różniących się aktywnością wody i sposobem prowadzenia hodowli (w ciemności lub świetle widzialnym UV-VIS)

Stawianych jest wiele hipotez na temat wpływu aktywności wody na aktywność enzymatyczną organizmów w warunkach in vivo oraz in vitro [263–265]. Domodaran [263] uważa, że większość reakcji enzymatycznych zachodzących w komórkach mikroorganizmów to reakcje bez udziału wody, które jednak są prowadzone w środowisku wodnym. W środowisku pozbawionym wody spada szybkość tych reakcji. Ponadto ich kontrola staje się niemożliwa, bo woda wpływa na konfirmację receptorów błonowych, odpowiedzialnych za monitoring środowiska reakcji. Najprawdopodobniej z tego powodu to właśnie aktywność wody pożywek miała największy wpływ na wzrost i biomasę grzybów *Penicillium chrysogenum*.

Rezultaty przedstawione w niniejszej pracy rzucają nowe światło na znaczenie aktywności wody w zwiększeniu skuteczności fotokatalizatorów tytanowych. W większości przypadków wykazano, że przy niskich aktywnościach wody skuteczność działania ditlenku tytanu nieaktywowanego lub aktywowanego światłem rośnie. Przy obniżeniu aktywności wody do wartości bliskich poziomowi tolerowanemu przez gatunek *Penicillium chrysogenum* (tj. $a_w \leq 0,900$) można uzyskać pełną eliminację grzybów pleśniowych. Należy dodać, że w tych warunkach grzyby nie wykazywały żywotności. Świadczą o tym negatywne wyniki przeprowadzonych oznaczeń aktywności esteraz.

Powyższe wnioski mogą mieć istotne znaczenie dla producentów zapraw i farb fotokatalitycznych. Jeżeli pod warstwą farby będzie się znajdowała woda dostępna dla grzybów, a dodatkowo będą tam substancje organiczne (np. drewno), może się okazać, że nawet najsukuczniejsza powłoka malarska nie będzie zabezpieczona przed korozją mikrobiologiczną. Grzyby strzępkowe będą się rozwijać zarówno na styku podłoża pokrytego powłoką malarską, jak i w samym podłożu. Jak wiadomo, duża część materiałów jest malowana farbami o działaniu antygrzybowym, przy czym podłoże pozostaje niezabezpieczone lub słabo zabezpieczone przed wnikaniem wody. Należy przy tym zaznaczyć, że ze względu na różne mechanizmy powiązania wody w materiałach budowlanych, wyroby o takiej samej

zawartości wody mogą wykazywać różną jej aktywność. Wzrost i bytowanie grzybów w materiałach o niskiej zawartości wody jest możliwe dzięki syntetyzowaniu i akumulacji w komórkach substancji rozpuszczalnych (np. sacharydów, aminokwasów, chlorków sodu czy potasu) bądź ich pobieraniu ze środowiska. Substancje te działają stabilizująco na równowagę osmotyczną układu komórka–środowisko. Z tego względu im uboższe w składniki odżywcze będzie środowisko, w którym będą się rozwijać grzyby, tym większą skutecznością będą się odznaczać fotokatalizatory tytanowe.



Wykres przedstawiający wpływ zawartości wody w materiale na wzrost grzybów. Oś pozioma przedstawia różne substraty, a oś pionowa – wartość wzrostu. Wysokość słupków maleje od lewej do prawej, co sugeruje, że wzrost grzybów jest silnie zależny od dostępności wody w środowisku.

Wzrost grzybów na substratach o niskiej zawartości wody jest możliwy dzięki syntetyzowaniu i akumulacji w komórkach substancji rozpuszczalnych (np. sacharydów, aminokwasów, chlorków sodu czy potasu) bądź ich pobieraniu ze środowiska. Substancje te działają stabilizująco na równowagę osmotyczną układu komórka–środowisko. Z tego względu im uboższe w składniki odżywcze będzie środowisko, w którym będą się rozwijać grzyby, tym większą skutecznością będą się odznaczać fotokatalizatory tytanowe.

Wzrost grzybów na substratach o niskiej zawartości wody jest możliwy dzięki syntetyzowaniu i akumulacji w komórkach substancji rozpuszczalnych (np. sacharydów, aminokwasów, chlorków sodu czy potasu) bądź ich pobieraniu ze środowiska. Substancje te działają stabilizująco na równowagę osmotyczną układu komórka–środowisko. Z tego względu im uboższe w składniki odżywcze będzie środowisko, w którym będą się rozwijać grzyby, tym większą skutecznością będą się odznaczać fotokatalizatory tytanowe.

Wzrost grzybów na substratach o niskiej zawartości wody jest możliwy dzięki syntetyzowaniu i akumulacji w komórkach substancji rozpuszczalnych (np. sacharydów, aminokwasów, chlorków sodu czy potasu) bądź ich pobieraniu ze środowiska. Substancje te działają stabilizująco na równowagę osmotyczną układu komórka–środowisko. Z tego względu im uboższe w składniki odżywcze będzie środowisko, w którym będą się rozwijać grzyby, tym większą skutecznością będą się odznaczać fotokatalizatory tytanowe.

11. Podsumowanie i proponowany model oddziaływania ditlenku tytanu na grzyby

Badania nad wpływem aktywności wody i ditlenku tytanu aktywowanego światłem prowadzono z wykorzystaniem trzech szczepów *Penicillium chrysogenum*. Wszystkie badane grzyby wyizolowano z powietrza, jednak z użyciem odmiennych metod. Dwa spośród badanych szczepów (ZUT11 i ZUT24a) uzyskano z powietrza budynku użyteczności publicznej (fitness klub), jeden z piwnicy budynku mieszkalnego (AMS1). Badania identyfikacyjne potwierdziły przynależność wszystkich szczepów do gatunku *Penicillium chrysogenum*. Pomimo podobieństwa morfologicznego i fizjologicznego grzybów stwierdzono, że badane szczepy różniły się znacznie w reakcji na światło, aktywność wody i ditlenek tytanu, aktywowany światłem UV-VIS lub UVA. Wskazuje to jasno, że miejsce pochodzenia izolatów w sposób złożony wpływało na ich możliwości rozwojowe w hodowlach in vitro.

Badania nad wpływem ditlenku tytanu na wzrost grzybów prowadzono metodą płytkową, wzbogacając pożywki przeznaczone do hodowli grzybów w TiO_2 . Po raz pierwszy sztuczne podłoże do badań nad działaniem środków antygrzybowych w ochronie drewna zastosował w 1910 roku Seidenschur. Trzydzieści lat później metodę agarową zastąpiono metodą klockową [266]. W literaturze przedmiotu można znaleźć opisy co najmniej kilku sposobów badania skuteczności produktów biobójczych i substancji czynnych o działaniu grzybobójczym, stosowanych do ochrony materiałów technicznych [267, 268]. Niektóre spośród tych metod zostały objęte normami: PN-EN 152-1: 1994 [269], PN-EN 1275:2000 [270], PN-EN 1650:2002 [271]. Inne są wykorzystywane w laboratoriach przemysłowych stosujących własne procedury (np. metoda Instytutu Techniki Budowlanej: procedura LD-14 pt. *Badanie skuteczności działania środków przeznaczonych do zwalczania grzybów pleśniowych na tynkach*). Opisane metody różnią się między sobą warunkami prowadzonych oznaczeń, sposobem oceny parametrów, a także wyborem organizmów modelowych. Żadna z prezentowanych metod nie jest przeznaczona wyłącznie do testowania skuteczności preparatów o działaniu fotokatalitycznym. Na podstawie wyników uzyskanych przez autorkę niniejszego opracowania można zaproponować metodę płytkową, z wykorzystaniem pożywek agarowych do badań nad antygrzybowymi właściwościami fotokatalizatorów tytanowych. W trakcie doświadczeń przebadano cztery podłoża standardowo używane do hodowli grzybów. Były to pożywki MEA, CYA, SGA i PDA. Analizy, przeprowadzone z wykorzystaniem najnowszych technik mikroskopii elektronowej SEM i TEM, potwierdziły, że suplementacja pożywek ditlenkiem tytanu daje równomierne rozłożenie wprowadzonego czynnika w pożywce (rys. 8–11). Ponadto nie powoduje zmian w jego charakterystyce krystalograficznej. Dotyczy to zarówno kształtów, jak i wielkości kryształitów.

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów określono szybkość wzrostu grzybów na badanych podłożach kontrolnych i podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu w hodowlach prowadzonych w ciemności, w świetle UV-VIS oraz UVA. Jak dowiedli Sharma i Pandey [272], szybkość przyrostu grzybni jest bardzo dobrym wskaźnikiem identyfikacji i wyboru komponentów podłoża, odpowiednich dla danego gatunku grzybów. Może być również przydatnym narzędziem uzupełniającym charakterystykę gatunków i podgatunków z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* [273]. Potwierdziły to wyniki otrzymane przez autorkę niniejszego opracowania. Wykazano, że *Penicillium chrysogenum* jest gatunkiem wrażliwym na światło UV-VIS oraz UVA. Każdy z badanych szczepów reagował na światło w odmienny spo-

sób (negatywnie lub pozytywnie). Reakcja na naświetlanie nie może być uznana za wyróżnik szczepu, gdyż w dużej mierze zależała od typu zastosowanego podłoża, jego a_w i zawartości TiO_2 . Różną wrażliwość na światło szczepów grzybowych, należących do tego samego gatunku, potwierdzają również wyniki, które otrzymali Karpenko i in. [274].

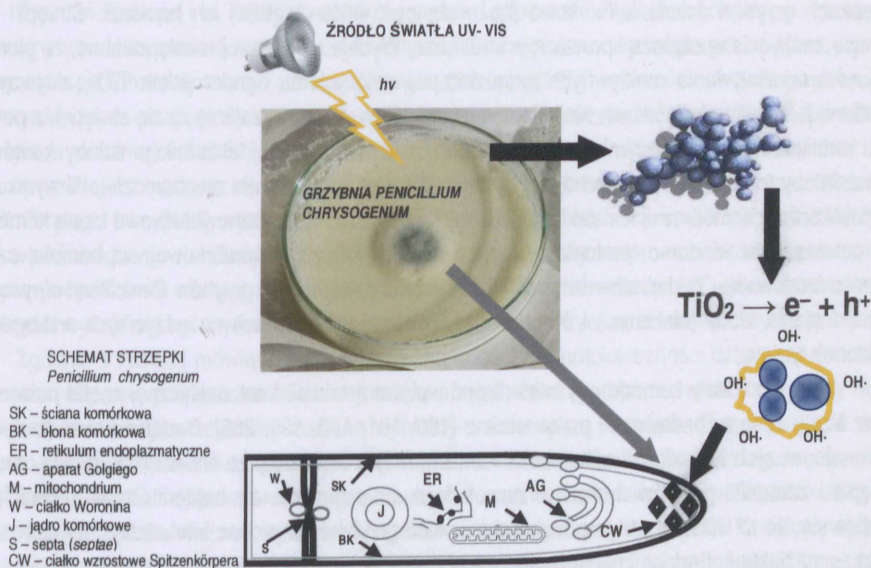
Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że odporność grzybów należących do rodzaju *Penicillium* na ditlenek tytanu aktywowany światłem UV-VIS jest znaczna. Spostrzeżenie to tylko częściowo potwierdzają wyniki Maneerata i Hayaty [215] oraz Hochmannovej i Vytrasovej [219]. Wymienieni autorzy badali pojedyncze szczepy *Penicillium*, a jak wskazują wyniki otrzymane przez autorów niniejszego opracowania, grzyby *Penicillium chrysogenum* charakteryzują się dużą zmiennością reakcji na fotokatalitycznie aktywny ditlenek tytanu. W zależności od szczepu i miejsca jego izolacji występuje różna wrażliwość na TiO_2 . Z badań własnych [275, 276] wiadomo, że podobny poziom zmienności cechuje również inne gatunki grzybów pleśniowych. Z tego powodu do badań nad skutecznością fotokatalizatorów tytanowych powinno się wybierać przynajmniej trzy szczepy z każdego gatunku grzybów.

Gatunek *Penicillium chrysogenum* można polecić jako organizm modelowy. Cechy, które ten wybór uzasadniają, to: powszechność występowania tego gatunku w powietrzu pomieszczeń, a także w środowisku zewnętrznym, typowa dla grzybów budowa, brak specjalnych wymagań hodowlanych (jego hodowle są tanie i łatwe) oraz krótki cykl życiowy.

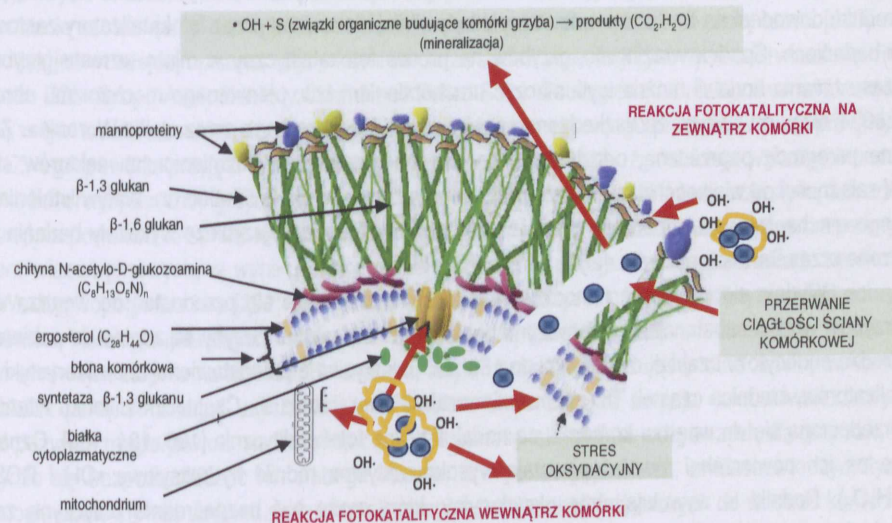
Według wielu uznanych autorytetów z dziedziny mikrobiologii ograniczenie funkcji życiowych mikroorganizmów (w tym również grzybów mikroskopowych) jest spowodowane tworzeniem rodników hydroksylowych ($\bullet\text{OH}$) w czasie reakcji fotokatalitycznej, przebiegającej z udziałem cząstek ditlenku tytanu, aktywowanych światłem UV [175, 182, 212, 218]. Z przeglądowej pracy autorstwa Hammela i in. [277], wiadomo, że identyfikacja rodników $\bullet\text{OH}$ i ROS w kulturach grzybowych jest zadaniem bardzo trudnym. Istniejące techniki umożliwiające ich wykrycie to spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego lub pośrednia ocena produktów reakcji rodników z różnymi substratami. Pierwsza z metod nie pozwala jednak określić, czy rodniki są wynikiem reakcji enzymatycznych przebiegających wewnątrz czy na zewnątrz komórek grzybów (w wyniku indukcji procesu fotokatalitycznego). Z kolei druga z wymienionych metod jest obciążona dużym błędem. Wynika to z faktu, że wiele detektorów $\bullet\text{OH}$ i ROS jest niespecyficznych i może ulec utlenieniu przez inne rodniki obecne w komórkach grzybów. Ponadto rodniki ROS charakteryzują się krótkim czasem połowicznego rozpadu i aby możliwe było ich oznaczenie w czasie długotrwałych badań *in vitro*, konieczne jest stosowanie akceptorów wolnych rodników (ang. *scavengers*), np. DMSO [277]. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, w przeprowadzonych badaniach zrezygnowano z prób określenia ilości tworzących się wolnych rodników, skupiając się na innych parametrach, które mogłyby wskazywać na zachodzenie procesu fotokatalitycznego.

Przydatnymi narzędziami badań nad antygrzybowymi właściwościami fotokatalizatorów tytanowych okazały się oznaczenia suchej biomasy i aktywności enzymatycznej. Tworzenie grzybni powierzchniowej obserwowane na pożywkach wzbogaconych ditlenkiem tytanu powoduje, że przy pomiarze promienia kolonii popełnia się znaczny błąd wpływający na zaniżenie ogólnego efektu działania ditlenku tytanu. Z kolei białkowy charakter enzymów powoduje, że reagują one szybko i wyraźnie na różne czynniki środowiskowe, zarówno naturalne, jak wprowadzone sztucznie. Z tego powodu określenie aktywności enzymatycznej np. esteraz, katalazy lub hydrolaz może być dobrym wskaźnikiem ogólnej żywotności grzybów pleśniowych oraz oddziaływania na nie takich związków jak tlenki metali lub biocydy. Potwierdzają to również wyniki badań uzyskane przez Gilhama i Lehnnera [278] oraz Gadda [279].

Na podstawie wyników badań własnych nad wpływem ditlenku tytanu na grzyby pleśniowe i bakterie [275, 276, 280–283] postawiono hipotezę, że ditlenek tytanu powoduje zakłócenie wewnętrznych systemów metabolicznych organizmów, oraz zaproponowano prawdopodobny model działania ditlenku tytanu na gatunek *Penicillium chrysogenum*. Ilustrację modelu przedstawiono na rys. 40 i 41.



Rys. 40. Pierwszy etap oddziaływania ditlenku tytanu na strzępki grzybów *Penicillium chrysogenum*



Rys. 41. Drugi etap oddziaływania ditlenku tytanu na strzępki grzybów *P. chrysogenum*

Ciągła aktywacja TiO_2 przez światło widzialne UV-VIS prowadzi do powstania pewnej ilości rodników ($\bullet\text{OH}$) o dużym potencjale utleniającym w stosunku do związków organicznych, w tym polimerów naturalnych (np. ligniny, celulozy, chityny itp.), wchodzących w skład ściany komórkowej grzybów. Ściana komórkowa grzybów *Penicillium chrysogenum* jest zbudowana z warstw składających się w 29% z glukanu, w 31% z mannanu (i związanych z nim białek) oraz w 25–30% z chityny [284]. W dojrzałych strzępkach grzybów ściana komórkowa może stanowić 40% objętości ich komórek. Strzępki młode, rosnące, mają ścianę cieńszą i prostszą w strukturze. Wydaje się zatem prawdopodobne, że pierwszym miejscem oddziaływania reaktywnych rodników, powstających na nanocząstkach TiO_2 , aktywowanych światłem, jest ściana komórkowa kielkującej grzybni. W następstwie zetknięcia się strzępek z powstającymi rodnikami hydroksylowymi mogłoby dochodzić do mineralizacji składników ściany komórkowej. Prowadziłoby to do zmiany jej grubości i wytrzymałości na uszkodzenia mechaniczne. W wyniku utraty ciągłości ściany komórkowej komórki strzępki byłyby otoczone tylko jednowarstwową błoną komórkową. Jak powszechnie wiadomo, protoplasty (czyli komórki bez ściany komórkowej) są bardziej czułe na czynniki środowiska. Taki mechanizm potwierdza większa wrażliwość grzybów *Penicillium chrysogenum* na niedostatek wody (niskie a_w) i światło obserwowana w hodowlach na pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu.

Rozpad ściany komórkowej bakterii pod wpływem reakcji fotokatalitycznej został potwierdzony przez liczne zespoły badawcze i prace własne [180, 181, 188, 195, 283]. Badania prowadzone z użyciem najnowszych technik mikroskopii elektronowej (AFM) wskazują, że ściana komórkowa otaczająca strzępki i zarodniki grzybów może być nawet dwukrotnie grubsza niż bakterii Gram-dodatnich [285]. Wydaje się, że to właśnie z tego powodu odporność grzybów na proces fotokatalityczny jest znacznie większa niż bakterii. Podobny pogląd wyrażają Matsunaga i in. [166].

Równie prawdopodobne (jak rozpad ściany komórkowej) wydaje się oddziaływanie rodników hydroksylowych na tzw. ciało wzrostowe Spitzenkörpera (rys. 40). Większa wrażliwość grzybów na ditlenek tytanu aktywowany światłem, obserwowana w pierwszych dniach założenia hodowli, jest pośrednim dowodem na to, że rosnące strzępki były silnie blokowane przez fotokatalizatory zastosowane w badaniach. Spadek wrażliwości grzybów na proces fotokatalityczny w miarę wzrostu grzybni oraz czasu trwania hodowli można wytłumaczyć uruchomieniem tzw. pierwotnego mechanizmu obronnego [286]. Polega on na tym, że uszkodzona część strzępki jest zamykana przez ciało Woronina. Zatykają one przegrodę poprzeczną, oddzielając zniszczone komórki od niezmiennych sektorów strzępki. W zależności od wielkości strzępki przegroda ta ma szerokość około 50–500 nm. Wpływ istnienia opisanego mechanizmu na odporność grzybów na fungicydy i leki antygrzybicze wykazały badania prowadzone przez Bartoszewską i in. [287].

Wydaje się, że część nanocząstek ditlenku tytanu może się przedostać do wnętrza strzępki grzybów wraz z substancjami odżywczymi pobieranymi z podłoża. Grzyby są zdolne do pobierania na drodze endocytozy cząstek o wielkości do 150 nm. Jak wynika z przedstawionej charakterystyki fotokatalizatorów, średnica cząstek TiO_2 nie przekraczała 25 nm (tabela 3). Cząsteczki ditlenku tytanu, które przedostaną się do wnętrza komórek, są nadal aktywne fotokatalitycznie [180, 184, 186]. Oznacza to, że na ich powierzchni również powstają wysokoreaktywne rodniki hydroksylowe $\bullet\text{OH}$ i ROS ($\bullet\text{O}_2^-$ i H_2O_2). Rodniki te wywołują stres oksydacyjny, który może być bezpośrednią przyczyną zakłóceń w funkcjonowaniu endogennych enzymów grzybowych, produkowanych w cytoplazmie, mitochondriach i peroksysomach (rys. 40). Toksyczność rodników zależy bezpośrednio od ich stężenia w żywych ko-

mórkach. Umiarkowany stres oksydacyjny może spowodować upośledzenie wzrostu i rozwoju komórek. Natomiast silniejszy może wywołać u nich apoptozę (czyli programowane samobójstwo komórek) lub doprowadzić do martwicy [288–290]. Potwierdzeniem wystąpienia stresu oksydacyjnego w komórkach grzybów *Penicillium chrysogenum* były obserwowane zaburzenia w wydzielaniu enzymów (esteraz, katalazy i hydrolaz) oraz ich częściowa lub całkowita inaktywacja.

Z badań Emriego i in. [288] wiadomo, że wysoka odporność *Penicillium chrysogenum* na stres oksydacyjny wywołany przez fotokatalitycznie aktywny ditlenek tytanu jest najprawdopodobniej związana z wysokim poziomem katalazy i peroksydazy glutationowej (GPX) w komórkach tych grzybów. Użyte wyniki potwierdzają te spostrzeżenia tylko częściowo. Aktywacja światłem UV-VIS lub UVA ditlenku tytanu dodanego do pożywek spowodowała istotne obniżenie aktywności katalazy oraz ilości tworzonej suchej biomasy u wszystkich badanych szczepów *Penicillium chrysogenum*. Natomiast z badań Emriego i in. [288] wynika, że obecność egzogennych czynników utleniających, takich jak: H_2O_2 i wodoronadtlenek tert-butyłowy (t-BOOH), nie spowodowała zmian w poziomie wykorzystania glukozy z pożywki oraz nie wpłynęła na przyrosty biomasy grzybów. Jedynym wytłumaczeniem tych rozbieżności wydaje się być wyższa aktywność TiO_2 w procesach wywołania stresu oksydacyjnego.

Zgodnie z zasadą mówiącą o większej reaktywności i nanotoksyczności cząstek o mniejszych rozmiarach i większej powierzchni właściwej należy przyjąć, że antygrzybowy efekt fotokatalizy będzie tym większy, im mniejsze krystality zostaną wchłonięte do wnętrza komórek. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez Hochmannową i Wytrasową [219]. Chociaż autorki nie sformułowały tego wniosku w swojej pracy, to analizując uzyskane przez nie wyniki, można stwierdzić, że powłoki fotokatalityczne wykonane z anatazu o mniejszej wielkości krystalitów (i większych wartościach BET) wykazywały lepsze właściwości antygrzybowe. Potwierdzają to wyniki przedstawione w niniejszej pracy. Ditlenek tytanu ZCh, produkowany przez Grupę Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A., charakteryzowała największa powierzchnia aktywna, co skutkowało najsilniejszymi właściwościami przeciugrzybowymi. Na wzrost antygrzybowych właściwości fotokatalizatorów względem referencyjnego P-25 wpływa również domieszkowanie azotem (ang. *doping*). Ten wniosek znalazł swoje potwierdzenie w pracy Li i in. [220].

Jak już wcześniej opisano, najlepszymi właściwościami przeciugrzybowymi odznaczał się ditlenek tytanu ZCh (Grupa Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A.). Ze względu na małą zawartość anatazu (21,8%) w tym katalizatorze mechanizm fotokatalityczny wydaje się w jego przypadku mniej prawdopodobny. Z tego powodu przyjęto również drugą hipotezę. Zakłada ona, że inhibicja wzrostu, biomasy i aktywności enzymatycznej grzybów może być spowodowana sorpcją. Główną przyczyną adsorpcji substancji na powierzchni sorbentów jest wytworzenie wiązań o charakterze kowalencyjnym, z pewnym udziałem wiązań jonowych, w wyniku czego sorbenty zmieniają swoje właściwości i skład chemiczny [291]. Według Topoglidisa i in. [292] oraz Ellingsena [293] nanokrystaliczny ditlenek tytanu jest dobrym adsorbentem białek strukturalnych i enzymów. Z najnowszej literatury wiadomo, że sorpcja może zachodzić w równym stopniu na krystalitach anatazu, rutyli i brukitu, powodując istotne zmiany w konformacji białek [294]. Analizując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że sorpcja cukrów wchodzących w skład pożywek mogła powodować zmniejszenie dostępności składników odżywczych dla grzybów, co przyczyniło się bezpośrednio do ich słabego wzrostu. Z kolei sorpcja białek, zwłaszcza enzymatycznych, mogła spowodować upośledzenie kontroli przepływu substancji odżywczych do wnętrza komórek. Wydaje się, że badania nad sorpcją na cząstkach ditlenku tytanu mogą wyjaśnić, który z zaproponowanych mechanizmów jest ważniejszy.

W ostatnich latach szczególnego znaczenia nabierają badania fizjologicznych i biochemicznych właściwości grzybów występujących w pomieszczeniach zamkniętych. Można sądzić, że wiedza ta umożliwi opracowanie nowych, skutecznych i tanich metod pozwalających na wyeliminowanie ich ze środowiska człowieka. Ze względu na powszechne wykorzystanie fotokatalizatorów tytanowych w tworzeniu materiałów samoczyszczących (ang. *self cleaning* lub *stay clean*) określenie właściwości antygrzybowych nowej generacji fotokatalizatorów na bazie ditlenku tytanu wydaje się dobrym początkiem nowego kierunku badań.

12. Wnioski

1. Metodę płytkową z wykorzystaniem pożywek agarowych można polecić do badań nad antygrzybowymi właściwościami fotokatalizatorów tytanowych. Najbardziej odpowiednim podłożem do modelowania wzrostu grzybów jest pożywka CYA (w doświadczeniach trwających krócej niż siedem dni) i PDA (w doświadczeniach trwających dłużej niż siedem dni).

2. Komercyjny ditlenek tytanu P-25, produkowany przez niemiecką firmę Evonik, można polecić jako materiał odniesienia w badaniach nad antygrzybowymi właściwościami katalizatorów tytanowych.

3. Badane szczepy *Penicillium chrysogenum* charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem wrażliwości na światło, aktywność wody i ditlenek tytanu, aktywowany światłem UV-VIS lub UVA.

4. Ze względu na znaczną odporność grzybów *Penicillium chrysogenum* na ditlenek tytanu aktywowany światłem wymieniony gatunek może być dobrym organizmem modelowym w badaniach nad skutecznością działania produktów fotokatalitycznych (np. farb, powłok itp.).

5. Dodatek 20 g ditlenku tytanu na dm^3 pożywki i aktywacja światłem UVA ($3 \cdot 30$ min) lub UV-VIS są niewystarczające do pełnej eliminacji grzybów *Penicillium chrysogenum*, występujących w powietrzu. Dawka taka wpływa jednak na ograniczenie tempa wzrostu grzybów, spadek tworzonej biomasy i obniżenie aktywności enzymów (w tym katalaz, esteraz i hydrolaz).

6. Oznaczenia aktywności enzymatycznej są dobrym wskaźnikiem vitalności grzybów rosnących na powłokach fotokatalitycznych.

7. Badania siły przeciugrzybowych właściwości ditlenków tytanu pozwala uszeregować analizowane fotokatalizatory w następującym porządku (od najlepszego do najgorszego): ditlenek tytanu ZCh (Grupa Azoty Zakłady Chemiczne Police S.A.) > fotokatalizator N/TiO_2 (Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie) > P-25 (Evonik).

8. Niższa aktywność wody zwiększa skuteczność fotokatalizatorów tytanowych, aktywowanych światłem UV-VIS.

9. Zahamowanie wzrostu grzybów pleśniowych obserwowane na pożywkach z ditlenkiem tytanu, który nie był aktywowany światłem, mogło być spowodowane sorpcją białek i cukrów na powierzchni nanocząstek TiO_2 . Aktywacja ditlenku tytanu światłem prowadziła do dalszego zahamowania wzrostu grzybów, a główną jego przyczyną mógł być proces fotokatalityczny.

Literatura

- [1] DUFLO E., GREENSTONE M., HANNA R., Indoor air pollution, health and economic well-being, *Surv. Perspect. Integr. Environ. Soc.*, 2008, vol. 1, s.1–9.
- [2] MITCHELL C.S., ZHANG J.J., SIGSGAARD T., JANTUNEN M., LIOY P.J., SAMSON R., KAROL M.H., Current state of the science: health effects and indoor environment, *Environ. Health Persp.*, 2007, vol. 115, no. 6, s. 958–964.
- [3] KOLSTAD H.A., BRAUER C., IVERSEN M., SIGSGAARD T., MIKKELSEN S., Do indoor molds in nonindustrial environments threaten workers' wealth? A review of the epidemiologic evidence, *Epidem. Rev.*, 2002, vol. 24, s. 203–217.
- [4] BONNEFOY X.R., BRAUBACH M., MOISSONNIER B., MONOLBAEV K., ROBBEL N., Housing and health in Europe: preliminary results of pan-European study, *Am. J. Public. Health*, 2003, vol. 93, no. 9, s. 1559–1563.
- [5] SOROKA P.M., CYPROWSKI M., SZADKOWSKA-STAŃCZYK I., Narażenie zawodowe na mykotoksyny w różnych gałęziach przemysłu, *Med. Pr.*, 2008, vol. 59, nr 4, s. 333–334.
- [6] EL-ANSARY A., AL-DAIHAN A.S., On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview, *J. Toxicol.*, 2009, vol. 1, doi 10.1155/2009/754810.
- [7] ALLEN N.S., EDGE M., SANDOVAL G., VERRAN J., STRATTON J., MALTBY J., Photocatalytic coatings for environmental applications, *J. Photochem. Photobiol.*, 2005, vol. 81, no. 2, s. 279–290.
- [8] SINGH M., SINGH S., PRASAD S., GAMBHIR I.S., Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles, *Digest J. Nanomat. Biostruct.*, 2008, vol. 3, no. 3, s. 115–122.
- [9] MALATO S., BLANCO J., VIDAL A., RICHTER C., Photocatalysis with solar energy at a pilot plant scale: an overview, *Appl. Catal. B: Environ.*, 2007, vol. 37, no. 1, s. 1–15.
- [10] YU Q.L., BALLARI M.M., BROUWERS H.J.H., Indoor air purification using heterogeneous photocatalytic oxidation. Part II kinetic study, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2010, vol. 99, s. 58–65.
- [11] GÓRNY R.L., REPONEN T., WILLEKE K., SCHMECHEL D., ROBINE E., BOISSIER M., GRINSHUPUN S.A., Fungal fragments as indoor air biocontaminants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no. 7, s. 3522–3531.
- [12] ANDERSEN B., FRISVAD J.C., SØNDERGAARD I., RASMUSSEN I., LARSEN L.S., Associations between fungal species and water-damaged building materials, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, no. 12, s. 4180–4188.
- [13] ZYSKA B., ŻAKOWSKA Z., *Mikrobiologia materiałów*, Łódź, Wydaw. Politechniki Łódzkiej, 2005.
- [14] BUSH R.K., PORTNOY J.M., SAXON A., TERR A.I., WOOD R.A., The medical effects of mold exposure, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, vol. 117, no. 2, s. 326–333.
- [15] *Assembling the Tree of Life*, eds J. Cracraft, M.J. Donaghue, Oxford, Oxford University Press, 2004.
- [16] *Dictionary of the Fungi*, 10 ed., Wallingford, CAB International, 2008.
- [17] MORA C., TITTENSOR D., ADL S., SIMPSON A., WORM B., How Many species are there on earth and in the ocean?, *PLoS Biology*, 2008, vol. 9, doi 10.1371/journal.pbio.1001127.
- [18] DUBEY S., LANJEWAR S., SAHU M., PANDEY K., KUTTI U., The monitoring of filamentous fungi in the indoor, *Air Quality Health J. Phytol.*, 2011, vol. 3, no. 4, s. 13–14.
- [19] KUNICKI-GOLDGINGER W.H., *Życie bakterii*, Warszawa, PWN, 2001.
- [20] SAUTOUR M., SIXT N., DALLE F., L'OLLIVER C., FOURQUENET V., CALINON C., PAUL K., VALVIN S., MAUREL A., AHO S., COUILLAUD G., CACHIA C., VAGNER O., CUISENIER B., CAILLOT D., BONNIN A., Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at French hospital, *Sci. Total Environ.*, 2009, vol. 407, no. 12, s. 3766–3771.
- [21] PORTNOY J.M., BARNES C.S., KENNEDY K.K., Sampling for indoor fungi, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, vol. 113, no. 2, s. 189–198.

- [22] PITKÄRANTA M., MEKLIN T., HYVÄRINEN A., NEVALAINEN A., PAULIN L., AUVINEN P., LIGNELL U., RINTALA H., Molecular profiling of fungal communities in moisture damaged buildings before and after remediation – a comparison of culture-dependent and culture-independent methods, *BMC Microbiol.*, 2011, vol. 11, s. 235–251.
- [23] MIKASZEWSKA B., GRAJEWSKI J., Pataogenne i alergogenne grzyby pleśniowe w otoczeniu człowieka, *Alergia*, 2005, nr 2, s. 45–50.
- [24] KRAJEWSKA-KULAK E., GNIADEK A., ŁUKASZUK C.R., MACURA A.B., KULAK W., Wstępne porównanie wyników badań zanieczyszczenia powietrza grzybami z wykorzystaniem aparatu SAS SUPER 100 i MAS 100. Doniesienie wstępne, *Mikol. Lek.*, 2009, vol. 16, nr 1, s. 34–39.
- [25] JANIŃSKA B., Metody oceny skażenia obiektów budowlanych grzybami pleśniowymi, *Found. Civil Environ. Eng.*, 2002, vol. 3, s. 47–64.
- [26] PIONTEK M., *Grzyby pleśniowe*, Zielona Góra, Wydaw. Uniwersytetu Zielonogórskiego, 1999.
- [27] AMEND A.S., SEIFERT K.A., BRUN T.D., Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics, *PNAS*, 2010, vol. 107, no. 31, s. 13748–1375.
- [28] SORENSON W.G., Fungal spores: hazardous to health, *Environ. Health Perspect.*, 1999, vol. 107, no. 3, s. 469–472.
- [29] PIETARINEN V.M., RINTALA H., HYVARINEN A., LIGNELL U., KARKKAINEN P., NEVALAINEN A., Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis, *J. Environ. Monit.*, 2008, vol. 10, no. 5, 655–663.
- [30] HYVÄRINEN A., MEKLIN T., VEPSÄLÄINEN A., NEVALAINEN A., Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials – concentrations and diversity, *Int. Biodet. Biodegrad.*, 2002, vol. 49, no. 1, s. 27–37.
- [31] ŻUKIEWICZ-SOBCZAK W., SOBCZAK P., IMBOR K., KRASOWSKA E., ZWOLIŃSKI J., HOROCH A., WOJTYŁA A., PIĄTEK J., Zagrożenia grzybowe w budynkach i w mieszkaniach – wpływ na organizm człowieka, *MONZ*, 2012, vol. 18, nr 2, s. 141–146.
- [32] TROCHONOWICZ M., Wilgoć w obiektach budowlanych, Problematyka badań wilgotnościowych, *Budownictwo i Architektura*, 2010, vol. 7, s. 131–144.
- [33] BOGOSŁOWSKI W., *Procesy cieplne i wilgotnościowe w budynkach*, Warszawa, Arkady, 1989.
- [34] PAŁACHA Z., Aktywność wody – ważny parametr żywności, *Przem. Spoż.*, 2008, vol. 62, s. 22–26.
- [35] SOCHACKA M., BORATYŃSKI J., Osmoregulacja – ważny parametr rozwoju bakterii, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011, vol. 65, s. 714–724.
- [36] NIELSEN K.F., *Mould growth on building materials*. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Praca doktorska, By og BYG Statens Byggeforskingsinstitut, 2002, ISBN 87-563-1130-3.
- [37] LAROCHE C., FINE F., GERVAIS P., Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders, *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, vol. 97, no. 3, s. 307–315.
- [38] BEDNARSKI W., FIEDURKA J., *Podstawy biotechnologii przemysłowej*, Warszawa, WNT, 2007.
- [39] GRANT C., HUNTER C.A., FLANNIGAN B., BRAVERY A.F., The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwelling, 1989, *Int. Biodeterior.*, vol. 25, no. 3, s. 259–284.
- [40] LEWICKI P.P., Właściwości wody w produktach spożywczych, *Zesz. Nauk., Politech., Łódź. Inż. Chem. Proc.*, 1999, vol. 24, s. 29–46.
- [41] NIELSEN K.F., Mycotoxin production by indoor molds, *Fungal Genet. Biol.*, 2003, vol. 39, no. 2, s. 103–117.
- [42] ELBERT W., TAYLOR P.E., ANDREA M.O., POSCHL U., Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions, *Atmos. Chem. Phys.*, 2007, vol. 7, s. 4569–4588.
- [43] HAMADA N., FUJITA T., Effect of air-conditioner on fungal contamination, *Atmosph. Environ.*, 2002, vol. 36, no. 35, s. 5443–5448.
- [44] HOFBAUER W., KREUGER N., BREUER K., SEDLBAUER K., SCHOCH T., Mould resistance assessment of building materials – material specific isoplethsystems for practical application, in: *Indoor Air 2008. Mate-*

- riały 11th International Conference on Indoor Air Quality and Climate: 17.08.–22.08.2008, Kopenhaga, [b.w.], s. 8.
- [45] GUTAROWSKA B., Metabolic Activity of moulds as a factor of building materials biodegradation, *Pol. J. Microbiol.*, 2010, vol. 59, nr 2, s. 119–124.
- [46] *Schimmelpilze in Innenräumen*, bookbrowse.net/sachprospekt-schimmelprospekt-pdf-d410108573, dostęp 20. 01. 2013.
- [47] FARGUES J., ROUGIER M., GOUJET R., SMITS N., COUSTERE C., ITIER B., Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation, *J. Invertebr. Pathol.*, 1997, vol. 69, no. 1, s. 70–78.
- [48] WILLOCQUET L., COLOMBET D., ROUGIER M., FERGUS J., CLERJEAU M., Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelia growth of grape powdery mildew, *Europ. J. Plant. Pathology*, 1996, vol. 102, s. 441–449.
- [49] YANG C.Y., Effects of ultraviolet irradiation on production of aflatoxins by *Aspergillus flavus*, *Rad. Botany*, 1972, vol. 12, no. 2, s. 2105–111.
- [50] GRAJEWSKI J., *Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenia dla człowieka i zwierząt*, Bydgoszcz, Wydaw. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, 2006.
- [51] COLE R.J., COX R.H., *Handbook of toxic fungal metabolites*, New York, Academic Press, 1981.
- [52] BALIŃSKA-MIŚKIEWICZ W., Znaczenie grzybów mikroskopowych w chorobach alergicznych u dzieci, *Mikol. Lek.*, 2011, vol. 18, nr 2, s. 102–107.
- [53] AMMANN H.M., Mycotoxins in indoor environments, *Mycotoxin. Res.*, 2005, vol. 21, no. 3, 157–163.
- [54] BUSH, R.K., PORTNOY J.M., SAXON A., TERR A.I., WOOD R.A., The medical effects of mold exposure, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, vol. 117, no. 2, s. 326–333.
- [55] MAYER S., ENGELHART S., KOLK A., BLOME H., The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risk, *Mycotoxin. Res.*, 2008, vol. 24, no. 3, s. 151–164.
- [56] MĘDRELA-KUDER E., Występowanie alergizujących i toksynotwórczych grzybów w powietrzu wewnętrznym w cyklu rocznym, *Mikol. Lek.*, 2008, vol. 15, s. 25–28.
- [57] PN-89/Z-04111/03:1989 *Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*.
- [58] JAHNZ-ROŻYK K., Wprowadzenie do alergii na antygeny grzybów pleśniowych, *Pol. Merk. Lek.*, 2008, vol. 24, s. 1–7.
- [59] LICHTENSTEIN J.H.R., MOLINA R.M., DONAGHEY T.C., AMUZIE C.J., PESTKA J.J., COULL B.A., BRAIN J.D., Pulmonary responses to *Stachybotrys chartarum* and its toxins: mouse strain affects clearance and macrophage cytotoxicity, *Toxicol. Sci.*, 2010, vol. 116, no. 1, s. 113–121.
- [60] FLORCZYKOWSKI J., *Szkodliwe dla zdrowia wpływy pleśni domowej*, 2009, <http://www.igya.pl/wszystkie/462-szkodliwe-dla-zdrowia-wplywy-pleśni-domowej.html>, dostęp 01. 02. 2013.
- [61] GREGORY L., PESTKA J.J., DEARBORN D.G., RAND T., Localization of satratoxin-G in *Stachybotrys chartarum* spores and spore-impacted mouse lung using immunocytochemistry, *Toxicol. Pathol.*, 2004, vol. 32, no. 1, s. 26–34.
- [62] PERSAD A.S., STEDEFORD T., BANASIK M., SUCHECKI T., MURO-CACHO C.A., A review of inhalation exposure to mold and adverse health outcomes, *J. Land Use*, 2004, vol. 19, no. 2, s. 557–568.
- [63] RAPIEJKO P., Najczęstsze alergeny i ich występowanie, w: *Alergia, choroby alergiczne, astma*, t. 1, red. A.M. Fał, Kraków, Wydaw. Medycyna Praktyczna, 2010.
- [64] HUSSEIN H.S., BRASEL J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 2001, vol. 167, no. 2, s. 101–132.
- [65] SMORAGIEWICZ W., COSSETTE B., BOUTARD A., KRZYSTYŃIAK K., Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings, *Int. Arch. Occup. Env. Health*, 1993, vol. 65, no. 2, s. 113–117.

- [66] HINTIKKA E.L., HOLOPAINEN R., ASOLA A., JESTOI M., PEITZSCH M., KALSO S., LARSSON L., REIJULA K., TUOMI T., Mycotoxins in the ventilation systems of four schools in Finland, *World Mycotoxin.*, 2009, vol. 2, no. 4, s. 269–379.
- [67] RAO C.Y., RIGGS M.A., CHEW G.L., MUILENBERG M.L., THORNE P.S., VAN SICKLE D., DUNN K.H., BROWN C., Characterization of airborne molds, endotoxins and glucans in homes in New Orleans after hurricane Katrina and Rita, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 5, s. 1630–1634.
- [68] BÜNGER J., WESTPHAL G., MÖNNICH A., HINNENDAHL B., HALLIER E., MÜLLER M., Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins, *Toxicology*, 2004, vol. 202, no. 3, s. 199–211.
- [69] PITT J.I., *A laboratory guide to common Penicillium species*, 3rd ed., North Ryde, Food Science Australia, 2000, ISBN 0643048375.
- [70] YEON J.O., KIM E.N., RYOO I.M., KIM K.D., Morphological and molecular identification of *Penicillium islandicum* isolate KU101 from stored rice, *Plant Pathol. J.*, 2008, vol. 24, no. 4, s. 469–473.
- [71] HOUBRAKEN J., FRISVAD J.C., SAMSON R.A., Sex in *Penicillium* series *roqueforti*, *IMA Fungus*, 2010, vol. 1, no. 2, s. 171–180.
- [72] FRISVAD J.C., SAMSON R.A., Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and airborne terverticillate penicillia and their mycotoxins, *Stud. Mycol.*, 2004, vol. 49, s. 1–173.
- [73] SAMSON R.A., FRISVAD J.C., *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites, *Stud. Mycol.*, 2004, vol. 49, no. 1, s. 1–266.
- [74] BERREIRO C., MARTIN J.F., GARCIA-ESTRADA C., Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, vol. 1, doi 10.1155/2012/105109.
- [75] HOUBRAKEN J., FRISVAD J.C., SEUFERT K.A., OVERY D.P., TUTHILL D.M., VALDEZ J.G., SAMSON R.A., New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*, *Persoonia*, 2012, vol. 29, s. 78–100.
- [76] SIMMONS R.B., NOBLE J.A., ROSE L., PRICE D.L., CROW S.A., AHEARN D.G., Fungal colonization of automobile air conditioning systems, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, vol. 19, s. 150–153.
- [77] CHANG J.C.S., FOARDE K.K., VANOSDELL D.W., Assessment of fungal (*Penicillium chrysogenum*) growth on three HVAC duct materials, *Environ. Int.*, 1996, vol. 22, no. 4, s. 425–431.
- [78] CRCC Centre de recherche sur la conservation des collections, <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=106#ancr7>, dostęp 20. 01. 2013.
- [79] NIZIO-MAŚSIOR J., Standaryzacja szczepionek zawierających alergeny grzybów pleśniowych, *Alerg. Info*, 2002, vol. 1, nr 10, s. 15–17.
- [80] PRESTER L., Indoor exposure to mould allergens, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2011, vol. 62, no. 4, s. 371–380.
- [81] GARCIA-ESTRADA C., ULLÁN R.V., ALBILLOS S.M., FERNÁNDEZ-BODEGA M.A., DUREK P., DÖHREN H. VON, MARTIN J.F., A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*, *Chem. Biol.*, 2011, vol. 18, no. 11, s. 1499–512.
- [82] KOBAYASHI Y., HORIKOSHI K., Purification and characterization of extracellular polyamineoxidase produced by *Penicillium* No PO-1, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1982, vol. 705, no. 2, s. 133–138.
- [83] THORWALD J., *Dawna medycyna, jej tajemnice i potęga*, Egipt, Babilonia, Indie, Chiny, Meksyk, Peru, Wrocław, Ossolineum, 1990.
- [84] PRADEEP T., ANSHUP, Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review, *Thin Solid Films*, 2009, vol. 517, no. 24, s. 6441–6478.
- [85] URK H., DUIN N., SUTCLIFFE J., *A history of medicine: from prehistory to the year 2020*, Londyn, Morgan Samuel Editions, 1992.
- [86] ALEXANDER J.W., History of the Medical Use of Silver, *Surg. Infect.*, 2009, vol. 10, no. 3, s. 289–292.
- [87] WZOREK Z., KONOPKA M., Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy, *Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej*, 2007, nr 1, s. 1–7.
- [88] BUZEA C., PACHECO BLANDINO I.V., ROBB K., Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Bio-interphases.*, 2007, vol. 2, no. 4, s. 17–172.

- [89] NOYCE J.O., MICHELS H., KEEVIL C.W., Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment, *J. Hosp. Infect.*, 2006, vol. 63, no. 3, s. 289–297.
- [90] MEHTAR S., WIID I., TODOROV S.D., The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study, *J. Hosp. Infect.*, 2008, vol. 68, no. 1, s. 45–51.
- [91] PULIT J., BANACH M., KOWALSKI Z., Właściwości nanocząstek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu, *Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej*, 2011, nr 10, s. 197–209.
- [92] TIWARI P.M., VIG K., DENNIS V.A., SINGH S.R., Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications, *J. Nanomater.*, 2011, vol. 1, no. 1, s. 31–63.
- [93] SPERLING A.R., GIL R.P., ZHANG F., ZANELLA M., PARAK J.W., Biological application of gold nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, vol. 37, no. 1, s. 1896–1908.
- [94] BABICH H., STOTZKY G., Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: influence of chloride ions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, vol. 36, no. 6, s. 906–914.
- [95] APPLEROT G., LIPOVSKY A., DROR R., PERKAS N., NITZAN Y., LUBART R., GEDANKEN A., Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury, *Adv. Functional Mater.*, 2009, vol. 19, no. 6, s. 842–852.
- [96] SEWAI J., YOSHIKAWA T., Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO, and ZnO) by an indirect conductometric assay, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 96, no. 4, s. 803–809.
- [97] ADAMS L.K., LYON D.Y., ALVAREZ P.J.J., Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspension, *Water Res.*, 2006, vol. 40, no. 19, s. 3527–3532.
- [98] TRAN N., MIR A., MALLIK D., SINHA A., NAYAR S., WEBSTER T.J., Bacterial effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Nanomedicine*, 2010, vol. 5, s. 277–283.
- [99] THILL A., ZEYONS O., SPALLA O., CHAUVAT F., ROSE J., AUFFAN M., FLANK A.M., Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*, physicochemical insight of the cytotoxicity mechanism, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, no. 19, s. 6151–6156.
- [100] MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: an overview, *Catal. Today*, 2011, vol. 169, no. 1, s. 249–257.
- [101] BYSTRZEJEWSKA G.P., GOLIMOWSKI J., URBAN P.L., Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management, *Waste. Manage.*, 2009, vol. 29, no. 9, s. 2587–2595.
- [102] ATIYEH B.S., COSTAGLIOLA M., HAYEK S.N., DIBO S.A., Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, *Burns*, 2007, vol. 33, no. 2, s. 139–148.
- [103] SAMUEL U., GUGGENBICHLER J.P., Prevention of catheter-related infection: the potential of a new nanosilver impregnated catheter, *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, 2004, vol. 1, s. 75–78.
- [104] LUBICK N., Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, vol. 42, no. 23, s. 8617–8617.
- [105] OVINGTON L.G., The truth about silver, *Ostomy Wound Manag.*, 2004, vol. 50, no. 9, s. 1–10.
- [106] BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., LESZKIEWICZ A., Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowania w medycynie, *Kosmos*, 2007, vol. 56, nr 1–2, s. 115–122.
- [107] KOHANSKI M.A., DWYER D.J., COLLINS J.J., How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nature Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, s. 423–435.
- [108] LARSON E., Community factors in the development of antibiotic resistance, *Ann. Rev. Public Health*, 2007, vol. 28, s. 435–447.
- [109] DANYSZ A., JELJASZEWICZ J., *Podstawy antybiotykoterapii*, wyd. 2, Tarchomin, Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa, 1976.
- [110] OPPEGAARD H., STEINUM T.M., WASTESON Y., Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 8, s. 3732–3734.

- [111] COATES A., HU Y., BAX R., PAGE C., The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002, vol. 1, no. 11, s. 895–910.
- [112] PERCIVAL S.L., BOWLER P.G., RUSSEL D., Bacterial resistance to silver in wound care, *J. Hosp. Infect.*, 2005, vol. 60, no. 1, s. 1–7.
- [113] SILVER S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 27, no. 2–3, s. 341–353.
- [114] MAKI D.G., TAMBYAH P.A., Engineering out the risk of infection with urinary catheters, *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, vol. 7, no. 2, s. 342–347.
- [115] WASZKIEWICZ-ROBAK B., ŚWIDERSKI F., Nanotechnologia – korzyści i zagrożenia zdrowotne, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008, vol. 41, no. 3, s. 202–208.
- [116] LANDSIEDEL R., KAPP M.D., SCHULZ M., WIENCH K., Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers, *Mutat. Res.*, 2009, vol. 681, no. 2–3, s. 241–258.
- [117] REDDY K.M., FERIS K., BELL J., WINGETT D.G., HANLEY C., PUNNOOSE A., Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, vol. 90, no. 213902, s. 2139021–2139023.
- [118] DAVIS J.M., WANG A., SHATKIN J.A., Nanomaterial case studies: nanoscale titanium dioxide in water treatment and in topical sunscreen, *Federal Register*, 2009, vol. 74, no. 146, s. 38091–38322.
- [119] SADOWSKI Z., Biosynthesis and application of silver and gold nanoparticles, *Silver Nanopart.*, 2001, s. 256–275.
- [120] ZATORSKI W., ZAPÓR L., JANKOWSKA E., Wybrane zagadnienia toksyczności nanocząstek wykorzystywanych w produkcji nanokompozytów polimerowych, *Kompozyty*, 2010, vol. 10, nr 1, s. 3–10.
- [121] COMNINELLIS C., KAPALKA A., MALATO S., PARSONS S.A., POULIOS I., MANTZAVINOS D., Perspective advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2008, vol. 83, no. 6, s. 769–776.
- [122] STASINAKIS A.S., Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for waste water treatment – a mini review, *Global NEST J.*, 2008, vol. 10, no. 3, s. 376–385.
- [123] ZHAO J., YANG X., Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review, *Build. Environ.*, 2003, vol. 38, no. 5, s. 645–654.
- [124] OHTANI B., Photocatalysis A to Z – what we know and what we do not know in a scientific sense, *J. Photoch. Photobiol. C*, 2010, vol. 11, no. 4, s. 157–178.
- [125] MILLS A., LE HUNTE S., An overview of semiconductor photocatalysis, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1997, vol. 108, no. 1, s. 1–35.
- [126] ANPO M., Utilization of TiO₂ photocatalysts in green chemistry, *Pure Appl. Chem.*, 2000, vol. 72, no. 7, s. 1265–1270.
- [127] HERRMANN J.M., Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications, *Topics Catal.*, 2005, vol. 34, no. 1–4, s. 49–65.
- [128] HERRMANN J.M., Photocatalysis fundamentals revisited to avoid several misconceptions, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2010, vol. 99, no. 3–4, s. 461–468.
- [129] OHTANI B., Preparing articles on photocatalysis-beyond the illusions, misconceptions and speculation, *Chem. Lett.*, 2008, vol. 37, no. 3, s. 217–229.
- [130] MALATO S., FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ P., MALDONADO M.I., BLANCO J., GERNJAK W., Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, *Catal. Today*, 2009, vol. 147, no. 1, s. 1–59.
- [131] PIEGOT-RÉMY S., SIMONET F., ERRAZURIZ-CARDA, LAZZARONI J.C., ATLAN D., GUILLARD C., Photocatalysis and disinfection of water: identification of potential bacterial target, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2011, vol. 104, no. 3–4, s. 390–398.
- [132] MO J., ZHANG Y., LAMSON J.J., ZHAO R., Photocatalytic purification of volatile organic compounds in indoor air: a literature review, *Atmos. Environ.*, 2009, vol. 43, no. 14, s. 2229–2246.

- [133] CHONG M.N., JIN B., CHOW C.W.K., SAINT C., Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review, *Water Res.*, 2010, vol. 44, no. 10, s. 2997–3027.
- [134] MARKOWSKA-SZCZUPAK A., MORAWSKI A.W., *Ochr. Powietrza Probl. Odpadów*, 2011, vol. 2, s. 60–69.
- [135] PAZ Y., Application of TiO_2 photocatalysis for air treatment: patents overview, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2010, vol. 99, no. 3–4, s. 448–460.
- [136] BENEDIX R., DEHN F., QUAAS J., ORGASS M., Application of titanium dioxide photocatalysis to create self-cleaning building materials. Annual Civil Engineering Report, *Lacer*, 2000, vol. 5, s. 157–168.
- [137] FUJISHIMA A., ZHANG X., Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches, *Cr. Chim.*, 2005, vol. 9, no. 5, s. 750–760.
- [138] ALLEN N.S., EDGE M., VERRAN J., STRATTON J., MALTBY J., BYGOTT C., Photocatalytic titania based surfaces: environmental benefits, *Polym. Degrad. Stab.*, 2008, vol. 93, no. 9, s. 1632–1646.
- [139] CARP O., HUISMAN C.L., RELLER A., Photoinduced reactivity of titanium dioxide, *J. Prog. Solid State Chem.*, 2004, vol. 32, no. 1–2, s. 33–177.
- [140] DUBROVINSKY L.S., DUBROVINSKAIA N.A., SWAMY V., MUSCAT J., HARRISON N.M., AHUJA R., HOLM B., JOHANSSON B., Materials science: the hardest known oxide, *Nature*, 2001, vol. 410, s. 653–654.
- [141] FRAZER L., Titanium dioxide: environmental white knight, *Environ. Health Persp.*, 2001, vol. 109, no. 4, s. 174–177.
- [142] LUBKOWSKI K., GRZMIL B., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., TYMEJCZYK A., Właściwości fotokatalityczne jako istotny parametr jakościowy pigmentów ditlenku tytanu, *Tow. Probl. Jakości*, 2009, vol. 1, s. 82–91.
- [143] ZHANG P.X., ZHANG D.Y., QIU Q., JING L., REN X.Z., Preparation of nano titanium dioxide using industrial raw material, *Adv. Mat. Res.*, 2008, vol. 58, s. 129–139.
- [144] OHNO T., SARUKAWA K., TOKIEDA K., MATSUMURA M., Morphology of a TiO_2 photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of anatase and rutile crystalline phases, *J. Catal.*, 2003, vol. 203, no. 3, s. 82–86.
- [145] DIEBOLD U., The surface science of titanium dioxide, *Surf. Sci. Rep.*, 2003, vol. 48, no. 5–8, s. 53–229.
- [146] KAPINUS E.I., KHALYAVKA T.A., SHIMANOVSKAYA V.V., VIKTOROVA T.I., STRELEKO V., Photocatalytic activity of spectro-pure titanium dioxide: effects of crystalline structure, specific surface area and sorption properties, *Intern. J. Photoenergy*, 2003, vol. 5, no. 5, s. 159–166.
- [147] LINSEBIGLER L., LU G., YATES JR. J.T., Photocatalysis on TiO_2 surfaces: principles, mechanism and selected results, *Chem. Rev.*, 1995, vol. 95, s. 735–758.
- [148] BLAKE D.M., *Bibliography of work on the heterogeneous photocatalytic removal of hazardous compounds from water and air*, Kolorado, National Renewable Energy Laboratory, 2001, s. 1–158.
- [149] KABRA K., CHAUDHARY R., SAWHNEY R.L., Treatment of hazardous organic and inorganic compounds through aqueous-phase photocatalysis: a review, *Ind. Engin. Chem. Res.*, 2004, vol. 43, no. 24, s. 7683–7696.
- [150] MOLINARI R., PIRILLA F., LODDO V., PALMISANO L., Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceutical in water by using polycrystalline TiO_2 and a nanofiltration membrane reactor, *Catal. Today*, 2006, vol. 118, no. 1–2, s. 205–213.
- [151] CHO I.H., ZOH, K.D., Photocatalytic degradation of azo dye (reactive Red 120) in TiO_2 /UV system: optimization and modelling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design, *Dyes Pigments*, 2007, vol. 75, no. 3, s. 533–543.
- [152] ACHILLEOS A., HAPESHIA E., XEKOUKOULOTAKIS N.P., MANTZAVINOS D., FATTA-KASSINOSA D., Factors affecting diclofenac decomposition in water by UV-A/ TiO_2 photocatalysis, *Chem. Engin. J.*, 2010, vol. 161, no. 1–2, s. 53–59.
- [153] MORAWSKI A.W., JANUS M., TRYBA B., TOYODA M., TSUMURA T., INAGAKI M., Carbon modified TiO_2 photocatalysts for water purification, *Pol. J. Chem. Technol.*, 2009, vol. 11, no. 2, s. 46–50.
- [154] HUPKA J., ZALESKA A., JANCZAREK M., KOWALSKA E., GÓRSKA P., ARANOWSKI R., UV/VIS light – enhanced photocatalysis for water treatment and protection, w: *Solid and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, red. I. Twardowska, [b.w.], 2006, s. 3–23.

- [155] GRZECHULSKA J., MORAWSKI A.W., Photocatalytic decomposition of azo-dye acid black 1 in water over modified titanium dioxide, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2002, vol. 36, no. 1, s. 45–51.
- [156] BUBACZ K., CHOINA J., DOLAT D., MORAWSKI A.W., Methylene blue and phenol photocatalytic degradation on nanoparticles of anatase TiO₂, *Pol. J. Environ. Stud.*, 2010, vol. 19, no. 4, s. 685–691.
- [157] HÜSKEN G., HUNGER M., BROUWERS H.J.H., Experimental study of photocatalytic concrete products for air purification, *Build. Environ.*, 2009, vol. 44, no. 12, s. 2463–2474.
- [158] AGROS A.G., PICHAT P., State of the art and perspectives on materials and applications of photocatalysis over TiO₂, *J. Appl. Electrochem.*, 2010, vol. 35, no. 7–8, s. 655–663.
- [159] DE RICHTER R., CAILLOL S., Fighting global warming: the potential of photocatalysis against CO₂, CH₄, N₂O, CFCs, tropospheric O₃, BC and other major contributors to climate change, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, 2011, vol. 12, no. 1, s. 1–19.
- [160] TRYBA B., PISZCZ M., MORAWSKI A.W., Photocatalytic and self-cleaning properties of Ag-doped TiO₂, *Open. Mater. Sci. J.*, 2010, vol. 4, s. 5–8.
- [161] MORAWSKI A.W., JANUS M., TRYBA B., INAGAKI M., KALUCKI K., TiO₂-anatase modified by carbon as the photocatalyst under visible light, *Cr. Chimie*, 2006, vol. 9, no. 5–6, s. 800–805.
- [162] PAOLA A.D., GARCÍA-LÓPEZ E., IKEDA S., MARCÍ G., OHTANI B., PALMISANO L., Photocatalytic degradation of organic compounds in aqueous systems by transition metal doped polycrystalline TiO₂, *Catal. Today*, 2002, vol. 75, no. 1–4, s. 87–93.
- [163] NIU X., LI S., CHU H., ZHOU J., Preparation, characterization of Y³⁺-doped TiO₂ nanoparticles and their photocatalytic activities for methyl orange degradation, *J. Rare Earths*, 2011, vol. 29, no. 3, s. 225–229.
- [164] KUMAR S.G., DEVI L.G., Review on modified TiO₂ photocatalysis under UV/visible light: selected results and related mechanisms on interfacial charge carrier transfer dynamics, *J. Phys. Chem. A.*, 2001, vol. 115, no. 46, s. 13211–1324.
- [165] ZHANG J., WU J., XING M., LEGHARI S.A.K., SAJJAD S., Development of modified N doped TiO₂ photocatalyst with metals, nonmetals and metal oxides, *Energy Environ. Sci.*, 2010, vol. 3, s. 715–726.
- [166] MATSUNAGA T., TOMODA T., NAKAJIMA T., WAKE H., Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powder, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1985, vol. 1, no. 1–2, s. 211–214.
- [167] MANESS P.C., SMOLINSKI S., BLAKE D.M., HUANG Z., WOLFRUM E.J., JACOBY W., Bacterial activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 9, s. 4094–4098.
- [168] COLEMAN H.M., MARQUIS C.P., SCOTT J.A., CHIN S.S., AMAL R., Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts, *J. Chem. Eng.*, 2005, vol. 113, no. 1, s. 55–63.
- [169] BUI T.H., FELIX C., PIGEOT-REMYA S., HERRMANN J.M., LEJEUNEC P., GUILLARD C., Photocatalytic inactivation of wild and hyper-adherent *E. coli* strains in presence of suspended or supported TiO₂. influence of the isoelectric point of the particle size and of the adsorptive properties of titania, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2008, vol. 11, no. 3, s. 510–518.
- [170] HORIE M., NISHIO K., FUJITA K., ENDOH S., MIYAUCHI A., SAITO Y., IWAHASHI H., YAMAMOTO K., MURAYAMA H., NAKANO H., NANASHIMA N., NIKI E., YOSHIDA Y., Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, vol. 22, no. 3, s. 543–553.
- [171] PIGEOT-REMY S., SIMONET F., ATLAN D., LAZZARONI J.C., GUILLARD C., Bactericidal efficiency and mode of action: A comparative study of photochemistry and photocatalysis, *Water Res.*, 2012, vol. 46, no. 10, s. 3208–3238.
- [172] DALRYMPLE O.K., STEFANAKOS E., TROTZ M.A., GOSWAMIA D.Y., A review of mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2010, vol. 98, no. 1–2, s. 27–38.
- [173] TSUANG Y.H., SUN J.S., HUANG Y.C., LU C.H., CHANG W.H., WANG C.C., Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles, *Artif. Organs.*, 2008, vol. 32, no. 2, s. 167–174.
- [174] DESAI V.S., KOWSHIK M., Antimicrobial activity of titanium dioxide nanoparticles synthesized by sol-gel technique, *Res. J. Microbiol.*, 2009, vol. 4, no. 3, s. 97–103.

- [175] RINCON A.G., PULGARIN C., Photocatalytical inactivation of *E. coli* effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO_2 concentration, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2003, vol. 44, no. 3, s. 263–284.
- [176] RINCON A.G., PULGARIN C., Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H_2O_2 on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO_2 . Implications in solar water disinfection, *Appl. Catal. B-Environ.*, 2004, vol. 51, no. 4, s. 283–302.
- [177] CHENG C.L., SUN D.S., CHU W.C., TSENG Y.H., HO H.C., WANG J.B., CHUNG P.H., CHEN J.H., PEI J.T., LIN N.T., YU M.S., CHANG H.H., The effect of the bacterial interaction with visible-light responsive titania photocatalyst on the bactericidal performance, *J. Biomed. Sci.*, 2009, vol. 16, no. 7, s. 6–7.
- [178] BANERJEE S., GOPAL J., MURALEEDHARAN P., TYAGI A.K., RAJ B., Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy, *Curr. Sci.*, 2006, vol. 90, no. 10, s. 1378–1383.
- [179] ASHIKAGA T., WADA M., KOBAYASHI H., MORI M., KATSUMURA Y., FUKUI H., KATO S., YAMAGUCHI M., TAKAMATSU T., Effect of the photocatalytic activity of TiO_2 on plasmid DNA, *Mutat. Res.*, 2000, vol. 466, no. 1, s. 1–7.
- [180] JACOBY W.A., MANESS P.C., WOLFRUM E.J., BLAKE D.M., FANNELL J.A., Mineralization of bacterial cell mass on photocatalytic surface in air, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, vol. 32, no. 17, s. 2650–2653.
- [181] SRINIVASAN C., SOMASUNDARAN N., Bactericidal and detoxification effects of irradiated semiconductor catalyst TiO_2 , *Curr. Sci.*, 2003, vol. 85, no. 10, s. 1431–1438.
- [182] KIWI J., NADTOCHENKO V., New evidence for TiO_2 photocatalysis during bilayer lipid peroxidation, *J. Phys. Chem. B.*, 2004, vol. 108, no. 45, s. 17675–17694.
- [183] KIWI J., NADTOCHENKO V., Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO_2 interface by AFR-FITR and laser kinetic spectroscopy, *Langmuir*, 2005, vol. 21, no. 10, s. 4631–4641.
- [184] GUILLARD C., BUI T.H., FELIX C., MOULES V., LINA B., LEJEUNE P., Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis, *Cr. Chimie*, 2007, vol. 11, no. 1–2, s. 107–113.
- [185] CHO M., CHUNG H., CHOI W., YOON J., Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection, *Water. Res.*, 2004, vol. 38, no. 4, s. 1069–1077.
- [186] BOSSHARD F., BERNEY M., SCHEIFELE M., WEILENMANN H.U., EGLI T., Solar disinfection (SODIS) and subsequent dark storage of *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* monitored by flow cytometry, *Microbiologia*, 2009, vol. 155, s. 1310–1317.
- [187] DITTA I.B., STEELE A., LIPTRON C., Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO_2 , CuO and TiO_2/CuO dual layers on *E. coli* and bacteriophage T4, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 79, no. 1, s. 127–133.
- [188] FAURE M., GERARDIN F., ANDRE J.F., PONS M.N., ZAHRAA O., Study of photocatalytic damages induced on *E. coli* by different photocatalytic supports (various types and TiO_2 configurations), *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2011, vol. 222, no. 2–3, s. 323–329.
- [189] SHANG S., CHEUNG L.M., HO C.M., ZENG M., Repression of photoreactivation and dark repair of coliform bacteria by TiO_2 -modified UV-C disinfection, *Appl. Catal. B-Environ. Environ.*, 2009, vol. 89, no. 3–4, s. 536–544.
- [190] WONG M.S., CHU W.C., SUN D.S., HUANG H.S., CHEN J.H., TSAI P.J., LIN N.T., YU M.S., HSU S.F., WANG S.L., CHANG H.H., Visible-light-induced bactericidal activity of a nitrogen-doped titanium photocatalyst against human pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 9, s. 6111–6116.
- [191] RAHMANI A.R., SAMARGHANDI M.R., SAMADI M.T., NAZEMI F., Photocatalytic disinfection of coliform bacteria using UV/ TiO_2 , *J. Res. Health Sci.*, 2009, vol. 9, no. 1, s. 1–6.
- [192] HU C., GUO J., HU X., Efficient destruction of pathogenic bacteria with $\text{NiO}/\text{SrBi}_2\text{O}_4$ under visible light irradiation, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, no. 17, s. 5508–5513.
- [193] HU CH., GUO J., QU J., HU X., Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO_2 under visible light irradiation, *Langmuir*, 2007, vol. 23, no. 9, s. 4982–4987.

- [194] KÜHN K., CHABERNY I.F., MASSHOLDER K., STICKLER M., BENZ V.B., SONNTAG H.G., ERDINGER L., Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light, *Chemosphere*, 2003, vol. 53, no. 1, s. 71–77.
- [195] KANGWANSUPAMONKON W., LAURUENGTHANA V., SURASSMO S., RUKTANONCHAI U., Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications, *Nanom. Nanotechnol. Biol. Med.*, 2009, vol. 2, s. 240–249.
- [196] MILLER M.J., CRITCHLEY M.M., HUTSON J., FALLOWFIELD H.I., The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments, *Wat. Res.*, 2011, vol. 35, no. 6, s. 1461–1468.
- [197] MAKOWSKI A., WARDAS W., Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and unicellular alga and photocatalytic degradation of the cells of selected microorganisms, *Curr. Top. Biophys.*, 2001, vol. 25, no. 1, s. 19–25.
- [198] WATTS R.J., KONG S., ORR M.P., MILLER G.C., HENRY B.E., Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent, *Water Res.*, 1994, vol. 29, no. 1, s. 95–100.
- [199] GERRITY D., RYU H., CRITTENDEN J., ABBASZADEGAN M., Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 2008, vol. 43, no. 11, s. 1261–1270.
- [200] SJORGREN J.C., SIERKA R., Inactivation of Phage MS2 by iron-aided titanium dioxide photocatalysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, no. 1, s. 344–347.
- [201] HEASELGRAVE W., PATEL N., KILVINGTON S., KEHOE S.C., MCGUIGAN K.G., Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water – a laboratory study using simulated sunlight, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 43, no. 2, s. 125–130.
- [202] KATO T., SHIBATA T., TOUMA H., TAMURA M., MIKI O., Degradation of norovirus in sewage treatment water by photocatalytic ultraviolet disinfection, *Shinnittetsu Giho*, 2005, vol. 382, s. 39–42.
- [203] MAZURKOVA N.A., SPITSYNA Y.E., SHIKINA N.V., ISMAGILOV Z.R., ZAGREBELNYI S.N., RYABCHIKOVA E.I., Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus, *Nanotech. Russia*, 2010, vol. 5, no. 5–6, s. 417–420.
- [204] HAJKOVA P., SPATENKA P., HORSKY J., HORSKA I., KOLOUCH A., Photocatalytic effect of TiO₂ films on viruses and bacteria, *Plas. Proces. Pol.*, 2007, vol. 4, no. 1, s. 397–401.
- [205] ZAN L., FA W., PENG T., GONG Z.K., Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on *Hepatitis B* virus, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 2007, vol. 86, no. 2, s. 165–169.
- [206] PASPALTSIS I., KOTTA K., LAGOUDAKI R., GRIGORIADIS N., POULIOS I., SKLAVIADIS T., Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions, *J. General. Virol.*, 2006, vol. 87, s. 3125–3130.
- [207] WEISSMANN C., The state of the prion, *Nature Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 2, no. 11, s. 861–871.
- [208] MATSUNAGA T., TOMODA R., NAKAJIMA T., NAKAMURA N., KOMINE T., Continuous-sterilization system that uses photosemiconductor powders, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, vol. 54, no. 6, s. 1330–1333.
- [209] WAWRZYCKA D., Drożdże jako model w badaniach chorób neurodegeneracyjnych, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011, vol. 65, s. 328–337.
- [210] YANG J.Y., KIM H.J., CHUNG C.H., Photocatalytic antifungal activity against *Candida albicans* by TiO₂ coated acrylic resin denture base, *J. Korean Acad. Prosthodont.*, 2006, vol. 44, no. 3, s. 284–294.
- [211] SEVEN O., DINDAR B., AYDEMIR S., METIN D., OZINEL M.A., Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 2004, vol. 165, no. 1–3, s. 103–107.
- [212] MITORAJ D., JAŃCZYK A., STRUS M., KIRSCH H., STOCHEL G., HECZKO P.B., MACYK W., Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, vol. 6, s. 642–648.
- [213] LONNEN J., KILVINGTON L.J., KEHOE S.C., AL-TOUATJ F., MCGUIGAN K.G., Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water, *Water Res.*, 2005, vol. 39, no. 5, s. 877–883.
- [214] AHARIZ M., COURTOIS P., *Candida albicans* biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating, *Med. Dev. Evid. Res.*, 2010, vol. 3, s. 33–40.

- [215] MANEERAT CH., HAYATA Y., Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit test, *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, vol. 107, no. 2, s. 99–103.
- [216] HUR J.S., OH A.O., LIM K.M., JUNG J.S., KIM J.W., KOH Y.J., Novel effects of TiO₂ photocatalytic ozonation on control of postharvest fungal spoilage of kiwifruit, *Posthar. Biol. Technol.*, 2005, vol. 35, no. 1, s. 109–113.
- [217] CHEN F., YANG X., WU Q., Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood, *Building. Environ.*, 2009, vol. 44, no. 5, s. 1088–1093.
- [218] FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ P., SICHEL C., POLO-LÓPEZ M.I., CARA-GARCÍA M. DE, TELLO J.C., Photocatalytic disinfection of natural well water contaminated by *Fusarium solani* using TiO₂ slurry in solar CPC photo-reactors, *Catal. Today*, 2009, vol. 144, no. 1–2, s. 62–68.
- [219] HOCHMANNOVA L., VYTRASOVA J., Photocatalytic and antimicrobial effects of interior paint, *Progr. Organ. Coat.*, 2010, vol. 67, no. 1, s. 1–5.
- [220] LI M., HUANG Q.Z., QIU D.F., JIAO Z.J., MENG Z.H., SHI H.Z., Study on anti-fungal activity of nitrogen-doped TiO₂ nanophotocatalyst under visible light irradiation, *Chin. Chem. Lett.*, 2010, vol. 21, no. 1, s. 117–121.
- [221] PICHAT P., A brief survey of the potential health risk of TiO₂ particles and TiO₂-containing photocatalytic or non-photocatalytic materials, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2010, vol. 13, no. 3, s. 238–246.
- [222] BAAN R., STRAIF K., GROSSE Y., SECRETAN B., EL GHISSASSI F., COGLIANO V., Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc, *Lancet Oncol.*, 2006, vol. 7, no. 4, s. 295–296.
- [223] REEVES J.F., DAVIES S.J., DODD N.J.F., JHA A.N., Hydroxyl radicals (•OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells, *Mutat. Res.*, 2008, vol. 640, no. 1–2, s. 113–122.
- [224] PUCHALSKA H., Czynniki wpływające na toksyczność substancji chemicznych, *Bezp. Pr. Nauk. Prakt.*, 1999, nr 4, s. 12–14.
- [225] LEE J.H., KANG M., CHOUNG S.J., OGINO K., MIYATA S., KIM M.S., PARK J.Y., KIM J.B., The preparation of TiO₂ nanometer photocatalyst film by a hydrothermal method and its sterilization performance for *Giardia lamblia*, *Water Res.*, 2004, vol. 38, no. 3, s. 713–719.
- [226] SNOPCZYŃSKI T., GÓRALCZYK K., CZAJA K., STRUČIŃSKI P., HERNIK A., KORCZ W., LUDWICKI J.K., Nanotechnologia – możliwości i zagrożenia, *Rocz. PZH*, 2009, vol. 60, nr 2, s. 101–111.
- [227] LARSEN S.T., ROURSGAARD M., JENSEN K.A., NIELSEN G.D., Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice, *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, 2009, vol. 106, no. 6, s. 114–117.
- [228] LONG T.C., SALEH N., TILTON R., LOWRY G.V., VERONESI B., Titanium dioxide (P-25) products reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, no. 14, s. 4346–4352.
- [229] DUNFORD R., SALINARO A., CAI L., SERPONE N., HORIKOSHI S., HIDAKA H., KNOWLAND J., Chemical oxidation and DNA damage catalyzed by inorganic sunscreen ingredients, *FEBS Lett.*, 1998, vol. 418, no. 1–2, s. 87–90.
- [230] FUJITA K., HORIE M., KATO H., ENDOH S., SUZUKI M., NAKAMURA A., MIYAUCHI A., YAMAMOTO K., KINUGASA S., NISHIO K., YOSHIDA Y., IWAHASHI H., NAKANISHI J., Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: Involvement of extracellular matrix and cell adhesion, *Toxicol. Lett.*, 2009, vol. 191, no. 2–3, s. 109–117.
- [231] LAGOPATI N., KITSIOU P.V., KONTOS A.I., VENIERATOS P., KOTSPOULOU E., KONTOS A.G., DIONYSIOU D.D., PISPAS S., TSILIBARY E.C., Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution, *J. Photch. Photobiol. A-Chem.*, 2010, vol. 214, no. 2–3, s. 215–223.
- [232] FERRARI M., BARKER A., DOWNING G., A cancer nanotechnology strategy, *Nano. Bio. Technol.*, 2005, vol. 1, no. 2, s. 129–131.
- [233] NIE S., XING Y., KIM G.J., SIMONS J.W., Nanotechnology applications in cancer, *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2007, vol. 9, s. 257–228.

- [234] ROZHKOVA E.A., ULASOV I., LAI B., DIMITRIJEVIC N.M., LESNIAK M.S., RAJH T., A high-performance nano-bie photocatalyst for targeted brain cancer therapy, *Nano Lett.*, 2009, vol. 9, no. 9, s. 3337–3342.
- [235] ZHANG A.P., SUN Y.P., Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells, *World J. Gastroenterol.*, 2010, vol. 10, no. 21, s. 3191–3193.
- [236] XU J., SUN Y., ZHAO Y., HUANG J., CHEN C., JIANG Z., Photocatalytic inactivation effect of gold-doped TiO₂ (Au/TiO₂) nanocomposites on human colon carcinoma LoVo cells, *Int. J. Photoenergy*, 2007, s. 1–7, doi 10.1155/2007/97308.
- [237] FUJISHIMA A., CAI R.X., OTSUKI J., HASHIMOTO K., ITOH K., YAMASHITA T., KUBOTA Y., Biochemical application of photoelectrochemistry: photokilling of malignant cells with TiO₂ powder, *Electrochem. Acta*, 1993, vol. 38, no. 1, s. 153–157.
- [238] MIYOSHI N., KUME K., TSUTUMI K., FUKUNAGA Y., ITO S., IMAMURA Y., BIBIN A. A., Application of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in photodynamic therapy (PDT) of an experimental tumor, *AIP Conf. Proc.*, 2011, vol. 1415, no. 21, doi.org/10.1063/1.3667210.
- [239] THURN K.T., ARORA H., PAUNESKY T., WU A., BROWN E.M., DOTY C., KREMER J., WOLOSCHAK G., Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells, *Nanomedicine*, 2011, vol. 7, no. 2, s. 123–130.
- [240] DIBA K., RHAIMIRAD M., MAKHDOOMI K., KHORSHIDVAND Z., Identification of *Candida* species isolated from hospital acquired infections cases and hospital indoor environments, *Afric. J. Microbiol. Res.*, 2012, vol. 6, no. 2, s. 4164–4168.
- [241] GAMS W., HOEKSTRA E.S., APTROOT A., *CBS Course of mycology*, 4th ed, Holandia, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998.
- [242] OH J.K., KIM E.N., RYOO M.I., KIM K.D., Morphological and molecular identification of *Penicillium islandicum* isolate KU101 from stored rice, *Plant Pathol. J.*, 2008, vol. 24, no. 4, s. 469–473.
- [243] MOZIA S., BUBACZ K., JANUS M., MORAWSKI A.W., Decomposition of 3-chlorophenol on nitrogen modified TiO₂ photocatalysts, *J. Haz. Mat.*, 2012, vol. 15, no. 203–204, s. 128–136.
- [244] MAZURKIEWICZ L., TOMASIK P., ZAPŁOTNY J., Relationships between water activity and viscosity of solutions, *J. Food Hydrocoll.*, 2001, vol. 15, no. 1, s. 43–46.
- [245] International standards ISO 21348 2007, *Space environment (natural and artificial) – process for determining solar irradiances*, vol. 5–6, http://www.spacewx.com/pdf/SET_21348_2004.pdf, dostęp 20.01.2013.
- [246] HOCKBERGER P.E., A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, 2002, vol. 76, no. 6, s. 561–579.
- [247] DANTIGNY P., GUILMART A., BENSOUSSAN M., Basis of predictive mycology, *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, vol. 100, no. 1–3, s. 187–196.
- [248] LLOYD G.I., MORRIS E., SMITH J.E., A Study of the esterases and their function in *Candida lipolytica*, *Aspergillus niger* and a yeast-like fungus, *J. Gen. Microbiol.*, 1970, vol. 63, no. 2, s. 141–150.
- [249] LEŠTAN D., LEŠTAN M., CHAPELLE J.A., LAMAR R.T., Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils, *J. Ind. Microbiol.*, 1996, vol. 16, s. 286–294.
- [250] KACEM-CHAOUCHE N., MARAIHI Z., DESTAIN J., THONART P., Study of catalase production by an *Aspergillus phoenicis* mutant strain in date flour extract submerged cultures, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2005, vol. 9, no. 3, s. 173–178.
- [251] BRZEZIŃSKA M., WŁODARCZYK T., Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (oksydoreduktazy), *Acta Agrophys. Rozpr. Monogr.*, 2005, vol. 3, s. 11–26.
- [252] CARVAJAL M., MARTINEZ-SANCHEZ F., ALCARAZ. C.F., Effect of titanium (IV) application on some enzymatic activities in several developing stages of red pepper plants, *J. Plant Nutrition.*, 1994, vol. 17, no. 2–3, s. 243–253.
- [253] PAIS I., FEHER M., BOKORI J., NAGY B., Physiologically beneficial effects of titanium, *Water, Air Soil Poll.*, 1991, vol. 57–58, no. 1, s. 675–680.

- [254] HAGHIGHI M., HEIDARIAN S., TEIXEIRA DA SILVA J.A., The effect of titanium amendment in N-withholding nutrient solution on physiological and photosynthesis attributes and micronutrient uptake of tomato, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2012, vol. 150, no. 1–3, s. 381–390.
- [255] DOBROMILSKA R., Wpływ stosowania tytanitu na wzrost i plon pomidora drobnoowocowego, *Rocz. AR Pozn. 383, Ogród.*, 2007, vol. 41, s. 451–454.
- [256] GALECKA E., JACEWICZ R., MROWICKA M., FLORKOWSKI A., GALECKI P., Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje, *Pol. Merk. Lek.*, 2008, vol. 146, s. 266–268.
- [257] ŚCIBÓR D., CZECZOT H., Katalaza – budowa, właściwości, funkcje, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006, vol. 60, s. 170–180.
- [258] SULLIVAN N.J., TOBER K.L., BURNS E.M., SCHICK J.S., RIGGENBACH J.A., MACE T.A., BILL M.A., YOUNG G.S., OBERYSZYN T.M., LESINSKI G.B., UV light B-mediated inhibition of skin catalase activity promotes Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid cell expansion, *J. Invest. Dermatol.*, 2012, vol. 132, no. 3, s. 695–702.
- [259] SAUTOUR M., DANTIGNY P., DIVIES C., BENSOUSSAN M., A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity, *Intern. J. Food Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 1–2, s. 63–69.
- [260] JANDA-ULFIG K., ULFIG K., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., Extracellular enzyme profiles of xerophilic fungi isolated from dried medicinal plants, *Pol. J. Environ. Stud.*, 2009, vol. 18, no. 3, s. 391–397.
- [261] JANDA-ULFIG K., ULFIG K., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., Further studies of extracellular enzyme profiles of xerophilic fungi isolates from dried medicinal plants, *Pol. J. Environ. Stud.*, 2009, vol. 18, no. 4, s. 627–633.
- [262] MARKOWSKA A., JANDA-ULFIG K., ULFIG K., Wpływ aktywności wody na wzrost i aktywność celulolityczną szczepów *Thermomyces lanuginosus* wyizolowanych z surowego ziarna kawy i kompostu, *Ekol. Tech.*, 2008, vol. 1, s. 71–79.
- [263] DOMODARAN S., Water activity at interfaces and its role in regulation of interfacial enzymes: a hypothesis, *Colloids Surf. B*, 1998, vol. 11, no. 5, s. 231–237.
- [264] ROSSO L., ROBINSON T.P., A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds, *Int. J. Food. Microbiol.*, 2001, vol. 63, no. 3, s. 265–273.
- [265] GOCK M.A., HOCKING A.D., PITT J.I., POULOS P.G., Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi, *Int. J. Food Microb.*, 2003, vol. 81, no. 3, s. 11–19.
- [266] WAŻNY J., Badania nad działaniem środków grzybobójczych na grzyby *Coniophora cerebella* Pers. i *Merulius lacrymans* (Wulf.), *FR. Folia For. Pol.*, 1960, vol. 2, s. 93–114.
- [267] REX J.H., PFALLER M.A., WALSH T.J., CHATURVEDI V., ESPINEL-INGROFF A., GHANNOUM M., GOSEY L.L., ODDS F.C., RINALDI M.G., SHEEHAN D.J., WARNOCK D.W., Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current Challenges, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, vol. 14, no. 4, s. 643–658.
- [268] RÖHM-RODOWALD E., JAKIMIĄK B., PODGÓRSKA M., Zasady rejestrowania, opiniowania i badania preparatów dezynfekcyjnych, *Prz. Epidemiol.*, 2008, vol. 62, s. 661–688.
- [269] PN-EN 152-1:1994 *Metody badań środków ochrony drewna. Metoda laboratoryjna oznaczania skuteczności zabiegu zabezpieczania drewna obrobionego przed grzybami powodującymi siniznę. Zastosowanie w metodzie smarowania.*
- [270] PN-EN 1275:2000 *Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – podstawowe działanie grzybobójcze – metoda badania i wymagania (faza 1).*
- [271] PN-EN 1650:2002 *Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Ilościowa zawieszinowa metoda określania działania grzybobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych stosowanych w sektorze żywnościowym, warunkach przemysłowych i domowych oraz zakładach użyteczności publicznej – metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1).*
- [272] SHARMA G., PANDEY R.R., Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes, *J. Yeast Fungal Res.*, 2010, vol. 1, s. 157–164.

- [273] ZAIN M.E., RAZAK A.A., EL-SHEIKH H.H., SOLIMAN H.G., KHALIL A.M., Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2009, vol. 3, no. 5, s. 280–286.
- [274] KARPENKO Y.V., REDCHITZ T.I., ZHELTONOZHSKY V.A., DIGHTON J., ZHDANOVA N.N., Comparative responses of microscopic fungi to ionizing radiation and light, *Folia Microbiol.*, 2006, vol. 5, no. 1, s. 45–49.
- [275] MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., GRZMIL B., A preliminary study on antifungal effect of visible light active TiO₂-based paints, *Pol. J. Chem. Technol.*, 2010, vol. 12, no. 4, s. 53–57.
- [276] MARKOWSKA A., TOMASZEWSKA M., Badania wstępne nad przeciwgrzybowym działaniem ditlenku tytanu, *Przem. Chem.*, 2011, vol. 90, no. 5, s. 911–913.
- [277] HAMMEL K.E., KAPICH A.N., JENSEN JR. K.A., RYAN Z.C., Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi, *Enzyme Microb. Techn.*, 2002, vol. 30, no. 42, s. 445–453.
- [278] GILHAM D., LEHNER R., Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro, *Methods*, 2005, vol. 36, no. 2, s. 139–147.
- [279] GADD G., Mycotransformation of organic and inorganic substrates, *Mycologist*, 2004, vol. 18, no. 2, s. 60–70.
- [280] MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., Antifungal effect of titanium dioxide, indoor light and the photocatalytic process in *in vitro* test on different media, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2012, vol. 15, no. 1, s. 1–4.
- [281] JANUS M., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., KUSIAK E., MORAWSKI A.W., Disinfection of *E. coli* by carbon modified TiO₂ photocatalysts, *Environ. Prot. Eng.*, 2012, vol. 38, no. 2, s. 89–97.
- [282] DOLAT D., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., WANAG A., MOZIA S., MORAWSKI A.W., N-doped rutile TiO₂ as effective photocatalysts for *Escherichia coli* inactivation, in: *Mat. Conf. 7th European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA7)*, Porto 17–20.06.2012, [b.w.], s. 330–332.
- [283] CENDROWSKI K., MARKOWSKA-SZCZUPAK A.M., PERUZYSKA M.P., KURZAWSKI M.K., DROZDZIK M.D., MIJOWSKA E., Systematic study of silica-titania nanomaterials with enhanced antifungal and antibacterial abilities for bioapplications, in: *Mat. Conf. Colloids and Nanomedicine*, Amsterdam, 15–17.07.2012, [b.w.].
- [284] RIZZA V., KORNFELD J.M., Components of conidial and hyphal walls of *Penicillium chrysogenum*, *J. Gen. Microbiol.*, 1969, vol. 58, s. 307–331.
- [285] DUPRES V., DUFRÈNE Y.F., HEINISCH J.J., Measuring cell wall thickness in living yeast cells using single molecular rulers, *ACSNano.*, 2010, vol. 4, no. 9, s. 5498–5509.
- [286] VIRAG A., HARRIS S., The Spitzenkörper: a molecular perspective, *Mycol. Res.*, 2006, vol. 110, no. 1, s. 4–13.
- [287] BARTOSZEWSKA M., OPALIŃSKI Ł., VEENHUIS M., KLEI I.J. VAN DER, The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi, *Biotechnol. Lett.*, 2011, vol. 33, no. 10, s. 1921–1931.
- [288] EMRI T., POCSI I., SZENTIRMAI A., Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxidase in *Penicillium chrysogenum*, *Free Rad. Biol. Med.*, 1997, vol. 23, no. 5, s. 809–814.
- [289] SIRBU T., The searching of active catalase producers among the microscopic fungi, *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie*, 2011, vol. 18, no. 2, s. 164–167.
- [290] HAMANN A., BRUST D., OSIEWACZ H.D., Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing, *Trend Microbiol.*, 2008, vol. 16, no. 6, s. 276–283.
- [291] LIU Q., ZHANG Y., LASKOWSKI J.S., The adsorption of polysaccharides onto mineral surfaces: an acid-base interaction, *Int. J. Miner. Process.*, 2000, vol. 60, no. 3–4, s. 229–245.
- [292] TOPOGLIDIS E., CASS A.E.G., GILARDI G., SADEGHI S., BEAUMONT N., DURRANT J.R., Protein adsorption on nanocrystalline TiO₂ films: an immobilization strategy for bioanalytical devices, *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, no. 23, s. 5111–5113.
- [293] ELLINGSEN J.E., A study on mechanism of protein adsorption to TiO₂, *Biomaterials*, 1991, vol. 12, no. 6, s. 593–596.
- [294] RAFFAINI G., GANAZZOLI F., Molecular modeling of protein adsorption on the surface of titanium dioxide polymorphs, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci. A*, 2012, vol. 370, no. 1963, s. 1444–1462.

Wykaz ważniejszych publikacji własnych związanych tematycznie z pracą

JANUS M., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., KUSIAK E., MORAWSKI A.W., Desinfection of *E. coli* by carbon modified TiO_2 photocatalysts, *Environ. Prot. Eng.*, 2012, vol. 38, no. 2, s. 89–97.

LUBKOWSKI K., GRZMIL B., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., TYMEJCZUK A., Właściwości fotokatalityczne jako istotny parametr jakościowy pigmentów ditlenku tytanu, *Tow. Probl. Jakości*, 2009, vol. 1, s. 82–91.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., MORAWSKI A.W., Wykorzystanie ditlenku tytanu aktywowanego światłem do oczyszczania powietrza z zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych, *Ochr. Powietrza Probl. Odpadów*, 2011, vol. 2, nr 258, s. 60–69.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., MORAWSKI A.W., Zgłoszenie patentowe nr P-397603, *Metoda badania antygrzybowych właściwości fotokatalizatorów tytanowych*, data zgłoszenia 30.12.2011.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., TOMASZEWSKA M., Badania wstępne nad przeciugrzybowym działaniem ditlenku tytanu, *Przem. Chem.*, 2011, vol. 90, nr 1, s. 911–913.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., Antifungal effect of titanium dioxide, indoor light and the photocatalytic process in *in vitro* test on different media, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2012, vol. 15, no. 1, s. 1–4.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: an overview, *Catal. Today*, 2011, vol. 169, no. 1, s. 249–257.

MARKOWSKA-SZCZUPAK A., ULFIG K., MORAWSKI A.W., GRZMIL B., A preliminary study on antifungal effect of visible light active TiO_2 -based paints, *Pol. J. Chem. Technol.*, 2010, vol. 12, no. 4, s. 53–57.

The influence of water activity and light activated titanium dioxide on the growth, biomass production and enzymatic activity of *Penicillium chrysogenum*

Summary

To assure the correct quality of the air at the places of work and resistance is one of the biggest challenges facing technologists-chemists responsible, among others, for developing new building materials formula and experts in ventilation and air conditioning system. Particles of some metals and their oxides as small as nanometers are strong antimicrobial properties and therefore can be applied as additives to various types (e.g. building materials, cosmetics, plastic etc.) of materials and as an element of biological filters used to clean the air or water. Most of solutions presented can be applied although they do not clarify the data necessary to understand their biological operation. Lacking information on the antifungal properties of those materials is particularly inconvenient.

The purpose of this paper was to study the impact of titanium dioxide activated by various types of light on the growth, biomass production and enzymatic activity of *Penicillium chrysogenum* which were isolated from the air of a residential building and fitness club. The titanium dioxide impact on the growth of fungi was tested by the Petri dish method, the medium designated to grow fungi supplemented with TiO_2 . A majority of experiments were carried out with the use of P-25 titanium dioxide, obtained in the chloride technology in the German company Evonik (formerly Degussa). The operation of P-25 was compared to titanium dioxide produced by Azoty Group (Chemical Company Police S.A.) by the sulfate process and the $\text{TiO}_2/\text{N-100}$ titanium dioxide produced in the Institute of Chemical and Environment Engineering West Pomeranian University of Technology in Szczecin.

In the research, four standard media were used. They were MEA, CYA, SGA and PDA media. In the research on the impact of titanium dioxide activated by the light, two types of light were applied: visible spectrum (VIS) and UVA ultraviolet spectrum of $\lambda = 315\text{--}400$ nm wave length.

The impact of water activity on the growth of *Penicillium chrysogenum* was tested on CYA medium. The control medium was without TiO_2 . The water activity of the basal media was adjusted to 0.999; 0.997; 0.975; 0.950, 0.900 and 0.850 a_w with sodium chloride. Ten-days old fungal cultures on MEA slants at 25°C were used for preparation of spore suspensions. 5 ml of sterile physiological saline were added to each slant. The slants were then vigorously shaken with a vortex for 3 minutes. Each plate was centrally inoculated with 5 μl of spore suspension. One part of the plates was incubated in the dark, while another part was exposed to indoor light. The natural indoor windows light was strengthened by everyday 8-hour exposition to halogen light. The daily growth rates ($\text{mm} \cdot \text{day}^{-1}$) were calculated from the linear regression equation $r = a \cdot t + b$, in which: r – colony radius (mm); t – incubation time (day); a – daily growth rate; and b – growth retardation time (lag phase; λ). The experiment was verified three times. The statistical significance of the differences in daily growth rates was evaluated with one-way ANOVA test at $p \leq 0.05$.

Despite of the morphological and physiological similarity of fungi, it was ascertained that fungi strains varied significantly in their response to the light, low water activity and titanium dioxide. This

clearly indicates that the place of origin of isolates had a complex impact on the potential of their growth in *in vitro* culture.

The titanium dioxide impact on mold fungi depended on the microbiological medium type, TiO_2 concentration and type of light used as a titanium photocatalytic process activator. On the grounds of the results obtained, the Petri dish method with the use of CYA or PDA media can be suggested for the research on antifungal properties of titanium photocatalysts.

The resistance of *Penicillium chrysogenum* fungi to photocatalytically active titanium dioxide is significant. Lower daily growths of colonies, a drop in the biomass, reduced number of released spores, a different mycelium texture and colour noticed on media enriched in $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$, testify, however, to a strong impact of titanium dioxide on living parameters of the fungi tested. It was found out that the titanium dioxide activated by UV-VIS and UVA visible spectra reduced the activity of catalase, esterase and of most hydrolases secreted by *Penicillium chrysogenum*.

A comparative analysis carried out for all types of substrates and strains proved that the titanium dioxide, originating from Azoty Group (Chemical Company Police S.A.) had the strongest antifungal properties under UV-VIS irradiation. The fungicide efficiency of the catalyst modified by nitrogen (nitrogen doped) – $\text{TiO}_2/\text{N-100}$, was higher than the commercial P-25 from Evonik Company.

Lower water activity in media caused further changes in the growth rate, biomass formed and enzymatic activity. The degree of inhibition depended upon the individual properties of the strain. The media containing titanium dioxide with water activity 0.900 inhibited the growth of all *P. chrysogenum* strains under UV-VIS irradiation. The most probable explanation of changes noticed seems to be the photocatalytic process. Sorption may be another possible mechanism.

Further studies are required to find out more combined effect of TiO_2 , water activity of technical materials and indoor light to effectively inhibit fungal growth. These studies should be focused on obtaining experimental data to develop indoor photocatalytic paints and coatings which under visibly irradiation effectively decrease the growth of potentially pathogenic fungi occurring in the human environment.

Einfluss der Wasseraktivität und des durch Licht aktivierten Titandioxids auf das Wachstum, die Produktion der Biomasse und enzymatische Aktivität von Pilzen *Penicillium chrysogenum*

Zusammenfassung

Die Gewährleistung den Menschen, eine richtiger Luftqualität an Arbeits- und Erholungsplätzen zu garantieren, ist eine der größten Herausforderungen, die vor Chemikern, die für chemische Verfahrenstechnik und u.a. für die Entwicklung neuer Rezepturen von Baustoffen verantwortlich sind, als auch vor Spezialisten im Bereich der Lüftungs- und Klimatechnik, stehen. Nanomoleküle mancher Metalle oder ihrer Oxide verfügen über starke biozide Eigenschaften und können daher als Zusätze für verschiedene Materialarten (z.B. Baustoffe, Kosmetika, Kunststoffe usw.) als auch als ein Teil von biologischen Filtern zur Reinigung von Luft oder Wasser eingesetzt werden. Die Mehrheit präsentierter Lösungen ist zwar applikationsfähig, es werden jedoch keine Informationen bekannt gegeben, die für das Verstehen der Art und Weise deren biologischen Wirkung erforderlich wären. Besonders spürbar ist das Fehlen von Informationen über fungizide Eigenschaften von diesen Stoffen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war das Kennenlernen des Einflusses des durch verschiedene Lichtarten aktivierten Titandioxids auf das Wachstum, die Produktion der Biomasse und enzymatische Aktivität von Schimmelpilzen der Art *Penicillium chrysogenum*. Für die Forschungen wurden Pilze verwendet, die aus der Luft im Keller eines Wohngebäudes und eines Fitness-Clubs isoliert wurden. Die Untersuchungen des Einflusses von Titandioxid auf das Wachstum der Pilze wurden mit Schalenmethode durchgeführt, wobei die Nährmedien für Pilzkulturen mit TiO_2 angereichert wurden. Für die Mehrheit der Versuche wurde das Titandioxid P-25 verwendet, welches im Chloridverfahren bei der deutschen Firma Evonik (ehemals Degussa) hergestellt wird. Die Wirkung von P-25 wurde mit der Wirkung von Titandioxid, welches im Sulfatverfahren in chemischen Werken Zakłady Chemiczne Police SA (Polen) produziert wird, und von Titandioxid $\text{TiO}_2/\text{N-100}$, welches im Institut für Chemische Anorganische Verfahrenstechnik und Umweltingenieurwissenschaften der Westpommerschen Technischen Universität in Szczecin gewonnen wurde, verglichen. In den Untersuchungen wurden vier Nährmedien verwendet, die für Pilzkulturen standardmäßig eingesetzt werden, und zwar MEA, CYA, SGA und PDA. In den Untersuchungen des Einflusses des durch das Licht aktivierten Titandioxids wurden zwei Lichtarten verwendet: sichtbares Licht und ultraviolettes Licht im Bereich von 315 bis 400 nm. Den Einfluss von Wasseraktivität auf das Wachstum von Schimmelpilzen *Penicillium chrysogenum* untersuchte man auf dem Nährmedium CYA. Die Wasseraktivität (a_w) von Nährmedien modifizierte man durch Zugabe von Natriumchlorid. Es wurden Nährmedien mit folgender Wasseraktivität erzielt: 0,999; 0,997; 0,975; 0,950; 0,900 und 0,850. Die Nährmedien wurden mit Pilzsporen geimpft, die in einer Lösung des physiologischen Salzes suspendiert wurden. Einen Teil der Petrischalen (mit Pilzsporen geimpft) inkubierte man im Dunklen bei einer Temperatur von 25°C, den anderen Teil der Schalen platzierte man in einem mit einer Lichtquelle ausgestatteten Brutschrank. In zyklischer Weise bestimmte man den Durchmesser von Pilzkolonien und auf dieser Grundlage berechnete man die Kennzahl des täglichen Durchmesserzuwachses der Kolonie ($\text{mm} \cdot \text{Tag}^{-1}$). Diese Kennzahlen wurden mit dem Wachstum der Pilze auf Kontroll-

nährmedien verglichen. Bestimmt wurde auch die Biomasse der Pilze und die Aktivität von Esterasen, der Katalase und von 19 Hydrolasen.

Alle Versuche wurden dreimal wiederholt. Für die statistische Auswertung wurden die Programme Excel und Statistica (Version 8.0) eingesetzt. Die Signifikanzanalyse wurde mit Hilfe des ANOVA-Tests auf dem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$ durchgeführt.

Trotz der morphologischen und physiologischen Ähnlichkeit der Pilze stellte man fest, dass sich die untersuchten Stämme hinsichtlich der Reaktion auf das Licht, auf niedrige Wasseraktivität und die Anwesenheit des Titandioxids unterschieden. Dies weist deutlich darauf hin, dass die Herkunftsstelle der Isolate in einer komplexen Weise die Entwicklungsmöglichkeiten in In-Vitro-Zuchten beeinflusst.

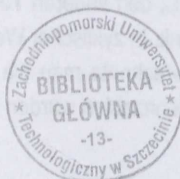
Der Effekt der Einwirkung von Titandioxid auf Schimmelpilze hing von der Art des verwendeten mikrobiologischen Nährmediums, der TiO_2 Konzentration und der Art des Lichtes, das als Aktivator des photokatalytischen Prozesses verwendet wurde, ab. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann die Schalenmethode unter Verwendung von Nährmedien CYA oder PDA als eine Testmethode für die Untersuchungen an fungiziden Eigenschaften von Titanphotokatalysatoren vorgeschlagen werden.

Die Beständigkeit der Pilze *Penicillium chrysogenum* gegen photokatalytisch aktives Titandioxid ist beträchtlich. Kleinere Tageszuwächse der Kolonien, die Reduzierung der Biomasse, niedrigere Menge der erzeugten Sporen, andere Myzeltextur und -farbe wurden auf Nährmedien mit Zugabe von $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ TiO}_2$ beobachtet, welches als Nachweis eines starken Einflusses von Titandioxid auf Lebensparameter von untersuchten Pilzen gilt. Man stellte fest, dass durch das sichtbare Licht UV-VIS und im Bereich UV-A aktiviertes Titandioxid, die Aktivität der Katalase, der Esterasen und der Mehrheit von Hydrolasen verringerte, die von Pilzen *Penicillium chrysogenum* sekretiert wurden.

Die für alle Nährmedienarten und alle Stämme durchgeführte Vergleichsanalyse wies nach, dass die stärksten fungiziden Eigenschaften im UV-VIS-Licht das Titandioxid aus chemischen Werken Zakłady Chemiczne Police SA - Grupa Azoty aufweist. Die fungizide Effektivität des mit Stickstoff modifizierten Katalysators ($\text{TiO}_2/\text{N}-100$) war höher als für das kommerzielle Bezugsmaterial – das Titandioxid der Firma Evonik (P-25).

Die Verringerung der Wasseraktivität in Nährmedien führte zu weiteren Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit, der erzeugten Biomasse und der enzymatischen Aktivität. Der Inhibitionsgrad hing von individuellen Eigenschaften des Stammes ab. Nährmedien, die Titandioxid mit Wasseraktivität von $a_w = 0,900$ beinhalten, hemmten das Wachstum von allen untersuchten Stämmen von *P. chrysogenum*, wenn die Zuchten im UV-VIS-Licht stattfanden. Die meist wahrscheinliche Erläuterung der beobachteten Veränderungen scheint der photokatalytische Prozess zu sein. Der zweite mögliche Mechanismus der beobachteten Veränderungen ist wahrscheinlich die Sorption.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Titandioxid auf das Wachstum von Schimmelpilzen der Art *P. chrysogenum* ermutigen zur Fortsetzung der Forschungen auf diesem Terrain. Weitere Untersuchungen zum Einfluss des Titandioxides auf das Wachstum von Schimmelpilzen können zur Entwicklung neuer, ökologischer und für menschliche Gesundheit neutraler Produkte beitragen, die in der Lage sein werden, Pilze effektiv in geschlossenen Räumen zu bekämpfen.



Biblioteka Główna
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie

CZ.56535



001-056535-00-0

CZ 12.05

ISBN 978-83-7663-167-7