

Undersökning av
metallföreningars påverkan på
Bacillus subtilis, *Escherichia*
coli och *Saccharomyces*
cerevisiae

Erik Osterman

Projektrapport
Katedralskolan Uppsala
25 april 2010

Sammanfattning/Abstract

The aim of the study was to determine the effect of copper sulfate, silver nitrate and zinc sulfate on the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. A series of tests were conducted to determine lethal concentrations and determine whether the compounds were bactericidal or bacteriostatic. Attempts were also made to determine the mechanism of inhibition of bacterial growth by testing the activity of catalase and also testing whether or not the substances would pass through the cellular membrane.

The silver and copper compounds were shown to be the most effective in inhibiting the growth of bacteria. The effects of the substances on *S. cerevisiae* were hard to determine with only discoloration as a visible effect. Silver showed bactericidal capabilities and in concentrations of 1 mM copper also had a bactericidal effect. In yeast and *E. coli* the uptake of copper sulfate and silver nitrate was visible.

Målet med studien var att försöka avgöra hur kopparsulfat, silvernitrat och zinksulfat påverkar tillväxten av *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* och *Saccharomyces cerevisiae*. Flera försök utfördes för att avgöra den letala dosen av metalljonerna samt om de påverkade tillväxten bakteriostatiskt eller bakteriocidalt. Försök gjordes också för att avgöra vilka inhibitionsmekanismer som verkade genom att testa aktiviteten hos katalas och huruvida föreningarna trängde igenom plasmamembranet.

Silvernitrat och kopparsulfat visade sig vara effektivast för att förhindra bakterietillväxt. Effekten på *S. cerevisiae* var svår att avgöra då den enda synliga effekten var missfärgning. Silvernitrat hade bakteriocidala egenskaper och vid koncentrationer av 1mM hade även kopparsulfat det. Upptaget av silvernitrat och kopparsulfat var synligt vid mikroskopstudier av jäst och *E. coli*.

Innehållsförteckning

Sammanfattning/Abstract.....	1
Innehållsförteckning.....	5
Inledning och syfte	7
Bakgrund	8
Metod.....	10
Resultat.....	14
Diskussion.....	18
Slutsats	22
Referenser	23

Inledning och syfte

Undersökningar har visat att tungmetaller kan ha tillväxthämmande och letala effekter på bakterier (1). Mot bakgrund av de ökande problemen med resistensutveckling hos bakterier mot många sorters antibiotika är det av intresse att ytterligare undersöka tungmetallers effekter på bakterietillväxt och eventuella praktiska användningar av dessa ämnen.

I denna undersökning var syftet att bestämma hur vissa föreningar av koppar, zink och silver påverkar bakterier och bagerijäst.

Den centrala frågeställningen var huruvida de undersökta metallföreningarna skulle ha någon effekt på tillväxten hos mikroorganismerna och i så fall hur.

Hypoteserna var att:

- kopparsulfat inhiberar tillväxten av bakterier.
- silvernitratt verkar bakteriocidalt och fungerar även mot *S. cerevisiae* och inhiberar tillväxt.
- även zinksulfat inhiberar tillväxt.
- den kontroll som används, fysiologisk koksaltlösning, inte alls påverkar tillväxten.
- inhibering av enzymet katalas är en möjlig förklaring till eventuell påvisad effekt av metallföreningarna på bakteriernas tillväxt.

Bakgrund

En överanvändning av antibiotika har idag gjort att vissa bakteriestammar är resistent mot många antibiotika. Detta kan i framtiden resultera i att en vanlig infektion kan bli dödlig då det inte går att behandla infektionsorsaken med antibiotika (2). Man söker efter nya antibiotika men under tiden blir gamla antibiotika verkningslösa snabbare än det kommer nya. Det är därför viktigt att på andra sätt än med antibiotika förhindra att resistent bakterier kan tillväxa. Tungmetallföreningarna är intressanta i sammanhanget även om deras toxiska egenskaper gör dem olämpliga som läkemedel.

Val av undersökta organismer

Bakterierna som testades valdes så att de på bästa sätt representerade olika slags bakterier. *S. cerevisiae* valdes för att den är en eukaryot modellorganism. *Escherichia coli* och *Bacillus subtilis* används ofta inom forskning som modellorganismer för gram-negativa respektive gram-positiva bakterier. De skiljer sig också åt på flera andra punkter såsom rörlighet och levnadsmiljö (3)(4). Dessa försöksorganismer går att odla i flytande medium eller på agarplattor.

E. coli är en gramnegativ bakterie som vid forskning värderas högt eftersom den är lättodlad, har kort generationstid, är enkel att transformera och dess egenskaper är väl kartlagda (5). Den stam som användes vid denna undersökning var HB101 vilket är en av de vanligare stammarna. (3). Till skillnad från de vilda stammar som finns är de laborierstammar som används icke-motila (3).

B. subtilis är också en modellorganism men för grampositiva bakterier. *B. subtilis* lever antingen aerobt eller anaerobt i naturen. Den är vanligt förekommande i hö varför den också ofta kallas "høbakterien" (3). Den har till skillnad från *E. coli* inte förlorat sin motilitet utan kan röra sig fritt över odlingsmediumet där de ofta sprider sig över hela odlingsplattan i sökandet efter gynnsamma förhållanden. Detta gör det svårt att räkna kolonier och att ympa vidare enbart en koloni då de sprids i ett tunt lager över hela plattan. De har en längre generationstid (6) än *E. coli* men har trots detta fördelar som modellorganism.

S. cerevisiae eller bagerijäst är en populär modellorganism för eukaryoter då den går att odla på ungefär samma villkor som bakterier. Den är helt sekvenserad och välundersökt vilket ytterligare gagnar dess status som modellorganism. Den kan leva aerobt eller anaerobt och producerar etanol vid anaerob metabolism varför den används vid alkoholframställning. Bagerijäst används också som namnet antyder vid brödjäsning då den producerar koldioxid vid respirationen (1).

Val av undersökta metallföreningar

Tungmetaller finns inte naturligt i större koncentrationer i naturen utan de högre koncentrationerna är ofta ett resultat av utsläpp. Detta innebär att när det sker utsläpp av tungmetaller kommer organismerna i den miljön inte att vara förberedda på detta vilket ofta leder till att större organismer som fiskar dör. Bakterier är dock mer resistent mot föroreningar än de flesta organismer, något som ofta har att göra med att de har plasmider (7)(8)(9). För eukaryoter är tungmetallutsläpp ofta farligare än motsvarande utsläpp är för prokaryoter. Dödlig dos av en tungmetall per kg är ofta lägre för människor än vad den är för bakterier (10) (11).

Silver är i sin lösta form känt för att vara bakteriocidalt, något som har lett till att det finns människor som dricker kolloidalt silver (silverpartiklar suspenderade i vätska) för att hålla sig friska (12) med

bieffekten att de drabbas av argyria (ansamling av silver i mjukvävnad). Forskning visar att det finns bakterier som till viss del är resistenta mot silverjoner. Den form av silverjoner som oftast används är silvernitratt då andra former är mycket svårösliga i vatten. *E. coli* med plasmiderna pJT1 och pJT2 klarar 1mM silver på odlingsmedium (8). Denna stam har jämförts med en stam som saknade plasmiderna och man fann att den resistenta stammen inte ackumulerade silver inuti sina celler. Man kunde dock inte komma fram till vilken mekanism som gav denna resistens (8). Upptaget av silver och koppar är aktivt och då dessa metaller tas upp hamnar de i plasmamembranet och ibland i cellplasman. Silverföreningar som tas upp blir till rent silver som samlas i större mängd (11).

Försök med *B. subtilis* har visat att dess cellvägg absorberar kopparsulfat, silvernitratt och zinkjoner. Absorptionen av silverjoner är dock väldigt liten jämfört med koppar och zink (13).

Kopparabsorptionen var nästan i nivå med den absorption av magnesium som sker eftersom bakterierna aktivt tar upp magnesium men ej koppar. Zinkabsorptionen var avsevärt lägre och i affinitetskolonner med bakteriecellvägg fäst i matrisen visades en lägre absorption även av koppar jämfört med magnesium (ca fyra gånger lägre) (13).

Det har länge varit känt att koppar är ett bättre val av material än stål då sterilitet efterfrågas på utrustning i industrin. Legeringar av koppar är effektivare än motsvarande stållegeringar i att minska tillväxt av bakterier då man i köttindustrin maler köttfärs (14). Test med *E. coli* taget från grisar som matas med kopparsulfatsupplement visar också på att resistens mot koppar är möjlig och att även denna resistens ges av en plasmid, pRJ1004 (9). Mekanismen koppar har som inhibitor är att metallen binder till enzymer (15) där den i höga koncentrationer helt kan inhibera enzymet.

Det har inte gjorts så många studier av zinkupptaget hos bakterier, det som sedan tidigare är känt är att zinkjonerna kan binda till *B. subtilis* cellvägg (13).

Katalas

Ett av experimenten hade som syfte att avgöra om aktiviteten hos enzymet katalas kunde inhiberas av metalljonerna. Katalas finns i nästan alla levande celler för att bryta ner den skadliga restprodukten väteperoxid (H_2O_2) som bildas vid metabolismen. Katalas fungerar som katalysator av det naturliga sönderfallet av väteperoxid och en molekyl katalas kan på en sekund katalysera sönderdelningen av miljontals väteperoxidmolekyler till vatten och syrgas (17). Enzymet katalas är precis som andra enzymer ett protein uppbyggt av aminosyror vilket betyder att även det delvis kan inhiberas av vissa antibiotika. Eftersom katalas finns i alla levande celler är dock användning av ett sådant antibiotika inte en bra ide.

Material och metod

Plattor för odling göts löpande under försöken. Till att börja med göts 38 st nutrient agarplattor (NA), 8.4 g/ 300 ml H₂O och 13 st maltextrakt agarplattor (MA), 15 g/300 ml H₂O. För de fortsatta försöken göts 13 st NA-plattor och 34 st MA-plattor enligt recept.

De tre mikroorganismerna ympades till två plattor vardera för att odlas upp till lämplig mängd. *E. coli* och *B. subtilis* inkuberades i ett dygn vid 37°C och *S.Cerevisiae* inkuberades i ett dygn vid 30°C. Två plattor med HB101 *E. coli* förbereddes och inkuberades i ett dygn vid 37°C. Dessa första plattor förvarades sedan i kylskåp för att användas som startplattor vid försöken.

Stamlösningar av metallföreningarna gjordes och späddes enligt tabell 1. Dessa späddes genom att 10 ml av stamlösningen späddes till 100 ml med avjoniserat vatten. Stamlösningarna autoklaverades sedan vid 120°C och 2 atm i 15 minuter. Då kopparsulfaten fällades ut i lösning CuSO₄ 1 så späddes en ny lösning och denna lösning autoklaverades ej. Även en NaCl lösning tillreddes till 0.9%, fysiologisk koksaltlösning, och autoklaverades tillsammans med metalljonlösningarna. Dessutom autoklaverades avjoniserat vatten och pipettspetsar till försöken.

Tabell 1: Stamlösningarnas koncentrationer

Lösningsnamn	Koncentration
CuSO ₄ 1	0.26 M
CuSO ₄ 10	0.026 M
CuSO ₄ 100	0.0026 M
ZnSO ₄ 1	0.13 M
ZnSO ₄ 10	0.013 M
ZnSO ₄ 100	0.0013 M
AgNO ₃ 1	0.026 M
AgNO ₃ 10	0.0026 M
AgNO ₃ 100	0.00026 M

Försöksserierna A och B

Serierna utfördes på liknande sätt, det enda som skiljde dem åt var koncentrationerna och volymerna av metallösning som racklades på plattorna. I försök A racklades 100 µl av de tre tillredda lösningarna per ämne ut på plattorna, varje spädd lösning racklades alltså på en MA-platta och en NA-platta. Koncentrationerna på varje platta presenteras i tabell 2. *E. coli* och *B. subtilis* ympades från startplattorna till varsin sida av samma platta för att minska risken för variationer i koncentrationerna. *S.Cerevisiae* ympades till MA-plattor från sina startplattor medan bakterierna ympades till NA-plattor. Som kontroll användes plattor racklade med NaCl-lösning, varje organism ympades till en egen kontrollplatta. Plattorna inkuberades vid 37°C(NA) och 30°C(MA) i ca 24 timmar innan de kontrollerades och tillväxtgraden antecknades. Plattorna ställdes sedan i kylskåp för jämförelse med senare försök och för senare fotografering.

Tabell 2: Försöksserie A's utformning.

Platta #	Ämne	Organism	Koncentration av lösning i plattan
1	CuSO ₄ 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	1,0 mM
2	CuSO ₄ 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.1 mM
3	CuSO ₄ 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0,01 mM
4	ZnSO ₄ 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.5 mM
5	ZnSO ₄ 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.05 mM
6	ZnSO ₄ 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.005 mM

7	AgNO3 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.1 mM
8	AgNO3 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0,01 mM
9	AgNO3 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.001 mM
10	NaCl 1	<i>E. coli</i>	
11	NaCl 1	<i>B. subtilis</i>	
12	CuSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	1,0 mM
13	CuSO4 10	<i>S.cereviscae</i>	0.1 mM
14	CuSO4 100	<i>S.cereviscae</i>	0,01 mM
15	ZnSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	0.5 mM
16	ZnSO4 10	<i>S.cereviscae</i>	0.05 mM
17	ZnSO4 100	<i>S.cereviscae</i>	0.005 mM
18	AgNO3 1	<i>S.cereviscae</i>	0.1 mM
19	AgNO3 10	<i>S.cereviscae</i>	0,01 mM
20	AgNO3 100	<i>S.cereviscae</i>	0.001 mM
21	NaCl 1	<i>S.cereviscae</i>	

Försöksserie B utfördes på samma sätt men de koncentrationer som racklades utplattorna var högre, tabell 3 visar koncentrationerna av de lösningar som spreds på plattan och den ungefärliga koncentrationen som fanns i plattan är uträknat för 25 ml agar per platta. Den högsta koncentrationen "2" uppnåddes genom att racklingen skedde med dubbla volymen, 200 µl. Till dessa plattor ympades organismerna från sina startplattor. Även i detta försök användes fysiologisk koksaltlösning som kontroll. Efter 24 timmar avlästes plattorna och ställdes i kylskåp för senare jämförelse och fotografering.

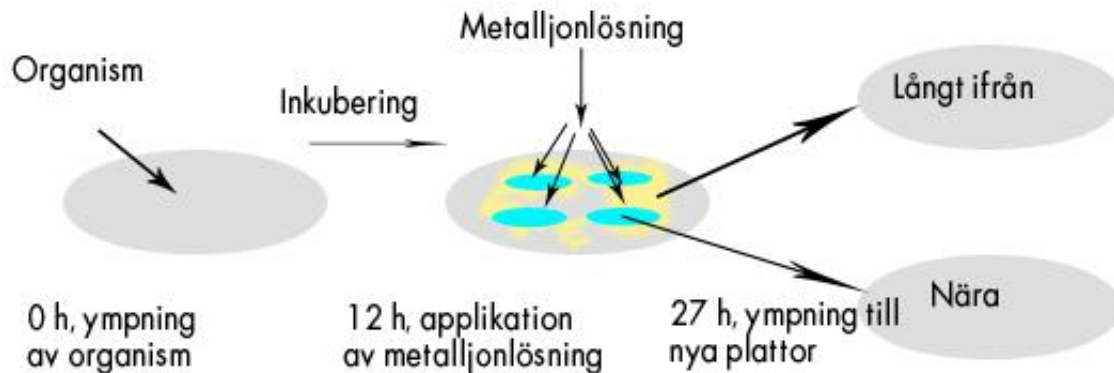
Tabell 3: Försöksserie B's utformning

Platta #	Ämne/Lösning	Organism	Koncentration i plattan
1	CuSO4 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	2.0 mM
2	CuSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	1.0 mM
3	CuSO4 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.5 mM
4	ZnSO4 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	1.0 mM
5	ZnSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.5 mM
6	ZnSO4 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.25 mM
7	AgNO3 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.2 mM
8	AgNO3 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.1 mM
9	AgNO3 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	0.05 mM
10	NaCl 1	<i>E. coli</i>	
11	NaCl 1	<i>B. subtilis</i>	
12	CuSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	2.0 mM
13	CuSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	1.0 mM
14	CuSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	0.5 mM
15	ZnSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	1.0 mM
16	ZnSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	0.5 mM
17	ZnSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	0.25 mM
18	AgNO3 2	<i>S.cereviscae</i>	0.2 mM
19	AgNO3 1	<i>S.cereviscae</i>	0.1 mM
20	AgNO3 5	<i>S.cereviscae</i>	0.05 mM
21	NaCl 1	<i>S.cereviscae</i>	

Försöksserie C

För att determinera metallösningarnas effekt så ympades först organismerna till plattor (*E.coli* och *B.subtilis* på NA-plattor, *S. Cerevisiae* till MA-plattor). Plattorna inkuberades sedan i ca 12 timmar så att tillväxt var synlig, efter detta applicerades 50 µl, av den starkaste av varje metallösning, på 4 punkter på en platta per organism. En kontroll med NaCl användes och applicerades också på en platta per organism. För att se hur mycket av lösningarna som absorberades av agarplattan gjordes också två plattor med karamellfärg löst i vatten som applicerades på tomma plattor. Alla plattorna

inkuberades sedan i de optimala temperaturerna för varje organism, 37 °C (*E. coli* och *B. subtilis*) och 30°C (*S. cerevisiae*), i ca 15 timmar varefter de kontrollerades och resultat antecknades. Nya odlingar startades på nya plattor, organismer ympades från ställen nära applikationspunkterna och så långt från dem som möjligt där koncentrationen av den testade föreningen var lägre och renströks på nya plattor. Dessa kontrollerades sedan ca 12 timmar senare och resultaten antecknades och fotograferades. (Se figur 1 för tydliggörande över försök C).



Figur 1: Försöksupställning för försöksserie C.

Permeabilitetsförsök

För försöket förbereddes 36 mikro-ependorfrör. (För en bra överblick se tabell 4). Till 15 av rören tillsattes NaHCO_3 , till tre av dessa rör tillsattes också neutralrött. 4 rör med 1 ml stamlösning av varje metallförening förbereddes också, i ett rör för varje stamlösning tillsattes neutralrött. I 12 av de ovan nämnda NaHCO_3 -rören tillsattes också 0.5 ml metallösning, alltså fyra rör med CuSO_4 , fyra rör med AgNO_3 osv. Ett antal kontroller förbereddes också. I tre rör tillsattes bara NaCl lösning. I tre rör med bara stamlösning av en metall tillsattes organismer, olika organismer för varje rör, detsamma tillsattes sedan till rören med 0.5 ml stamlösning och 0.5 ml NaHCO_3 . Till rören med neutralrött och NaHCO_3 tillsattes också organismer tagna från startplattorna, även i rören med NaCl tillsattes organismer. Rören omskakades och fick stå i ca två minuter innan de centrifugerades och färgen på supernatanten och pelleten antecknades.

Tabell 4: Semipermeabilitetsförsökets utförande

#	Innehåll 1	Innehåll 2	Organism
1	1 ml CuSO_4 0.26 M		<i>E. coli</i>
2	1 ml CuSO_4 0.26 M		<i>B. subtilis</i>
3	1 ml CuSO_4 0.26 M		<i>S.cerevisiae</i>
4	0.5 ml CuSO_4 0.26 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>
5	0.5 ml CuSO_4 0.26 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>
6	0.5 ml CuSO_4 0.26 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cerevisiae</i>
7	1 ml ZnSO_4 0.13 M		<i>E. coli</i>
8	1 ml ZnSO_4 0.13		<i>B. subtilis</i>

	M		
9	1 ml ZnSO_4 0.13 M		<i>S.cerevisiae</i>
10	0.5 ml ZnSO_4 0.13 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>
11	0.5 ml ZnSO_4 0.13 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>
12	0.5 ml ZnSO_4 0.13 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cerevisiae</i>
13	1 ml AgNO_3 0.026 M		<i>E. coli</i>
14	1 ml AgNO_3 0.026 M		<i>B. subtilis</i>
15	1 ml AgNO_3 0.026 M		<i>S.cerevisiae</i>
16	0.5 ml AgNO_3 0.026 M	NaHCO_3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>
17	0.5 ml AgNO_3	NaHCO_3 0.5 ml	<i>B. subtilis</i>

	0.026 M	0.1 M	
18	0.5 ml AgNO ₃ 0.026 M	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>
19	Neutralrött	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>
20	Neutralrött	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>
21	Neutralrött	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>
22		H ₂ O 1 ml	<i>E. coli</i>
23		H ₂ O 1 ml	<i>B. subtilis</i>
24		H ₂ O 1 ml	<i>S.cereviscae</i>
25		H ₂ O 1 ml	
26	Neutralrött	Fys. NaCl 1 ml	
27	Neutralrött	H ₂ O 1 ml	

28	1 ml CuSO ₄ 0.26 M		
29	1 ml ZnSO ₄ 0.13 M		
30	1 ml AgNO ₃ 0.026 M		
31	0.5 ml CuSO ₄ 0.26 M	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	
32	0.5 ml ZnSO ₄ 0.13 M	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	
33	0.5 ml AgNO ₃ 0.026 M	NaHCO ₃ 0.5 ml 0.1 M	
34		Fys. NaCl 1 ml	<i>E. coli</i>
35		Fys. NaCl 1 ml	<i>B. subtilis</i>
36		Fys. NaCl 1 ml	<i>S.cereviscae</i>

För att testa enzymaktiviteten förbereddes 22 st mikro-ependorfrör till vilka metallösning eller fysiologisk koksaltlösning tillsattes enligt tabell 5. Organismer tillsattes genom att de togs från sina respektive plattor och suspenderades i lösningen i röret. Till detta tillsattes väteperoxid(H₂O₂) och den resulterande aktiviteten studerades. Graden på sönderdelning av väteperoxid observerades i form av mängden bubblor som bildades i rören.

Tabell 5: Enzymaktivitetstest. Specifikt Katalas.

Prov #	Ämne	Organism
1	CuSO ₄ 2	<i>E. coli</i>
2	CuSO ₄ 5	<i>E. coli</i>
3	ZnSO ₄ 2	<i>E. coli</i>
4	ZnSO ₄ 5	<i>E. coli</i>
5	AgNO ₃ 2	<i>E. coli</i>
6	AgNO ₃ 5	<i>E. coli</i>
7	Ingen tillsats	<i>E. coli</i>
8	CuSO ₄ 2	<i>B. subtilis</i>
9	CuSO ₄ 5	<i>B. subtilis</i>
10	ZnSO ₄ 2	<i>B. subtilis</i>
11	ZnSO ₄ 5	<i>B. subtilis</i>
12	AgNO ₃ 2	<i>B. subtilis</i>
13	AgNO ₃ 5	<i>B. subtilis</i>
14	Ingen tillsats	<i>B. subtilis</i>
15	CuSO ₄ 2	<i>S.cereviscae</i>
16	CuSO ₄ 5	<i>S.cereviscae</i>
17	ZnSO ₄ 2	<i>S.cereviscae</i>
18	ZnSO ₄ 5	<i>S.cereviscae</i>
19	AgNO ₃ 2	<i>S.cereviscae</i>
20	AgNO ₃ 5	<i>S.cereviscae</i>
21	Ingen tillsats	<i>S.cereviscae</i>
22	Ingen tillsats	Kontroll med vatten

Mikroskopstudie

Mikroorganismerna studerades i mikroskop efter suspendering i stamlösning för att avgöra om de potentiellt tog upp metallföreningarna eller om joner gick att påträffa på plasmamembranen. I lösningen fanns också NaOH på grund av ett tidigare misstag under enzymaktivitetsbestämningen, vilken sedan gjordes om. Preparaten observerades under 1000 gångers förstoring och observationerna skissades ner och analyserades sedan.

Resultat

Resultaten från försök A, B och C presenteras nedan i tabellerna 6-8.

Tabell 6: Resultat från försöksserie A.

Platta #	Ämne	Organism	Tillväxt
1	CuSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Tydligt avgränsade E.C kolonier. B.S matta(svärmning)
2	CuSO4 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Bakteriematta. E.C och B.S har blandats
3	CuSO4 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Bakteriematta. E.C och B.S har blandats
4	ZnSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Fåtal E.C och B.S längst kanterna
5	ZnSO4 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Mattor av båda, B.S svärmar
6	ZnSO4 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Mattor av båda, B.S svärmar
7	AgNO3 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Tillväxt kring kanterna, bort från applikationspunkten
8	AgNO3 10	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Mattor, verkar som om E.C och B.S blandats
9	AgNO3 100	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Mattor, verkar som om E.C och B.S blandats
10	NaCl 1	<i>E. coli</i>	Oräknbart antal kolonier
11	NaCl 1	<i>B. subtilis</i>	B.S svärmar över hela plattan
12	CuSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	Tillväxt koncentrerad kring kanterna. Tydlig zon där CuSO4 applicerats
13	CuSO4 10	<i>S.cereviscae</i>	Matta
14	CuSO4 100	<i>S.cereviscae</i>	Matta
15	ZnSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	Matta
16	ZnSO4 10	<i>S.cereviscae</i>	Matta
17	ZnSO4 100	<i>S.cereviscae</i>	Matta
18	AgNO3 1	<i>S.cereviscae</i>	Halva plattan utan tillväxt
19	AgNO3 10	<i>S.cereviscae</i>	Tillväxt kring kant
20	AgNO3 100	<i>S.cereviscae</i>	Matta
21	NaCl 1	<i>S.cereviscae</i>	Jästen växer som vanligt

Tabell 7: Resultat från försöksserie B.

Platta #	Ämne	Organism	Tillväxt	Övriga observationer
1	CuSO4 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Ingen tillväxt	
2	CuSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	E.C växer, B.S svärmar	
3	CuSO4 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	E.C bra tillväxt. Svärmande B.S	B.S verkar svärma för jämnan
4	ZnSO4 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	E.C längst kanten. Ingen B.S	
5	ZnSO4 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Längst kant, samt där bakterierna ympades	
6	ZnSO4 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Bra tillväxt	
7	AgNO3 2	<i>E. coli/B. subtilis</i>	1 E.C koloni, ingen B.S tillväxt	Tveksamt om ens en koloni
8	AgNO3 1	<i>E. coli/B. subtilis</i>	2 E.C kolonier, inga B.S	
9	AgNO3 5	<i>E. coli/B. subtilis</i>	Enstaka <i>E. coli</i> kolonier, flera B.S längst kanten.	B.S verkar svärma
10	NaCl 1	<i>E. coli</i>	Bra tillväxt	
11	NaCl 1	<i>B. subtilis</i>	Bra tillväxt	SVÄRMAR
12	CuSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	Knappt tillväxt/ingen tillväxt	Blåaktig platta
13	CuSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	Tillväxt längst kant	
14	CuSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	
15	ZnSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	
16	ZnSO4 1	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	
17	ZnSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	
18	AgNO3 2	<i>S.cereviscae</i>	Tillväxer i övre delen av plattan, där den ympades	Brunaktig närmare mitten av plattan
19	AgNO3 1	<i>S.cereviscae</i>	Tillväxer längst kanten	Brunaktig, inte lika mycket som platta 18
20	AgNO3 5	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	Liknar uppodlingsplatta
21	NaCl 1	<i>S.cereviscae</i>	Bra tillväxt	Som en uppodlingsplatta

Tabell 8: Resultat från försöksserie C.

Platta #	Ämne	Organism	Tillväxt före	Tillväxt efter, prov nära applikationspunkt	Tillväxt efter, prov långt från applikationspunkt
1	CuSO4 2	<i>E. coli</i>	God	Ej tillväxt	Tillväxt

2	ZnSO4 2	<i>E. coli</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
3	AgNO3 2	<i>E. coli</i>	God	Ej tillväxt	Tillväxt
4	NaCl 1	<i>E. coli</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
5	CuSO4 2	<i>B. subtilis</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
6	ZnSO4 2	<i>B. subtilis</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
7	AgNO3 2	<i>B. subtilis</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
8	NaCl 1	<i>B. subtilis</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
9	CuSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	God	Ej tillväxt	Tillväxt
10	ZnSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
11	AgNO3 2	<i>S.cereviscae</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
12	NaCl 1	<i>S.cereviscae</i>	God	Tillväxt	Tillväxt
13	Kontroll	Färg	-	-	-
14	Kontroll	Färg	-	-	-

Resultaten från försöken på permeabiliteten hos plasmamembranen för de tre ämnena presenteras i tabell 9.

Tabell 9: Resultat från permeabilitetsförsök.

#	Innehåll 1	Innehåll 2	Organism	Innan Centrifugering	Supernatant, efter centrifugering	Pellet, efter centrifugering
1	1 ml CuSO4 0.26 M		<i>E. coli</i>	Blå, susp. <i>E. coli</i>	Blå	Gul pellet, liknande den i kontroll 22
2	1 ml CuSO4 0.26 M		<i>B. subtilis</i>	Blå	Blå	Gul, liten pellet
3	1 ml CuSO4 0.26 M		<i>S.cereviscae</i>	Blå, susp. Jäst syns	Blå	Gul, liknande den i kontroll 24
4	0.5 ml CuSO4 0.26 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>	Blå fällning	Svagt blå	Blå pellet
5	0.5 ml CuSO4 0.26 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>	Blå fällning	Svagt blå	Blå pellet
6	0.5 ml CuSO4 0.26 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>	Blå fällning	Svagt blå	Blå pellet
7	1 ml ZnSO4 0.13 M		<i>E. coli</i>	Ofärgad, med susp. Organism	Ofärgad	Ofärgad pellet
8	1 ml ZnSO4 0.13 M		<i>B. subtilis</i>	Ofärgad, med susp. Organism	Ofärgad	Ofärgad pellet
9	1 ml ZnSO4 0.13 M		<i>S.cereviscae</i>	Ofärgad, med susp. Organism	Ofärgad	Ofärgad pellet
10	0.5 ml ZnSO4 0.13 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>	Mjölkgig	Svagt mjölkgig, vitaktig	Vit pellet
11	0.5 ml ZnSO4 0.13 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>	Mjölkgig	Svagt mjölkgig, vitaktig	Vit pellet
12	0.5 ml ZnSO4 0.13 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>	Mjölkgig	Svagt mjölkgig, vitaktig	Vit pellet
13	1 ml AgNO3 0.026 M		<i>E. coli</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Vit/gul pellet
14	1 ml AgNO3 0.026 M		<i>B. subtilis</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Vitt spår/pellet
15	1 ml AgNO3 0.026 M		<i>S.cereviscae</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Vit pellet
16	0.5 ml AgNO3 0.026 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Lite svart i annars vit pellet
17	0.5 ml AgNO3 0.026 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Lite svart i annars vit pellet
18	0.5 ml AgNO3 0.026 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>	Mjölkgig	Ofärgad	Svart/grå
19	Neutralrött	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>E. coli</i>	Gul	Gul	Röd/svart pellet
20	Neutralrött	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>B. subtilis</i>	Gul	Gul	Ingen pellet
21	Neutralrött	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M	<i>S.cereviscae</i>	Gul	Gul	Röd/svart pellet
22		H2O 1 ml	<i>E. coli</i>	Ofärgad, med susp. organism	Ofärgad	Gul
23		H2O 1 ml	<i>B. subtilis</i>	Ofärgad, med susp. organism	Ofärgad	ingen pellet
24		H2O 1 ml	<i>S.cereviscae</i>	Ofärgad, med susp. organism	Ofärgad	Gul/vit pellet

25		H2O 1 ml		Ofärgad	Ofärgad	ingen pellet
26	Neutralrött	Fys. NaCl 1 ml		Gul	Gul	ingen pellet
27	Neutralrött	H2O 1 ml		Röd	Röd supernatant	ingen pellet
28	1 ml CuSO4 0.26 M			Lila/röd	Lila/röd	ingen pellet
29	1 ml ZnSO4 0.13 M			Cerise	Cerise	ingen pellet
30	1 ml AgNO3 0.026 M			Cerise	Cerise	ingen pellet
31	0.5 ml CuSO4 0.26 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M		Blå fällning		Blå pellet/fällning
32	0.5 ml ZnSO4 0.13 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M		Vit fällning/mjölkig		Vit pellet/fällning
33	0.5 ml AgNO3 0.026 M	NaHCO3 0.5 ml 0.1 M		?		Svart/grå pellet/fällning
34		Fys. NaCl 1 ml	<i>E. coli</i>	Mjölkgigt gul	Ofärgad	Gul pellet
35		Fys. NaCl 1 ml	<i>B. subtilis</i>	Ofärgad	Ofärgad	vit/gul pellet
36		Fys. NaCl 1 ml	<i>S.cereviscae</i>	Gul mjölkig	Ofärgad	Gul pellet

I tabell 10 presenteras resultaten från försöken att bestämma enzymaktiviteten hos organismerna efter tillsats av försöksämnen. Aktiviteten sattes till en skala 0-3 där 0 är ingen aktivitet och 3 är max aktivitet relativt de andra provrören.

Tabell 10: Resultat och observationer från enzymaktivitetsbestämningen.

Prov #	Ämne	Organism	Resultat(aktivitet 0/1/2/3)
1	CuSO4 2	<i>E. coli</i>	3
2	CuSO4 5	<i>E. coli</i>	2
3	ZnSO4 2	<i>E. coli</i>	1
4	ZnSO4 5	<i>E. coli</i>	2
5	AgNO3 2	<i>E. coli</i>	1
6	AgNO3 5	<i>E. coli</i>	2
7	Ingen tillsats	<i>E. coli</i>	3
8	CuSO4 2	<i>B. subtilis</i>	2
9	CuSO4 5	<i>B. subtilis</i>	1
10	ZnSO4 2	<i>B. subtilis</i>	1
11	ZnSO4 5	<i>B. subtilis</i>	2
12	AgNO3 2	<i>B. subtilis</i>	3
13	AgNO3 5	<i>B. subtilis</i>	3
14	Ingen tillsats	<i>B. subtilis</i>	2
15	CuSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	3
16	CuSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	2
17	ZnSO4 2	<i>S.cereviscae</i>	3
18	ZnSO4 5	<i>S.cereviscae</i>	2
19	AgNO3 2	<i>S.cereviscae</i>	2
20	AgNO3 5	<i>S.cereviscae</i>	2
21	Ingen tillsats	<i>S.cereviscae</i>	2

I tabell X6 presenteras de observationer som gjordes under de tidigare nämnda mikroskopstudierna efter enzymaktivitets bestämningen.

Tabell 11:(X6) Mikroskopstudier av organsimer suspenderade i lösning och NaOH

Prov #	Organism	Omständigheter	Anteckningar
1	<i>E. coli</i>	CuSO4 2 + NaOH	Kan ej identifiera enstaka bakterier, verkar vara blåare
2	<i>E. coli</i>	CuSO4 5 + NaOH	Omgivna av mörkt "gojs"
3	<i>E. coli</i>	CuSO4	Synliga E.C, ogenomsynlig plasma, mörka cellmembran
4	<i>B. subtilis</i>	CuSO4 2 + NaOH	Grupperade bakterier. Omgärdade av brunt (CuO?) Förändrade färg från blå pellet till grönare och till sist brun
5	<i>B. subtilis</i>	CuSO4 5 + NaOH	Fixerades m. brännare. Bruna runt. Se anteckningsbok
6	<i>B. subtilis</i>	AgNO3 2 +	Svarta bakterier. Svarta inuti och runt, vissa ickefärgade delar.

		NaOH	
7	S.cerevisc ae	CuSO ₄ 2 + NaOH	Lite gröna inuti
8	S.cerevisc ae	CuSO ₄ 5 + NaOH	Mindre gröna än 7, små runda jästceller. Se anteckningsbok för illustration
9	S.cerevisc ae	AgNO ₃ 2 + NaOH	Jästen är omgiven av svarta kulor, ser ut som kristaller. Kulorna är ca bakteriestora. Kristallerna är svarta och ser ut att inte innehålla celler
10	S.cerevisc ae	Susp. i koksalt	Runda genomsynliga celler. Har lite grönt i sig, men inte lika tydligt som 7. Snarlika dock

Diskussion

Försöksserie A och B

Resultaten från försökserierna A och B pekar på att det krävs högre koncentrationer av zinksulfat respektive kopparsulfat än det gör av silvernitratt för att inhibera tillväxten av bakterier. Det krävdes tio gånger högre koncentration av kopparsulfat för att få liknande effekt som silvernitrattlösningen gav. Av zinksulfat krävdes det 20 gånger så hög koncentration som av silvernitratt för att *B. subtilis* inte skulle växa. *E. coli* klarade denna koncentration och visar genom det bättre överlevnad vid högre zinksulfatkoncentrationer jämfört med *B. subtilis*. Jästen påverkades av dessa kopparsulfatkoncentrationerna och silvernitrattkoncentrationerna men det var enbart på kopparsulfatplattan som den påverkades på ett sådant sätt att den inte växte. På silvernitrattplattan blev den enbart missfärgad. Resultat från andra försök (15) har tytt på att kopparsulfat inhiberar enzymfunktionen hos jäst. Sammanfattningsvis var silvernitratt effektivast när det gäller uppvisad effekt per mol ämne löst i plattan.

På grund av att metalllösningarna racklats ut på plattorna kan man anta att koncentrationen av metalljoner var jämn vilket innebär att det inte bör växa på plattorna som anses ha bakteriocidal koncentration. Racklan nådde dock inte ända ut i kanterna vilket betyder att det kanske inte var lika hög koncentration av metalljoner där. Plattorna med jäst är ett bra exempel på detta då det renströks stora mängder jäst på plattorna eftersom det var svårt att få upp enbart en koloni från odlingsplattorna då jästen bildade en matta på plattan. På grund av att *B. subtilis* svärmar så kontaminerades odlingen delvis av dem även på *E. coli*s halva vilket självklart kan ha fått konsekvenser. Å andra sidan så kan det då sägas att där *B. subtilis* inte klarat sig var med stor säkerhet ämnet bakteriostatiskt/cidalt. Hade de kunnat klara sig på mediumet skulle de ha emigrerat till en lägre koncentration och där överlevt. Detta innebär också att lösningarna diffunderat ut i hela mediumet.

Försöksserie C

Försöksserie C pekade på att kopparsulfat och silvernitratt var de effektivaste när det gällde att inhibera fortsatt tillväxt. På alla plattor slutade organismerna att föröka sig. Efter att de ympats till nya plattor utan metalljonlösning fortsatte de dock att växa vilket tydde på att alla ämnen förutom NaCl verkade bakteriostatiskt i hälften av den koncentrationen som inte tillät tillväxt. Kopparsulfat och silvernitratt verkar i högre koncentrationer istället bakteriocidalt något som bekräftas av undersökningar utförda av Trevors, M. E. Starodub samt av Luke, Timothy, J. Tetaz och Richard K. J.

Det var svårt att avgöra koncentrationerna i appliceringspunkterna då molekylerna är något olika stora vilket innebär att de diffunderade något olika. Den karamellfärg som användes bestod av stora molekyler som diffunderar långsammare vilket innebär att metalllösningarna borde ha spritts mer än karamellfärgen. Detta var lättast att se på kopparsulfatplattorna då dessa plattor blev något blåaktiga. Silvret blev tydligt på grund av att det reagerade med kloridjoner i odlingsmediumet och därför bildades en fällning av silverklorid. Dessa kloridjoner kommer dock inte att verka mot bakterier eller jäst på samma sätt som silvernitratt. Därför var effekten av silvernitratt svår att bestämma. Studier visar att silvernitratt är effektivare än andra silverföreningar att inhibera tillväxt (8).

Då silvernitratt, kopparsulfat eller zinksulfat blandades med NaHCO_3 bildades olikfärgade fällningar vilket innebar att resultaten från dessa prover inte gick att använda. Övriga prover visade inget annat än att organismerna centrifugerats ner till en pellet och att jonerna fortfarande var lösta i vätskan. Det skulle vara tämligen osannolikt att metalljonerna skulle passera genom membranerna såvida organismerna inte aktivt pumpade in dem. För att passera membranet krävs det att molekylen är oladdad, opolär eller liten och polär. Joner och stora laddade molekyler kan inte passera plasmamembranet då det är negativt laddat (18). Det fanns ytterligare ett problem med denna metod förutom det tidigare nämnda bildandet av fällningar, det var svårt att få ihop tillräckligt stor mängd *B. subtilis* för att pelleten skulle bli synlig efter centrifugering.

De prover som observerades i ljusmikroskop togs efter ett misslyckat försök till enzymaktivitetsbestämningen. Istället för H_2O_2 tillsattes NaOH vilket inte gav någon reaktion. De observationer som gjordes var problemfyllda på grund av att proven hade gjorts basiska. Det som observerades var att bakterierna i vissa fall tog upp metallföreningarna och att dessa då fäste på membranet och ibland tog sig in i cellplasman. Det är svårt att säga om det var det som observerades i proven då det mycket väl kan ha varit så att det som observerades var stora komplex som bildades på grund av alkaliniteten. Det finns trots detta belegg för att tro att celler antingen tar upp eller att ämnen fäster på deras membran (13). För att få bra resultat bör proverna med mikroorganismer studerats i svep elektron mikroskop eller kraftigare ljusmikroskop.

Enzymaktivitet

Enzymaktiviteten hos proverna var svår att avgöra då reaktionen skedde i eppendorfrör. Förvånande nog skedde kraftigast utvecklingen av syrgas i de provrör där koncentrationen av kopparjoner var som högst. Metallen kan potentiellt ha katalyserat sönderdelningen separat och gett reaktionsytor, något som skulle förklara den ökade aktiviteten men det stämmer inte överrens med andra undersökningar. Katalas inhiberas enligt tidigare studier av kopparsulfat (15) vilket också skulle kunna förklara missfärgningen av jästen i försök B då många enzymer är viktiga för nedbrytningen av skadliga ämnen.

Detta skulle innebära att koppar agerar som en ickekompetitiv inhibitor då den inte kan blockera en aktiv plats på grund av sin struktur. Detta bekräftas av andra studier (15). De rör som innehöll silvernitratt och zinksulfat gav hos *E. coli* de väntade resultaten med nedsatt funktion vid hög koncentration. *B. subtilis* var även i detta försök svår att jämföra med andra organismer då det var svårt att få ihop en tillräckligt stor mängd att fördela på de provrör som användes i försöken.

Kopparsulfat

Kopparsulfat påverkade vid den näst högsta koncentrationen både jäst och bakterier. Påverkan var störst på bakterierna och vid den högsta koncentrationen inhiberades tillväxten av bakterier helt. Jästen påverkades så att den blev brun/blå när den växte på medium med hög koncentration av kopparsulfat. Vid lägre koncentrationer verkade kopparsulfat inhiberande på tillväxten av bakterier men inte på jäst, där verkade den snarare statistiskt. De *B. subtilis* som behandlades med kopparsulfat blev brunaktiga på samma sätt som jästen. Detta tyder på att ett eller flera enzym stördes av kopparsulfat. Höga koncentrationer av kopparsulfat verkar bakteriocidalt och hindrade alltså också återväxt då det tagits bort från odlingsmediumet. Det har spekulerats att koppar skadar genom det då en organism utsätts för det under längre tid. Detta skulle kunna stämma med resultaten (16). Kopparsulfat verkade också vid observation kunna ta sig igenom plasmamembranet och även fästa

på plasmamembranet. Det kan vara så att kopparsulfaten reducerats till kopparoxid då det fäste kring jäst och *B. subtilis* då det observerades som mörka eller svarta klumpar kring cellerna. Detta kan också ha att göra med den alkaliska miljön, vilket är svårt att bevisa.

Silverniträt

Silverniträt var det ämne som verkade hämma tillväxten av jäst och bakterier bäst. Det kunde vid den näst högsta koncentrationen "tvinga" bakterier och jäst att växa längs kanten och vid den högsta koncentrationen blev jästen brunaktig och växte kring kanten medan bakterierna inte tillväxte alls. Silverniträtet hade bakteriocidal effekt på *E. coli* enligt försöksserie C. På *B. subtilis* och *S. Cervisae* hade den enbart statistisk effekt. Den enzymatiska aktiviteten påverkades av silverniträt men effekten var inte lika påtaglig som kopparsulfatets effekt. Jämfört med de andra ämnena krävdes det lägre koncentrationer av silverniträt för att uppnå liknande effekt som de andra ämnena gav vid viss koncentration.

Effekten

Effekten på de olika organismerna skiljde sig något åt. Den största skillnaden var mellan de två bakterierna och jästen men även bakteriernas reaktion skiljde sig åt på vissa punkter. Kopparsulfatets påverkan på jästcellerna verkade vara mindre än den påverkan kopparsulfat hade på bakterierna. Detta stämmer med teorin om att kopparsulfat påverkar genomet och påskyndar nedbrytningen eller inaktiverar viktiga processer som transkription eller translationen. Då eukaryoter har cellkärna är genomet bättre skyddat från ämnen i cytoplasman. Prokaryoternas genom är istället fritt i cytoplasman och är mindre skyddat vilket leder till att kopparen lättare kan komma i kontakt med det. En annan skillnad var hur jästen och bakterierna reagerade på silverniträt. Jästen blev missfärgad medan bakterierna inte tillväxte. Detta kan ha berott på att jästcellen har ett mer avancerat system för att skydda sig från påverkan jämfört med bakterierna som bygger upp sin anpassningsbara nedbrytning av ämnen på ett enklare sätt. Missfärgningarna kan tänkas vara en produkt av processen då silverniträt oskadliggörs eller så kan det vara en liknande reaktion som den då silverniträt kommer i kontakt med hud. Denna reaktion färgar huden svart tills det att de missfärgade hudcellerna ersätts med nya.

Praktiska tillämpningar

De praktiska tillämpningarna av kopparsulfat och silverjoners bakteriocidala egenskaper utnyttjas redan genom användning av tex. silvertråd i sportstrumpor för att motverka bakterietillväxt och odör. Kunskapen om koppars egenskaper används inte lika ofta som silvers antibakteriella egenskaper. I sökandet efter bättre sterilmiljö i till exempel sjukhus är kopparlegeringar ett bra val för ytor som exponeras för patogener (16)(14). Det material som används i nuläget är ofta rostfritt stål som inte alls har samma verkan. Problemet med att byta till exempel rostfria dörrhandtag och kärl mot föremål av kopparlegeringar är utseendemässiga och prismässiga. I nuläget är koppar dyrare att tillverka och det bildas lätt kopparoxider vilket inte är särskilt estetiskt eller praktiskt.

Många sjukhus har problem med infektioner hos patienter inlagda för andra symptom, särskilt för patienter inlagda en längre tid är det ett problem. De vanligaste infektionerna var under 2009 urinvägsinfektioner, infektioner i lungor, hud och i mjukdelar (19). Risken för infektion ökar då patienten behandlas med antibiotika, har urinvägskateter och/eller en central venös ingång. Hygien hos vårdpersonal är viktig och efter en satsning på hygienrutiner på Akademiska Sjukhuset i Uppsala

halverades förekomsten av vårdrelaterade infektioner (20). Vad ett byte av stålföremål mot kopparföremål skulle resultera i är svårt att säga då det inte gjorts några omfattande studier på området, det är bevisat att kopparhandtag är bättre ur ett smittskyddsperspektiv jämfört med rostfritt stål (16)(14). Det finns dock risk för stora komplikationer om man byter den intravenösa kanylen mot en i koppar i form av bildning av kopparoxid, som då kan spridas i kroppen.

En tänkbar användning av silverföreningar är som tidigare nämnts att väva in dessa i textilier vilket skulle kunna motverka överföringen av patogener, exempelvis den överföring som sker via saronger och rockar inom sjukvården. Idag finns förband med invävt silver vilka används mot kroniska sår men de eventuella fördelarna är dåligt kartlagd då det finns misstanke om att en ökning av antibiotika resistenta bakterier kan ske vid användning av silverförband (21). Ett problem med invävt silver är kostnaderna, vilket måste vägas mot de potentiella fördelarna.

Slutsats

Testen med kopparsulfat, silvernitratt och zinksulfat hade alla en observerbar effekt på tillväxten hos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* och *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa effekter skiljde sig mellan de olika metallf oreningarna och också mellan de testade organismerna. Silvernitratt var den effektivaste f oreningen. Silvernitrattet verkade bakteriocidalt vid koncentrationer på ca 0.2 mM och bakteriostatiskt i lägre. Det påverkade även *S. cerevisiae* men inte i lika hög grad som det påverkade bakterierna. Kopparsulfat var effektivt men det krävdes minst 10 gånger högre koncentration (2 mM)  n silvernitratt för att uppnå liknande resultat. Även kopparsulfat verkade bakteriocidalt i högre koncentrationer och bakteriostatiskt i lägre koncentrationer. Zinksulfat var den minst effektiva f oreningen och påverkade bara tillväxten bakteriostatiskt.

Silvernitratt och kopparsulfat verkar ha skilda verkningsmekanismer då det f r jästen blev olika typer av förändring. Kopparsulfat påverkade enzymaktiviteten och det finns teorier om att det också påskyndar nedbrytningen av genomet. Silvernitratts verkningsmekanism  r okänd men själva effekten av silvernitratt har varit känd länge. Zinksulfat verkade på *B. subtilis* i högre grad än vad det påverkade *E. coli* och det påverkade inte alls *S. cerevisiae*. Resultaten visar på att det skulle vara möjligt att utnyttja de bakteriocidala effekterna inom exempelvis sjukvård men det är enklare att använda legeringar av koppar och silver istället för salter. Det används till och med redan inom livsmedelsindustrin och i vissa sjukvårdsmaterial som ett sätt att minska infektioner vid till exempel kateterisation.

Referenser

1. *Biology 8th edition* **Cambell, Reece**. San Francisco. Pearson Education, Inc. 2008
2. *Männsikokroppen: Fysiologi och Anatomi*. **O. Sand et. al** Oslo : Liber AB, 2006.
3. Mikrobiologikursen. 2008.
4. *On torque and tumbling in swimming Escherichia coli*. **Darnton NC, Turner L, Rojevsky S, Berg HC**. u.o. : J Bacteriology, 2007 Mar, Vol. 22, 189(5):1756-64.
5. *Genmodifiering av organismer för proteinproduktion, Framställning och rening av GFP* **E.Osterman**. Uppsala : u.n., 2009. Laborationsrapport.
6. *Analysis of the Multiseptate Potential of B. subtilis*. **PAULTON, R. J. L.** No. 2, u.o. : American Society for Microbiology, 1970, Vol. Vol. 104, .
7. Plasmid-Determined Cadmium Resistance in Pseudomonas putida. **HIROYUKI HORITSU, KAZUMI YAMAMOTO, SAYURI WACHI, KEIICHI KAWAI AND AKIRA FUKUCHI**. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Jan 1986, ss. p. 334-335 Vol. 165.
8. *Silver resistance in Escherichia Coli R1*. **TREVORS, M. E. STARODUB and J. T.** Vol. 29 (1989, J. Med. Microbiol., ss. 101-1 10.
9. *Plasmid-Controlled Resistance to Copper in Escherichia coli*. **LUKE, TIMOTHY J. TETAZ AND RICHARD K. J.** June 1983, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, ss. p. 1263-1268.
10. Coppersulfate. *Pesticide information profile*. [Online] May 1994.
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/copper-sulfate-ext.html>.
11. *Bacterial Sorption of Heavy Metals*. **M. D. MULLEN, It D. C. WOLF, F. G. FERRIS, T. J. BEVERIDGE, C. A. FLEMMING, AND G. W. BAILEY**. Dec. 1989, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, ss. p. 3143-3149.
12. *Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on Staphylococcus aureus*. **Tien DC, Tseng KH, Liao CY, Tsung TT**. 2008, Vol. 948-52.
13. *Uptake and Retention of Metals by cell Walls of Bacillus*. **MURRAY, T. J. BEVERIDGE AND R. G. E.** Sept. 1976, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, ss. p. 1502-1518.
14. *Use of Copper Cast Alloys To Control Escherichia coli O157*. **J. O. Noyce, H. Michels and C. W. Keevil**. June 2006, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, ss. p. 4239-4244.
15. *Undersökning av villkoren för en enzymreaktion*. **E. Osterman**. Uppsala : Katedralskolan, 2009.
16. *Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus*. **J. O. Noyce, H. Michels and C. W. Keevil**. Apr. 2007, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, ss. p. 2748-2750.
17. Catalase, molecule of the month. **Goodsell, David S**. *RCSB*. [Online] September 2004.
http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb57_1.html

18. *Plasmamembranets permeabilitet, Undersökning av olika ämnen.* **E. Osterman.** Uppsala : Katedralskolan, 2009.

19. Minskning av vårdrelaterade infektioner räddar hundratals liv. **Gunnarsdotter, Sara.** *Läkartidningen.* 2009, nr 52, s. s 3484.

20. Bättre hygienrutiner halverade infektioner. *Läkartidningen.* nr 52, s. s 3484.

21. *Silverförband vid behandling av kroniska sår.* **SBU.** Stockholm : Statens beredning för medicinsk utvärdering, 2010. 1652-7151.